Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

توالی‌یابی ناحیه اگزون سوم ژن IGF1 در گوسفند

سعیده سجادی زرجانی[۱]، محمدرضا بحرینی بهزادی*[۲]، مجید فردایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

[۲] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

[۳] دانشیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰٦/۲۲

چکیده

فاکتور رشد شبه انسولین (IGF1) پپتیدی تک زنجیره با وزن مولکولی ۷/۵ کیلو دالتون است. این فاکتور دارای فعالیتی شبیه انسولین بوده و مهمترین فاکتور رشد در بدن می‌باشد که نقش مهمی در تکثیر، تمایز و رشد سلول‌ها دارد. ژن IGF1 در گوسفند روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد. این ژن بیشتر به عنوان یک ژن منتخب برای پیش‌بینی رشد و صفات کیفی گوشت در برنامه‌های بهبود ژنتیکی حیوانات مطرح است. هدف از این تحقیق، یافتن چندشکلی در ناحیه اگزون سوم ژن IGF1 در گوسفند بود. در این پژوهش از تعداد ۲۵ رأس گوسفندان نژاد مهربان، قره‌گل، قزل، لک‌قشقایی و بهمئی به طور تصادفی با تیوب های حاوی EDTA خونگیری شد. پس از استخراج DNA، ناحیه اگزون سوم توسط آغازگرهای اختصاصی با روش PCR تکثیر و تعیین توالی گردید. نتایج نشان داد که دو چندشکلی در اینترون دوم و سوم وجود دارد. همچنین ساختار پروتئین ژن IGF1 با استفاده از نرم افزار Swiss-pdb viewer و VMD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که این ژن دارای سطح بالایی از حفاظت‌شدگی تکاملی است و این پروتئین دارای ساختاری متشکل از مارپیچ‌های نامنظم آلفا می‌باشد.

کلمات کلیدی: *توالی‌یابی، چندشکلی، ژن IGF1، ساختار پروتئین، گوسفند.*

* نویسنده مسئول: محمدرضا بحرینی بهزادی تلفن: ۰۷٤۳۳۲۲٤۸٤۰ Email: bahreini@yu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

نگهداری و پرورش گوسفند در ایران به منظور تأمین گوشت، شیر، پوست و الیاف پشمی انجام می‌شود. به دلیل افزایش هزینه‌های نگهداری و ادامه خشکسالی، پرورش گوسفند دچار مشکلاتی شده است. در سال‌های اخیر مطالعه ژن‌های منتخب که در تکامل و فیزیولوژی صفات مرتبط نقش دارند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. ژن IGF1 برای صفات رشد و تولید گوشت در پستانداران یک ژن منتخب محسوب می‌شود و نقش مهمی در تمایز و رشد غدد پستان ایفا می‌کند (Ghail *et al.*, 1991). مهم‌ترین سیستم هورمونی در بدن محور سوماتوتروپیک می‌باشد که تنظیم متابولیسم و فرآیندهای فیزیولوژیکی مرتبط با رشد را کنترل می‌کند. این سیستم شامل هورمون رشد و IGFs می‌باشد. IGFs شامل IGF1، IGF2 و گیرنده‌های IGFs و IGFBPs است. هورمون رشد مستقیماً موجب رشد نمی‌شود بلکه کبد را تحریک می‌کند تا ترکیبی میانجی بسازد که به خون وارد می‌شود و این ترکیب است که موجب فعال شدن غضروف و احتمالاً دیگر فرآیندهای وابسته به هورمون رشد می‌شود که این ترکیب را سوماتومدین (میانجی سوماتوتروپین) نامگذاری کردند (Abdolmohammadi *et al.*, 2008). IGF1 دارای ۷۰ اسیدآمینه و IGF2 ٦۷ اسیدآمینه دارد. IGF1 از نظر ساختمانی ٤۹ درصد و IGF2 ٤۷ درصد با انسولین تشابه دارند. توالی‌های اسیدآمینه در این فاکتورها ٦۲ درصد مشابه می‌باشد (Minghui *et al.*, 2007).

فاکتورهای رشد شبه انسولین فعالیتی شبیه انسولین در بدن دارند (Froesch *et al.*, 1963). این فاکتورها در مایعات بیولوژیکی به صورت نرمال با یکی از ٦ پروتئین اختصاصی باند و در خون حمل می‌شوند و با دو مکانیسم افزاینده و محدود کننده در فعالیت‌های بیولوژیکی دخالت و نیمه عمر آن را طولانی‌تر می‌کنند. IGFBP-3 با وزن مولکولی ۵۳ کیلو دالتون فراوان‌ترین نوع آن‌ها می‌باشد (Minghui *et al.*, 2007). فاکتورهای رشد شبه انسولین در بافت‌های مختلف بدن طی دوره‌های متفاوت سنتز می‌شوند اما حدود ۹۰ درصد منبع اصلی تولید آن‌ها در بافت کبد می‌باشد (Minghui *et al.*, 2007). IGF1 بیشتر در کبد و پس از آن در بافت‌های کلیه و قلب و به میزان کمتر در ماهیچه‌های اسکلتی بیان می‌شود (Giulietti *et al.*, 2001). فاکتورهای رشد شبه انسولین از طریق چرخه سلولی رشد و تکثیر سلول‌ها را به دو صورت اتوکراین و پاراکراین کنترل می‌کنند. IGFs هایپرتروفی سلولی که لازمه بقای سلول‌ها می‌باشد را افزایش می‌دهد (Minghui *et al.*, 2007). ژن IGF1 در گوسفند دارای شش اگزون می‌باشد و پپتید بالغ آن توسط اگزون سوم و چهارم رمز می‌شود (Pell *et al.*, 1993). این ژن در گوسفند روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد (Ghail *et al.*, 1991). IGF1 در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها نقش داشته و عامل افزایش دهنده جذب گلوکز در

