



## تولیات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

صفحه‌های ۶۸۶-۶۷۹

# بررسی نواحی پروموتور و بیان ژن‌های *ovoll*, *nobox* و *zp3* در بافت فولیکول تخمدان میش‌های نژاد شال

سجاد پزشکی نجف‌آبادی<sup>۱</sup>، علی اکبر مسعودی<sup>۲\*</sup>، ابوالفضل شیرازی<sup>۳</sup>، پروین شریعتی<sup>۴</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه ابن سینا، تهران - ایران
۴. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۶/۰۲

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۴/۰۹/۲۹

### چکیده

فاکتورهای نسخه‌برداری با اتصال به نواحی پروموتوری ژن‌ها و تنظیم بیان آن‌ها نقش مهمی در کنترل باروری حیوانات دارند. در این مطالعه، بیان ژن‌های *ovoll*، *nobox* و *zp3* که از ژن‌های کاندید درگیر در مسیرهای تنظیمی ژن‌ها می‌باشند، در دو گروه چندقلوزا و تک‌قلوزای گوسفندان شال بررسی شد. تعداد ۶ رأس گوسفند با توجه به شجره آنها از گله اصلاح شده ایستگاه شال قزوین جدا شده و برای این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. پس از همزمان‌سازی فحلی، گوسفندان با روش بیهوش عمومی جراحی شده و فولیکول-های بالغ تخمدان با روش اسپیره کردن استحصال شدند. پس از استخراج *cdna*، *RNA* نمونه‌ها ساخته شد. برای بررسی بیان ژن-های فوق، آغازگرهای اختصاصی هر ژن طراحی شده و سپس با استفاده از روش *Real-Time PCR* و با به‌کارگیری روش  $\Delta\Delta Ct$  بیان نسبی ژن‌ها سنجیده شد. مقایسات بین میانگین‌ها، با استفاده از رویه آماری *T-Test* انجام شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار *BDGP* نواحی پروموتوری و فاکتورهای نسخه‌برداری ژن‌های مورد مطالعه بررسی شد. بیان ژن‌های *ovoll* و *nobox* در گروه حیوانات چندقلوزا، معنی‌دار بود ( $P < 0/01$ ). تفاوتی در بیان ژن *zp3* در گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. براساس نتایج حاصل، ژن‌های *ovoll* و *nobox* می‌توانند از جمله ژن‌های مؤثر در چندقلوزایی گوسفندان شال باشند.

کلیدواژه‌ها: چندقلوزایی، ژن‌های خانواده *homeobox* ژن‌های خانواده *tgf-β* ژن‌های عمده، نرخ تخمک‌گذاری

Email:

\* نویسنده مسئول

## مقدمه

یکی از مهمترین صفات اقتصادی گوسفند که نقش مهمی در افزایش بهره‌وری این دام دارد، تولیدمثل است. تولیدمثل در گوسفند تحت تأثیر عوامل مختلفی نظیر عوامل فیزیولوژی، ژنتیکی و مدیریتی است. عوامل ژنتیکی بیشتر بر پایه تعداد تخمک‌اندازی در هر بار تخمک‌گذاری و فاصله میان تخمک‌گذاری طبقه‌بندی می‌شوند [۱۰]. بررسی تنوع ژنتیکی میزان تخمک‌گذاری در نژادهای مختلف گوسفند نشان داده است که بخش مهمی از پدیده چندقلوزایی به واسطه تفرق ژن‌های اصلی مرتبط با تولیدمثل و تخمک‌گذاری می‌باشد. تاکنون ژن‌هایی از خانواده بزرگ *tgf-β* شناسایی شده‌اند که به‌طور مؤثر بر رشد فولیکول‌ها و نرخ تخمک‌اندازی مؤثرند [۱۴]. کنترل بیان این خانواده ژنی توسط عوامل مختلفی صورت می‌گیرد. در نواحی پروموتوری ژن‌های این خانواده جایگاه‌هایی برای اتصال فاکتورهای فعال‌سازی وجود دارد که در کنترل بیان این ژن‌ها مؤثر هستند. ژن‌های خانواده *homeobox* از ژن‌های مؤثر در کنترل بیان ژن‌های خانواده *tgf-β* هستند. ژن *nobox* (*newborn ovary homeobox*) از ژن‌های عمده این خانواده می‌باشد که اثر تنظیمی بر ژن‌های *zp* (*zona pellucida*) در تخمدان دارد. این ژن علاوه بر نقش منحصر به فرد و کلیدی در تخمدان موش [۴]، کنترل بیان ژن‌های کلیدی *gdf9*، *bmp15* و *pou5f1* و *oct4* در تخمدان را نیز بر عهده دارد [۱۶].

