Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

بررسی تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMT در گاوهای نژاد هلشتاین با تکنیک PCR-SSCP

مهدی وفای واله[1] و سجاد شهدادی ساردو[2]

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسوول: mehdi.valleh@uoz.ac.ir)
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۳
صفحه: ۱۰۴ تا ۱۱۲

چکیده

ژن‌های خانواده DNA متیل‌ترانسفراز (DNMTs) بواسطه نقش کلیدی در شکل‌گیری و ابقاء الگوهای اپی‌ژنتیکی، اهمیت بالایی در کنترل تکوین و رشد و نمو جنینی از مرحله لقاح تا دوران پس از تولد دارند. مطالعه حاضر به‌منظور شناسایی جهش‌های بالقوه در اگزون ۳۳ ژن DNMT-1، اینترون ٤ ژن DNMT-3a و اینترون ۳ ژن DNMT-3b و ارتباط آن‌ها با وزن تولد در گاوهای نژاد هلشتاین صورت گرفت. خونگیری به‌طور تصادفی از تعداد ٦۰ رأس گاو هلشتاین دارای رکورد وزن تولد تا بلوغ از یک گاوداری صنعتی در استان کرمان انجام شد. استخراج نمونه‌های DNA با استفاده از روش فنل‌کلروفرم انجام گرفت و جایگاه‌های هدف با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شدند. به‌منظور ردیابی چندشکلی در توالی‌های هدف از تکنیک چندشکلی ساختار فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) و رنگ‌آمیزی با نیترات‌نقره استفاده شد. نتایج این مطالعه حاکی از عدم وقوع جهش در تمامی جایگاه‌های مورد مطالعه بود، بطوریکه در تمام نمونه‌های مورد بررسی، بر اساس اندازه قطعه مورد بررسی، الگوی باندی یکسانی شناسائی شد. عدم شناسائی وجود چندشکلی در نواحی مورد بررسی، احتمالاً ممکن است به‌دلایلی نظیر ناکارآمدی نسبی تکنیک PCR-SSCP در شناسائی جهش‌ها، کوچک‌بودن اندازه نمونه‌های مورد بررسی، پیامدهای تصادفی ناشی از رانش ژنی و یا تاثیر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در نواحی مزبور باشد. بنابراین، نواحی ژنی مورد بررسی در این تحقیق به‌عنوان نشانگر مولکولی برای ارزیابی صفت وزن تولد در گاوهای هلشتاین فاقد کارائی هستند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، DNMTs، گاو هلشتاین ایران، PCR-SSCP

مقدمه

با وجود یکسان‌بودن توالی ژنومی در سلول اولیه تخم و سلول‌های مختلف حاصل از آن، تنوع الگوی بیان ژنی در این سلول‌ها، پایه و اساس فرآیند تکوین است که با تغییر تدریجی الگوی اپی‌ژنتیکی سلول‌ها در طی مراحل جنین‌زایی شکل می‌گیرد (۸،۱۲،۳۵). از جمله تغییرات اپی‌ژنتیکی که در سلول‌های تمایزیافته به‌طور پایداری قابلیت توارث دارد فرآیند متیلاسیون DNA است که در پیدایش اندام‌ها و بافت‌های مختلف جنین در حال تکوین نقش بسزایی دارد (۲۴،۱۶،۲۹).
متیلاسیون کربن ۵ نوکلئوتید سیتوزین در مناطق دارای دی‌نوکلئوتیدهای CPG به‌منظور تولید ۵–متیل‌سیتوزین، یکی از مدیفیکاسیون‌های اصلی اپی‌ژنتیک می‌باشد. سیتوزین متیله‌شده در شیار بزرگ مارپیچ دو رشته‌ای DNA قرار می‌گیرد که در روند اتصال فاکتورهای رونویسی تداخل کرده و بیان ژن‌ها را مهار می‌کند (۱۳،۲۹). الگوهای متیلاسیون در طول دوره جنینی ایجاد شده و از طریق میتوز به ارث می‌رسند. متیلاسیون DNA دارای نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های ایمپرینت و ژن‌های دارای الگوی بیان وابسته به جنس که نقش تعیین‌کننده‌ای در فرآیند تکوین و نیز کنترل وزن جنین دارند، می‌باشد (۷،۱۱،۱۶،۳۵). الگوهای اپی‌ژنتیکی همچنین نقشی کلیدی در خاموش‌کردن ترانسپوزن‌ها دارند. در این رابطه پژوهشگران گزارش کردند که اعضای خانواده ژن‌های DNMTs به‌ترتیب شامل ژن DNMT-1 مسوولیت حفظ الگوهای متیلاسیون و در مقابل ژن‌های DNMT-3a و DNMT-3b نقشی کلیدی در شکل‌گیری الگوهای جدید متیلاسیون در طی فرآیند همانندسازی را در رشته‌های جدید DNA دارند (۸). پژوهشگران همچنین گزارش کردند، ژن‌های DNMT3a و DNMT3b نه‌تنها در فرآیند تشکیل الگوهای اپی‌ژنتیکی اسپرم و یا تخمک در طی فرآیند گامتوژنز دخالت دارند (۱۲،۲۹،۳۵)، بلکه نقش بسزایی در ایجاد الگوهای جدید اپی‌ژنتیکی در طول فرآیند برنامه‌ریزی مجدد الگوهای اپی‌ژنتیکی ژنوم در طول دوران پس از لقاح ایفاء می‌کنند (۱۳،۲۹). از طرف دیگر، نتایج تحقیقی نشان داد که ژن‌های اعضای خانواده DNMTs نقش مهمی در کنترل تکوین و نیز کنترل مراحل مختلف رشد جنینی در پستانداران دارند (۱۱،۲۴). در این رابطه نشان داده شده است که اختلال در میزان بیان هریک از ژن‌های DNMT-1، DNMT3a و DNMT3b منجر به بروز اختلال در لانه‌گزینی رویان، تکوین جفت، سقط جنین پس از لانه‌گزینی و مرده‌زائی می‌شود (۳۵،۱۶،۱۱). پژوهشگران همچنین گزارش کردند که اختلال در عملکرد فعالیت ژن‌های DNMTs، بر ساختار الگوهای متیلاسیون و نیز الگوی بیان ژن‌های ایمپرینت، نظیر ژن‌های IGF2 و H19 که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین جنین و جفت در دوران قبل از تولد دارند، اثرات معنی‌داری می‌گذارند (۱۶،۷،۲،۳۵،۲۴).

