



## تولیدات دامی

دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷  
صفحه‌های ۲۱۳-۲۲۴

### بررسی چندشکلی ژن‌های *Wnt10a* و *Wnt10b* در گوسفند آمیخته افشاری برولامرینو

سمیه زمانی افشار<sup>۱</sup>، طاهر هرکی نژاد<sup>۲\*</sup>، عباس بهاری<sup>۳</sup>، محمد حسین شهیر<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۳. استادیار، پژوهشکده فناوری‌های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۰۳

#### چکیده

انتخاب دام‌های زنده دارای حداقل چربی لاشه در جهت اصلاح گله‌های داشتی به افزایش تولید گوشت کشور کمک می‌کند. اعضای خانواده ژن Wnt از عوامل مؤثر در تمایز سلول‌های چربی هستند. این پژوهش به منظور بررسی ارتباط چندشکلی ژن‌های *Wnt10a* و *Wnt10b* با صفات لاشه در ۹۶ رأس گوسفند آمیخته افشاری-برولامرینو انجام شد. از نمونه خون گوسفندان آمیخته به روش فنول کلروفرم DNA استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس برای تکثیر قطعه‌های ۶۶۳ جفت‌بازی از آگزون سوم و قسمتی از اینترون دوم ژن *Wnt10a* و ۵۱۲ جفت‌بازی از آگزون سوم ژن *Wnt10b* انجام شد. یک چندشکلی و سه تک‌شکلی (مشاهده آللی متفاوت از توالی رفرنس) در جایگاه ژن *Wnt10a* مشاهده شد اما تفاوتی بین نمونه‌ها برای ژن *Wnt10b* وجود نداشت. یک تک‌شکلی در ناحیه اینترون و یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی از نوع هم‌معنی و دو تک‌شکلی در ناحیه آگزون در ژن *Wnt10a* مشاهده شد که یکی از این تک‌شکلی‌ها در کدون ۱۳۹ بود. پس از هضم با آنزیم برشی *HpaII* در کدون ۱۳۹، مشخص شد که تمامی افراد در مقایسه با توالی رفرنس دارای ژنوتیپ هموزیگوت موتانت هستند. این SNP علاوه بر گوسفندان آمیخته در تعدادی از گوسفندان افشاری (دنبه‌دار) و زل (بدون دنبه) نیز بررسی شد و مجدداً همان نتایج مشاهده شد. براساس نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد در این جایگاه از ژن در نژادهای مورد بررسی آلل اصلی G باشد.

**کلیدواژه‌ها:** تغییر تک‌نوکلئوتیدی، چندشکلی، ژن Wnt، صفات لاشه، گوسفند افشاری.

## مقدمه

یکی از اهداف اصلاح نژاد گوسفند افزایش کیفیت لاشه بوده که تحت تأثیر ترکیبات لاشه و نسبت‌های بافتی (نسبت گوشت به استخوان و گوشت به چربی) می‌باشد [۱۷]. اگرچه مقداری ذخیره چربی در بدن ضروری است، اما با توجه به این که میزان انرژی مورد نیاز برای ذخیره هر گرم چربی ۲/۱۱ مرتبه بیشتر از ذخیره همان میزان پروتئین است و چربی از لحاظ قیمت، بهای چندانی ندارد بنابراین ذخیره چربی اضافی مطلوب نبوده و بازده تولید را کاهش می‌دهد [۷].

گوسفند افشاری به دلیل خصوصیات ویژه از جمله چندقلوزایی (۱۵ الی ۳۰ درصد)، سرعت رشد بالا، پایین بودن ضریب تبدیل و مقاومت نسبتاً خوب در مقابل امراض انگلی داخلی و خارجی یکی از بهترین نژادهای گوسفند ایرانی محسوب می‌شود [۱۲].

در آزمایشی به منظور بررسی جهش ژن در موش، پس از آلوده کردن موش به تومور سرطان پستان، پروتئینی شناسایی شد که به مقدار زیادی حفاظت شده بود و بعدها *int1* نام گرفت [۱۴]. پژوهشگران در سال ۱۹۸۷ همولوگ یکسان آن پروتئین را در مگس سرکه کشف کردند که البته در مگس سرکه به نام بدون بال شناخته شده است (WG)، یک جهش در ژن WG مگس سرکه ملانوگاستر شناسایی شد که این جهش موجب ایجاد یک اختلال و از دست دادن بال آن شد که نشان‌دهنده ارتباط فیزیولوژیکی بین این ژن و توسعه و تکامل در مگس سرکه است [۲]. در نهایت در سال ۱۹۹۱ یک نام‌گذاری جدید برای WG/INT-1 و ژن‌های مربوط به خانواده لیگاند Wnt انجام شد و *Int* و *Wg* با هم ادغام شدند و به صورت خانواده *Wingless/Int* تغییر نام داد و *Int1* تبدیل به *Wnt1* شد [۱۴].

تا به حال ۱۹ ژن در خانواده ژنی Wnt شناسایی شده است که این خانواده ژنی دستورالعمل لازم برای ساخت

پروتئین‌های مشابه‌ای را در مسیر سیگنال‌دهی شیمیایی تعیین سرنوشت و شکل‌دهی سلول و جنین را فراهم می‌کند. اعضای خانواده Wnt گلیکوپروتئین‌هایی ترشح می‌کنند که نقش کلیدی در رشد برعهده دارند. بعضی از پروتئین‌های Wnt در سلول‌ها و بافت‌های خاصی مثل استخوان، چربی و ... نقش دارند. این خانواده ژنی در مهره‌داران و بی‌مهرگان شناسایی شده است، اما تعداد لیگاندهای آن‌ها به‌طور قابل‌توجهی در هر دو گونه متفاوت است [۱۱].