OVO یک خانواده حفاظت شده از پروتئین‌های zinc-finger است که به نظر می‌رسد روی ناحیه پایین دست مسیر سیگنالینگ *wg/wnt* و *bmp/tgf-β* عمل کنند و در تمایز انواع سلول‌های خاص در موجودات پرسلولی دخالت دارند. این ژن‌ها برای توسعه و تمایز بافت‌های اپی‌تلیال و سلول‌های جنسی ضروری هستند، درحالی‌که در دروزوفیلا و سی‌الگانس فقط یک ژن *ovo* وجود دارد،

در موش سه پارالوگ *ovo* شامل *ovoll*، *ovol2* و *ovol3* دیده می‌شود. *OVO-like protein1* (*ovoll*) در بافت‌های اپی‌تلیال سوماتیک متعدد از جمله پوست و کلیه و همچنین در اپیتلیوم ژرمینال نرها یافت می‌شود [۱۸]. ژن *ovoll* از جمله ژن‌هایی است که عملکرد آن مشابه ژن‌های *homeobox* بوده و با تحت تأثیر قرار دادن ژن‌های *tgf-β* نقش مهمی در افزایش سطح تخمک‌گذاری دارد. بیان این ژن علاوه بر افزایش معنی‌دار در طی رشد و نمو فولیکول‌های تخمدان، دارای مشابهت زیادی در بیان با ژن‌های خانواده *tgf-β* می‌باشد [۳]. ژن *ovoll* در نواحی حفاظت شده پروموتور ژن‌های *tgf-β* در انسان، دارای جایگاه برای اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری می‌باشد که نقش تنظیمی در فعالیت ژن‌های این خانواده را بر عهده دارد [۶].

بیشترین میزان بیان ژن‌ها در اووسیت گوسفند، مربوط به ژن‌های *zp2*، *zp3* و *gdf9* می‌باشد [۳]. ژن *Zona Pellucida Glycoprotein3* (*ZP3*) بر غشای زوناپلوسیدای تخمک بیان می‌شود و اصلی‌ترین نقش آن، در تلاقی با سر اسپرم و ایجاد عملکرد انتخابی جهت ورود اسپرم به داخل تخمک می‌باشد [۱۷]. بیان این ژن، به همراه ژن‌های خانواده *tgf-β* از جمله *gdf9* و *bmp15* در مراحل رشد تخمک‌ها افزایش می‌یابد که به عنوان ژن‌های اصلی مؤثر در رشد تخمک‌ها در تخمدان معرفی شده‌اند [۷].

درصد چندقلوزایی در گوسفند شال، در مقایسه با دیگر نژادهای بومی ایران بالاتر است. براساس بررسی‌های انجام شده، هیچ‌یک از جهش‌های مرتبط با باروری و چندقلوزایی در ژن‌های مؤثر بر چندقلوزایی (*gdf9*، *bmp15* و *bmpr 1b*) در این نژاد مشاهده نشده است [۱] و [۲]. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن‌های *ovoll nobox* و *zp3* در گوسفندان چندقلوزا و تک‌قلوزای نژاد شال و یافتن علل ژنتیکی و آگاهی از ژن‌های مؤثر در چندقلوزایی در این نژاد بود.