محققان گزارش کردند که سطح بیان DNMT3a و یا DNMT3b با صفاتی مانند کیفیت گوشت و صفات لاشه (۱۴،۲۵)، میزان بیان سیتوکین‌های التهابی در بافت چربی (۱۹) و نیز میزان حساسیت و یا مقاومت به بیماری‌ها از جمله بیماری مارک (Marek Disease) در پرندگان (۳۴) ارتباط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

دارد. از طرفی تغییر الگوی بیان ژن‌های اعضای خانواده DNMTs از جمله دلایل مشترک در بروز انواع سرطان‌ها می‌باشد (۳۱،۲۳).

بنابراین با توجه به نقش کلیدی ژن‌های خانواده DNMTs در شکل‌گیری و ابقاء الگوهای متیلاسیون در طی فرآیند گامتوژنسیس، دوره پس از لقاح و با توجه به نقش کلیدی آن‌ها در کنترل طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی و به‌طور خاص فرآیندهای مربوط به رشد و تکوین جنین (۱۶،۳۵)، بنابراین چندشکلی احتمالی در این ژن‌ها احتمالاً بر وزن گوساله در زمان تولد نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد (۱۶،۳۵). با توجه به ارزش اقتصادی وزن تولد، این صفت به‌عنوان یک صفت مهم در اهداف اصلاحی مطرح می‌باشد (۶،۲۷،۱۸،۳۰). محققان گزارش کردند که وزن گوساله متولدشده بر عملکرد صفات تولیدی و تولیدمثلی مؤثر است، بطوریکه نتایج تحقیقات دلالت بر وجود همبستگی مثبت معنی‌داری بین وزن تولد و میزان نرخ رشد در بلندمدت (حتی تا سن ۸ سالگی) دارد (۳،۶). از طرف دیگر، یکی از دلایل عمده‌ی سخت‌زایی، نامتناسب‌بودن جثه گاو ماده (جثه کوچک) با اندازه جثه گوساله (که تاحدود زیادی با وزن تولد مرتبط است) می‌باشد (۲۷،۳۰)؛ در این رابطه گزارش شده است که به ازاء افزایش هر کیلوگرم وزن گوساله‌ی تازه متولدشده، سخت‌زایی حدود ۱۳ درصد افزایش می‌یابد (۱۸).

بنابراین، با توجه به اهمیت ژن‌های خانواده DNMTs در کنترل فرآیند تکوین جنین در دوران آبستنی، هدف از پژوهش حاضر، شناسایی تنوع ژنتیکی در ژن‌های DNMT1، DNMT3a و DNMT3b در گاوهای هلشتاین به کمک تکنیک PCR-SSCP بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون

در این تحقیق، تعداد ۶۰ رأس گاو هلشتاین در گله‌ای واقع در استان کرمان که با سیستم پرورشی صنعتی نگهداری می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. خونگیری به‌صورت تصادفی از ورید گردن در لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد EDTA انجام شد. نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری سریعاً داخل ظرف حاوی یخ فراوان قرار گرفتند و مستقیماً به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون کامل توسط روش فنل‌کلروفرم مشابه روش شریعت و همکاران (۳۲) انجام شد. کیفیت نمونه‌های DNA توسط روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها

توالی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier نسخه ۶ طراحی (جدول ۱) و به‌وسیله سایت Ncbi Blast از یکسان‌بودن محل جفت‌شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد و به‌منظور سنتز به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند.

