کلون سازی و تعیین توالی ژن هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری

مهدی دیانی‌نیا[1]، مرتضی کریمی پور[2]، وهاب باباپور[3]، لهراسب شاهقلیان[1]، عباس دوستی[1*]

۱. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۳. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات: Adleishmania@yahoo.com*

(دریافت مقاله: ۸۸/۷/٤، پذیرش نهایی: ۸۹/۷/۱۰)

چکیده

هورمون رشد باعث تحریک رشد و تکثیر سلول‌ها در انسان و حیوانات می‌شود. این هورمون یک پلی پپتید تک زنجیره‌ای با ۱۹۱ اسید آمینه است که در سلول های سوماتوتروف واقع در بال جانبی غده هیپوفیز پیشین ساخته شده و ذخیره و ترشح می‌گردد. هدف از این تحقیق کلون سازی و تعیین توالی ژن هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری برای اولین بار در ایران می‌باشد. به منظور کلون‌سازی و تعیین توالی ژن هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری، RNA از غده هیپوفیز گوسفند تازه کشتار شده، استخراج و cDNA هورمون رشد ساخته شد. با استفاده از روش کلون‌سازی T/A، قطعه cDNA هورمون رشد کلون شد و سپس به باکتری *E. coli* به عنوان میزبان منتقل گردید. تأیید صحت کلون‌های به‌دست آمده با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام گرفت. کلون سازی cDNA ژن هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری با موفقیت انجام شد و توالی ژن کد کننده هورمون رشد گوسفند با طول ٦٩٠ جفت باز مشخص گردید. مقایسه توالی ژن هورمون رشد موجود در پلاسمید نوترکیب ساخته شده با رکوردهای ثبت شده در بانک ژن جهانی، نشان دهنده شباهت بسیار زیادی بین توالی هورمون رشد گوسفند بومی ایران با سایر نژادهای دنیا می‌باشد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ٤، شماره ۱، پیاپی ۱۳، صفحات: ۷۵۱-۷٤۷.

کلید واژه‌ها: هورمون رشد، گوسفند نژاد لری بختیاری، کلون سازی

مقدمه

هورمون رشد پلی‌پپتیدی است که تحت تأثیر هورمون آزادکننده هورمون رشد از غده هیپوفیز پیشین ترشح می‌شود. این هورمون، باعث رشد تمام بافت‌های دارای قابلیت رشد، پس از تولد می‌شود. همچنین دارای اثرات متابولیکی مانند افزایش تولید پروتئین، افزایش مصرف اسید چرب و کاهش مصرف گلوکز می‌باشد (۲). بیان ژن این هورمون تحت تأثیر عوامل تغذیه‌ای و استرس و در پاسخ به هورمون‌های تیروئیدی و گلوکوکورتیکوئیدی افزایش می‌یابد (۱). هورمون رشد به صورت یک هورمون پلی‌پپتیدی تک‌زنجیره‌ای می‌باشد که وزنی در حدود ۲۲ کیلو دالتون دارد و دارای ۱۹۱ اسید آمینه است (۱۰ و ۱۱).

ژن هورمون رشد در پستانداران، پرندگان و برخی از گونه‌های ماهی شامل ٥ اگزون و ٤ اینترون با طول kb ۳-۲ است (۲ و ۱۱). این هورمون از ٤ رشته مارپیچی تشکیل شده (١٤) و به نظر می‌رسد، تکامل این ژن به‌وسیله مضاعف‌سازی ژن اجدادی آن رخ داده است. این مضاعف‌سازی در ژن هورمون رشد

گوسفند و بز نیز به طور اختصاصی توسط Valinsky و همکاران در سال ۱۹۹۰ مطالعه شده است (١٤).

چند شکلی ژن هورمون رشد بر سطح پلاسمایی آن مؤثر است اما ظاهراً سطوح پلاسمایی هورمون رشد وابسته به میزان بیان ژن هورمون رشد نیست (۳ و ۹).

