

ارزیابی چند شکلی ژن آروماتاز در گوسفند زندی با استفاده از روش PCR-RFLP

مریم اشرفی^۱، علیرضانوشری^۱ و مهدی امین افشار^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۱۵

تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۰۶/۲۴

چکیده

ژن Cyp19 که آنزیم P450 سیتوکروم آروماتاز را کد می‌کند با تبدیل آندروژن به استروژن مسئول بیوستز استروژن است. این ژن در گوسفند روی باندها q24-q31 کروموزوم شماره ۷، قرار دارد. هدف از انجام این مطالعه بررسی چندشکلی ناحیه کد کننده ژن آروماتاز به منظور شناسایی جهش‌های موجود در این ناحیه می‌باشد. برای این منظور از ۹۳ رأس بره زندی نر و ماده در سن شیرگیری نمونه‌های خون تهیه شد. استخراج DNA با استفاده از کیت (PCR Template purification kit) انجام و نمونه‌های DNA حاصل برای تکثیر قطعه ۱۴۰ جفت بازی استفاده شدند. چند شکلی طول قطعات برشی محصولات PCR با افزودن آنزیم برشی BSTMBI به محصول واکنش PCR اجرا گردید. شناسایی ژنوتیپ‌های PCR-RFLP از طریق بارگذاری محصول حاصل از واکنش هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز انجام شد. نتایج این تحقیق نشان داد سه ژنوتیپ AB,AA و BB به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۸۶، ۰ و ۰/۱۴ در جایگاه مطالعه شده ژن آروماتاز گوسفند زندی قابل شناسایی می‌باشند. فراوانی آللی نیز برای آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۵۷ برآورد گردید. همچنین نتایج نشان داد که تعادل هاردی - واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه در رابطه با این جایگاه برقرار نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: ژن آروماتاز، چند شکلی، گوسفند زندی، PCR-RFLP

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه علوم دامی، کرج، ایران (Ashrafi_m285@yahoo.com)

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم دامی، تهران، ایران

مقدمه

آروماتاز^۱ یک ترکیب پیچیده آنزیمی است که تبدیل استرول به استرادیول را کاتالیز می‌کند. در سلولهای گرانولوزا، آروماتاز برای ایجاد فولیکول و در نتیجه کیفیت اووسیت ضروری است (۶). ژن *cyp19* که آنزیم P450 را در گوسفند کد می‌کند بر روی کروموزوم ۷، قرار دارد. در موقعیت ۲۴۲ کروموزوم ۷ اگزون ۳ ژن *cyp19* یک جهش از نوکلئوتید C به T (C242T) صورت می‌گیرد. ژن *cyp19* در بافت چربی، مغز، غده آدرنال و استخوان نیز یافت شده است (۲). مطالعات و بررسی‌های انجام گرفته اثر حضور و فراوانی آللهایی از چند شکلی ژن آروماتاز *Cyp19* را بر روی صفت رشد و تولید مثل و توانایی مادری نشان داده است (۲). اثر حضور و فراوانی آللهایی از چند شکلی C242T در موقعیت ۲۴۲ از ژن آروماتاز *Cyp19* در چند نژاد مختلف از گوسفندان برزیلی ژنوتیپ AA مشاهده نشد و فراوانی ژنوتیپ‌های AB, BB به ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۶۴ بود در نهایت لوبو و همکاران (۲۰۰۹) به این نتیجه رسیدند که حیوانات با ژنوتیپ AB بهترین ارزش نژادی را دارند (۲). رابطه چند شکلی ژن آروماتاز *Cyp19* در تعدادی از گاوهای سیاه و سفید جرسی مشخص نمود که فراوانی ژنوتیپ و آللهای بدست آمده برای این گاوها شامل AA=۰/۰۸۹۸۵، AB=۰/۰۹۷۷، BB=۰/۰۰۳۸، *Cyp19*(A)=۰/۹۴۷۴، *Cyp19*(B)=۰/۰۵۲۶ بود و نتایج بدست آمده نشان داد که هیچ گونه ارتباطی بین چند شکلی ژن آروماتاز و صفت تولید شیر وجود ندارد (۳). با بررسی آللهایی از ژن *Cyp19* در گاوهای هلشتاین فریزن لهستانی چند شکلی مشاهده شد در نمونه‌های مورد نظر هر سه نوع ژنوتیپ AA، *Cyp19*، BB و AB مشاهده شدند (۸). رابطه چند شکلی ژن آروماتاز *Cyp19* روی باروری در گوساله ماده بوفالو مشخص نمود که اگر سطح آروماتاز در تخمدان پایین باشد سطح ۱۷-بتا استرادیول و LH^۲ نیز پایین خواهد آمد و در نتیجه فولیکول ممکن است آشکار نشود و حیوان علائم فحلی را نشان نخواهد داد (۷). گاو و گوسفند پروموتورهای مختلفی را برای بیان و هدایت سیتوکروم P450 آروماتاز که ژن *Cyp19* را در طول آبستنی کد می‌کند به کار می‌برند به ترتیب مشخص شد بین گاو و گوسفند پروموتورهای بیان ژن آروماتاز در جفت، (P 1.1) و (P 1.5) است. در گوسفند ژن *Cyp19* تحت کنترل چهار پروموتور مختلف است (p2 و p1.1، p1.4 و p1.5) که در اندام‌های خاصی فعالیت دارند. جفت، محل اصلی بروز سیتوکروم P450 آروماتاز است که در گوسفند بروز ژن *Cyp19* در جفت تحت کنترل پروموتور P1.5 است جفت نقش مهمی را در نیمه دوم آبستنی بازی می‌کند و منبع اصلی از استروژن است (۹). نژاد زندی یکی از بهترین گوسفندان پوستی ایران محسوب می‌شود، اما بدلیل افزایش تقاضا برای گوشت و عدم توجه اقتصادی تولید پوست، امروزه از این نژاد برای تولید گوشت استفاده می‌شود چرا که از این لحاظ نیز در حد متوسطی قرار دارد. این در حالی است که تا کنون برنامه‌های اصلاحی مدونی برای بهبود عملکرد و بازده اقتصادی در گوسفند زندی اجرا نگردیده یا اهداف مورد نظر حاصل نگردیده است. هدف از انجام تحقیق حاضر شناسایی ژنوتیپ‌های ژن آروماتاز و فراوانی آللهای