مسیرهای سیگنال‌دهی Wnt مسیرهایی بسیار تکامل‌یافته و حفاظت‌شده‌ای بوده و در بسیاری از گونه‌ها از جمله مگس میوه تا انسان شبیه هم هستند [۱۴]. سیگنال‌دهی Wnt به دو دسته متعارف و نامتعارف تقسیم می‌شوند و تفاوت بین این گروه‌ها در این است که در مسیر متعارف پروتئین بتاکاتین نقش دارد، درحالی‌که مسیر نامتعارف مستقل از آن عمل می‌کند [۱۵]. اعضای خانواده ژن Wnt در تمایز سلول چربی نقش دارند [۴]. سلول‌های چربی، استئوبلاست‌ها، میوسیت‌ها و سلول‌های غضروفی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز پیدا می‌کنند. تمایز سلول چربی به‌عنوان آدیپوژنیز شناخته شده و شامل دو مرحله تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی به پیش‌ساز چربی و تمایز نهایی می‌باشد [۶]. یکی از اعضای خانواده ژن Wnt، لیگاند *Wnt10b* بوده که در مسیر سیگنال‌دهی متعارف فعال می‌شود. این مسیر برای تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی در دوران جنینی و در افراد بالغ ایفای نقش می‌کند. هر دو مسیر سیگنال‌دهی متعارف و نامتعارف می‌توانند در پیش‌ساز چربی فعال شوند و اعضای خانواده ژن Wnt در نحوه شکل‌گیری و تمایز سلول چربی عملکرد متفاوتی دارند مثلاً برخی از اعضای این خانواده ژنی که در مسیر نامتعارف عمل می‌کنند مانند *Wnt5a* و *Wnt4* منجر به تمایز و توسعه

## تولیدات دامی

احتمال یک درصد ارتباط داشت [۹]. در مطالعه‌ای که در افرادی که چاقی زودهنگام داشتند صورت گرفت، مشاهده شد که یک جهش هتروزیگوت (C256Y) از نوع دگر معنی در ژن *Wnt10b* منجر به اختلال در فعالیت این ژن و مسیر سیگنال‌دهی متعارف شده و در نتیجه توسعه بافت چربی مهار نمی‌شود. قابل توجه است که این جهش در همه بستگان این افراد که آنها نیز چاقی زودهنگام داشتند نیز مشاهده شد، به طوری که این جهش در افراد شاهد یافت نشد. این یافته‌ها دلالت بر اهمیت بالقوه ژن *Wnt10b* به عنوان یک تنظیم‌کننده تمایز بافت چربی دارد و همچنین نشان می‌دهد که *Wnt10b* ممکن است به عنوان یک تک‌ژنی یا چندژنی بالقوه در افرادی باشد که به صورت ارثی چاق می‌شوند [۵].

هدف از این مطالعه بررسی آگرون سوم ژن‌های *Wnt10a* و *Wnt10b* در بره‌های آمیخته افشاری- برونلامرینو و بررسی ارتباط آن‌ها با صفات لاشه بود.

### مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۹۶ راس بره نر گله اصلاح نژاد گوسفندان آمیخته افشاری- برونلامرینو نسل دوم (۷۵ درصد افشاری و ۲۵ درصد برونلامرینو) موجود در مزرعه آموزشی- پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان خون‌گیری شد. از حیوانات مورد استفاده، شجره کاملی در دسترس بود. DNA به روش فنول کلروفرم از نمونه خون این دام‌ها استخراج شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از نانودراپ استفاده شد. پرایمرهای مورد نظر با استفاده از نرم‌افزارهای CLC و Primer3 برای ناحیه آگرون سوم ژن *Wnt10b* با طول ۵۱۲ جفت باز، برای بخشی از اینترون دو و آگرون سوم ژن *Wnt10a* با طول ۶۶۳ جفت باز و همچنین برای بخشی از آگرون سوم ژن *Wnt10a* با طول ۳۵۶ جفت باز طراحی شد (جدول ۱).

بافت چربی می‌شود [۱۶]. اما برخی دیگر از جمله *Wnt10b* که یک تنظیم‌گر سرنوشت سلول‌های بنیادی است، در مراحل تمایز سلول‌های چربی، این لیگاند مسیر سیگنال‌دهی متعارف Wnt را فعال کرده و به وسیله مهار بیان C/EBP و PPAR $\gamma$  پیش‌ساز چربی را در حالت تمایز نیافته نگه داشته و از توسعه بافت چربی ممانعت کرده و موجب توسعه بافت استخوان می‌شود. علاوه بر این لیگاند، *Wnt6* و *Wnt10a* نیز به عنوان مهارکننده‌های بافت چربی هم در داخل بدن و هم در شرایط آزمایشگاهی شناخته شده‌اند [۴].

بیان اجباری *Wnt10a* و *Wnt6* مانند *Wnt10b* موجب تثبیت بتاکاتین شده و توسعه بافت چربی را مهار می‌کند، هم‌چنین *Wnt10a* تا حدی مشابه با *Wnt10b* موجب توسعه بافت استخوان می‌شود. در طول فرآیند تمایز چربی بیان این ژن‌ها به طور چشم‌گیری کاهش پیدا می‌کند [۴]. در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن *Wnt10a* و صفات رشد ۴۳۵ گاو ماده سه نژاد مختلف با استفاده از تعیین توالی DNA و با روش PCR-RFLP دو SNP از نوع هم‌معنی (g.3980G>T، g.4711G>C) در ناحیه آگرون ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با وزن، طول و ارتفاع بدن داشتند [۱۸]. حال آن‌که در بررسی که در زمینه بیان و ارتباط چندشکلی ژن *Wnt10b* با چربی پشت خوک صورت گرفت و یک SNP در ناحیه 3'-UTR شناسایی شد که با ضخامت چربی پشت در شانه، کفل و آخرین دنده در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود [۸].

