ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۳۷۴- ۳۶۵

بررسی ارتباط چند شکلی ناحیه اگزون چهارم و ناحیه غیر کد شونده ′۳ ژن فاکتور نکروز تومور آلفا با صفات رشد در گوسفندان ماکویی

Analysis of association of polymorphism in the exon 4 and 3' UTR of *TNFα* gene with growth traits in Makoei sheep

پریسا بیابانی*[۱]، علی هاشمی[۱]، کریم مردانی[۱]، محمد قادرزاده[۱]، حافظعلی دلجوعیسی‌لو[۲]، فاطمه پوربایرامیان[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناس‌ارشد، استادیار، دانشیار و کارشناسان‌ارشد، دانشگاه ارومیه
۲- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه زنجان

Biabani P*[1], Hashemi A[1], Mardani K[1], Ghaderzadeh M[1], Deljoisalo HA[2], Purbayramian F[1]

1. MSc Student, Assistant Professor, Associate Professor and MSc Students, Urmia University
2. Graduated MSc Student, Zanjan University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: parisabiabani@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

به منظور بررسی چند شکلی ناحیه اگزون چهارم و ناحیه غیر کدشونده ′۳ (3'UTR) ژن فاکتور نکروز تومور آلفا از ۹۰ رأس گوسفند ماکویی به صورت تصادفی خونگیری به عمل آمد. DNA از نمونه‌های خون استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت تکثیر قطعه ۲۷۳ جفت بازی ناحیه اگزون چهارم و 3' UTR ژن فاکتور نکروز تومور آلفا انجام گرفت. روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد برای تعیین ژنوتیپ استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آکریل آمید انجام شد که بیانگر چندشکلی این جایگاه بود. در مجموع در گوسفندان مورد مطالعه سه ژنوتیپ EE ، OE و RE به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۴۶۶۷، ۰/۳۵۵۶ و ۰/۱۷۷۷ بدست آمدند. فراوانی‌های ژنوتیپی در جایگاه مورد مطالعه انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند. اثر ژنوتیپ‌های مشاهده شده روی صفات رشد نشان داد که ژنوتیپ‌های TNFα، ارتباط معنی‌داری با وزن تولد و میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری دارند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که افراد دارای ژنوتیپ EE، وزن تولد و میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری بالاتری (به ترتیب ۴/۳۲ کیلوگرم و ۰/۲۲۴ کیلوگرم در روز) نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر دارند. بین ژنوتیپ‌های TNFα با سایر صفات، ارتباط معنی‌داری یافت نشد.