www.SID.ir

Archive of SID

بافت‌های محیطی بوده که سبب تحریک ساخت گلیکوژن شده و با افزایش جذب اسیدآمینه، منجر به ساخت پروتئین می‌شود. این ژن در سنتز RNA و DNA نیز دخالت می‌کند (Dela Rosa Reyna, 2010). این ژن در تکثیر و تمایز سلول-ها، رشد جنین، رشد پس از تولد و اندام‌زائی در پستانداران نقش عمده‌ای دارد. این ژن با صفات رشد مرتبط بوده و دارای دو نوع گیرنده روی سطح سلول‌ها می‌باشد (Baxter, 1988). اولین بار تاثیر هورمون رشد روی عملکرد گونادهای موش نر گزارش شد (Lackey *et al.*, 1999). توالی اسیدآمینه‌ای نوع ۱ این ژن در انسان، گاو، سگ و خوک توسط (Nixon *et al.*, 1999) شناسایی شد. ژن IGF1 در گاو روی کروموزم شماره ۵ قرار دارد (Miller *et al.*, 1998). همچنین در پژوهشی همبستگی میان ژن IGF1 و نرخ رشد در میان دو نژاد هلشتاین و سیمنتال گزارش شد (Schlee *et al.*, 1994). در پژوهشی دیگر مشخص شد که در ناحیه ´۵ کناری این ژن و ۵۱۲ جفت قبل از اولین کدون اگزون اول یک جایگزینی نوکلئوتید T با C اتفاق افتاده است. همچنین یک نشانگر ریز ماهواره نیز در این ناحیه تعیین شد که در گاوهای گوشتی با صفات وزن از شیرگیری و وزن تولد در ارتباط است (Ge *et al.*, 2001). گزارش شده است که چند شکلی در ژن IGF1 با نرخ رشد و صفات کیفی گوشت در گاو همبستگی دارد (Kirkpatrick *et al.*, 1993). ارتباط چندشکلی‌ها در گیرنده نوع یک این ژن با طول عمر در تعدادی از گونه‌ها بیان شده است (Braeckman & Vanfleteren., 2006). گزارش های مشابهی نیز در انسان و موش ارائه گردیده است (Suh *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2003). در پژوهشی وجود دو چندشکلی از این ژن در نژاد گاوهای نروژی مشخص و بیان شد که این چند شکلی‌ها با نرخ رشد همبستگی دارد (Lien *et al.*, 2000). چندشکلی در گیرنده نوع یک این ژن با طول عمر در گوسفند ارتباط دارد (Byun *et al.*, 2012). فقدان IGF1 در دوران جنینی منجر به ناهنجاری‌های شدید رشد و نمو در گاوهای هلشتاین می‌شود و چند شکلی‌ها در گیرنده این ژن با صفات تولیدی شیر و گوشت در این گاوها همبستگی دارد (Siadkowska *et al.*, 2006). ژن IGF1 به عنوان یک ژن منتخب جهت پیش‌بینی رشد، ترکیب بدنی و صفات متابولیکی در جوجه‌های گوشتی مطرح شده و نشان داده شده است که چند شکلی‌های این ژن با صفات فنوتیپی در این گونه ارتباط دارد (Kadlec *et al.*, 2011). این ژن نقش کلیدی بسیار مهمی در انقباضات ماهیچه‌ای ایفا می‌کند و همبستگی بین این ژن با رشد جنین و زنده‌مانی در گونه‌ای از ماهیان نیز نشان داده شده است (Renteria *et al.*, 2008). اثر معنی‌دار ژن IGF1 در گاوهای آنگوس و شارولە بر چربی پشت، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک مشخص شده است (Sherman *et al.*, 2008). اثر معنی‌دار چندشکلی در ناحیه پروموتر این ژن روی وزن بدن در گوسفند گزارش شده است (Thomas *et al.*, 2007).