در مطالعه‌ای، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های رایج ژن *Wnt10b* و تجمع چربی در نمونه‌ای از زنان کره‌ای بررسی شد. در تحقیق ذکر شده توالی‌یابی مستقیم از DNA ژنومیک ۴۵ نفر، شش تغییر تک‌نوکلئوتیدی مشترک شناسایی شد. در میان شش SNP، تغییر تک‌نوکلئوتیدی (rs833840) به طور قابل توجهی با چربی شکمی و چربی زیر پوستی در سطح

### تولیدات دامی

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای ژنهای *Wnt10a* و *Wnt10b*

نام ژن	نوع آغازگر	توالی آغازگر	Tm	طول قطعه حاصل
<i>Wnt10b</i>	رفت	5-TTCCTTTGGCCTCCTTACTC-3	۵۶٫۸۳	۵۱۲bp
	برگشت	5-TGCTGTGCCCTCTCAAATC-3	۵۷٫۷۵	۵۱۲bp
<i>Wnt10a</i>	رفت	5-TTCTGCCCTCTCTATGTCC-3	۵۹٫۲۴	۶۶۳bp
	برگشت	5-AAGCACACACAACGACAAGC-3	۵۹٫۹۵	۶۶۳bp
<i>Wnt10a</i>	رفت	5-TTCTGCCCTCTCTATGTCC-3	۵۹٫۲۴	۳۵۶bp
	برگشت	5-GGAACTCCGTGGCTCAGG-3	۶۱٫۸۲	۳۵۶bp

شماره دو مربوط به بخشی از اینترون دو و آگزون سه ژن *Wnt10a* با طول ۶۶۳ جفت بازی و شماره سه بخشی از آگزون سوم ژن *Wnt10a* با طول ۳۵۶ جفت بازی است.

ارسال گردید. با بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی وجود یا عدم وجود تغییر تک نوکلئوتیدی شناسایی شد. به منظور بررسی تغییر نوکلئوتید ۴۱۵ (rs425354815) کدون ۱۳۹ که تنها جهش دگرمعنی در ناحیه آگزون بود، در تمامی ۹۶ نمونه مربوط به ژن *Wnt10a* از روش PCR-RFLP استفاده شد. آنزیم برشی *HpaII* از لحاظ در دسترس بودن و محل برش انتخاب شد. این آنزیم حالت جهش‌یافته (CCGG) را برش می‌دهد. با توجه به این‌که در طول قطعه انتخابی ناحیه چهار نوکلئوتیدی CCGG در فواصل کوتاه تکرار شده است و ازدیاد قطعات حاصل از هضم آنزیمی در توالی ۶۶۳ جفت بازی موجب کاهش دقت در نتایج می‌شد؛ به منظور افزایش دقت در نتایج، مجدداً آغازگر پایین دست طراحی شد (جدول ۱) و در نهایت قطعه ۶۶۳ جفت‌بازی کوتاه‌تر شده و یک قطعه ۳۵۶ جفت‌بازی حاصل شد. با استفاده از آنزیم *HpaII* حداکثر پنج قطعه از هضم آنزیمی ایجاد می‌شد. با توجه به شکل ۱، پس از هضم آنزیمی قطعه ۳۵۶ جفت‌بازی ژن *Wnt10a* انتظار می‌رود که در افراد نوع وحشی (رفرنس) قطعه ۲۲۶ جفت‌بازی و در افراد هموزیگوت قطعه ۱۵۶ جفت‌بازی و در افراد هتروزیگوت دو قطعه ۲۲۶ و ۱۵۶ جفت‌بازی نمایش داده شود. قطعات ۹۰ و ۴۰ جفت‌بازی در هر سه فرد وجود دارد که در قسمت پایین شکل دیده

شرایط دمایی PCR برای تکثیر ناحیه مورد نظر ژن *Wnt10b* شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه با دمای ۹۵ °C و ۳۰ چرخه شامل سه مرحله: مدت زمان ۴۰ ثانیه با دمای ۹۵ °C، دمای اتصال [۵۵ °C] به مدت ۳۰ ثانیه برای قطعه ۵۱۲ جفت‌بازی از آگزون شماره سه ژن *Wnt10b*، (۵۹ °C) به مدت ۳۰ ثانیه برای قطعه ۶۶۳ جفت‌بازی از ژن *Wnt10a*، (۶۱ °C) به مدت ۲۵ ثانیه برای قطعه ۳۵۶ جفت‌بازی از ژن *Wnt10a*] و مدت زمان ۴۰ ثانیه با دمای ۷۲ °C و یک چرخه گسترش نهایی ۷۲ °C به مدت پنج دقیقه اعمال شد. پس از انجام واکنش PCR برای تمامی نمونه‌ها و مشاهده باند مناسب روی ژل آگارز یک و نیم درصد مقدار یکسانی از هر کدام از نمونه‌ها در میکروتیوپ‌های یک و نیم میلی‌لیتری ریخته و سپس محصولات PCR مربوط به ژن *Wnt10b* برای توالی‌یابی ارسال شد. با توجه به این در مورد ژن *Wnt10b* چندشکلی مشاهده نشد و نگرانی از این‌که با صرف هزینه زیاد برای توالی‌یابی تغییری مشاهده نشود این بار تصمیم گرفته شد با توجه به این که ژنوتیپ‌هایی با فراوانی بیش از پنج درصد برای به دست آوردن ارتباط آلی با صفات لاشه لازم بود در مورد ژن *Wnt10a* تعداد ۴۰ نمونه از محصولات PCR مربوط به قطعه ۶۶۳ جفت‌بازی از این ژن به صورت تصادفی جهت توالی‌یابی

## تولیدات دامی

بررسی چندشکلی ژنهای *Wnt10a* و *Wnt10b* در گوسفند آمیخته افشاری پرولامرینو

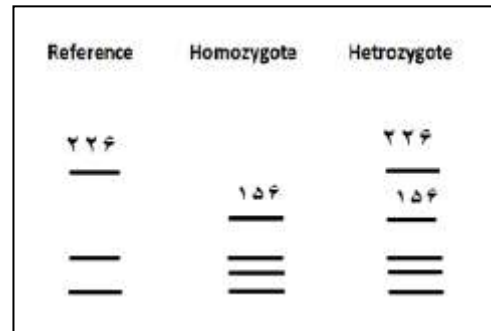
و دو و نیم درصد استفاده شد. برای این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول به همراه سه میکرولیتر بافر در هر یک از چاهک‌ها بارگذاری شد و در کنار چاهک‌های محصولات، در یک چاهک نشانگر DNA ۱۰۰ جفت باز نیز بارگذاری شد. باندهای مربوطه روی ژل آگارز با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تصویر ژل‌ها با کمک دستگاه ژل داگ آتاژاپن (Atta, Japan) و استفاده از نور UV ثبت شد.