جدول ۱- پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر نواحی هدف در ژن‌های DNMTs

Table 1. Designed primers for amplification of target region in the DNMTs genes

نام ژن	توالی آغازگرهای رفت و برگشت	تعداد جفت باز تکثیر شده	کد پیگیری در بانک ژن
DNMT-1	F:5′-CCACGGTGTTCACAGAGGACTG-3′ R: 5′-CGCACAGCATCTCCACATCTCC-3′	114bp	NM_182651.2
DNMT-3a	F:5′-TCTGGTGAGAGGAACGGTAGGA-3′ R:5′-GACTTTGGAAGCAGGACCTTGAC-3′	176bp	AC_000168.1
DNMT-3b	F: 5′-CACAGAGGAGGTTCCAAGAGAT-3′ R:5′-ATTCAGGTCATTATCAGGCACTG-3′	207bp	AC_000170.1

مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش PCR مطابق با پروتکل‌های بهینه‌سازی‌شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر؛ به این صورت که ۱۲ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (رفت و برگشت)، ۲ میکرولیتر DNA و ۹ میکرولیتر آب دوبار تقطیر در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندرف ساخت آمریکا انجام شد.

شرایط دمایی PCR به‌منظور تکثیر نواحی مورد نظر شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه برای مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۰°C و ۳۸ چرخه شامل سه مرحله: مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۹۴°C، دمای اتصال [(۶۰°C به‌مدت ۴۵ ثانیه برای ژن DNMT-1)، (۶۳°C برای ژن‌های DNMT-3a و DNMT-3b به‌مدت ۴۵ ثانیه)] و مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲ °C و یک چرخه بسط نهایی ۷۲°C به‌مدت ۱۵ دقیقه اعمال شد.

آزمون چندشکلی ساختار فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)

به‌منظور شناسائی تنوع ژنتیکی، محصولات PCR به کمک روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)، بر اساس پروتکل‌های توسعه‌یافته با اندکی تغییرات ارزیابی شدند (۱). برای این منظور، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP مخلوط شد و برای مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵°C واسرشت‌سازی شدند. نمونه‌های واسرشت‌شده در کمترین زمان ممکن روی یخ انتقال یافتند تا از به هم چسبیدن رشته‌های مکمل ممانعت به‌عمل آید. به‌منظور نمایان‌سازی ژنوتیپ‌ها از تانک الکتروفورز عمودی و ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد استفاده شد. سپس الکتروفورز نمونه‌ها با ولتاژ ۱۸۰ ولت

www.SID.ir

Archive of SID

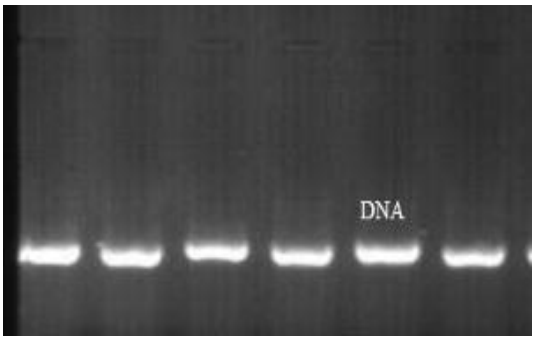
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

به‌مدت ۶ ساعت در دمای ۴°C انجام گرفت. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای باندی به‌روش نیترات‌نقره به‌ترتیب در سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور انجام شد (۱).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از استخراج نمونه‌های DNA

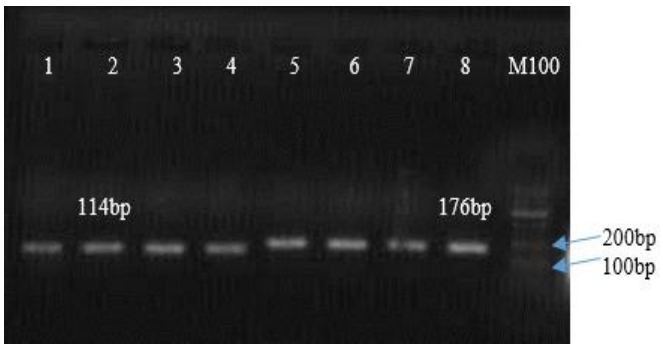
استخراج نمونه‌های DNA با روش فنل‌کلروفرم منجر به حصول مقادیر بالایی از DNA ژنومی شد که به‌صورت تک‌باند و بدون هرگونه تکثیر غیراختصاصی بودند (شکل ۱).



شکل ۱- کیفیت DNAهای استخراج‌شده از نمونه خون گاو هلشتاین روی ژل آگارز یک درصد
Figure 1. Quality of extracted DNA from blood samples of Holstein cow on a 1% agarose gel

نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، تکثیر قطعه ۱۱۴ جفت‌بازی از ژن DNMT-1، قطعه ۱۷۶ جفت‌بازی از ژن DNMT-3a (شکل ۲) و قطعه ۲۰۷ جفت‌بازی مربوط به ژن DNMT-3b (شکل ۳) به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بدون تکثیر باند غیراختصاصی انجام گرفت. نشانگر وزن مولکولی استفاده‌شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعات مورد نظر را تأیید کرد.