www.SID.ir

Archive of SID

در پژوهشی ارتباط چند شکلی‌های ژن IGF1 با تعداد فرزند در هر زایش مورد مطالعه قرار گرفت و با تکنیک SSCP چند شکلی‌های این ژن تعیین گردید. نتایج نشان دهنده وجود دو SNP در ناحیه تنظیمی این ژن برای گوسفندان نژاد تکسل، دورست و Small Tail Han بود و هیچ گونه چندشکلی در اگزون‌های این ژن یافت نشد. میش‌های نژاد Small Tail Han با ژنوتیپ BB یا AB تعداد بره‌های بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA داشتند. ژن IGF1 در باروری پستانداران نقش اساسی داشته و همچنین نقش تنظیمی مهمی در بسیاری از هورمون‌های مرتبط با تولید مثل دارد. نتایج پژوهش این محققین نشان داد که ژن IGF1 به عنوان یک نشانگر مولکولی قوی می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژاد مورد استفاده قرار گیرد (Zhang *et al.*, 2014). اثر معنی‌دار ژن IGF1 بر افزایش وزن روزانه در گوسفندان بلوچی از تولد تا سه ماهگی گزارش شده و همچنین استفاده از اطلاعات این ژن در شاخص انتخاب گوسفند بلوچی نیز پیشنهاد شده است (Tahmoorespur *et al.*, 2008). در پژوهشی با بکار بردن تکنیک SSCP چندشکلی‌های ناحیه اگزون ٤ ژن IGF1 در گوسفندان نژاد زل مورد بررسی قرار گرفت. ۳ الگوی باندی متفاوت در این جایگاه شناسائی و ارتباط معنی‌داری بین این الگوها با صفات لاشه و ضخامت چربی پشت گزارش شده است. این الگوهای ژنوتیپی متفاوت بیانگر وجود جهش‌های تک نوکلئوتیدی است که سبب بروز تفاوت‌های ژنتیکی در نژاد زل شده است (Ghazikhani shad *et al.*,2013). ارتباط چندشکلی ژن IGF1 با ارزش اصلاحی صفات رشد در گوسفند ماکوئی مطالعه شده است. در این پژوهش با استفاده از تکنیک SSCP چندشکلی‌های این ژن تعیین شد. با توجه به اثر معنی دار ژن IGF1 با صفات رشد از آن به عنوان یک شاخص در انتخاب گوسفندان بلوچی حداقل برای دوره اول رشد نام برده شده است (Haji hosseinlu *et al.*, 2011). در پژوهشی دیگر با استفاده از تکنیک SSCP چند شکلی ژن IGF1 در گوسفندان نژاد زل و لری بختیاری مطالعه شد. نتایج وجود تنوع در ناحیه کناری ´۵ این ژن را نشان داد و استنباط گردید که جهش‌های تک نوکلئوتیدی سبب بروز تفاوت‌های ژنتیکی بین این نژادها شده است. رابطه بین این ژن با تعادل انرژی، صفات تولیدی و تولیدمثلی این پتانسیل را ایجاد می‌کند که به عنوان ابزاری مناسب در برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریتی دام‌ها مورد توجه قرار گیرد. بنابراین برای بهبود راندمان تبدیل غذا در گوسفند، انتخاب برای ژن فاکتور رشد شبه انسولین با موفقیت انجام گرفته است (Honrvar *et al.*, 2012).

با توجه به نقش کلیدی ژن IGF1 در صفات رشد و تولید گوشت و از آنجائی که پپتید بالغ این ژن توسط اگزون سوم و چهارم رمز می‌شود (Pell *et al.*, 1993)، توالی‌یابی اگزون سوم این ژن در ۵ نژاد گوسفند مورد بررسی قرار

www.SID.ir

Archive of SID

گرفت و چندشکلی‌های موجود در این ناحیه تعیین گردید.

مواد و روش‌ها

از ۲۵ رأس گوسفند متعلق به ۵ نژاد هرکدام به تعداد ۵ رأس شامل نژادهای قزل، مهربان، لک‌قشقایی، بهمئی و قره‌گل، ۱ میلی لیتر نمونه خون در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA از آن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA توسط کیت سینا ژن استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دو روش Nano Drop و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد. آغازگرهای ژن IGF1 بر اساس توالی ژنوم با شماره دسترسی NC_019460.1 طراحی گردید. جهت طراحی آغازگر از برنامه Primer 3 و Primer Blast موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI استفاده شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی-مراز (PCR) در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. توالی آغازگرهای طراحی شده به صورت زیر بود:

Forward:
5'GGGTCAAGAGTTGTCGGAG 3'
Reverse:
5'GACCCTATGAGCCAGAAGTC **3**'

مراحل انجام PCR شامل دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، دناتوراسیون کامل در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و سنتز پایانی با دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. تعداد ۳۵ سیکل نیز در این پژوهش در نظر گرفته شد. پس از انجام PCR، محصولات حاصل شده روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۷۵ به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز شدند و سپس با دستگاه Ultra Violet transillumination مورد بررسی قرار گرفتند و با کمک نشانگر (100bp Ladder) اندازه محصول PCR مورد نظر مشخص شد. از هر نژاد یک نمونه و در مجموع تعداد ۵ نمونه از فرآورده‌های PCR بر اساس آغازگر برگشت جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. نتیجه تعیین توالی در این نژادها با توالی مرجع ژن IGF1(NC_019460.1) در سایت NCBI به منظور تعیین چندشکلی‌های احتمالی در این نواحی بررسی و مقایسه شدند. جهت تجزیه و تحلیل توالی‌های بدست آمده از نرم افزارهای BioEdit (version 7.05) و برنامه workbench clc main 5.5 استفاده شد. به منظور بررسی ساختار سه بعدی پروتئین کد شده توسط این ژن ابتدا توالی‌های پروتئینی ژن IGF1 در گوسفند (NP_001009774.1) و سایر گونه‌ها شامل گاو (NP_001071296.1)، بز (NP_001272626.1)، اسب (NP_001075967.1) و مرغ (NP_001004384.1) از بانک اطلاعاتی NCBI بازیابی شد سپس این توالی‌ها توسط برنامه Clustal w موجود در نرم افزار BioEdit (version 7.05) هم‌تراز شدند و در نهایت با

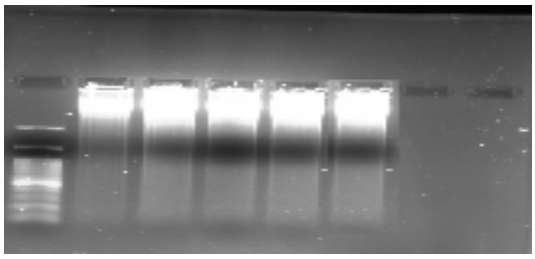
www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از نرم افزار Swiss-pdb viewer ساختار سه بعدی پروتئین این ژن تعیین شد. برای بررسی این ساختار از روش de novo استفاده گردید. در این روش بر مبنای تعداد اسیدآمینه‌های درگیر در تشکیل ساختار پروتئین مورد نظر، ساختار ثانویه پروتئین IGF1 نیز تعیین شد. برای مشخص کردن راست‌گرد یا چپ‌گرد بودن پروتئین مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار VMD، نمودار راماچاندارن پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Mega5 با ۱۰۰۰ تکرار به روش آماری بوت استراپ انجام و درخت فیلوژنی رسم شد.