## تولیدات دامی

## مواد و روش‌ها

شش رأس میث از مرکز اصلاح نژاد شال قزوین تهیه و به دو گروه تک‌قلوزا (شاهد) و دوقلوزا تقسیم شدند. کلیه نمونه‌ها براساس شجره آن‌ها انتخاب شدند، به طوری که در گروه شاهد تا چند نسل قبلی فقط رکورد تک‌قلوزایی و در گروه دوقلوزا نیز نه تنها خودشان دارای رکورد دوقلوزایی بودند، بلکه نسل‌های قبلی آن‌ها نیز دو یا چندقلوزا بودند. از روش سیدرگذاری (به مدت ۱۲ روز) برای همزمان‌سازی استفاده شد. روز سیزدهم سیدرگذاری، گوسفندان با روش بیهوشی عمومی، مورد جراحی قرار گرفته و با روش آسپیره کردن، از فولیکول‌های تخمدان نمونه‌برداری شد. بلافاصله پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها در ازت مایع به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. سپس RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت تجاری شرکت Vivantis ساخت کشور مالزی و طبق دستورالعمل شرکت

سازنده استخراج شد. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده شد. همچنین، برای تعیین کیفیت RNA استخراج شده، ژل آگارز یک درصد مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-MULV از کیت تجاری Vivantis در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری رشته اول cDNA ساخته شد. در این مطالعه، با در نظر گرفتن اصول اولیه طراحی آغازگر و با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 (شرکت ملی علوم زیستی) آغازگرهای مناسب طراحی و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی ساخته شدند. جهت نرمال کردن نمونه‌های حاصل شده، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای مناسب ژن *gapdh* روی کلیه نمونه‌ها انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های کاندید

توالی آغازگر	نام ژن	T <sub>m</sub> /°C	طول قطعه
F-5'-GTGATGCTGGTGCTGAGTATG-3'	<i>gapdh</i>	۵۸	۲۹۲
R-5'-GGCGTGGACAGTGGTCATAAG-3'		۵۸	
F-5'-AACGGGAAGGAGAATAAGGATG-3'	<i>nobox</i>	۵۶	۲۱۸
R-5'-GGTATGGAACTGGGGCTGTG-3'		۵۶	
F-5'-CCCCGAGCGTTTCTAGTAAAG-3'	<i>Ovoll</i>	۵۶	۲۱۵
R-5'-AGATGTGGCAGGTGAAGAGGT-3'		۵۸	
F-5'-TGATGGAGGAGAACTGGAGTG-3'	<i>Zp3</i>	۵۶	۱۷۲
R-5'-ATGGTGTGGTAAGGCGAGGTG-3'		۵۸	

براساس روش PCR، بیان ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، با استفاده از روش Real-Time PCR بیان ژن‌های مورد نظر مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام این مرحله از آزمایش، دستگاه MiniOpticon (آزمایشگاه‌های بیوراد،

مطالعه میزان بیان ژن‌های کاندیدا در تخمدان گوسفندان نژاد شال با دو گروه دوقلوزا و تک‌قلوزا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، توسط Real-timePCR انجام شد (جدول ۱). جهت افزایش دقت آزمایش، ابتدا

## تولیدات دامی

رابطه (۱)

= میزان تغییرات بیان ژن

$$2^{[-1](\Delta Ct \text{ least square means})}$$

رابطه (۲)

$$2^{[\Delta Ct \text{ least square means}] * (-1)} = \text{میزان تغییرات بیان ژن}$$

در این رابطه‌ها، میزان تغییرات بیان ژن تابع  $\Delta Ct$  (تفاوت بیان ژن موردنظر و ژن کنترل در چرخه آستانه) می‌باشد.

میانگین‌ها به کمک آزمون T-Test مقایسه شدند.