### نتایج و بحث

باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن *Wnt10b* را در تعدادی از نمونه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به طول قطعه تکثیر شده (۵۱۲ جفت باز)، باند به دست آمده بین دو باند ۵۰۰ و ۶۰۰ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی قرار گرفت.

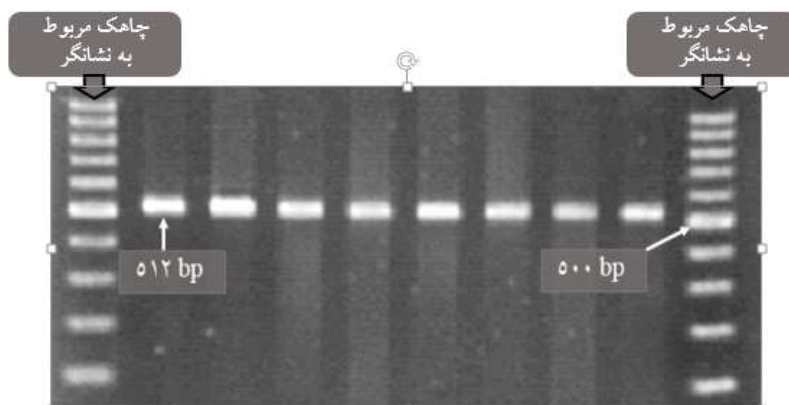
شکل سه باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات PCR مربوط به ژن *Wnt10a* را در تعدادی از نمونه‌ها نشان می‌دهد. با توجه به طول قطعه تکثیر شده (۶۶۳ جفت باز)، باند به دست آمده بین دو باند ۶۰۰ و ۷۰۰ نشانگر مولکولی قرار گرفت.

می‌شود. قطعه ۷۰ جفت بازی در افراد با آلل نوع وحشی دیده نخواهد شد (شکل ۱).



شکل ۱. باندهای مورد انتظار از هضم آنزیمی ناحیه ۴۱۵ کدون (rs425354815) قطعه ۳۵۶ جفت بازی ژن *Wnt10a* در نمونه‌های رفرنس، هموزیگوت و هتروزیگوت

هضم آنزیمی فرآورده‌های PCR با توجه به مواد لازم و مدت زمان ارائه شده کاتالوگ در دو مرحله عملکرد آنزیم به مدت ۱۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و مرحله غیرفعال‌سازی آنزیم به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه انکوباتور انجام شد. برای مشاهده محصولات PCR و نیز نتایج هضم آنزیمی به ترتیب از الکتروفورز ژل آگارز یک و نیم



شکل ۲. الکتروفورز فرآورده‌های PCR، مربوط به ژن *Wnt10b* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت بازی

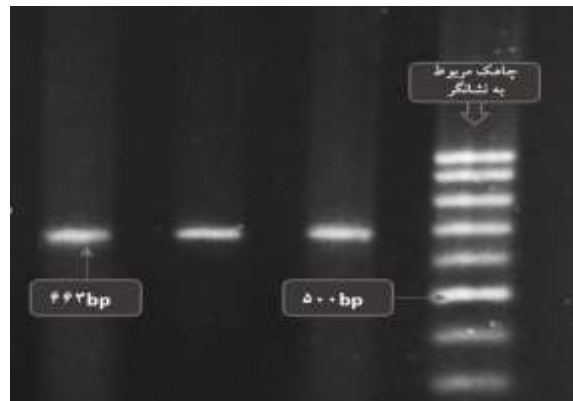
## تولیدات دایمی

دوره ۲۰ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۷

## زمانی افشار و همکاران

رفرنس این ژن، نوکلئوتید سیتوزین قرار دارد اما در تمامی نمونه‌های مورد بررسی به صورت تک شکل آدنین (rs424669772) مشاهده شد (شکل ۴). در ناحیه آگزون سوم در توالی رفرنس در نوکلئوتید ۴۱۵ (rs425354815) کدون ۱۳۹ آلل اصلی سیتوزین است و اسیدآمینه آرژنین تولید می‌شود اما در تمامی نمونه‌های مورد بررسی آلل اصلی گوانین بود که منجر به تولید اسیدآمینه گلیسین می‌شود (شکل ۵). در نوکلئوتید ۶۲۷ کدون ۲۰۹ در تمامی نمونه‌ها تک‌شکلی گوانین (rs403987034) مشاهده شد درحالی‌که در توالی رفرنس نوکلئوتید آدنین قرار دارد، با این حال هر دو مورد اسیدآمینه یکسانی را تولید می‌کنند. در نوکلئوتید ۶۳۳ کدون ۲۱۱ نیز تغییر تک‌نوکلئوتیدی (rs415178599) سیتوزین به تیمین (Y) مشاهده شد که این تغییر منجر به تغییر اسیدآمینه نمی‌شود (شکل ۶)، لازم به ذکر است که این چند شکلی‌ها قبلاً در پایگاه‌های اطلاعات زیستی در مورد گوسفند گزارش و با شماره‌های ذکر شده ثبت شده‌اند.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی (شکل ۷) نشان داد که تمامی افراد هموزیگوت از نوع GG بودند که با توجه به آنچه در پایگاه‌های اطلاعات زیستی آمده است افراد هموزیگوت جهش یافته محسوب می‌شوند. به‌منظور اطمینان از نتایج، این آزمایش روی تعدادی گوسفند افشاری که مربوط به گله‌های دیگر بود نیز انجام شد و همین نتایج حاصل شد. به‌علاوه مشخص شد که این آلل، آلل معمول (وحشی = غیرموتانت) در این نژاد است. اما از طرفی چون این ژن بر تمایز، توسعه و شکل‌گیری بدن نقش دارد، برای روشن‌تر شدن تأثیر این ژن در گوسفند، این تغییر در گوسفند زل (بدون دنبه) هم مورد بررسی قرار گرفت و همان نتایج قبلی مشاهده شد. در بررسی دیگر تغییرات نوکلئوتیدی، نوکلئوتید ۶۲۷ ژن *Wnt10a* نیز در تمام نمونه‌های مورد بررسی تنها آلل G مشاهده گردید و تمام افراد ژنوتیپ GG داشتند. حال این‌که در توالی رفرنس این