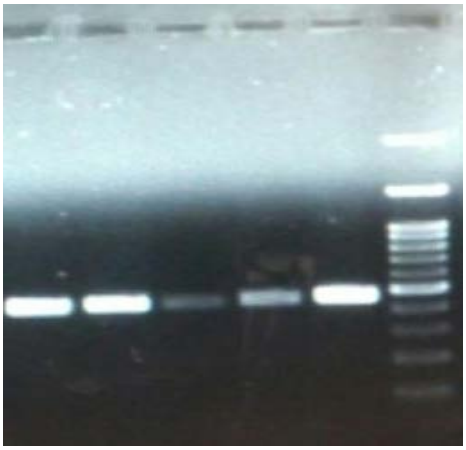
نتایج

پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA (شکل ۱) با استفاده از پرایمرهای طراحی شده یک قطعه ٤٦٨ جفت بازی از اگزون سوم به همراه بخش-هایی از اینترون ژن IGF1 بوسیله واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد (شکل ۲).



شکل ۱- DNA روی ژل یک درصد آگارز.

Figure1- DNA on Agarose gel 1%.



شکل ۲- قطعه ٤٦٨ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن IGF1 روی ژل آگارز.

Figure2- Agarose gel electrophoresis examination of amplification [ ] bp of IGF1.

تعداد ۵ نمونه جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. هم‌ردیف‌سازی نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم افزار BioEdit (version 7.05) و برنامه clc mainworkbench

www.SID.ir

Archive of SID

5.5 و مقایسه آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن هیچ‌گونه تفاوت نوکلئوتیدی را بین ۵ نژاد گوسفند نشان نداد. به منظور اطمینان از این نتایج، توالی‌های مربوطه دوباره برای تعیین توالی به شرکت نامبرده فرستاده شد و نتایج مورد تائید قرار گرفت. نتیجه تعیین توالی نمونه‌ها با آغازگر برگشت، وجود دو چندشکلی در نواحی اینترون ۲ و ۳ اطراف این اگزون بود. SNP اول ٤٧ نوکلئوتید قبل از شروع اگزون سوم واقع شده است که در این مکان نوکلئوتید C جایگزین A شده و توالی نوکلئوتیدی اطراف این SNP به صورت

۵'...CAGTGAACAC/GCCTATTATC...۳'

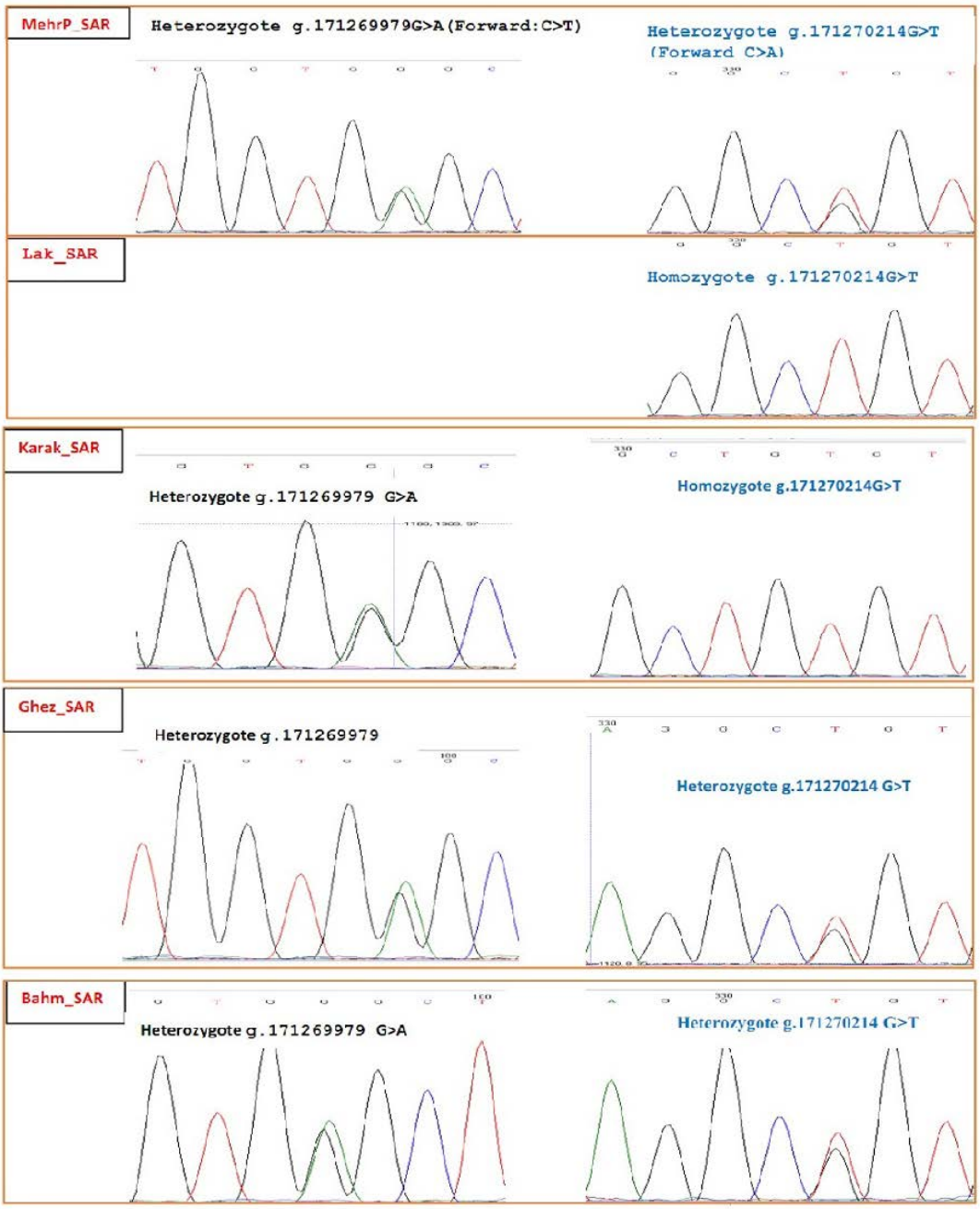
است و باعث ایجاد ژنوتیپ هتروزیگوت در تمام نژادها شده است. SNP دوم ۷ نوکلئوتید بعد از شروع اگزون سوم واقع شده است. این SNP نسبت به SNP اول در فاصله نزدیکتری به اگزون سوم اتفاق افتاده است. در این مکان نوکلئوتید C جایگزین T شده و توالی نوکلئوتیدی اطراف این SNP به صورت ۵'.GTAAGC/CACCAG.۳' می‌باشد و در نهایت باعث ایجاد ژنوتیپ هتروزیگوت در نژادهای مهربان، قزل و بهمئی و ژنوتیپ هموزیگوت در نژادهای لک‌قشقایی و قره‌گل شده است (شکل ۳).