به دلیل اینکه ساختار پروموتور و فاکتورهای نسخه-برداری مرتبط با آن اهمیت بالایی در میزان نسخه‌برداری ژن‌ها دارند، در ادامه تحقیق حاضر با استفاده از داده‌های مربوط به توالی‌های ژنومی گوسفند یا انسان و با به‌کارگیری نرم‌افزار آنالاین BDGP (شبکه عصبی پیش‌بینی پروموتور) نواحی پروموتوری و فاکتورهای نسخه‌برداری ژن‌های مورد مطالعه بررسی شدند.

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از خروجی‌های Real-Time PCR نشان داد که تفاوت بیان ژن‌های *nobox* و *ovoll* در دو گروه دوقلوها و تک‌قلوهای معنی‌دار و برای ژن *zp3* بین دو گروه غیرمعنی‌دار بود (جدول ۲).

ایالات متحده آمریکا) و محلول آماده‌اواگرین ساخت شرکت سولیس بیوداین (SBD) مورد استفاده قرار گرفت. این محصول حاوی آنزیم DNA پلیمراز هات فایرپول، بافر ۵ برابر غلظت، اواگرین qPCR،  $MgCl_2$  ۱۲/۵ میلی‌مولار، dNTP، رنگ اواگرین و ROX می‌باشد. باتوجه به اینکه آنزیم DNA پلیمراز هات فایرپول بعد از قرار گرفتن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه فعال می‌شود، از تکثیر غیراختصاصی آغازگرهایی که در دمای پایین در زمان Real-Time PCR متصل شده‌اند، جلوگیری می‌شود. مراحل انجام این واکنش ابتدا یک چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (جهت فعال‌سازی آنزیم DNA پلیمراز هات فایرپول)، سپس، ۴۰ چرخه به ترتیب دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای بهینه اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و یک چرخه پایانی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

برای آنالیز داده‌های بیان ژن از روش ( $\Delta Ct$ ) استفاده شد [۱۳]. در این روش به منظور تصحیح  $Ct$ ‌های ژن مورد نظر با  $Ct$  ژن مرجع (*gapdh*)، تفاوت بین  $Ct$ ‌ها ( $\Delta Ct$ ) محاسبه شد. طبق این روش، اگر  $\Delta Ct$  کوچکتر از صفر باشد، از رابطه ۱ و در غیر این صورت (یعنی  $\Delta Ct$  مساوی یا بزرگتر از صفر) از رابطه ۲ برای نشان دادن تغییرات استفاده می‌شود:

جدول ۲. مقایسه بیان ژن‌های *ovoll*، *nobox* و *zp3* در بافت تخمدانی گوسفندان شال تک‌قلو و دوقلو

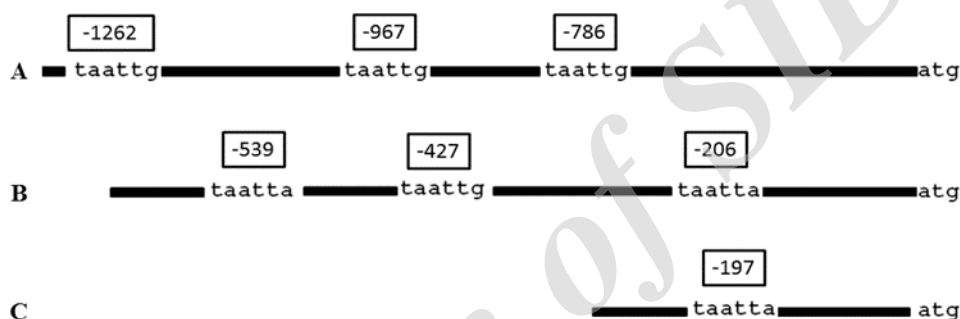
Zp3	Ovoll	nobox	ژن‌های کاندید
-۵/۲۴	-۹/۴۴	-۷/۴۸	میش‌های شال تک‌قلو
-۴/۳۳	-۶/۸۱	-۵/۵۴	میش‌های شال دو‌قلو
>۰/۰۱P	۰/۰۱P<	۰/۰۱P<	P-value