شکل ۳. الکتروفورز فرآورده‌های PCR مربوط به ژن *Wnt10a* روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در کنار نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی

پس از هم‌ردیف‌سازی نتایج توالی‌یابی ژن *Wnt10b* با توالی رفرنس موجود در سایت Ensemble، هیچ‌گونه تغییر تک نوکلئوتیدی در این ناحیه مشاهده نشد و در تمامی افراد توالی‌ها با هم یکسان بودند. در ابتدا ژن *Wnt* به‌عنوان یک ژن با توالی بسیار حفاظت‌شده و مسیر سیگنال‌دهی *Wnt* به‌عنوان مسیری بسیار تکامل یافته و حفاظت‌شده معرفی شدند که در بسیاری از گونه‌ها از جمله مگس میوه تا انسان شبیه هم هستند [۴]. نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی ژن *Wnt10b* در موجودات مختلف، بیانگر وجود توالی‌های حفاظت‌شده در قسمت‌های عمده‌ای از این ژن بود که همانند نتیجه حاصل از ژن *Wnt10b*، احتمال وجود تغییر در این نواحی کاهش می‌یابد. بنابراین یکسان بودن توالی‌ها ممکن است به دلیل تعداد نسبتاً کم دام‌های مورد بررسی و یا به دلیل وجود حفاظت بالای این نواحی باشد.

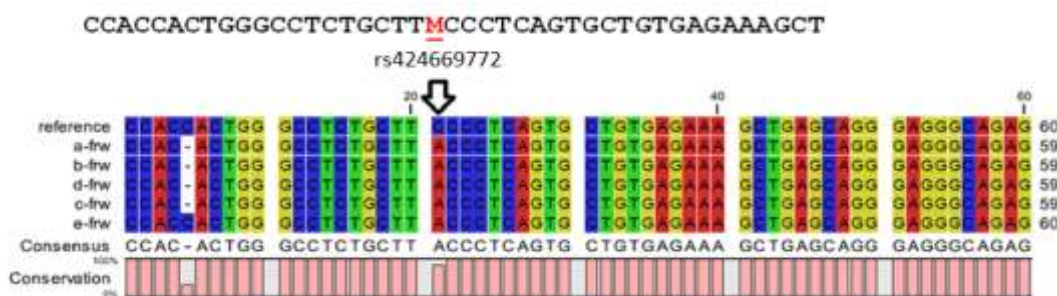
نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به‌دست‌آمده ژن *Wnt10a* با هم‌دیگر و با توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعات زیستی ژن با شماره دستیابی XM\_004004935.3، وجود یک تک‌شکلی (آلی متفاوت از رفرنس) در ناحیه ایترون دوم و یک تغییر تک نوکلئوتیدی و دو تک‌شکلی در ناحیه آگزون سوم را نشان داد در ناحیه ایترون دوم در توالی

## تولیدات دامی

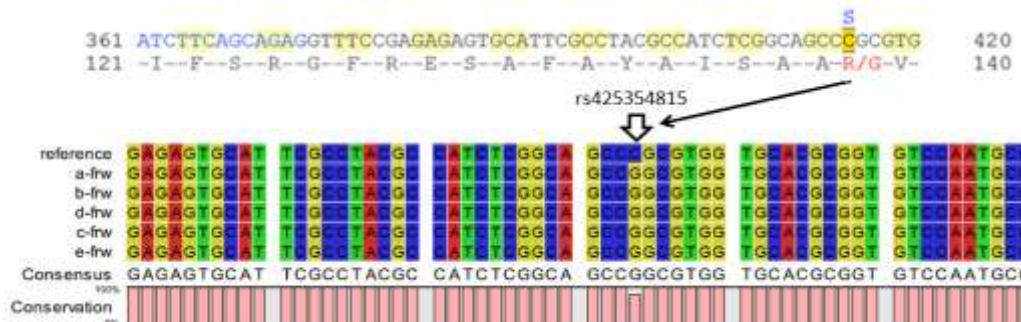
بررسی چندشکلی ژنهای *Wnt10a* و *Wnt10b* در گوسفند آمیخته افشاری پرولامرینو

هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۳۲ درصد محاسبه شد و این ممکن است به دلیل تعداد محدود نمونه‌ها باشد. البته با توجه به اینکه این تغییر نوکلئوتیدی یک تغییر هم‌معنی است و منجر به تغییر اسید آمینه نمی‌شود، لذا بررسی بیشتری در این ارتباط انجام نگرفت.