این جهش‌ها در نواحی اینترون یعنی نواحی غیرکدکننده این ژن واقع شده است. به طور کلی تعداد قابل توجهی از جهش‌ها در اینترون‌ها که تعداد نوکلئوتید بیشتری دارند رخ می‌دهد. اینترون‌ها در پردازش متناوب نقش دارند و در فرایند پردازش متناوب از یک ژن محصولات مختلفی ایجاد می‌شود. هیچ‌گونه جهشی در توالی اگزون سوم ژن IGF1 برای ۵ نژاد گوسفند مورد مطالعه یافت نشد و نتایج این پژوهش با دستاوردهای (Zhang *et al.*, 2014) مطابقت داشت. آن‌ها با بکار بردن تکنیک SSCP چند شکلی‌های ژن IGF1 را در چندین نژاد گوسفند بررسی کردند و هیچ گونه چندشکلی در اگزون سوم این ژن مشاهده نکردند.

توالی اگزون سوم ژن IGF1 در گوسفند دارای ۱۸۲ نوکلئوتید می‌باشد که به ٦۰ اسید آمینه ترجمه می‌شود. در شکل ٤ توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به این اگزون به صورت رمزهای سه‌تائی نشان داده شده و اسیدهای آمینه کدشونده توسط آن‌ها نیز مشخص شده است. مقایسه نوکلئوتیدهای توالی اگزون سوم در گوسفندان بومی ایران (۵ نژاد گوسفند مورد مطالعه) و توالی مربوط به نژاد تکسل در سایت NCBI با شماره دسترسی (NC_019460.1) هیچ گونه تفاوتی را نشان نداد و این نتیجه بیانگر این است که توالی کدکننده این ژن در نواحی اگزون سوم به شدت در طول تکامل حفظ شده است. همچنین همه این نژادها تقریباً دارای تغییرات مشابه در ژنوم در ناحیه اینترون ۲ و ۳ ژن IGF1 خود می باشند که متفاوت از توالی مرجع می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ – مقایسه گراف‌های حاصل از توالی یابی اگزون ۳ ژن IGF1 در نژادهای مهربان (Mehr)، قره‌گل(Karak)، قزل(Ghez)، بهمئی(Bahm) و لک‌قشقایی (Lak).

Figure3- Comparison of the Graph of sequencing in 5 breeds include (Mehr, Karak, Ghez, Bahm and Lak).

www.SID.ir

Archive of SID

به دلیل اهمیت توالی‌های پروتئینی، توالی-های DNA در سایت ExPASy - Translate tool به اسیدآمینه ترجمه شدند. مقایسه اسیدهای آمینه هیچ گونه تفاوتی در توالی کدکننده پروتئین نشان ندادند و این نتیجه نشان داد که این ناحیه طی تکامل کاملاً حفاظت[1] شده است (شکل۵). به منظور مقایسه توالی‌های اسید آمینه این ژن با سایر گونه‌ها، ابتدا توالی‌های اسید آمینه ژن IGF1 با استفاده از نرم افزار BioEdit (version 7.05) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد در اسیدهای‌آمینه کد شونده از اگزون سوم در گوسفند نسبت به سایر گونه‌ها دو تفاوت وجود دارد که اسید آمینه آلانین جایگزین پرولین و اسید آمینه سرین جایگزین ترئونین شده است (شکل ٦).

در پژوهشی توالی‌های ژن IGF1 در جنین و گوسفندان بالغ مطالعه شد. نتایج نشان داد فاکتورهای رشد شبه انسولین از نظر ساختمان و فعالیت در گوسفند به انسان و گاو شباهت دارند. تفاوت مشاهده شده در توالی ژن IGF1 گوسفند جایگزینی اسید آمینه آلانین بجای پرولین در انسان و گاو می‌باشد و این تغییر اثر معنی‌داری روی فعالیت بیولوژیکی فاکتورهای رشد در این گونه نداشت (Geoffrey *et al.*,1989).