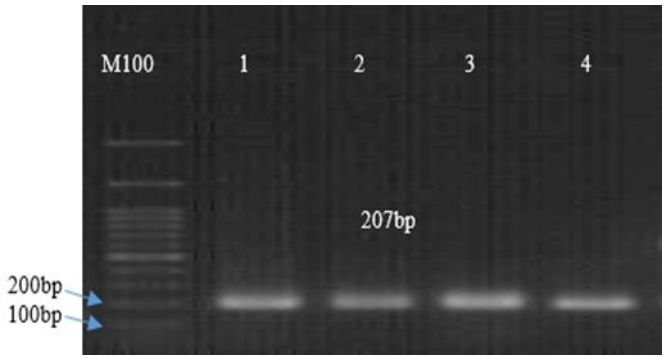


شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR برای ژن‌های DNMT-1 (لاین‌های شماره ۱ تا ۴) و DNMT-3a (لاین‌های شماره ۵ تا ۸) روی ژل آگارز
Figure 2. Agarose electrophoresis patterns of PCR-amplified fragments of DNMT-1 DNMT3a (lanes 5-8) genes (lanes 1–4)

www.SID.ir

Archive of SID

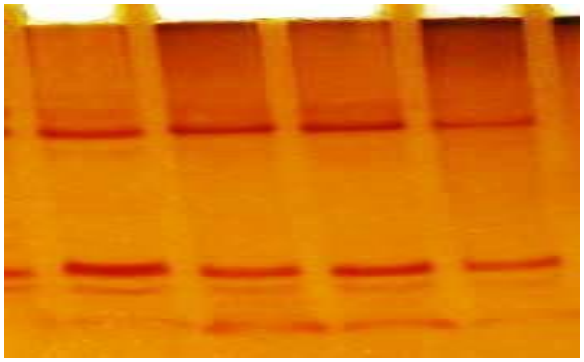
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020



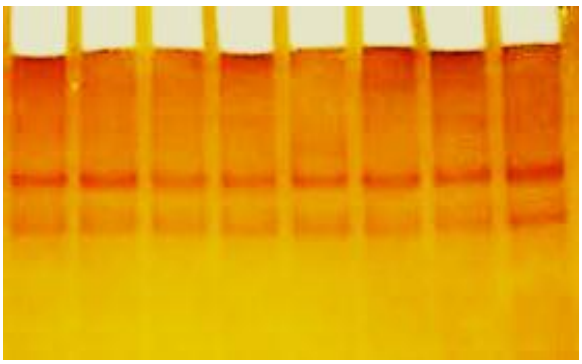
شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR برای ژن DNMT-3b بر روی ژل آگارز
Figure 3 . Agarose electrophoresis patterns of PCR-amplified fragments of DNMT3b gene

نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ با روش SSCP

پس از تکثیر قطعات مورد نظر، از روش SSCP جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی وجود چندشکلی در اگزون ۳۳ ژن DNMT1، اینترون ۴ ژن DNMT3a و اینترون ۳ ژن DNMT3b حاکی از عدم‌وجود چندشکلی در نواحی ژنی مورد بررسی در جمیعت گاو هلشتاین مورد ارزیابی در این مطالعه داشت؛ بطوریکه برای هر یک از جایگاه‌های مورد بررسی الگوهای باندی مشابهی شناسائی شد (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).



شکل ۴- الگوهای یک‌شکل PCR-SSCP نمایان‌شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اگزون ۳۳ ژن DNMT-1
Figure 4. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the exon 33 region of the DNMT1 gene on the 10% polyacrylamide gel

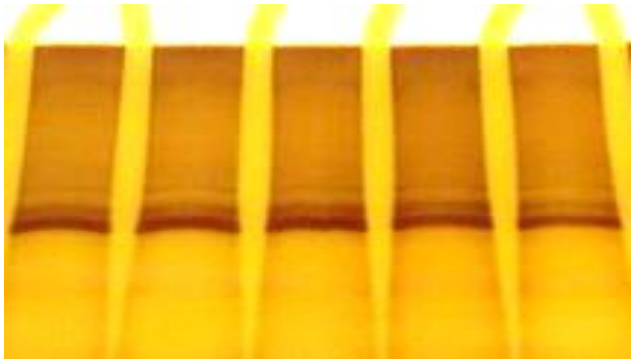


شکل ۵- الگوهای یک‌شکل PCR-SSCP نمایان‌شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اینترون ۴ ژن DNMT-3a
Figure 5. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the intron 4 region of the DNMT3a gene on the 10% polyacrylamide gel

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020



شکل ۶- الگوهای یک‌شکل PCR-SSCP نمایان‌شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اینترون ۳ ژن DNMT-3b
Figure 6. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the introns 3 region of the DNMT3b gene on the 10% polyacrylamide gel