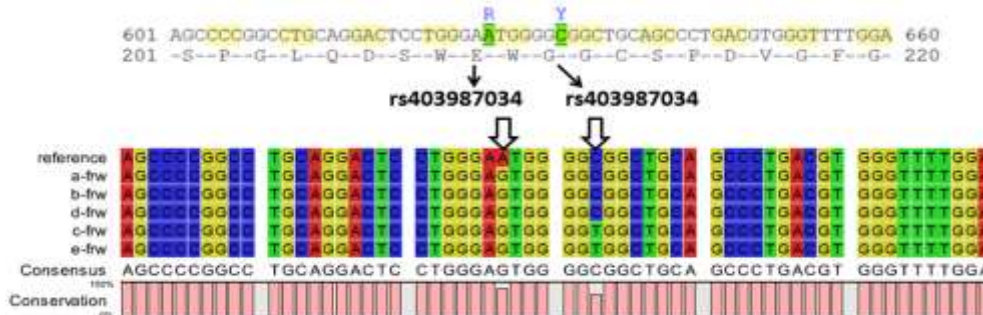
جایگاه نوکلئوتید A قرار دارد. اما در نوکلئوتید ۶۳۳ این ژن دو نوع ال C و T مشاهده شد که فراوانی ال C برابر ۰/۸ و فراوانی ال دیگر ۰/۲ بود. در این جایگاه جمعیت مورد بررسی در تعادل هاردی-واینبرگ نبود. در این مطالعه هیچ کدام از نمونه‌ها ژنوتیپ هتروزیگوت نشان ندادند هر چند



شکل ۴. تک‌شکلی (rs424669772) در ناحیه اینترون دوم ژن *Wnt10a*؛ در توالی رفرنس این نوکلئوتید C است در حالی که در نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه نوکلئوتید A مشاهده شد.



شکل ۵. تک‌شکلی مشاهده شده در نوکلئوتید ۴۱۵ (rs425354815) کدون ۱۳۹ سیتوزین به گوانین (S) ژن *Wnt10a* و تغییرات اسیدهای آمینه مربوطه (براساس رفرنس اسیدآمینه آرژنین تولید می‌شود ولی در تمامی نمونه‌های مورد بررسی اسیدآمینه گلیسین تولید می‌شود).



شکل ۶. تک‌شکلی در نوکلئوتید ۶۲۷ (rs403987034) تغییر آدنین به گوانین (R) در کدون ۲۰۹ و تغییر تک‌نوکلئوتیدی در نوکلئوتید ۶۳۳ (rs415178599) تغییر سیتوزین به تیمین (Y) ژن *Wnt10a*، هیچکدام از تغییرات باعث تغییر اسیدآمینه مربوطه نمی‌شوند.

### تولیدات دامی

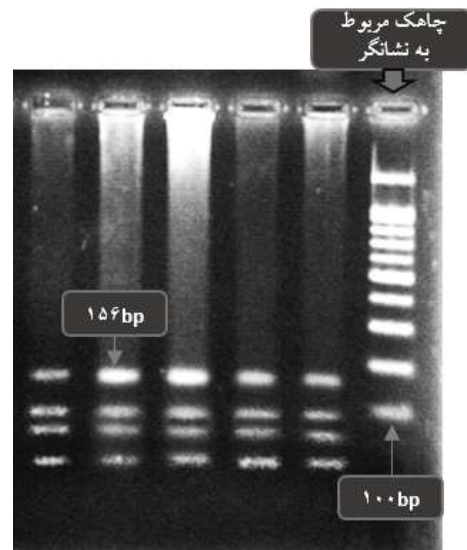
## زمانی افشار و همکاران

موجب کاهش مداوم وزن بدن، کاهش چربی عضلانی و ذخیره‌ای، کاهش هایپرانسولینیمی (Hyperinsulinemia) و سطوح تری‌گلیسیرید پلاسما و بهبود هموستاز گلوکز در این حیوانات نسبت به گروه شاهد می‌شود. علاوه بر این اثر طولانی‌مدت بیان Wnt10b موجب تراکم مواد معدنی استخوان شده بود [۱].

با بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌های مسیر سیگنال‌دهی Wnt با صفات لاشه مرغ کراس کرنیش و سیلکی (Silkie) ۵۸ چندشکلی در ۲۴ ژن با حداقل یک صفت لاشه ارتباط داشت. علاوه بر این، هر دو تغییر تک‌نوکلئوتیدی Wnt9a (rs15865526) و MAPK9 rs14066777 با اندازه دور ساق پا و وزن بال مرتبط بود. ژن‌های Wnt3a با درصد وزن عضله سینه بر وزن لاشه، Wnt11 با درصد وزن ران بر وزن لاشه، Wnt9a با طول ساق پا مرتبط بودند. بنابراین سیگنال‌دهی Wnt نقش عمده‌ای در تنظیم خصوصیات لاشه برای صفات تولیدی این نژاد ایفا می‌کند. البته دو SNP انتخابی در ژن Wnt10a ارتباطی با صفات لاشه نداشتند [۱۰]. در مطالعه حاضر SNP انتخابی در ژن Wnt10a در بین دام‌های مورد بررسی متفاوت نبود و به‌عبارت دیگر همه دام‌ها ژنوتیپ یکسانی داشتند و بنابراین بررسی ارتباط آلل‌ها با صفات لاشه مقدر نگرید.

در بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن Wnt10a و صفات رشد ۴۳۵ گاو ماده سه نژاد مختلف با استفاده از تعیین توالی DNA و با روش PCR-RFLP دو SNP از نوع هم‌معنی (g.4711G>C, g.3980G>T) در ناحیه اگزون با وزن، طول و ارتفاع بدن ارتباط داشتند [۱۸]. حال آن‌که در بررسی که در زمینه بیان و ارتباط چندشکلی ژن Wnt10b با چربی پشت خوک صورت گرفت و یک SNP در ناحیه 3'-UTR شناسایی شد که با ضخامت چربی پشت در شانه، کفل و آخرین دنده مرتبط بود [۸].

در مطالعه‌ای، ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های رایج ژن



شکل ۷. الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی مربوط به نژاد زل، افشاری و آمیخته افشاری-برلامینو روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، نشانگر ملکولی ۱۰۰ جفت‌بازی در سمت راست بارگذاری شده است و بقیه چاهک‌ها نمونه‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهند.