1- Aromatase

2 -Luteinizing Hormone

آن برای اولین بار در ایران و در گوسفند نژاد زندی به کمک روش PCR¹-RFLP² و تعیین میزان چند شکلی در جمعیت گوسفندان زندی بوده است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این طرح، از ۹۳ رأس گوسفند زندی در دامداری‌های قم به طور تصادفی خون گیری به عمل آمد. خون گیری از طریق ورید و داج و با استفاده از ونوجکت‌های استریل حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) به میزان ۳ الی ۵ سی سی انجام گرفت. استخراج DNA با استفاده از کیت (PCR Template purification kit) انجام گرفت و جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده گردید. در این تحقیق، تکثیر در آگرون ۳ در کدون ۶۱ کروموزوم شماره ۷ ژن آروماتاز گوسفند به طول ۱۴۰ جفت باز با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی به شرح زیر صورت گرفت:

'Forward 5' - CCAGCTACTTTCTGGGAATT-3

'Reverse 5' - AATAAGGGTTTCCTCTCCACA-3

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (DNA به میزان ۵/۳ میکرولیتر، بافر PCR به میزان ۱۲/۵ میکرولیتر، آب دیونیزه به میزان ۶ میکرولیتر، آغازگر رفت و آغازگر برگشت رقیق شده با آب مقطر، هر کدام به میزان ۰/۶ میکرولیتر) و با برنامه حرارتی زیر:

۹۵ درجه سانتیگراد جهت واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و تعداد ۳۲ چرخه به شرح زیر: واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، اتصال پرایمرها به مدت ۲۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط آغازگرها به مدت ۲۵ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در خاتمه بسط نهایی به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. صحت قطعه به دست آمده از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی سایبرگرین به همراه نشانگر وزنی M100 مورد تأیید قرار گرفت. به منظور برش آنزیمی قطعات DNA تکثیر شده حاصل از PCR، از آنزیم محدودگر BSTMBI استفاده شد. محصولات هضم شده با آنزیم بر روی ژل آگارز ۳٪ الکتروفورز گردید و با استفاده از سایبرگرین رنگ آمیزی شد. مطالعه جمعیتی نمونه و آزمون برقراری تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم افزار POP GENE 3.2 انجام یافت.

نتایج

استفاده از کیت (PCR Template purification kit) جهت استخراج DNA از نمونه خون برتری خوبی را از لحاظ کمیت و کیفیت و صرف زمان لازم در استخراج DNA نشان داد. تکثیر قطعه ۱۴۰ جفت بازی از ژن آروماتاز

1- Polymerase Chain Reaction

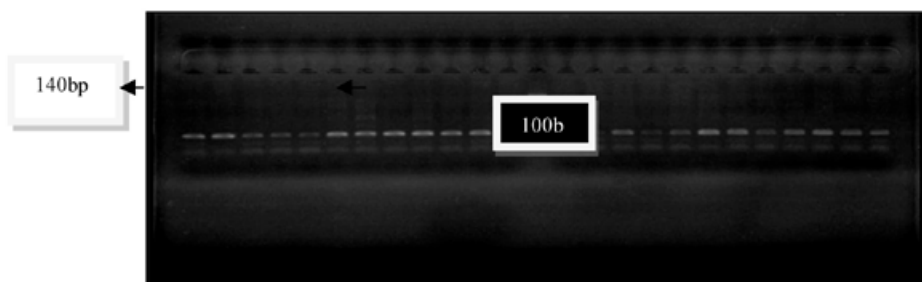
2- Restricted Fragment Length Polymorphisms