از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای درباره کلون‌سازی و تعیین توالی ژن هورمون رشد گوسفندهای ایرانی صورت نگرفته، لذا در این مطالعه برای اولین بار ژن کدکننده هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری به عنوان یکی از نژادهای گوسفند ایرانی پس از کلون‌سازی، تعیین توالی شده و ردیف نوکلئوتیدی حاصله با رکوردهای ثبت شده از این ژن در بانک ژن مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

بافت هیپوفیز از گوسفند تازه کشتار شده جداسازی شد. استخراج RNA از بافت هیپوفیز با استفاده از محلول RNX-Plus (CinnaGen, Iran) انجام شد. از روی RNA، cDNA ژن هورمون رشد با استفاده از کیت مخصوص cDNA سازی (Fermentas,Germany) ساخته شد و cDNA ژن هورمون رشد به وسیله PCR تکثیر و جدا سازی شد.

به منظور طراحی پرایمرهای مورد نیاز برای تکثیر ژن هورمون رشد، ابتدا توالی این ژن از GenBank گرفته شد. شماره ثبت این ژن در بانک ژن X15976 می‌باشد. در انتهای '۵ هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse به ترتیب سایت برش آنزیم‌های Xho I و Not I قرار داده شد که زیر سایت برش این آنزیم‌ها خط کشیده شده است. سایت‌های برش مذکور به منظور سهولت انجام کلون‌سازی این قطعه ژنی در پلاسمید بیان شونده PET32 در نظر گرفته شده‌اند.

توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری به صورت زیر می باشد:

Ovis GH-F: 5'-TGG CTC GAG CTA TGA TGG CTG CAG G – '3
Ovis GH-R: 5'- ATA GCG GCC GCA CAG GGG AGG GGT AAC A–'3

آزمون PCR برای تکثیر cDNA هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از مقادیر زیر انجام شد.

غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش PCR، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۱X بافر PCR، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq و ۲۰۰ میکرومولار dNTP Mix تعیین گردید. سپس ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید.

انجام واکنش PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید و با انجام ۳۰ سیکل (Hot start) ٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٠ ثانیه ادامه یافت و با مرحله طویل شدن به مدت ۵ دقیقه در۷۵ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید.

محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و پس از مشاهده باند٦٩٠ جفت بازی مربوط به cDNA ژن هورمون رشد، باند مذکور با حداقل ژل آگارز بریده شد و با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (Gel Extraction Kit, Bioneer, Korea) عمل خالص‌سازی انجام شد. در مرحلهٔ بعد DNA ژن هورمون رشد در وکتور کلونینگ T/A (pCR 8/GW/TOPO Vector) ساخت شرکت Invitrogen کلون شد. سپس از طریق ترانسفورماسیون شیمیایی با استفاده از کلرید کلسیم، حامل نوترکیب به داخل سلول میزبان انتقال یافت. برای تأیید حضور پلاسمید حاوی ژن هورمون رشد در باکتری بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بر روی کلونی‌های رشد یافته در پلیت حاوی آنتی‌یوتیک اسپکتینومایسین، واکنش PCR انجام شد. کلون‌هایی که در آزمون PCR باند ٦٩٠ جفت بازی مربوط به ژن GH را داشتند، انتخاب و با استفاده از کیت تخلیص

پلاسمید (Plasmid Purification Kit Bioneer) خالص‌سازی شدند. به منظور تأیید همسانه‌سازی ژن هورمون رشد در وکتور نوترکیب از دو روش هضم اندونوکلئازی و تعیین توالی (Sequencing) استفاده شد.

یافته‌ها

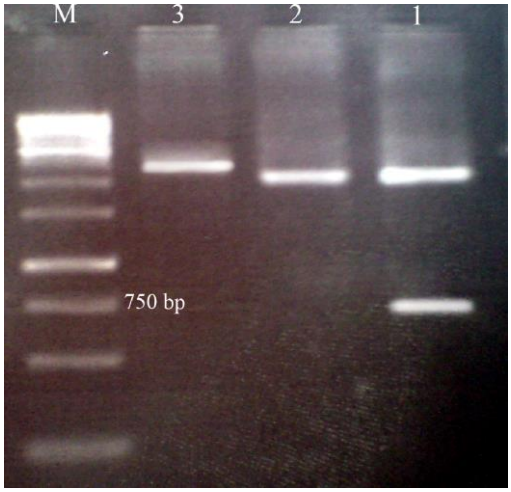
تکثیر ژن هورمون رشد و کلونینگ آن:

پرایمرهای هورمون رشد که بر اساس شماره ثبت X15976 در بانک ژن طراحی شده‌اند، طی واکنش PCR، محصولی با طول ٦٩٠ جفت باز ایجاد نمودند که در وکتور pCR 8/GW/TOPO Vector با موفقیت کلون شد و در سلول‌های *E.coli* از طریق ترانسفورماسیون وارد گردید. کلون‌های مثبت واجد ژن GH در وکتور Topo انتخاب شدند.