واژه‌های کلیدی

ژن *TNFα*
صفات رشد
گوسفند ماکویی
DNA
PCR-SSCP

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گوسفند ماکویی، دارای بدن کشیده و دست و پای بلند است. در این نژاد رنگ بدن سفید یکدست و در اطراف چشم‌ها، پوزه، انتهای قلم دست و پا و گوش‌ها لکه‌های اختصاصی سیاه وجود دارد. اعضای بدن آن عضلانی و دارای خصوصیات گوسفندان گوشتی می‌باشد. محل اصلی پرورش این نژاد، نواحی شمالی آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی می‌باشد. (Khaldari 2003). انتخاب به کمک نشانگر که ترکیبی از اطلاعات ژنتیک مولکولی و داده‌های فنوتیپی صفت موردنظر می‌باشد، می‌تواند باعث افزایش صحت انتخاب و پیشرفت ژنتیکی حیوانات شود (Israel and Wellr 2002). صفات رشد به عنوان بخش مهمی از صفات اقتصادی در پرورش گوسفند مطرح هستند و چنانچه روش‌های به‌نژادی مناسبی برای بهبود این صفات بکار گرفته شود، می‌توان عملکرد حیوانات و به خصوص نژادهای گوشتی را به طور قابل توجهی افزایش داد که این امر، یکی از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاح نژادی در کشور می‌باشد (Yazdi et al. 1997). برای رسیدن به این هدف، شناسایی ژن‌های موثر در رشد حیوان و بررسی میزان اثرات آنها بر روی صفات اقتصادی، امری ضروری به نظر می‌رسد. ژن فاکتور نکروز تومور آلفا (*TNFα*[1])، اصلی‌ترین میانجی شیمیایی پاسخ‌های التهابی حاد در مواجهه با عفونت با باکتری‌های گرم‌منفی و سایر میکروب‌های عفونت‌زا و مسئول بروز پاسخ ایمنی در عفونت‌های حاد است. اصلی‌ترین منبع تولید TNFα، سلول‌های بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای هستند و مهم‌ترین محرک آزادسازی این سیتوکین از ماکروفاژها، لیپوپلی ساکارید است (Farid-Hoseyni et al. 2001) این پروتئین اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط کارسول کشف شد (Carswell et al. 1975). ژن کدکننده پروتئین TNFα دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون است (Darlay et al. 2011). مشخص شده که TNFα قادر است همانند فاکتور رشد عمل کند (Vilcek and Palombella 1992) و به عنوان تکثیر دهنده سلولی بکار رود (Sugarman et al. 1985). همچنین TNFα می‌تواند تعدادی از سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها را تحریک کند (Adachi et al. 1992; Hattori et al. 1993; Schmiegel et al. 1993). ژن TNFα گوسفند در ناحیه کلاس III در مکان ژنی مجموعه اصلی سازگاری بافتی (MHC[2]) روی کروموزوم ۲۰ قرار گرفته است (Dukkipati et al. 2006 b). چندین مطالعه، ارتباط بین MHC و مقاومت یا حساسیت به بیماری در گوسفند را نشان داده‌اند (Dukkipati et al. 2006 a). علاوه بر نقش اصلی MHC در سیستم ایمنی میزبان، ارتباط ژنوتیپ‌های MHC با صفات تولیدی، تولیدمثلی و رشد نیز در گوسفند، بز و گاو شناسایی شده است (Stear et al. 1989; Ye et al. 2003; Sheikh et al. 2006; Geldermann et al. 2006). ارتباط چندشکلی ژن *TNFα* با صفات وابسته به رشد و افزایش وزن در خوک، موش، میمون و انسان نشان داده شده است (Uysa et al. 1997; Pihlajamaki et al. 2003; Szydlowski et al. 2011; Gray et al. 2011). پژوهش‌ها نشان داده که بافت چربی یکی از منابع مهم تولید *TNFα* است و میزان بیان این سیتوکین با افزایش وزن در گوسفندان افزایش می‌یابد (Daniel et al. 2003). در نژادهای مختلف گوسفند اطلاعات کمی در مورد چندشکلی ژن *TNFα* وجود دارد. در دهه ۱۹۹۰، ژن *TNFα* گوسفند توسط سه گروه مختلف تکثیر و توالی‌یابی شد. این توالی‌ها در دو مطالعه کاملاً مشابه بودند که در آنها ژن *TNFα* گوسفند، کدکننده یک توالی هدایت‌گر ۷۶ آمینواسیدی و یک پروتئین بالغ ۱۵۷ آمینواسیدی بود (Young et al. 1990; Green and Sargan 1991). توالی که در سومین مطالعه بدست آمد مشابه دو بررسی قبلی بود، به استثنای اینکه فاقد یک اسیدآمینه در توالی هدایت‌گر بود (Nash et al. 1991). در یک مطالعه، چندشکلی ژن *TNFα* گوسفندان نژادهای *Latxa* و *Rasa* با استفاده از روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP[3]) بررسی شد و سه جهش در ناحیه غیر کد شونده ۳' (3' UTR) این ژن گزارش شد. این جهش‌ها در یک حذف و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP[4]) با هم اختلاف داشتند و هیچ تفاوتی در توالی آنها در دو نژاد پیدا نشد. این جهش‌ها با TNF*01(حذف نوکلئوتید ۶۴)، TNF*02 (حذف نوکلئوتیدهای