## تولیدات دومی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

یکی از توالی‌های TAGTTG، TAATTG یا TAATTA باشد. چندین جایگاه اتصال برای *nobox* روی نواحی پروگزیمال پروموتور ژن *gdf9* انسان، موش، شامپانزه، خوک، گاو و گوسفند وجود دارد (شکل ۱). ناحیه پروموتوری ژن *gdf9* در موش دارای سه جایگاه اتصال در نواحی ۷۸۶-، ۹۶۷- و ۱۲۵۹- برای اتصال فاکتورهای نسخه‌برداری ژن *nobox* می‌باشد [۵].

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، ژن *nobox* از دسته ژن‌های عمده خانواده *homeobox* می‌باشد که ژن‌های این خانواده با ایجاد فعالیت تنظیمی، بر عملکرد ژن‌های دیگر مؤثر می‌باشند. وجود همزمان دو هورمون *gdf9* و *bmp15* در گوسفند به عنوان فاکتورهای ضروری جهت تکمیل بلوغ فولیکول‌ها ضروری گزارش شده‌اند [۸]. جایگاه اتصال *nobox* به پروموتور ژن‌ها در گونه‌های مختلف حفاظت شده نیست و اتصال *nobox* به DNA می‌تواند از طریق



شکل ۱. شمایی از محل اتصال *nobox* روی پروموتور ژن *gdf9* در موش (A)، انسان (B) و گوسفند (C)

به هم متصل شده‌اند، ساخته شده است. برخی پروتئین‌های zinc-finger سطوح محصولات ژن را از طریق مکانیسم‌های پس از ترجمه‌ای تنظیم می‌کنند [۱۱]. همان‌طور که در بالا نیز اشاره شد پروتئین‌های OVOL عضو خانواده پروتئین‌های zinc-finger هستند و به عنوان فاکتورهای نسخه‌برداری برای تنظیم بیان ژن در مراحل مختلف تمایز به کار می‌روند. این ژن‌ها هم به عنوان فعال‌کننده‌های نسخه‌برداری و هم به عنوان سرکوبگرهای نسخه‌برداری عمل می‌کنند [۹]. براساس مطالعات بیوانفورماتیک، ژن *ovoll* در نواحی حفاظت شده ژن‌های خانواده *tgf-β* دارای جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی می‌باشند که نقش تنظیمی در فعالیت ژن‌های این خانواده را بر عهده دارد [۶]. از آنجایی که توالی این ژن در