با هم‌ردیف‌سازی توالی ژنی و پروتئینی این دو لیگاند در موجودات مختلف مشاهده شد که ژن Wnt10b تا حدود زیادی حالتی حفاظت‌شده دارد، هرچند وقتی مقایسه بین گونه‌ای مطرح است نواحی متغیری هم مشاهده می‌شود. اما در این گونه بخصوص این حفظ توالی شدت بیشتری به خود می‌گیرد. در مورد پارالوگ این ژن یعنی Wnt10a نیز این حالت صادق است هرچند در این ژن تغییرات بیشتری مشاهده می‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها برای حفظ سلامت و حیات موجود زنده ضروری می‌باشند. بنابراین در طی زمان کمتر دچار تغییر شده و یا این که بدون تغییر مانده‌اند. در مطالعه‌ای که در آن پیامدهای بلندمدت سیگنال‌دهی Wnt و بیان ژن Wnt10b در عضلات اسکلتی رات‌های فربه تغذیه‌شده با رژیم غذایی پر چرب را مورد بررسی قرار داده‌اند، نشان داد بیان بیش از حد این ژن

## تولیدات دامی



تک‌شکلی در ناحیه نوکلئوتید ۴۱۵ (rs425354815) یعنی کدون ۱۳۹ در نمونه‌های مورد بررسی منجر به تولید اسید آمینه گلیسین و براساس توالی رفرنس اسید آمینه آرژنین تولید می‌شود. قابل ذکر است که به‌منظور بررسی بیشتر این تک‌شکلی تعدادی از گوسفندان افشاری گله‌های مختلف نیز مورد مطالعه قرار گرفت و همین نتایج مشاهده شد که ممکن است با توجه به این که توالی رفرنس سایت‌های Ensemble و NCBI براساس توالی گوسفندان خارجی است، تفاوت ژنوتیپ گوسفندان ایرانی با نژادهای خارجی دلیل این مغایرت باشد. اما از طرفی چون این ژن بر تمایز، توسعه و شکل‌گیری بدن نقش دارد، برای روشن‌تر شدن تأثیر این ژن در گوسفند بررسی تمامی توالی ژن و شناسایی آل‌ل‌های احتمالی در گوسفندان دنبه‌دار و بدون دنبه و یا کوچک جثه و بزرگ جثه لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. پس از هم‌ردیف‌سازی نتایج توالی‌یابی ژن *Wnt10b* با توالی رفرنس موجود در سایت Ensemble مشاهده شد که هیچ‌گونه تغییر تک‌نوکلئوتیدی در این ناحیه وجود نداشته و در تمامی افراد توالی‌ها با هم یکسان هستند که ممکن است به‌دلیل وجود حفاظت بالای این نواحی باشد.

با بررسی نتایج توالی‌یابی و آنالیز آن‌ها برای آگزون سوم ژن *Wnt10b* مشخص شد که هیچ‌گونه چندشکلی در این ناحیه در تمامی دام‌های مورد بررسی وجود نداشت که ممکن است به دلیل حفاظت شدگی بالای این نواحی باشد. نتایج حاصل از بررسی قسمتی از اینترون دوم و آگزون سوم ژن *Wnt10a* تعداد یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی از نوع هم‌معنی در آگزون و تعداد سه تک‌شکلی (یک مورد در اینترون و دو مورد در آگزون) نسبت به رفرنس مشاهده شد. تک‌شکلی در نوکلئوتید ۴۱۵ (rs425354815) یعنی کدون ۱۳۹ در همه نمونه‌های مورد بررسی منجر به تولید اسید آمینه گلیسین می‌شد. این تک‌شکلی در همه افراد مورد بررسی در نژادهای افشاری،

*Wnt10b* و تجمع چربی در یک نمونه شامل ۱۰۲۹ زن کره‌ای بررسی شد. در این تحقیق توالی‌یابی مستقیم از DNA ژنومیک ۴۵ نفر، شش تغییر تک‌نوکلئوتیدی مشترک شناسایی شد. در میان شش SNP، تغییر تک‌نوکلئوتیدی (rs833840) به‌طور قابل‌توجهی با چربی شکمی و چربی زیر پوستی ارتباط داشت [۹]. با مطالعه ۹۶ فرد زیر ۱۰ سال (با چاقی شدید زودهنگام) در انگلستان و ۱۱۵ فرد چاق ایتالیایی، گزارش شد که در افرادی که چاقی زودهنگام داشتند یک جهش هتروزیگوت (C256Y) از نوع دگر معنی در ژن *Wnt10b* منجر به اختلال در فعالیت این ژن و مسیر سیگنال‌دهی متعارف شده و در نتیجه توسعه بافت چربی مہار نمی‌شود. قابل توجه است که این جهش در همه بستگان این افراد که آن‌ها نیز چاق بودند مشاهده شد. این یافته‌ها دلالت بر اهمیت بالقوه ژن *Wnt10b* به‌عنوان یک تنظیم‌کننده تمایز بافت چربی دارد و همچنین نشان می‌دهد که *Wnt10b* ممکن است به‌عنوان یک تک ژنی یا چندژنی بالقوه در افرادی باشد که به‌صورت ارثی چاق می‌شوند [۵].

جهش دگر معنی خواص اسید آمینه‌ای را تغییر داده و پروتئین‌های کدکننده ساختاری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در تعداد زیادی از مطالعات انجام‌شده در چند دهه گذشته به‌وضوح نشان داده است که SNP‌های هم‌معنی در توالی کدکننده تغییری ایجاد نمی‌کنند و در نتیجه انتظار نمی‌رود که موجب تغییر بیان و عملکرد پروتئین شوند. با این حال شواهدی ارائه شده است که نشان می‌دهد SNP‌های هم‌معنی هم می‌توانند بیان پروتئین را با تغییر و یا افزایش ثبات mRNA تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین در نتیجه سنتز پروتئین محصولی با همان توالی اسید آمینه‌ای اما با خواص ساختاری و عملکردی متفاوت ایجاد شود [۱۳ و ۳].