ارزیابی ساختار سه بعدی پروتئین ژن IGF1 نشان داد که این ژن دارای سطح بالایی از حفاظت‌شدگی تکاملی در میان گونه‌های مورد مطالعه است. نتایج حاصل از مقایسه هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی نشان داد که این توالی‌ها از نظر اسید آمینه لیزین و آرژنین کاملاً حفاظت شده هستند و در تمامی ساختارهای مورد بررسی این دو اسید آمینه در جایگاه فعال پروتئین، بدون هیچ تغییری در تمامی گونه‌ها بودند. بنابراین ژن کد کننده IGF1 بسیار حفاظت شده است که این نشان دهنده نقش پر اهمیت IGF1 می‌باشد. بررسی ساختار دوم نیز نشان داد که این ژن دارای مارپیچ آلفای بیشتری می‌باشد. این ژن دارای ۸ عدد مارپیچ آلفا می‌باشد (شکل ۷). مارپیچ آلفا وقتی در پروتئین ظاهر می‌شود که دریک قطعه از توالی همگی زوایای فی و سای ۵۰- و ٦۰- داشته باشند. ارزیابی این زوایا با استفاده از نرم-افزار VMD مشخص کرد که پروتئین مورد نظر راست‌گرد می‌باشد.

شکل ۸ ارتباطات تکاملی ژن IGF-1 با استفاده از روش‌های فیلوژنتیک را در ۵ گونه نشان می‌دهد. با استفاده از روش‌های فیلوژنتیکی، روابط تکاملی بین توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن به منظور تعیین تاریخ تکاملی گونه‌های مورد مطالعه استخراج شد. انطباق تمام توالی‌های ژنی در این گونه‌ها انجام شد. دو گونه ی گوسفند و بز با هم گروه‌بندی شدند. در دومین گروه از این درخت گاو توسط یک شاخه کوتاه با گونه گوسفند و بز گروه‌بندی شد. گونه مرغ نیز با یک شاخه بلند از بقیه گونه‌ها جدا گردید.

[1] conserve

www.SID.ir

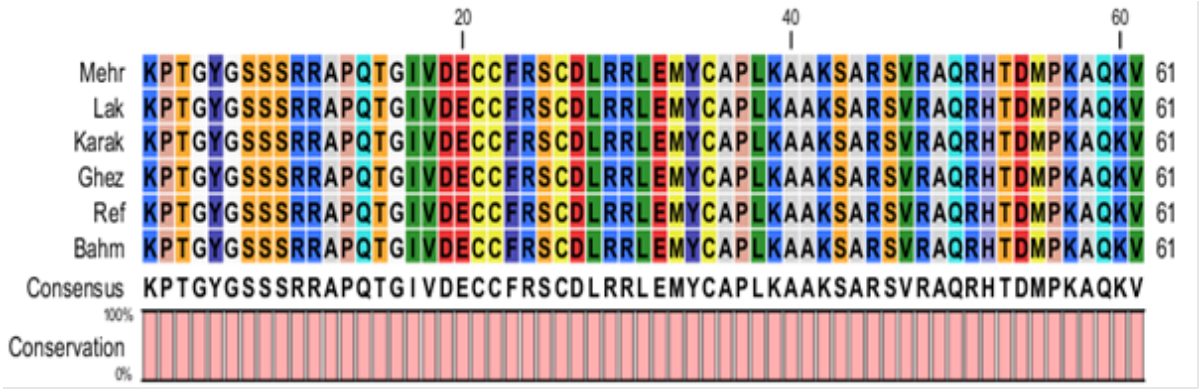
Archive of SID

با توجه به نقش کلیدی ژن IGF1 با رشد و صفات تولیدی و تولید مثلی، این ژن می‌تواند به عنوان ابزاری مناسب در برنامه‌های اصلاح نژادی و مدیریتی دام‌ها مورد توجه قرار گیرد. اگرچه این چندشکلی‌ها در نواحی اینترون واقع شده و ممکن است بر صفات اقتصادی تاثیرگذار نباشد اما بررسی این چندشکلی‌ها می‌تواند سبب بهبود نقشه نشانگری در گوسفند جهت نقشه‌یابی QTLهای موثر بر صفات اقتصادی در این صنعت شود. از آنجا که ممکن است یک بیماری را بتوان به حالت خاصی از چندشکلی‌ها نسبت داد لذا آنالیز چند شکلی‌های این ژن می‌تواند کمک شایانی به حل این مسئله نیز نماید.

```
AC  AAG CCC ACG GGG TAC GGC TCG AGC AGT CGG AGG GCG CCC CAG ACA GGA ATC GTG GAT GAG TGC TGC TTC
    K   P   T   G   Y   G   S   S   S   R   R   A   P   Q   T   G   I   V   D   E   C   C   F
CGG AGC TGT GAT CTG AGG AGG CTG GAG ATG TAC TGT GCG CCT CTC AAG GCC GCC AAG TCG GCC CGC TCA GTC
R   S   C   D   L   R   R   L   E   M   Y   C   A   P   L   K   A   A   K   S   A   R   S   V
CGT GCC CAG CGC CAC ACC GAC ATG CCC AAG GCT CAG AAG
R   A   Q   R   H   T   D   M   P   K   A   Q   K
```

شکل ٤- توالی اگزون سوم و اسیدهای آمینه مربوط به آن.

Figure4- Sequence of third exon and their amino acid.