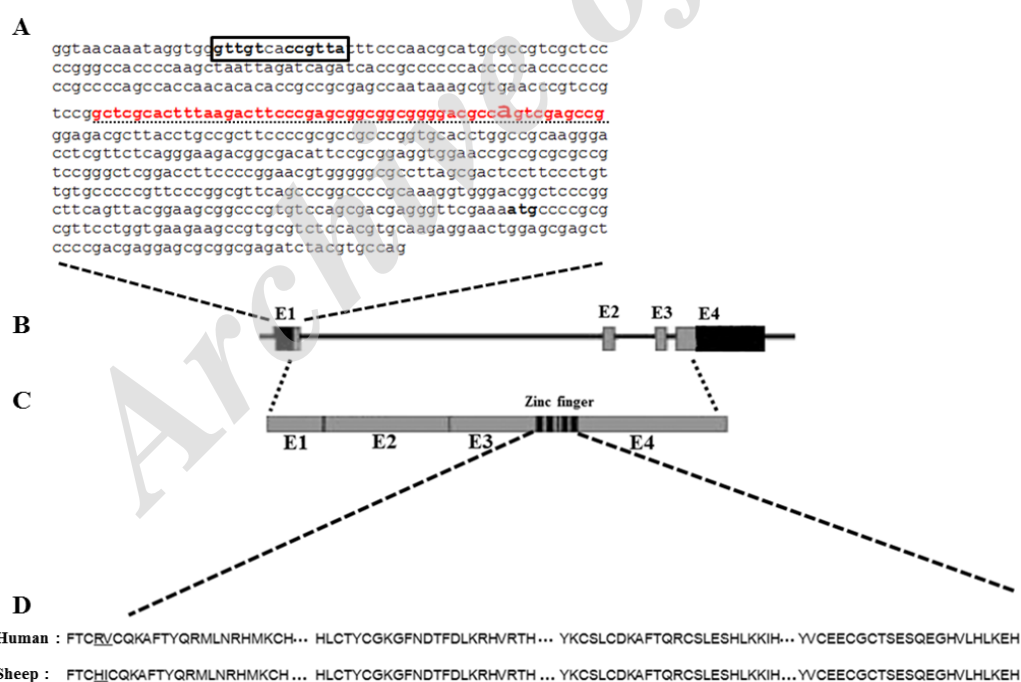
باتوجه به گزارش‌های مختلف مبنی بر اثر تنظیمی ژن *nobox* بر ژن *gdf9* و همچنین باتوجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، پیش‌بینی می‌شود ژن *nobox* با تنظیم میزان بیان ژن *gdf9*، اثری غیرمستقیم بر میزان تخم‌کریزی و دوقلوژیی گوسفندان شال داشته باشد.

فاکتورهای نسخه‌برداری بیان ژن را از طریق اتصال به توالی‌های خاصی از DNA تنظیم می‌کنند و فعالیت RNA پلیمراز را از طریق تعاملات بین مولکولی که اغلب پروتئین‌های تنظیمی بیشتری را شامل می‌شود، تعدیل می‌کنند. معمول‌ترین موتیف مورد استفاده توسط فاکتورهای نسخه‌برداری برای تشخیص توالی DNA خاص zinc finger Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> است که معمولاً از دنباله‌های متوالی که توسط لینکرهای پپتیدی به شدت حفاظت شده

## تولیدات دامی

پروموتور *ovoll* و همچنین توالی GTTGT که تقریباً در ناحیه بالادست CCGTTA قرار دارد. در واقع ناحیه zinc-finger پروتئین OVOL1 به پروموتور *ovoll* متصل می‌شود. OVOL1 و c-Myb توالی یکسانی را روی پروموتور *ovoll* شناسایی می‌کنند (توالی CCGTTA) و برای اتصال به این موتیف، بین آنها رقابت وجود دارد. c-Myb یک فعال‌کننده نسخه‌برداری است. در شرایطی که OVOL1 حضور داشته باشد، در پروموتور جایگزین c-Myb می‌شود. در انتهای آمینی پروتئین OVOL1 یک دومین SNAG وجود دارد که برای سرکوب فعالیت پایه پروموتور *ovoll* توسط پروتئین OVOL1 ضروری است [۱۵]. میزان بیان ژن *ovoll* در طی رشدونمو فولیکول‌های تخمدان گوسفند به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد [۳].

موجودات مختلف دارای شباهت بالایی می‌باشد، می‌توان از فرآیند تنظیمی این ژن در یک موجود، فرآیند تنظیمی آن را در موجود دیگر پیش‌بینی کرد. بررسی توالی ژن *ovoll* در انسان و گوسفند (GI:417531893 و GI:568815587) در پایگاه UniProt شباهت بسیار بالایی را در آگزون‌های یک، سه و چهار نشان داد. آگزون‌های سه و چهار ژن *ovoll* کدکننده چهار zinc-finger از نوع  $C_2H_2$  هستند. پروموتور ژن *ovoll* با استفاده از نرم‌افزار BDGP پیش‌بینی و براساس پایگاه داده پروموتور یوکاریوتی (EPD) تأیید شد. فاکتورهای نسخه‌برداری متعددی می‌توانند به پروموتور ژن *ovoll* متصل شوند (شکل ۲). یکی از این فاکتورها خود پروتئین OVOL1 است. پروتئین OVOL1 نسخه‌برداری پروموتور *ovoll* را از طریق اتصال مستقیم به آن مهار می‌کند (اتصال با هگزامر CCGTTA در ناحیه