[1] Tumor Necrosis Factor alpha

[2] Major Histocompatibility Complex

[3] Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism

[4] Single Nucleotide Polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir

۲۰۲-۲۰۰) و TNF*03 (SNP در نوکلئوتید ۲۴۸) توصیف شده‌اند (Alvarez-Busto et al. 2004). محققان دیگری، چندشکلی ژن *TNFα* را با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تحت حرارت (dHPLC[1]) در گوسفند نژاد *Charollais* بررسی کردند اما موفق به شناسایی چندشکلی در این جایگاه ژنی نشدند در صورتی که توالی cDNA منتشر شده در بانک ژن، چندشکلی A>G را در ناحیه 3' UTR پیشنهاد کرد. در مرحله بعد، آنها این چندشکلی را با آنزیم محدود کننده *TspRI* شناسایی کردند (Darlay et al. 2011). مطالعات در خصوص مکان‌یابی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات کمی (QTL) در گاو نشان داده که چندشکلی‌های ژن *TNFα*، ارتباط معنی‌داری با لوکوز گاوی (Konnai et al. 2006; Yudin et al. 2006; Bojarojc-Nosowicz et al. 2011)، ورم‌پستان (Xu et al. 2010) و وقوع اولین تخمک‌گذاری پس از زایمان (Shirasuna et al. 2011) دارند. در گوسفند، ارتباط چندشکلی ژن *TNFα* با صفات رشد و بیماری بطور محدود بررسی شده است. طبق مطالعات انجام شده، تکنیک PCR-SSCP برای شناسایی چندشکلی ژن *TNFα* در گوسفند مناسب ارزیابی شده است (Alvarez-Busto et al. 2004). تا بحال، هیچ گزارشی مبنی بر وجود چندشکلی در ژن *TNFα* در بین گوسفندان ایران ارائه نشده است. لذا اهداف این پژوهش شامل شناسایی چندشکلی اگزون ۴ و 3' UTR ژن *TNFα* و ارزیابی ارتباط چندشکلی‌های احتمالی با داده‌های فنوتیپی صفات رشد در جمعیت گوسفندان ماکویی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این پژوهش، از نمونه‌های خون ۹۰ رأس از گوسفندان نژاد ماکویی مرکز اصلاح نژاد و پرورش گوسفند ماکویی واقع در شهرستان ماکو که دارای شجره و رکورد بودند، استفاده شد. نمونه‌گیری به صورت تصادفی و از ورید وداجی توسط لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۰/۲ میلی‌لیتر خون کامل با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (*Fermentas, EU*) و مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز یک درصد تهیه شده با بافر (0.5X) TBE (شامل ۴۵ میلی‌مولار تریس بازی، ۴۵ میلی‌مولار اسید بوریک و یک میلی‌مولار EDTA با pH برابر ۸) حاوی اتیدیوم بروماید، ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی پیشنهاد شده توسط Alvarez-Busto et al. (2004) یک قطعه ۲۷۳ جفت بازی شامل قسمتی از ناحیه اگزون ۴ و ناحیه 3' UTR ژن *TNFα* با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد که توالی آغازگرها 5′- CTGCCGGAATACCTGGACTA-3′ و 5′- ovTNF-C2: TCCAGTCCTTGGTGATGGTT-3′ بود.

صحت توالی آغازگرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار *Amplifx* مورد تأیید قرار گرفت (Jullien 2008). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۴ میکرولیتر dNTP ۱/۲۵ میلی مولار، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۲۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلی‌مراز و ۴ میکرولیتر از DNA ژنومی انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و سپس مرحله اصلی تکثیر به تعداد ۳۵ چرخه (واسرشته سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه) و یک دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Master cycler (*Eppendrof, Germany*) جهت گسترش زنجیره DNA استفاده شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز شدند. قطعه تکثیر شده با استفاده از دستگاه ترانس‌لومیناتور مشاهده و عکس‌برداری شد. برای تشخیص اندازه

[1] Denaturing High-Performance Liquid Chromatography

Archive of SID
www.SID.ir

قطعات تکثیر شده از نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی (سیناژن- ایران) استفاده شد.

روش SSCP

برای تجزیه محصولات PCR به روش SSCP، ابتدا محصولات PCR، تک رشته‌ای شدند. برای این منظور دو میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل فرمامید ۹۵ درصد، EDTA (pH=8) ۰/۰۲ مولار، بروموفنل‌بلو ۰/۰۵ درصد و گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد) مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به روی یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید (Mousavizadeh et al. 2009). برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی به ابعاد ۲۰×۱۸×۰/۱ سانتی‌متر و از ژل آکریلامید غیرواسرشته‌ساز ۸ درصد استفاده شد (Shojaei et al. 2010). نمونه‌ها در ژل آکریلامید با ولتاژ ۲۰۰ ولت و به مدت سه ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و با بافر TBE (0.5 X) جهت مشاهده تفاوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Herring et al. 1982).