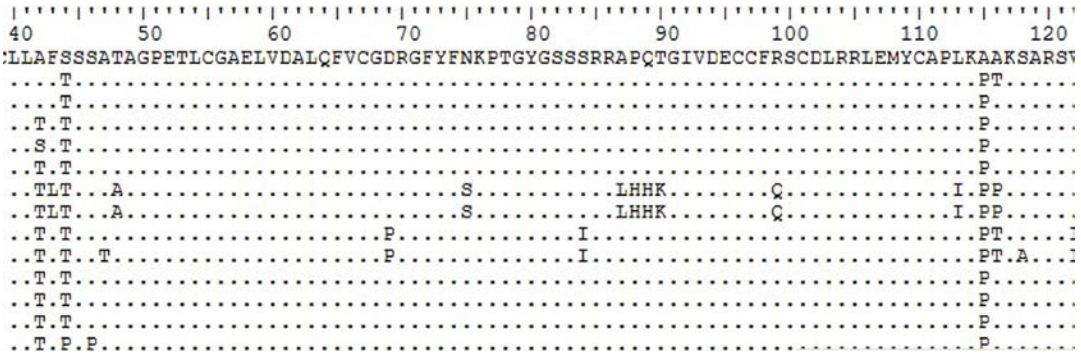


شکل ٥- هم‌ترازی اسیدهای آمینه کد شده از اگزون سوم با استفاده از نرم افزار clc main workbench 5.5.

Figure5- Allignment of the amino acid of third exon with using clc main workbench 5.5 software.

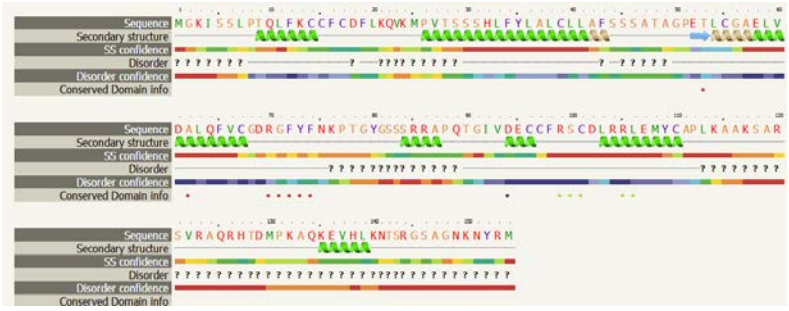
www.SID.ir

Archive of SID



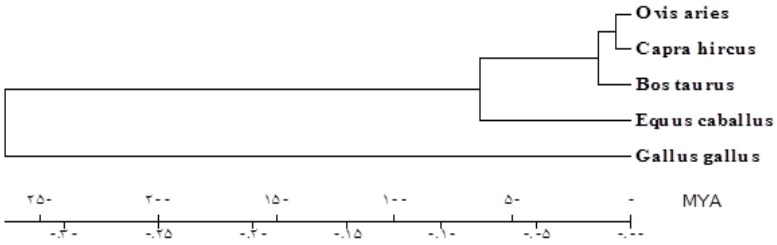
شکل ٦- مقایسه اسیدهای آمینه در ۱۵ گونه با استفاده از نرم افزار **BioEdit (version 7.05)**.

Figure 6- Comparison of the amino acid in 15 species with using BioEdit (version 7.05) software.



شکل ۷- ساختار ثانویه پروتئین ژن **IGF1**.

Figure 7- Protein secondary structure of IGF1 gene.



شکل ۸ – درخت فیلوژنی در پنج گونه دام اهلی.

Figure 8- Phylogenetic tree in the five species.

منابع

Abdolmohammadi A, Moradi Shahrbabak M, Mehrabani Yeganeh H (2008). Study of Genetic Variation for Four Candidate Genes Using PCR-RFLP and HRM and Their Association with Reproduction and Production Trait in Holstein Cows of Iran. Thesis of Ph.D. University of Tehran (in Farsi).

Baxter RC (1988). The Insulin-like Growth Factor and Their Bindings Proteins. Comparative Biochemistry and Physiology 91: 229-235.

Braeckman BP, Vanfleteren JR (2006). Genetic control of longevity in *C. elegans*. Experimental Grontology 42: 90-98.

www.SID.ir

Archive of SID

Byun SO, Forrest RH, Frampton CM, Zhou H, Hickford JG (2012). An association between lifespan and variation in insulin-like growth factor 1 receptor in sheep. American Society Journal of Animal Science 90: 2484-2487.

Dela Rosa Reyna XF, Montoya HM, Castrellón VV, Rincón AMS, Bracamonte MP, Vera WA (2010). Polymorphisms in the IGF-1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. Genetics and Molecular Research. 9: 875-883.

Froesch ER, H Bürgi, Ramseier EB, Bally P, Labhart A (1963). Antibody suppressible and NonSuppressible insulin like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. The Journal of Clinical Investigation 42: 1816-1843.

Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RC (2001). Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. Journal of Animal Science 79: 1757-1762.

Geoffrey L F, Kerrie A M, John C W, John Ballard f, Owens PC (1989). Sheep Insulin- Like Growth Factors I and II: Sequences, Activities and Assays. Endocrinology 124: 1173-1183.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. Methods 25: 386–401.

Ghail MI, Saidi Mehtar N, Guerin G (1991). Sheep gene mapping: Additional DNA Markers included (CASB, CASK, LALBA, IGF- I and AMH). Animal Genetics 22: 165-172.

Ghazikhani-shad A, Moradisharebabk H, Sadeghi M, Faraji R (1392). Genetic analysis of the 4th of IGF1 gene and its association with fatty acids and metabolites in blood and carcass traits in Zell sheep. Journal of Animal Science 12: 51-61 (in Farsi).

Hajihosseinlu A, Pirani N, Hashmi A, Fylkushmoghdam F, Jafari Sh (1390). Investigation of IGF1 of polymorphism by using of PCR-SSCP in Makuyi sheep. The first national conference on the role of biotechnology in animal science. Isfahan University of technology (in Farsi).