از دلایل احتمالی برای توجیه این نتایج می‌توان به تفاوت روش مورد استفاده برای شناسائی جهش در این مطالعه (PCR-SSCP) و مطالعات سایر محققان (عمدتاً تعیین توالی)، کوچک‌بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا اثرات احتمالی مرتبط با استراتژی‌های اصلاحی (کنترل آمیزش‌ها) مورد استفاده در گله مزبور اشاره کرد. در این رابطه نشان داده شده است که بکارگیری برخی از استراتژی‌های اصلاحی می‌تواند منجر به افزایش سطح روابط خویشاوندی بین افراد جامعه و نیز گاهاً تثبیت برخی ژن‌ها (رانش ژنی) در سطح جامعه شود (۲۲). از دیگر عوامل مؤثر بر عدم‌وجود تنوع در جایگاه‌های مورد بررسی می‌توان به اثر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در جایگاه‌های مورد بررسی اشاره کرد، هر چند برای تایید این فرضیه‌ها می‌بایست احتمال وقوع جهش‌های مزبور در سایر نژادها و نیز جمعیت‌هایی با اندازه بزرگ نیز بررسی شود. علاوه‌بر این، در تحقیق حاضر از تکنیک SSCP استفاده شد. روش SSCP بخاطر دقت بالا در تشخیص جهش‌های ناشناخته و نیز ارزان‌بودن نسبت به سایر روش‌های شناسائی جهش دارای مطلوبیت بالایی می‌باشد (۱۷،۲۱،۳۳). با این وجود محققان گزارش کردند که قابلیت شناسایی جهش‌های ناشناخته با استفاده از روش SSCP برای قطعات با طول کمتر از ۳۰۰ جفت‌باز، بالاتر از ۸۰ درصد می‌باشد (۱۷،۲۱).

در خصوص وجود تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs و نیز تأثیر احتمالی آنها بر عملکرد حیوانات اهلی حیوانات اهلی گزارشات اندکی ارائه شده است؛ بطوریکه عمده نتایج تحقیقات ارائه‌شده در خصوص تاثیر تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs بر مدل‌های انسانی تمرکز دارند. به‌طور خاص، ارزیابی ارتباط چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن DNMT3b با کیفیت گوشت و صفات لاشه در گاو گوشتی چینی نژاد Snow Dragon با استفاده از نشانگر PCR-RFLP منجر به شناسائی سه ژنوتیپ CC، CT و TT برای چندشکلی واقع در اینترون شماره ۶ (C63029349T)، سه ژنوتیپ GG، AG و AA برای چندشکلی واقع در اینترون شماره ۵ (G63032883A)، سه نوع ژنوتیپ AA، AG، GG برای چندشکلی واقع در اینترون شماره ۱۳ (A63039420G) شد؛ بطوری‌که چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی شناسائی‌شده با صفات لاشه از جمله رنگ و میزان چربی گوشت، وضعیت دنده‌ها، بازده لاشه و ضخامت چربی پشت بدن در ارتباط بودند (۲۵). بطور مشابه ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs در ۱۴ نژاد گاو دلالت بر ارتباط معنی‌دار برخی از جهش‌های شناسائی‌شده با صفات لاشه داشت؛ بطوریکه از میان ۱۰ جهش شناسائی‌شده تنها جهش‌های واقع در اگزون شماره ۱۷ ژن DNMT1 (13154420A>G)، جهش واقع در اینترون شماره ۱۱ ژن DNMT3a (76198537A>G) و جهش واقع در اینترون شماره ۱۰ ژن DNMT3b (63037313C>T) با برخی از صفات لاشه ارتباط معنی‌داری داشتند (۲۶). بعلاوه نتایج تحقیقات سایر محققان دلالت بر ارتباط بین الگوی بیان ژن‌های DNMT3a/3b با صفات اقتصادی و نیز صفات لاشه در گاو گوشتی دارند (۱۴).

اگرچه تاکنون ارتباط چندشکلی‌های اعضای ژن‌های خانواده DNMTs با وزن تولد و صفات رشد در مدل‌های حیوانی گزارشی ارائه نشده است؛ اما نتایج مطالعات پژوهشگران در سال‌های اخیر دلالت بر اهمیت توارث فرا نسلی الگوهای اپی‌ژنتیکی در کنترل طیف گسترده‌ای از صفات اقتصادی در حیوانات اهلی در نسل‌های آتی دارد (۱۲،۳۵). در این رابطه بطور خاص نقش ژن‌های خانواده DNMTs در مدل‌های مختلف حیوانی به اثبات رسیده است (۱۴،۲۴،۳۵). بعلاوه اهمیت کلیدی این ژن‌ها در شکل‌گیری الگوهای ایمپرینت ژنومی، که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین در دوران جنینی، کنترل وزن تولد، قابلیت زنده‌مانی و نیز وقوع سخت‌زائی دارد، در مدل‌های مختلف انسان و حیوان به اثبات رسیده است (۲،۷،۱۶،۲۴،۳۵). در این رابطه نتایج طیف گسترده‌ای از مطالعات دلالت بر ارتباط بین تغییر الگوی بیان ژن‌های خانواده DNMTs با میزان متیلاسیون ژن‌های ایمپرینت (ژن‌های موثر در رشد و تکوین در دوران جنینی) بر تکوین و عملکرد جفت (پلاسنتا) دارد (۲۴،۱۶،۳۵).