تجزیه و تحلیل آماری

معمولاً اندازه‌گیری تنوع درون جمعیتی توسط شاخص‌های مرسوم نظیر هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی موردانتظار (He)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب یا شاخص نئی (Nei)، متوسط هتروزیگوسیتی (تنوع ژنی) و شاخص شانون (I) مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، شاخص هتروزیگوسیتی، اندازه مؤثر آللی و آزمون مربع-کای از نرم افزار PopGene32 نسخه ۱/۳۱ استفاده شد (Yeh et al. 1999) که در آن شاخص هتروزیگوسیتی بر اساس رابطه تنوع ژنی نی (Nei 1973) به صورت احتمال متفاوت بودن دو آلل که به طور تصادفی از یک جمعیت گرفته می‌شود، محاسبه می‌شود:

$$(H = 1- \Sigma_i P_i^2)$$

به طوری‌که P_i فراوانی i امین آلل است. اندازه موثر آللی (تعداد آلل‌های موثر در تنوع درون جمعیت) بر اساس رابطه Kimura and Crow (1979) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) که بیانگر میزان تنوع در جمعیت است، بر اساس منبع Lewontin and Hubby (1966) $I = - \Sigma_i p_i ln(p_i)$ بدست آمدند.

که حداکثر مقدار I برابر ln(n) می‌باشد. برای ارزیابی اثر ژنوتیپ-های ژن *TNFα* بر صفات رشد از مدل آماری زیر استفاده شد:

$$Y_{ijklmn} = \mu + LS_i + YB_j + G_k + Sex_l + Age_{m+} e_{ijklm}$$

(Y_{ijklmn}) مقدار صفت برای هر دام، (μ) میانگین جامعه، (LS_i) اثر ثابت i امین چگونگی تولد (تیپ تولد)، (YB_j) اثر ثابت j امین سال تولد، (G_k) اثر تصادفی k امین ژنوتیپ، (Sex_l) اثر ثابت l امین جنس، (Age_m) اثر m امین سن رکوردگیری (بر حسب روز) به عنوان متغیر همراه، (e_{ijklm}) اثرات باقیمانده (خطای آزمایش).

عوامل تیپ تولد، سال تولد و جنس دام در تمامی صفات مورد بررسی اثر معنی‌داری نشان دادند و اثرات مادری، سن مادر، فصل تولد و ماه تولد در هیچ کدام از صفات اثر معنی‌داری نداشتند و در مدل وارد نشده‌اند. صفات مورد بررسی شامل رکوردهای وزن تولد (BW)، وزن از شیرگیری (WW)، وزن ۶ ماهگی (W6)، وزن ۹ ماهگی (W9)، وزن ۱۲ ماهگی (W12)، میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری (ADG3) و میانگین افزایش وزن روزانه از شیرگیری تا شش ماهگی (ADG6) بودند. علاوه بر رکوردهای مربوط به صفات رشد، اطلاعات مربوط به جنس و سن رکوردگیری (به عنوان عوامل ثابت) نیز در دسترس بودند که در مدل آماری وارد شدند. این اطلاعات در طی پنج سال یعنی سال‌های ۱۳۸۹- ۱۳۸۵ جمع‌آوری شده بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها از با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام شد (SAS Institute Inc 2004). نرمال‌سازی داده‌های صفت وزن ۹ ماهگی که از توزیع نرمال برخوردار نبودند با روش *Box-Cox* انجام شد که در این روش با کمک نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه *Transreg* ابتدا یک مقدار به نام لامبدا (λ) بدست آورده شد، سپس با کمک فرمول زیر داده‌ها نرمال شد:

$$X(n)=(x^{\lambda}) -1/\lambda$$

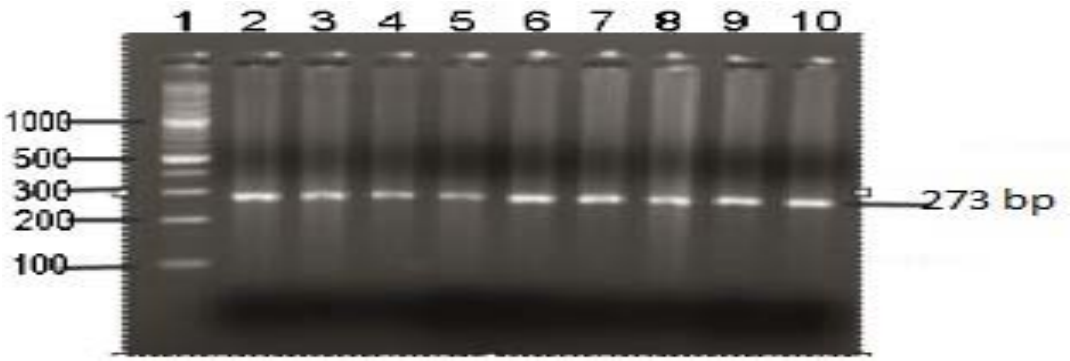
که در آن X(n) داده نرمال شده و X داده غیر نرمال می‌باشد. صفات مورد بررسی، توسط رویه GLM نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج و بحث

بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده (۲۷۳ bp) از ژن *TNFα*، از ژل آگارز دو درصد استفاده شد. همانطور که در شکل۱ مشاهده می‌شود، فقط یک باند ۲۷۳ bp و بدون باند اضافی به دست آمد که حاکی از اختصاصی بودن آغازگرها است. تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از الکتروفورز با ژل آکریلامید غیرواسرشته‌ساز ۸ درصد و رنگ-آمیزی با نیترات نقره با استفاده از روش SSCP، منجر به شناسایی سه الگوی باندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه شد (شکل۲). ملاک تشخیص و نحوه نامگذاری و تعیین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نتایج مطالعه Alvarez-Busto et al. (2004) انجام شد. در این پژوهش، با استفاده از الکتروفورز محصولات PCR تک‌رشته‌ای شده براساس روش SSCP، ۳ ژنوتیپ و ۳ آلل شناسایی شدند. فراوانی ژنوتیپ‌های EE، OE و RE به ترتیب ۰/۴۶۶۷، ۰/۳۵۵۶ و ۰/۱۷۷۷ و فراوانی آلل‌های E، O و R به ترتیب ۰/۷۳۳۳، ۰/۱۷۷۸ و ۰/۰۸۸۹ محاسبه شد (جدول۱). نتایج بدست آمده نشان داد که آلل E و ژنوتیپ EE به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۷۳۳۳ و ۰/۴۶۶۷ دارای بیشترین فراوانی بودند. Alvarez-Busto et al. (2004) سه جهش در ناحیه اگزون ۴ و 3' UTR ژن *TNFα* در گوسفندان نژادهای Latxa و Rasa گزارش کردند که منجر به شناسایی ۵ نوع ژنوتیپ OO، RR، OR، OE و RE و سه آلل O، R و E برای این ناحیه شد. نتایجی که از مطالعه حاضر به دست آمد تقریباً مشابه نتایج گزارش شده توسط Alvarez-Busto et al. (2004) بود به-طوری‌که در این مطالعه نیز ۳ آلل O، R و E شناسایی شد ولی سه ژنوتیپ بدست آمد که دو ژنوتیپ RE و OE مشابه نتایج آنها ولی ژنوتیپ EE متفاوت از نتایج آنها بود. این تفاوت در نوع و تعداد ژنوتیپ‌ها ممکن است مربوط به تفاوت در پتانسیل ژنتیکی نوع نژادهای مورد مطالعه، کوچک بودن تعداد نمونه‌های گرفته شده از جمعیت ماکویی در مطالعه حاضر و همچنین به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی و مهاجرت باشد. البته از آنجا که هیچ گونه پژوهشی غیر از مطالعه Alvarez-Busto et al. (2004) در گوسفند به شکل فوق گزارش نشده، نمی‌توان مقایسات کافی در این مورد انجام داد و نظر قطعی صادر نمود. تلاش‌های دیگر در گوسفند با استفاده از روش‌های دیگر مانند روش PCR-RFLP در پژوهش Engwerda et al. (1996) و روش dHPLC در مطالعه Darlay et al. (2011) برای شناسایی چندشکلی در ژن *TNFα* ناموفق بوده است، ولی همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر و مطالعه Alvarez-Busto et al. (2004) نشان داد، روش PCR-SSCP می-تواند برای شناسایی چندشکلی ژن *TNFα* در گوسفند مناسب باشد. آزمون مربع کای انجام شده بر روی نمونه‌های مطالعه شده در این پژوهش، عدم برقراری تعادل هاردی ـ واینبرگ را از لحاظ ژن *TNFα* نشان داد ($P\leq$ ۰/۰۵) که مخالف با نتایج Alvarez-Busto et al. (2004) بود. عدم تعادل مشاهده شده در گله گوسفند ماکویی می‌تواند به دلیل کوچک بودن اندازه نمونه مورد بررسی و وجود عوامل برهم زننده تعادل، نظیر جهش و انتخاب به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی در جمعیت مورد بررسی باشد. یکی از خصوصیات نشانگر مولکولی، تعداد آلل موثر است. در گوسفند ماکویی در جایگاه مورد مطالعه از ژن *TNFα*، تعداد آلل واقعی (Na) برابر سه و تعداد آلل موثر (Ne) برابر ۱/۷۳ محاسبه شد که نزدیکی مقادیر این دو عدد به همدیگر می‌تواند نشان دهنده کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی و تنوع ژنتیکی بالا باشد. هتروزیگوسیتی مورد انتظار در این پژوهش ۰/۴۲۵۱ برآورد شد به طوری که مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار گزارش شده توسط Alvarez-Busto et al. (2004) برای گوسفندان Latxa و Rasa به ترتیب ۰/۴۸۰ و ۰/۵۱۹ بود. شاخص نی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و شاخص شانون به ترتیب برابر ۰/۴۲۲۷، ۰/۵۳۳۳ و ۰/۷۴۹۷ برآورد شد که حاکی از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای این جمعیت از نظر ژن *TNFα* می‌باشد (جدول۲). توجه به این نکته ضروری است که در صورت کاهش تنوع ژنتیکی، قدرت انتخاب‌های ژنتیکی کاهش می‌یابد (Barker 1994). چندشکلی این ژن در سایر حیوانات بررسی شده است. در چندین مطالعه، چندشکلی ژن *TNFα* در نژادهای مختلف گاو و در نواحی مختلفی از این ژن بررسی شده است که همگی دو آلل و سه ژنوتیپ مختلف برای این جایگاه ژنی بدست آوردند (Yudin et al. 2006; Xu et al. 2010; Bojarojce-Nosowicz et al. 2011; Shirasuna et al. 2011)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- محصولات PCR بارگذاری‌شده بر روی ژل آگارز دو درصد. چاهک یک نشانگر مولکولی bp ۱۰۰ (سیناژن، ایران)، چاهک‌های ۱۰-۲ محصولات PCR (قطعه ۲۷۳ جفت بازی) ژن *TNFα*.

شکل۲- الگو های مختلف SSCP مشاهده شده ژن *TNFα* در گوسفندان ماکویی بر روی ژل آکریلامید ۸ درصد.

جدول۱- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و آزمون مربع‌کای مشاهده‌شده برای ژن *TNFα* در گوسفندان ماکویی. خطای استاندارد فراوانی‌ها ۰/۰۲۸ می‌باشد.