به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت و در نتیجه استفاده از برنامه حرارتی مناسب آغازگرهای اختصاصی و شرایط خوب آزمایشگاهی که فراهم شد قطعه ۱۴۰ جفت بازی بدون قطعات غیر اختصاصی بدست آمد. (شکل ۱) هضم قطعه ۱۴۰ جفت بازی با آنزیم BSTMBI وجود دو نوع ژنوتیپ AB و BB را نشان داد. در صورت وجود جهش در این ناحیه آنزیم BSTMBI منجر به ایجاد برش و ایجاد دو قطعه ۸۲ bp و ۵۸ bp می‌گردد. در غیر این صورت، یک قطعه ۱۴۰ bp ایجاد می‌گردد که نشان‌دهنده عدم وقوع جهش در قطعه مورد نظر می‌باشد. از این رو ژنوتیپ BB با تولید تنها یک باند به اندازه ۱۴۰ جفت باز و ژنوتیپ AB با تولید سه باند به اندازه‌های ۱۴۰، ۸۲ و ۵۸ جفت باز قابل شناسایی می‌باشد. در این تحقیق هیچ نمونه‌ای با ژنوتیپ AA مشاهده نشد (شکل ۲). بنابراین ژنوتیپ‌های AA، AB و BB با فراوانی‌های ۰، ۰/۸۶ و ۰/۱۴ در این گله تشخیص داده شدند. فراوانی‌های A و B به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۵۷ برآورد گردید. ژنوتیپ AB دارای بیشترین فراوانی نسبت به ژنوتیپ BB می‌باشد. و در مجموع تعداد ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب برابر ۰، ۸۰ و ۱۳ از نمونه‌ها بوده است. این گله با داشتن فراوانی افراد AB در حدود ۰/۸۶ دارای بیشترین فراوانی هتروزیگوتی می‌باشد و هموزیگوت‌های BB حدود ۱۴٪ گله را تشکیل می‌دهد و افراد با ژنوتیپ AA نیز وجود ندارد. آزمون‌های X² و G² نشان دادند که جامعه مورد بررسی در تعادل هاردی واینبرگ قرار نداشت و انحراف معنی داری از این تعادل نشان داد (جدول شماره ۱).

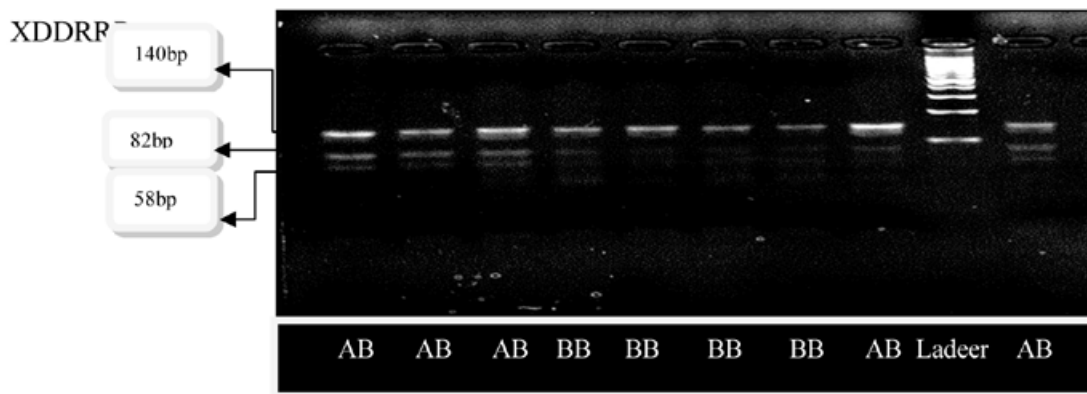
جدول ۱- تعادل هاردی - واینبرگ و فراوانی ژنوتیپی

ژنوتیپ	تعداد مشاهده	افراد مورد انتظار	X ²	G ²	فراوانی ژنوتیپی
AA	0	17.08	17.081	0.0001	0
AB	80	45.84	25.460	89.106	0.86
BB	13	30.08	9.699	-21.812	0.14

شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۵٪ درصد



شکل ۲- محصول هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۳ درصد



بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد جایگاه ژن آروماتاز در نمونه‌های مطالعه شده گوسفند زندی دارای چند شکلی می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که در گوسفند زندی از نظر آل‌های ژنهای کنترل کننده صفاتی که به تولید و ترشح آروماتاز مربوط است تنوع ژنتیکی وجود دارد. این امر می‌تواند به عنوان ابزاری در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرد. در صورت وجود ارتباط معنی دار بین چند شکلی‌های شناسایی شده و صفات مهم اقتصادی در این گوسفند، نتایج حاصله می‌تواند در برنامه‌های انتخاب در این گوسفند ارزشمند باشد. درخصوص چند شکلی‌های شناسایی شده در گوسفند زندی می‌توان به ژن میوستاتین، میار و همکاران (۲۰۱۰) و ژن لپتین، برزه کار و همکاران (۲۰۰۹) اشاره نمود که در هر دو ژن مذکور ارتباط معنی دار بین چند شکلی ژنی با صفات رشد و لاشه در گوسفند زندی وجود نداشت. این گوسفند با توجه به چند شکلی‌های موجود منبع خوبی از تنوع داخل نژادی را فراهم می‌کند و این به دلیل آن است که تا کنون برنامه‌های مدون اصلاح نژادی در این گوسفند انجام نشده است. نتایج حاصله از این تحقیق از نظر چند شکلی ژن آروماتاز با نتایج حاصل از مطالعه لوبو و همکاران (۲۰۰۹)، مگدالنا و همکاران (۲۰۰۶)، وانسلو و همکاران (۲۰۰۴)، کومارو و همکاران (۲۰۰۹)، واسکا و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت. همچنین از نظر جایگاه ژن آروماتاز طبق فراوانی ژنی و ژنوتیپی با نتایج بدست آمده توسط مگدالنا و همکارانش (۲۰۰۶) لوبو و همکارانش (۲۰۰۹) مطابقت نداشت. بر اساس نتایج حاصله، جامعه مورد بررسی در تعادل هاردی وینبرگ قرار نداشت و انحراف معنی داری از تعادل هاردی وینبرگ نشان داد. که با نتایج برزه کارو و همکاران (۲۰۰۹) در خصوص تعادل در جمعیت گوسفند زندی برای ژن لپتین مطابقت نداشت. مهم ترین عامل عدم برقراری تعادل هاردی وینبرگ در جایگاه مورد مطالعه را می‌توان به دلیل وجود عوامل برهم زننده تعادل نظیر انتخاب، مهاجرت، آمیزش‌های غیر تصادفی، جهش و حتی خطای نمونه برداری برشمرد.

منابع

1. **Barzehkar R, Salehi A, Mahjoubi F. 2009.** Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep, Iranian Journal of Biotchnology, 7(4):241-246
2. **Bezerra aliveira lobo A. m , noato braga lobo R and rezende paiva S. 2009.** Aromatase gene and its effects on growth, reproductive and maternal ability traits in a multibreed sheep population from Brazil, Genetics and Molecular biology, 32,3: 484-490.
3. **Magdalena J, Iwona S, Slawomir Z, Wilhelm G, Ewa C p and Andrzej D. 2006.** Evaluation of association of the polymorphism in the placenta specific promoter 1.1 of the Cyp19 gene in Black-and-white and Jersey cattle with milk production traits, Arch. Tierz., Dummerstorf, 49,4, 311-314.
4. **Miar Y, Salehi A, Aleyasin S, Kolbehdar D and Raoofzadeh S. 2010.** Polymorphisms in Myostatin Gene and its Association with Growth and Carcass Traits in Iranian Sheep. of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran; 3Monsanto Company, USA, 1(1):33-42
5. **Nikbakht G, Rezaii H, Stear M.J, Talebi M.A, Mahmoudzadeh H. 2010.** Allelic polymorphism in the second exon of Ovar-DRB1 in fat-tailed sheep. Journal of veterinary medicine (SANANDAJ), 4(11):81-87.
6. **Simpson E.R, Mahendroo M.S, Means G.D, Kilgore M.W, Hinshelwood M.M. 1994.** Graham-Lorence S, Amarneh B, Yuji I, Fisher CR, Michael MD, Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev, 15:342-355.
7. **Suneel kumar O, Sharma D, Singh D and Sharma M.K. 2009.** CYP19 (cytochrome P450 aromatase) gene polymorphism in murrh buffalo heifers of different fertility performance, Rsearch in Veterinary science, 86: 427-437
8. **Szatkowska I, Grzesiak W, Jedrzejczak M, Dybus A, Zaborski D and Jankowaik D. 2011.** An analysis of Cyp19 and ER genotypes in Polish Holstein-Friesian cows with regard to the selected reproductive traits , Acta Veterinarian Brno, 80:65-71
9. **Vanselow J, Furbass R, Rehbock F, Klautschek G and Schwerin M. 2004.** Cattle and sheep used different promoters to direct the expression of the aromatase cytochrome p450 encoding gene, cyp19, during pregnancy, Genetic and Molecular Biology, 27, 99-11