صرف‌نظر از محدودیت یافته‌های ارائه‌شده مرتبط با مدل‌های حیوانی؛ نتایج طیف گسترده‌ای از مطالعات اپیدمیولوژیکی دلالت بر وجود ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی‌های موجود در ژن‌های خانواده DNMTs با احتمال وقوع طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها دارند. در این رابطه نتایج

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

یک مطالعه حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار وابسته به سن بین چندشکلی واقع در ژن DNMT3b (-149C-->T) C46359T با میزان وقوع کارسینوم سر و گردن (انواع سرطان‌های ناحیه سر و گردن) و نیز میزان قابلیت زنده‌مانی بیمار داشت (۹). همچنین نتایج مطالعات حاکی از تأثیر معنی‌دار جهش در ناحیه پروموتر (579 G>T) ژن DNMT3b بر افزایش میزان خطر ابتلا به سرطان مری داشت، بطوریکه احتمال وقوع سرطان مری در افراد حامل آلل G در مقایسه با افراد حامل آلل T بالاتر بود (۱۰). نتایج تحقیقات پژوهشگران همچنین حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار بین احتمال وقوع سرطان کولورکتال (سرطان روده بزرگ) با چندشکلی واقع در پروموتور ژن DNMT3b (G39179T; rs1569686) داشت، بطوریکه نرخ ابتلا به سرطان در افراد دارای ژنوتیپ TT در مقایسه با ژنوتیپ‌های GT و GG بطور معنی‌داری بالاتر بود (۵).

نتایج تحقیقات پژوهشگران همچنین حاکی از ارتباط بین فقط یکی از چندشکلی‌های شناسائی شده در ژن‌های اعضای خانواده DNMTs با شانس ابتلا به بیماری نقرس دارد؛ بطوریکه تنها چندشکلی شناسائی شده واقع در ناحیه کدکننده ژن DNMT1 (rs2228611) با احتمال وقوع بیماری نقرس ارتباط داشت، در مقابل چندشکلی‌های شناسائی‌شده واقع در نواحی غیرکدکننده ژن‌های DNMT3a (rs1550117) و DNMT3b (rs2424913) تأثیری روی شانس ابتلا افراد به نقرس نداشت (۳۸). علاوه بر این اگرچه نتایج مطالعات پژوهشگران حاکی از ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی واقع در ناحیه کدکننده ژن DNMT1 (rs16999593) با نرخ ابتلا به الیگواسپرمی (کمبود اسپرماتوزوئید در مایع منی) داشت (۴)، اما در مقابل هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین جهش‌های شناسائی‌شده در نواحی مختلف این ژن، (Ile311Val، Ala147Gly، His97Arg) و احتمال وقوع سرطان کولورکتال (sporadic colorectal cancer) مشاهده نشد (۲۰). در مقابل نتایج برخی از پژوهش‌های دیگر انجام‌شده بر روی ارزیابی تأثیر وقوع جهش در ژن‌های خانواده DNMTs بر احتمال وقوع بیماری، منجر به شناسائی چندین جهش در نواحی کدکننده (اگزون) و نیز غیرکدکننده (اینترون) این ژن‌ها (rs8101866، rs2228611، rs16999593) شد، که با احتمال وقوع سرطان سینه و یا کولورکتال مرتبط بود (۳۶،۳۷). همچنین نتایج تحقیقات محققان حاکی از بالاتربودن ضریب هوشی افراد دارای جهش در موقعیت 11330C>T (rs7354779) در ژن کدکننده DNMT3L در مقایسه با سایر افراد داشت؛ هرچند ارتباطی بین تنوع ژنتیکی مشاهده شده در ژن‌های DNMT1, DNMT3a, DNMT3b و ضریب هوشی افراد مورد بررسی مشاهده نشد (۱۵).

در این تحقیق تمامی الگوهای باندی به‌دست‌آمده برای جایگاه‌های ارزیابی‌شده ژن‌های DNMT1، DNMT3a و DNMT3b، در جمعیت گاو هلشتاین مورد بررسی، بسته به جایگاه مورد ارزیابی دارای الگوی باندی تک‌شکل (مونومورف) بودند؛ لذا جایگاه‌های مورد مطالعه احتمالاً نمی‌توانند به‌عنوان نشانگر مناسب برای ارزیابی هیچکدام از صفات مورد مطالعه در گاو هلشتاین مورد استفاده قرار گیرند. از دلایل احتمالی توجیه‌کننده این نتایج می‌توان به‌دلایلی همچون اثرات پدیده رانش‌ژنی، ناکارآمدی نسبی تکنیک PCR-SSCP در شناسائی جهش‌ها، کوچک‌بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا تأثیر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در جایگاه‌های مورد بررسی اشاره نمود. از طرف دیگر، با توجه به نقش کلیدی این ژن‌ها در کنترل تمایز سلولی، کنترل میزان بیان ژن‌ها و نیز کنترل فرآیند تکوین جنین در دوران قبل از تولد و حتی رشد و نمو در دوران پس از تولد؛ و با توجه به تحقیقات اندک در رابطه با شناسایی و نیز ارتباط تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs و صفات مهم اقتصادی در حیوانات اهلی، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر بر روی سایر نواحی ژن‌های فوق‌الذکر در جمعیت‌های بزرگ‌تر و دیگر نژادها صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل (UOZ-GR-9517-35) انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