χ^2	فراوانی آل‌ها			فراوانی ژنوتیپ‌ها		
	R	O	E	RE	OE	EE
۱۱/۶۱*	۰/۰۸۸۹	۰/۱۷۷۸	۰/۷۳۳۳	۰/۱۷۷۷	۰/۳۵۵۶	۰/۴۶۶۷

جدول۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن *TNFα* در گوسفندان ماکویی

شاخص شانون	هموزیگوسیتی مشاهده‌شده	هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده	هموزیگوسیتی موردانتظار	هتروزیگوسیتی موردانتظار	هتروزیگوسیتی Nei
۰/۷۴۹۷	۰/۴۶۶۷	۰/۵۳۳۳	۰/۵۷۴۹	۰/۴۲۵۱	۰/۴۲۲۷

از آنجا که *TNFα* یکی از سیتوکین‌هایی است که همانند فاکتور رشد عمل می‌کند (Vilcek and Palombella 1992)، ژن آن می‌تواند یکی از ژن‌های انتخابی جهت بررسی صفات مرتبط با رشد باشد. تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی در مطالعه حاضر، نشان داد که ژنوتیپ‌های حاصل از ژن *TNFα* تاثیر معنی‌داری روی صفات وزن شیرگیری، وزن‌های ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی و میانگین افزایش وزن روزانه از شیرگیری تا ۶ ماهگی نداشت اما روی صفت وزن تولد و میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری، اثر معنی

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های مختلف ژن *TNFα* برای صفات رشد (میانگین ± انحراف معیار) در گوسفند ماکویی

صفت (کیلوگرم)	ژنوتیپ		
	(۴۲)EE	(۳۲)OE	(۱۶)RE
وزن تولد	۴/۳۲ ± ۰/۱ [a]	۴/۱۴ ± ۰/۲۲ [ab]	۴/۰۷ ± ۰/۱۴ [ab]
وزن شیرگیری	۲۴/۳۹ ± ۱/۲۵ [a]	۲۱/۴۷ ± ۱/۳۶ [a]	۱۸/۹۵ ± ۰/۱ [a]
وزن ۶ ماهگی	۳۰/۷۵ ± ۲/۲۵ [a]	۳۰/۶۶ ± ۱/۰۹ [a]	۲۸/۸ ± ۰/۸۹ [a]
وزن ۹ ماهگی	۳۸/۶ ± ۱/۸ [a]	۳۹/۳۵ ± ۱/۱ [a]	۳۸/۳۳ ± ۱/۱۹ [a]
وزن ۱۲ ماهگی	۴۱/۹ ± ۲/۹ [a]	۲۴/۲ ± ۱/۱ [a]	۴۰/۸ ± ۲/۹ [a]
میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری	۰/۲۲۴ ± ۰/۰۴ [a]	۰/۱۸۱ ± ۰/۰۶ [ab]	۰/۱۷۶ ± ۳/۰۳ [ab]
میانگین افزایش وزن روزانه از شیرگیری تا ۶ ماهگی	۰/۰۷۸ ± ۰/۰۰۲ [a]	۰/۰۸۲ ± ۰/۰۰۳ [a]	۰/۰۹۷ ± ۰/۰۰۱ [a]

*در هر ردیف هر دو میانگین با حروف لاتین غیرمشابه، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد. اعداد داخل پرانتز، تعداد دام است.