تأیید قطعی پلاسمید نوترکیب Topo-GH:

پلاسمیدهای تخلیص شده با استفاده از روش هضم آنزیمی و واکنش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. قطعه ٦٩٠ جفت بازی ژن هورمون رشد، طی واکنش هضم آنزیمی با آنزیم EcoRI از پلاسمیدهای Topo-GH خارج شد. (نگاره ١). به این ترتیب کلون واجد Topo-GH تأیید گردید.

جهت بررسی توالی ژن کلون شده توالی ژن هورمون رشد انجام شد. توالی خوانده شده از ژن GH با استفاده از توالی ژن GH یک نژاد گوسفند به شماره ثبت X15976 در پایگاه اطلاعاتی NCBI تحت آنالیز Blast قرار گرفت و صحت آن مورد تأیید قرار گرفت.



نگاره ١- شکل حاصل از Digestion پلاسمیدهای آمیخته pCR 8/GW/TOPO Vector با آنزیم اندونوکلئازی *EcoRI*. شماره ١: Topo-GH، شماره ٢: پلاسمید Topo فاقد ژن GH، شماره ٣: (Topo-UN CUT GH)، مارکر kb ١ (ساخت شرکت Fermentas).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت تولید فرآورده‌های دامی، طی دهه‌های اخیر راهکارها و تکنیک‌های متعددی مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفته است که میزان تولید فرآورده‌های قابل عرضه به بازار فروش را در این دام‌ها افزایش دهد. در این راستا تحقیقات زیادی در مورد استفاده از هورمون رشد نوترکیب در بسیاری از کشورها انجام گرفته است. تحقیق حاضر با هدف تولید پلاسمید نوترکیب حاوی ژن هورمون رشد گوسفند برای اولین بار در ایران آغاز شد.

Dellacha و همکاران در سال ١٩٦٩ درمقاله‌ای تحت عنوان: «جداسازی و خصوصیات سکانس ناحیه C انتهایی هورمون رشد گوسفند» بیان کردند که در مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه با نقشه‌های پپتیدی هورمون رشد گوسفند و گاو شباهت زیادی بین این دو پروتئین وجود دارد. در این تحقیق همچنین سکانس اسیدهای آمینهٔ C انتهایی هورمون رشد گوسفند عبارت بودند از Ala – Ser – Ala – Phe – OH (٤).

سکانس cDNA ژن هورمون رشد گوسفند پس از مطابقت با هورمون رشد هیپوفیز در سال ١٩٨٤ توسط Warwick

و Wallis گزارش شد و همین محققین در سال ۱۹۸۹، cDNA پیش هورمون رشد را کلون، سکانس و سپس در باکتری *E. coli* بیان نمودند (۱۳). در سال ۱۹۸۸ سکانس ژن هورمون رشد گوسفند بررسی و گزارش آن منتشر شد (۸).

درسال ۱۹۹۰، Valinsky و همکاران به وسیله تکنیک RFLP، پلی مورفیسم ژن GH را تعیین کردند که نتیجه آن شامل دو آلل برای جایگاه ژن GH در گوسفند و بز بود. در گوسفند یکی از آلل‌ها (GH) توسط یک ژن نمایش داده می‌شد، اما آلل دیگر ژن GH حالت مضاعف داشت یعنی به صورت *(5′)* GH -2 -N و *(3′)* GH -2-Z بود (۱۱).

در تحقیق دیگری بره‌های نر با سه ژنوتیپ Gh1Gh1، GH2/GH2 و Gh1/GH2 هیچ‌گونه تفاوتی در وزن بدن، ترکیب بدن و یا افزایش بیان ژن GH، از لحاظ نگه‌داری و ترشح نداشتند. اگر چه تفاوت‌های خیلی سطحی در محتوای GH هیپوفیز و هورمون ترشح کننده GH یافت شد (٦).