منابع

1. Akbari, H., G. Dashab, M. Vafaye Valleh. 2018. Exploration of MEG9 gene polymorphism and its association with birth weight in Sistani cattle. Research on Animal Production, 8(17): 194-200.
2. Biniszkiewicz, D., J. Gribnau, B. Ramsahoye, F. Gaudet, K. Eggan, D. Humpherys and R. Jaenisch. 2002. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting and embryonic lethality. Molecular and Cellular Biology, 22(7): 2124-2135.
3. Boligon, A.A., M.E.Z. Mercadante, S. Forni, R.B. Lobo and L.G.D. Albuquerque. 2010. Covariance functions for body weight from birth to maturity in Nellore cows. Journal of Animal Science, 88(3): 849-859.
4. Cheng, P., H. Chen, R.P. Zhang, S.R. Liu and A. Zhou-Cun. 2014. Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. Reproductive Biomedicine Online, 28(5): 644-649.
5. Daraei, A., R. Salehi and F. MohamadHashem. 2011. DNA-methyltransferase 3B 39179 G> T polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in a subset of Iranian population. Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences, 16(6): 807.
6. Dawson, W.M., R.W. Phillips and W.H. Black. 1947. Birth weight as a criterion of selection in beef cattle. Journal of Animal Science, 6(3): 247-257.
7. Delaval, K. and R. Feil, 2004. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting Current Opinion in Genetics and Development, 14(2): 188-195.
8. Denis, H., M.N. Ndlovu and F. Fuks. 2011. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. EMBO Reports, 12: 647-656.
9. Farias, L.C., C.A. De Carvalho Fraga, M.V.M. De Oliveira, T.F. Silva, L. Marques-Silva, P.R. Moreira and A.L.S. Guimarães. 2010. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. International Journal of Oncology, 37(1): 167-176.
10. Fan, H., D.S. Liu, S.H. Zhang, J.B. Hu, F. Zhang and Z.J. Zhao. 2008. DNMT3B 579 G>T promoter polymorphism and risk of esophagus carcinoma in Chinese. World Journal of Gastroenterology, 14(14): 2230.
11. Golding, M.C., G.L. Williamson, T.K. Stroud, M.E. Westhusin and C.R. Long. 2011. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. Molecular Reproduction and Development, 78(5): 306-317.
12. Feeney, A., E. Nilsson and M.K. Skinner. 2014. Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals. Journal of animal science and biotechnology, 5(1): 48-55.
13. Goll, M.G. and T.H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annual Review of Biochemistry, 74: 481-514.
14. Guo, X., X. Liu, X. Xu, M. Wu, X. Zhang, Q. Li and Y. Yu. 2012. The expression levels of DNMT3a/3b and their relationship with meat quality in beef cattle. Molecular Biology Reports, 39: 5473-5479.
15. Haggarty, P., G. Hoad, S.E. Harris, J.M. Starr, H.C. Fox, I.J. Deary and L.J. Whalley. 2010. Human intelligence and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking. PloS One, 5(6): e11329.
16. Haggarty, P., G. Hoad, G.W. Horgan, D.M. Campbell. 2010. DNA methyltransferase candidate polymorphisms, imprinting methylation, and birth outcome. PloS One, 8(7): e68896.
17. Hayashi, K. and D.W. Yandell. 1993. How sensitive is PCR-SSCP?. Human Mutation, 2(5): 338-346.
18. Johanson, J.M., P.J. Berger, S. Tsuruta and I. Misztal. 2011. A Bayesian threshold-linear model evaluation of perinatal mortality, dystocia, birth weight, and gestation length in a Holstein herd. Journal of Dairy Science, 94(1): 450-460.
19. Kamei, Y., T. Suganami, T. Ehara, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto and Y. Ogawa. 2010. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. Obesity, 18: 314-321.
20. Khatami, F., B. Noorinayer, S.R. Mohebi, S. Ghiasi, R. Mohebi, M. Hashemi and M. Zali. 2009. Effects of amino acid substitution polymorphisms of two DNA methyltransferases on susceptibility to sporadic colorectal cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 10: 1183-1188.
21. Konstantinos, K.V., P. Panagiotis, V.T. Antonios, P. Agelos and N.V. Argiris. 2008. PCR–SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. Molecular biotechnology, 38(2): 155-163.
22. Kristensen, T.N., A.A. Hoffmann, C. Pertoldi and A.V. Stronen. 2015. What can livestock breeders learn from conservation genetics and vice versa? Frontiers in genetics, 6: 38-50.
23. Kulis, M. and M. Esteller. 2010. DNA methylation and cancer. Advances in Genetics, 70: 27-56.
24. Lan, X., E.C. Cretney, J. Kropp, K. Khateeb, M.A. Berg, F. Peñagaricano, R. Magness, A.E. Radunz and H. Khatib. 2013. Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. Frontiers in genetics, 4: 49.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Liu, X., X.Y. Guo, X.Z. Xu, M. Wu, X. Zhang, Q. Li and C.H. Qin. 2012. Novel single nucleotide polymorphisms of the bovine methyltransferase 3b gene and their association with meat quality traits in beef cattle. Genetics and Molecular Research, 11: 2569-2577.
26. Liu, X., T. Usman, Y. Wang, Z.Wang, X. Xu, M. Wu, Y. Zhang, X. Zhang, Q. Li, L. Liu and W. Shi. 2015. Polymorphisms in epigenetic and meat quality related genes in fourteen cattle breeds and association with beef quality and carcass traits. Asian-Australasian journal of animal sciences, 28(4): 467-475.
27. Meijering, A. 1984. Dystocia and stillbirth in cattle-A review of causes, relations and implications Livestock Production Science, 11(2): 143-177.
28. Mmereole, F.U. and J.I. Obinne. 2010. Relationship of the body weight and linear measurements of the west African Dwarf (WAD) sheep under the humid environment of Nigeria. Agricultura Tropica et Subtropica, 43(1): 64-67.
29. Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell, 99: 247-257.
30. Olson, K.M., B.G. Cassell, A.J. McAllister and S.P. Washburn 2009. Dystocia, stillbirth, gestation length, and birth weight in Holstein, Jersey, and reciprocal crosses from a planned experiment. Journal of Dairy Science, 92(12): 6167-6175.
31. Seidel, C.C. Florean, M. Schnekenburger, M. Dicato and M. Diederich. 2012. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. Biochemistry, 94: 2264-2279.
32. Shariat, M., Gh.R. Dashab and M. Vafaye valleh. 2019. Comparison of evolutionary and phylogenetic processes of the nucleotide sequence of the hvr1 mitochondrial genome in goat and other animal species. Journal of Animal Production Research, 10(23): 133-143 (In Persian).
33. Sunnucks, P., A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French, and A.C. Taylor, 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. Molecular ecology, 9(11): 1699-1710.
34. Tian, F., F. Zhan, N.D. VanderKraats, J.F. Hiken, J.R. Edwards, H. Zhang, K. Zhao and J. Song. 2013. DNMT gene expression and methylome in Marek's disease resistant and susceptible chickens prior to and following infection by MDV. Epigenetics, 8(4): 431-444.
35. Triantaphyllopoulos, K.A., I. Ikonomopoulos and A.J. Bannister. 2016. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. Epigenetics and Chromatin, 9(1): 31.
36. Xiang, G., F. Zhenkun, C. Shuang, Z. Jie, Z. Hua, J. Wei, P. Da and L. Dianjun. 2010. Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province. Clinical Breast Cancer, 10: 373-377.
37. Ye, C., A. Beeghly-Fadiel, W. Lu, J. Long, X.O. Shu, Y.T. Gao, W. Zheng and Q. Cai. 2010. Two-stage case-control study of DNMT-1 and DNMT-3B gene variants and breast cancer risk. Breast Cancer Research and Treatment, 121: 765-769.
38. Zhong, X., Y. Peng, C. Yao, Y. Qing, Q. Yang, X. Guo, W. Xie, M. Zhao, X. Cai and J.G. Zhou. 2016. Association of DNA methyltransferase polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis. Biomedical Reports, 5: 467-472.