Honarvar M, Moradi-Shahrebabak H, Sadeghi M, Behzadi Sh, Mohamadabadi MR (1391). Study of the polymorphism at the 5' flanking region of the ovine IGF-I Gene and its association with carcass traits in Zel (tailed) and Lori-Bakhtiari (fat-tailed) breed sheep using PCR-SSCP. Journal of Agricultural Biotechnology. 4: 103-115 (in Farsi).

Kadlec J, Hosnedlova B, Rehout V, Cítek J, Vecerek L, Hanusova L (2011). Insulin-like growth factor-1 gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. Journal of Agrobiology 28: 157-163.

Kirkpatrick BW (1993). Diallelic single-strand conformation polymorphism in the bovine insulin-like growth factor-1 third intron. Animal Genetics 24-144.

Lackey BR, Gray SL, Henricks DM (1999). The insulin-like growth Factor (IGF) system and gonadotropin regulation: actions and interactions. Cytokine .and Growth Factor Reviews 10: 201-217.

Liang H, Masoro EJ, Nelson JF, Strong R, McMahan CA, Richardson A (2003). Genetic mouse models of extended lifespan. Experimental Gerontology 38: 1353-1364.

Lien S, Karlsen A, Klemetsdal G, Vage DI, Olsaker I, Klungland H, Aasland M, Heringstad B, Ruane J, Gomez Rayal L (2000). A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting twinning rate. Mammalian Genome 11: 877-882.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA form human nucleated cells. Oxford Journals, Life Sciences Nucleic Acids Research 16: 1215.

Minghui X, Yuqing Y, Linshan Z, Hongjie Z (2007). Progress in the Research of Insulin-Like Growth Factors and the Binding Proteins. Nature and Science 5:82-86.

www.SID.ir

Archive of SID

Nixon AJ, Brower Toland BD, Sandell LJ (1999). Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulin-like growth factor 1 and their gene expression patterns in tissues. American Journal of Veterinary Research 60: 1234-1241.

Pell JM, Saunders JC, Gilmour RS (1993). Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep 132: 1797-1807.

Rentería ME, Gandhi NS, Vinuesa P, Helmerhorst E, Mancera RL (2008). A comparative structural bioinformatics analysis of the insulin receptor family ectodomain based on phylogenetic information. Center for Genomic Regulation 3: 3667.

Salmon WD Jr, Daughaday WH (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 49:825-836.

Schlee p, Graml R, Schallenberger E, Schams D, Rotmann O, Olbrich bludau A, Pirchner F (1994). Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. Theoretical and Applied Genetic 497-500.

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, Moore SS (2008). Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. Journal of Animal Science 86: 1 -16.

Siadkowska E, Zwierzchowski L, Oprządek J, Strzałkowska N, Bagnicka E, Krzyżewski J (2006). Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Animal Science Papers and Report 225-237.

Suh Y, Atzmon G, Cho MO, Hwang D, Liu B, Leahy DJ, Barzilai N, Cohen P (2008). Functionally significant insulin-like growth factor 1 receptor mutation in centenarins. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 3438-3442.

Thomas MG, Enns RM, Shirley KL, Garcia MD, Garrett AJ, Silver GA (2007). Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. Genetics and Molecular Research 6: 222-237.

Tahmoorespur M, Vafaye Valeh, Nasiry M, mousavi A, Ansary M (2009). Association of the polymorphism in the 5' flanking region of the ovine IGF-1 gene with growth traits in the Baluchi sheep. South African Journal of Animal Science, 39 (Supplement 1) 97-101.

Zhang Q, Gong J, Wang X, Wu X, Li Y, Ma Y, Zhang Y, Zhao X (2014). Molecular cloning, Bioinformatics Analysis and Expression of Insulin-Like Growth Factor 2 from Tianzhu White Yak, Bos grunniens. International Journal of Molecular Sciences 15: 504-524.

www.SID.ir

Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۷، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤)

Sequencing of third exon of IGF1 gene in sheep

Sajadi Zarjani S.[1], Bahreini Behzadi M.R.[*2], Fardaei M.[3]

[1] M.Sc. Student of Animal Breeding, College of Agriculture, Yasouj University.
[2] Assistant Professor of Animal Breeding and Genetics, College of Agriculture, Yasouj University.
[3] Associated Professor of Human Genetics, College of Medicine, Shiraz University.

Abstract

Insulin-like growth factor is a single-chain polypeptide. The Molecular weight of it is 7.5 KDa. This factor is insulin like activity and the most important growth factor in the body and plays important role in the proliferation, differentiation and cells growth. IGF1 gene located on chromosome 3 in sheep. This gene is more proposed as a candida gene for growth and meat quality traits in animal genetic improvement programs. The aim of this research is to find Polymorphisms in the third exon. In this research blood samples of breeds of 25 sheep include Mehraban, Karakul, Ghezel, Lak Ghashghaei and Bahmaei were collected with EDTA tube. The DNA was extracted from blood samples and the third exon region was amplified with specific primers using PCR and sequencing. The results showed, there is 2 SNP in intron 2 and 3. Protein structure of IGF1 gene is investigated by using Swiss-pdb viewer software. Protein structure analysis showed that this protein is highly conserved of evolution. This protein has a structure consisting of an alpha helix with irregular structure.

Keywords: *Sequencing, Polymorphism, IGF1 gene, Protein structure, Sheep.*

[*] Corresponding Author: Bahreini Behzadi M.R. Tel: 07433224840 Email: bahreini@yu.ac.ir

www.SID.ir