شکل ۲. توالی ژن *ovoll* در انسان. (A) ناحیه بالادست و آگزون اول (پروموتور پیش‌بینی شده با خط چین و نقطه شروع نسخه‌برداری با فونت بزرگتر نشان داده شده است. جعبه مشخص شده محل اتصال پروتئین OVOL1 به پروموتور است. کدون آغاز به صورت پررنگ نشان داده شده است. (B) ساختار ژن *ovoll* در انسان. (C) نواحی کدکننده ژن *ovoll* در انسان و (D) مقایسه توالی آمینواسیدی zinc finger در انسان و گوسفند.

## تولیدات دامی

دوره ۱۸ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۵

بیشتر می‌باشد که می‌تواند در تحقیقات تکمیلی مدنظر قرار گیرد. براساس نتایج حاصل از این تحقیق، ژن‌های *nobox* و *ovoll* از ژن‌های مؤثر در چندقلوزایی گوسفند شال می‌باشند و می‌توانند در بررسی‌های مولکولی مدنظر قرار گیرند.

### منابع

۱. زارع ی (۱۳۸۶) شناسایی پلی‌مورفیسم در دو نقطه از ژن مؤثر بر دوقلوزایی (*BMP15*) در گوسفند شال. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.
۲. غفاری م (۱۳۸۶) شناسایی پلی‌مورفیسم موجود در ژن‌های برولا (*BMPR-IB*) و (*GDF9*) مرتبط با دوقلوزایی در گوسفند شال. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.
3. Bonnet A, Cabau C, Bouchez O, Sarry J, Marsaud N, Foissac F, Woloszyn F, Mulsant P and Pepin BM (2013) An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog. *BMC Genomics*. 14: 1-19.
4. Bouilly J, Bachelot A, Broutin I, Touraine P and Binart N (2011) Novel NOBOX loss-of-function mutations account for 6.2% of cases in a large primary ovarian insufficiency cohort. *Human Mutatioz*. 32: 1108-1113.
5. Choi Y and Rajkovic A (2006) Characterization of NOBOX DNA binding specificity and its regulation of *Gdf9* and *Pou5f1* promoters. *Biological Chemistry*. 281(47): 35747-35756.
6. Gomis RR, Alarcón C, He W, Wang Q, Seoane J, Lash L and Massague J (2006) A FoxO-Smad expression group in human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 103: 12747-12752.