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

PCR-SSCP Analysis of Genetic Variation in DNMT Gene Family in Holstein Cattle

Mehdi Vafaye Valleh[1] and Sajjad Shahdadi Sardo[2]

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran, (Corresponding Author: Mehdi.Valleh@uoz.ac.ir)
2- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
Received: April 13, 2019 Accepted: September 14, 2019

Abstract

Due to their roles in regulating embryonic growth and development members of DNA Methyltransferases (DNMTs) family have been shown to play fundamental parts in embryonic fertilization to postnatal life; through regulating the establishment and/or maintenance of specific epigenetic marks. The present study was conducted to identify potential reported mutations within the exon 33 of DNMT-1, introns 4 of DNMT-3a and introns 3 DNMT-3a genes and their relationship with birth weight in Iranian Holstein cows. A total of 60 blood samples from Holstein dairy cattle with records of weight from birth to adult age were randomly collected from industrial dairy cattle farm located in Kerman province. Genomic DNA samples was extracted using Phenol-Chloroform method and target sequence was amplified with PCR using specific primers. Polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) and silver nitrate staining methods was used for screening potential mutation in target sequences. According to results of this study, in all cases, no mutation in target sequence were identified as all samples had the same specific SSCP pattern with respect to their size. The lack of polymorphism may imply that these region may be attributable to a relative inefficiency of PCR-SSCP for mutation detection, small sample size, stochastic effects of genetic drift and/or conserved nature of these genes due to either natural or artificial selection. According to the results of this study, analyzed sequence may not be informative as molecular marker for birth weight in Holstein cattle.

Keyword: DNMTs, Genetic Variation, Iranian Holstein Cattles, PCR-SSCP

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 11:48 +0330 on Saturday February 15th 2020

www.SID.ir