در سال ۱۹۹۲، Gurn و همکاران، پس از ساخت cDNA هورمون رشد گوسفند و کلون نمودن آن، سکانس پیش هورمون رشد را تعیین نمودند و سکانس هورمون رشد را از روی سکانس اسیدهای آمینه این هورمون که قبلاً تعیین شده بود، مشخص نمودند. البته ایشان تفاوت در دو جایگاه اسید آمینه‌ای نسبت به تحقیقات قبلی را شناسایی و گزارش نمودند (۵).

Lacroix و همکاران در سال ۱۹۹٦ بیان پروتئین ژن هورمون رشد و سایر پلی پپتیدهای وابسته به آن در جفت پستانداران را نشان دادند. ایشان در بررسی جفت در روزهای ۱٤۰–۳۰ آبستنی توانستند دو نوع پروتئین ۲۲ و ۲۸ کیلو دالتنی را جدا سازی نمایند. mRNA رمز کننده این پروتئین‌ها بین روزهای ۵۰–٤۰ آبستنی بیان می‌شود. بررسی‌های بیشتر سه نوع mRNA هورمون رشد (GHP1، GHP2 و GHP3) را در جفت نشان داد (۷).

توالی کانستراکت نوترکیب حاوی ژن هورمون رشد گوسفند نژاد لری بختیاری با سایر ژن‌های هورمون رشد ثبت شده در بانک ژن، مقایسه شد. نتایج این مقایسه حاکی از شباهت قابل توجهی بین توالی ژن هورمون رشد با تمام پستانداران به‌خصوص نشخوارکنندگان بود.

منابع

۱. بیگدلی، م.ر. ۱۳۸۱. مروری بر فیزیولوژی پزشکی گانونگ. چاپ اول، انتشارات تیمورزاده، صفحات: ۲۵۱ و ۲۹۵–۲۸٦.

2. Agellon, E., Sise, J.A., Penty, J.M. and Montgomery, G.W. 1993. The duplicated gene copy of ovine growth hormone gene contains a P. vull polymorphism in the second intron. Animal generics. 24:319-321.
3. Brenner, C.A., Tam, A.W., Nelson, P.A., Engeman, E.G., Suzuki, N., Fry, K.E. et al. 1989. Novel method for studying mRNA phenotypes in single or small numbers of cells. Biotechniques. 7(10):1096-1103.
4. Dellacha, J.M., Enero, M.A., Sentome, J.A. and Palodini, A.C. 1970. Isolation, characterization and C-Terminal sequence of ovine growth hormone. European Journal of Biochemistry. 12:289-295.
5. Guron, C., Roa, K.B., Jain, S.K., Totey, S.M. and Talwar, G.P. 1992. Cloning and nucleotide sequencing of sheep growth hormone cDNA. Indian Journal of Experimental Biology. 30(8):659-63.
6. Fleming, J.S., Suttee, J.M., Montgonery, G.W., Gwnn, J., Stuart, S.K., Little john, R.P. et al. 1997. The effects of duplication in the ovine growth hormone (GH) gene on GH expression in the pituitaries of ram lambs from lean and fat-selected sheep line. Domestic Animal Endocrinology. 14:17-24.
7. Lacroix, M.C., Devinoy, E., Servely, L., Pulssant, C. and Kann, T. 1996. Expression of the growth hormone gene in ovine placents: detection and cellular localization of the protein. Journal of Endocrinology. 137:4886-4892.

8. Orian, J.M., O'Mahoneg, J.V. and Brandon, M.R. 1988. Cloning and sequencing of ovine growth hormone gene. Nucleic Acids Reserch. 16:9046.
9. Sch-lee, P., Grami, R., Schallenberger, E. and Scham, S.D. 1994. Growth hormone and Insulin-like growth Factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. Theoretical and Applied Genetics. 88:497-500.
10. Tashjian, A.H., Bancroft, F.C. and Levince, L. 1970. Hormone production cell culture model. Journal of Cell Biology. 47:61-70.
11. Valinsky, A., Shani, M. and Gootwine, E. 1990. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. Animal Biotechnology. 1:135-144.
12. Wallis, M. 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormone. Journal of Molecular Evolution. 38:619-627.
13. Warwick, J.M. and Wallis, M. 1984. Characterization of mRNA sequences encoding sheep somatotropin (growth hormone) by cloning of pituitary complementary DNA. Biochemical society Transactions. 12:247-250.
14. Warwick, J.M., Wallis, O.C. and Wallis, M. 1989. Cloning, sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNA. Biochimica et Biophysica Acta. 1008:247-250.