در این مطالعه برای بررسی ژن *Wnt10a* با بررسی نتایج توالی‌یابی و PCR-RFLP تعداد سه حالت تک‌شکل و یک تغییر تک‌نوکلئوتیدی از نوع هم‌معنی مشاهده شد که یک

## تولیدات دامی

- adipocyte differentiation. *Molecular Cell Biology*. 12: 722-734.
7. Iraq-Nezamabadi M (2010) The association of thyroglobulin gene polymorphism and Concentration of thyroid hormones with carcass traits in Afshari sheep. University of Zanjan. Master's Dissertation. (in Persian)
  8. He X, Gao H, Liu C, Fan B and Liu B (2011) Cloning, chromosomal localization, expression profile and association analysis of the porcine WNT10B gene with backfat thickness. *Molecular Biology Reports*. 38(5): 3095-9.
  9. Kim IC, Cha MH, Kim DM, Lee H, Moon JS, Choi SM, Kim KS and Yoon Y (2011) A functional promoter polymorphism -607G>C of WNT10B is associated with abdominal fat in Korean female subjects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 22(3): 252-8.
  10. Lu Y, Chen SR, Liu WB, Hou ZC, Xu GY and Yang N (2012) Polymorphisms in Wnt signaling pathway genes are significantly associated with chicken carcass traits. *Poultry Science*. 91(6): 1299-307.
  11. Mikels AJ and Nusse R (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*. 25(57): 7461-7468.
  12. Mousazadeh L, Shadparvar AA, ESkandarinasab MP (2011) Estimation of economic values for production and reproduction traits of Afshari sheep in rural system. *Journal of Animal Science Research*. 22(2): 35-44. (in Persian).
  13. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, Maixner W and Diatchenko L (2006) Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science*. 314(5807): 1930-3.
  14. Nusse R and Varmus H (2012) Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 12: 2670-2684.
  15. Rao T and Kühl M (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways: A prelude for more. *Circulation Research*. 106: 1798-1806.
  16. Van Camp JK, Zegers D, Verhulst SL, Van Hoorenbeeck K, Massa G, Verrijken A, Desager KN, Van Gaal LF, Van Hul W and Beckers S (2013) Mutation analysis of WNT10B in obese children, adolescents and adults. *Endocrine*. 44(1): 107-13.

افشاری- برولامرینو و زل همگی از نوع جهش یافته هموزیگوت (GG) بود. این تک‌شکلی ممکن است به دلیل تفاوت بین ژنوتیپ نژادهای دام‌های ایرانی و خارجی باشد. با توجه به نقش بالقوه این ژن در تمایز سلولی، الگودهی محوری، تکثیر و مهاجرت سلولی و ... ممکن است این تفاوت در ژنوتیپ‌ها منجر به تفاوت فنوتیپی هم شود که بررسی بیشتری را می‌طلبد.

### منابع

1. Aslanidi G, Kroutov V, Philipsberg G, Lamb K, Campbell-Thompson M, Walter GA, Kurenov S, Ignacio Aguirre J, Keller P, Hankenson K, Macdougald OA and Zolotukhin S (2007) Ectopic expression of Wnt10b decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*.
2. Baarsma HA, Königshoff M and Gosens R (2013) The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: Molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacology and Therapeutics* 138: 66-83.
3. Capon F, Allen MH, Ameen M, Burden AD, Tillman D, Barker JN and Trembath RC (2004) A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Human Molecular Genetics*. 13(20): 2361-8.
4. Cawthorn WP, Bree AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibañez G and MacDougald OA (2012) Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a  $\beta$ -catenin-dependent mechanism. *Bone*. 50(2): 477-89.
5. Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacciulli N, Sethi JK, Federspil G, Vidal-Puig A, Farooqi IS, O'Rahilly S and Vettor R (2006) WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia*. 49(4): 678-684.
6. Cristancho AG and Lazar MA (2011) Forming functional fat: a growing understanding of

بررسی چندشکلی ژنهای *Wnt10a* و *Wnt10b* در گوسفند آمیخته افشاری پرولامرینو

17. Williams JL (2008) Genetic control of meat quality traits. In: Toldra (ed.). Meat Biotechnology. PP: 21-61.
18. Zhao J, Zhang C, Fang X, Zhang H, Liu X, Li J, Liu Y, Yang D and Chen H (2012)

Polymorphisms of the bovine WNT10B gene and their associations with growth traits. Research in Veterinary Science. 93(3): 1301-6.



## Animal Production

(College of Abouraihan – University of Tehran)

Vol. 20 ■ No. 2 ■ Summer 2018

### Investigation of *Wnt10a* and *Wnt10b* genes polymorphism in Afshari × Booroola Merino crossbred sheep

Somayeh Zamani Afshar<sup>1</sup>, Taher harkinezhad<sup>2\*</sup>, Abbas Bahari<sup>3</sup>, Mohamad Hossein Shahir<sup>2</sup>

1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Associated professor, department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
3. Assistant professor, Institute of Modern biological Techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
4. Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

Received: January 22, 2017

Accepted: August 8, 2017

#### Abstract

Selection of live animals with minimum carcass fat in animal breeding programs will lead to increase in meat production at national level. The ligands of Wnt genes are of the effective factors in adipocyte cell differentiation. This study was aimed to assess the association between polymorphisms in *Wnt10a* and *Wnt10b* genes and carcass traits in 96 Afshari – Booroola Merino male lambs. In this study, DNA was extracted from blood samples using phenol-chloroform extraction method and polymerase chain reaction was performed for amplification a 663 bp fragment of exon III and a part of the second intron of *Wnt10a* gene and a 512 bp fragment of exon III *Wnt10b* gene. The results showed a polymorphism and three monomorphisms (a different allele compared to reference sequence of the gene) in the *Wnt10a* gene but all the sequences of the *Wnt10b* fragment were the same in studied region of the gene. Results of the sequencing lead to identification of four single nucleotide changes in *Wnt10a* gene in the studied area when compared to the reference sequence. One of the monomorphisms was in the intron and among other three nucleotide changes identified in exon III one was a missense in codon 139. After digestion with restriction enzymes *HpaII* at this codon, it was observed that all sampled lambs had mutant homozygous genotype compared to the reference sequence. This site was also evaluated in a number of Afshari (fat-tailed) and Zell (with the least fat tail) but again the same results were observed. Therefore, it seems that in this position the G is the wild type allele in the studied population.

**Keywords:** Afshari sheep, carcass traits, polymorphism, SNP, Wnt gene.