باتوجه به اینکه توالی ژن *ovoll* در گوسفند به طور کامل شناسایی نشده است و گزارشی از ارتباط بین توالی ناحیه پروموتوری ژن *ovoll* و ژن‌های خانواده *tgf-β* ارائه نشده است، نمی‌توان به صورت قطعی در مورد نقش این ژن بر روی ژن‌های *tgf-β* اظهارنظر نمود، اما باتوجه به ارتباط موجود بین ژن *ovoll* و ژن‌های خانواده *tgf-β* در تخمدان و ارتباط بیان این ژن‌ها در زمان‌های خاصی از چرخه‌های تخمدان، همچنین نتایج معنی‌دار بیان ژن *ovoll* در گوسفندان دوقلوزا و تک‌قلوزای شال، پیش‌بینی می‌شود این ژن نقش کلیدی و مهمی در سطح باروری و دوقلوزایی این نژاد داشته باشد. باتوجه به اثبات وجود آلل‌های وحشی ژن‌های خانواده *tgf-β* در نژاد شال [۱ و ۲]، احتمالاً مسیر اثرگذاری ژن‌های خانواده *tgf-β* در سطح باروری و دوقلوزایی نژاد شال نیز متفاوت از مسیرهای ذکر شده در تحقیقات قبل می‌باشد.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، بیشترین میزان بیان ژن‌ها در اووسیت گوسفند، مربوط به ژن‌های *zp2*، *zp3* و *gdf9* می‌باشد [۳]، اما عملکرد دقیق این ژن‌ها هنوز به طور کامل مشخص نشده است. بیان ژن *zp3* بر روی غشای زوناپلوسیدا در تخمک قرار دارد و اصلی‌ترین نقشی که تاکنون برای آن مشخص شده است، در تلاقی با سر اسپرم و ایجاد عملکرد انتخابی جهت ورود اسپرم به داخل تخمک می‌باشد [۱۷]. نواحی پروموتوری ژن *zp3* دارای گیرنده‌هایی جهت اتصال فاکتورهای رونویسی ژن‌های *sohlh1* و *figla* هستند که کنترل بیان ژن *zp3* را بر عهده دارند [۱۲]. بیشترین میزان بیان ژن‌ها در اووسیت گوسفند، مربوط به ژن‌های *zp2*، *zp3* و *gdf9* می‌باشد، اما با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، تأثیر ژن *zp3* در افزایش سطح باروری و چندقلوزایی گوسفندان شال از منظر تغییر بیان ژن بعید به نظر می‌رسد، اگرچه امکان تأثیر آن از طریق تغییرات نوکلئوتیدی در ساختار ژن نیازمند بررسی

### تولیدات دامی

7. Herrera L, Ottolenghi C, Garsia-Ortiz JEG, Pellegrini M, Manini F, Ko MSH, Nagaraja R, Forabosco A and Schlessinger D (2005) Mouse ovary developmental RNA and protein markers from gene expression profiling. *Developmental Biology*. 279: 271-290.
8. Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader KL and Lawrence SB (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*. 67: 1777-1789.
9. Kumar A, Bhandari A, Sinha R, Sardar P, Sushma M, Goyal P, Goswami C and Grapputo A (2012) Molecular phylogeny of OVOL genes illustrates a conserved C2H2 zinc finger domain coupled by hypervariable unstructured regions. *PLoS ONE*. 7(6): 1-12.
10. Kumar PR, Sanjeev KS and Rohit KAR (2013) Genetics of ovulation rate in farm animals. *Veterinary World*. 11: 833-838.
11. Laity JH, Dyson HJ and Wright P (2000) DNA-induced  $\alpha$ -helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys2-His2 zinc fingers. *Journal of Molecular Biology*. 295: 719-727.
12. Lim Ej and Choi Y (2012) Transcription factors in the maintenance and survival of primordial follicles. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 39: 127-131.
13. Livak KJ and Thomas DS (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 25(4): 402-408.
14. McNatty KP, Galloway SM, Wilson T, Smith P, Hudson NL and O'Connell A (2005) Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution*. 37: 25-38.
15. Nair M, Bilanchone V, Ortt K, Sinha S and Dai X (2007) *Ovol1* represses its own transcription by competing with transcription activator c-Myb and by recruiting histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Research*. 35(5): 1687-1697.
16. Pangas SA, Choi Y, Balliw DJ, Zhao Y, Westfal H, Matzuk MM and Rajkovic A (2006) Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 103: 8090-8095.
17. Redgrove KA, Aitken RJ and Nixon B (2012) More than a simple lock and key mechanism: unraveling the intricacies of sperm-zona pellucidabinding. In: *Binding protein*. In Tech open published. Pp. 953-978.
18. Teng A, Wells MN A, Segre J and Dai X (2007) Strain-dependent perinatal lethality of *Ovol1*-deficient mice and identification of *Ovol2* as a downstream target of *Ovol1*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1772(1): 89-95.