داری ($P<۰/۰۵$) داشت (جدول۳). دلیل این امر احتمالاً به دلیل اثرات تیپ تولد، سال تولد و جنس دام باشد که در صفات مورد بررسی اثر معنی داری نشان دادند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد دام‌های با ژنوتیپ EE دارای بیشترین میانگین وزن تولد و افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری (به ترتیب ۴/۳۲ کیلوگرم و ۰/۲۲۴ کیلوگرم در روز) و دام‌های با ژنوتیپ RE دارای کمترین میانگین وزن تولد و افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری (به ترتیب ۴/۰۷ کیلوگرم و ۰/۱۷۶ کیلوگرم در روز) نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر هستند. با توجه به عملکرد بالای ژنوتیپ EE در این صفات نسبت به دیگر ژنوتیپ‌ها، احتمالاً ژنوتیپ EE در بهبود این صفات در گوسفند موثر باشد. همچنین مشاهده شد که اختلاف ژنوتیپ EE با سایر ژنوتیپ‌ها معنی‌دار نیست. چندشکلی‌های ژن *TNFα* و ارتباط آنها با صفات مرتبط با رشد و چاقی یا افزایش وزن در سایر حیوانات نیز بررسی شده است. در یک مطالعه، اثر تنوع ژنوتیپی ژن *TNFα* بر صفات چاقی از جمله افزایش وزن روزانه، میزان تولید گوشت بدون چربی و ضریب تبدیل غذایی در نژادهای مختلف خوک بررسی شد و ارتباط معنی‌داری بین صفات چاقی و SNP در ناحیه راه‌انداز ژن *TNFα* (g.6464 C>T) بدست آمد که نشان می‌دهد این ارتباط معنی‌دار مربوط به ناحیه راه‌انداز این ژن در نژادهای مختلف خوک است (Szydlowski et al. 2011). Gray et al. (2011) نشان دادند که ۸ نوع SNP (-809G, -756A, -352C, -322A, +1285T, +2133T, +2362A, +2405) در ژن *TNFα*، ارتباط معنی‌داری با صفات وابسته به چاقی از جمله شاخص توده بدنی (BMI)، دور کمر و کلسترول پلاسما ($P<۰/۰۵$) در میمون‌های *Vervet* دارند. در انسان نیز چندین مطالعه، ارتباط چاقی یا افزایش وزن را با یک نوع SNP در ناحیه راه‌انداز ژن *TNFα* (G-308A) بررسی کردند و تفاوت معنی‌داری را بین این SNP با چاقی نشان دادند (Hermann et al. 1998; Brand et al. 2001; Dalziel et al. 2002; Pihlajamaki et al. 2003). نتایج پژوهش حاضر بر روی گوسفند ماکویی تا حدودی مشابه با پژوهش‌های قبلی بوده به طوری که در پژوهش حاضر نیز اثر چندشکلی ژن *TNFα* روی افزایش وزن روزانه قبل از شیرگیری معنی‌دار بود. اثر چندشکلی این ژن روی وزن تولد و سایر وزن‌ها در مطالعات قبلی بررسی نشده است. با توجه به نقش اصلی این جایگاه ژنی بر سیستم ایمنی، اثر معنی‌دار مشاهده شده در پژوهش حاضر، ممکن است به علت تفاوت‌ها در مقاومت به بیماری بین گوسفندان دارای ژنوتیپ‌های مختلف *TNFα* باشد که می‌تواند روی عملکرد رشد

Archive of SID
www.SID.ir

افراد موثر باشد (Geldermann et al. 2006). ارتباط چندشکلی ژن‌های دیگر نیز با صفات رشد در گوسفند ماکویی بررسی شده است. Farhadian et al. (2012) چندشکلی ژن میوستاتین را در گوسفند ماکویی با روش PCR-SSCP بررسی کردند و ۴ الگوی ژنوتیپی مختلف (AD، AC، AE و BC) بدست آوردند. ارتباط این ژنوتیپ‌ها با صفات رشد بررسی شد و آشکار شد که این ژنوتیپ‌ها با وزن تولد ارتباط معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Tahmoorespur et al. (2011) با بررسی چندشکلی جایگاه‌های ژنی کالپین و گیرنده آندروژنی β_3 با ارزش ارثی برآورد شده صفات رشد در گوسفند بلوچی با استفاده از روش PCR-SSCP موفق به شناسایی سه الگوی ژنوتیپی (AB ,AA و BB) مختلف شدند، که مشابه پژوهش حاضر ژنوتیپ‌های کالپین رابطه معنی‌داری با ارزش‌های ارثی برآورد شده با صفت وزن تولد داشتند. Shojaei et al. (2010) در پژوهشی با بررسی چندشکلی ژن لپتین در گوسفند کرمانی به روش PCR-SSCP موفق به شناسایی ۱۰ الگوی مختلف ژنوتیپی شدند. لذا می‌توان گفت تکنیک PCR-SSCP در شناسایی چندشکلی ژنوتیپی در گوسفندان بومی کشور موفق و کارآمد بوده و به عنوان روشی کم‌هزینه و مناسب در بررسی چندشکلی ژنوتیپی در گوسفندان کشور توصیه می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، تعداد نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش کافی به نظر نمی‌رسد، لذا بهتر است در مطالعات آینده در مورد ژن *TNFα* و ارتباط چندشکلی آن با صفات رشد از تعداد نمونه‌های بزرگتری جهت تعمیم نتایج آنها به جمعیت‌های مورد بررسی استفاده شود. در مجموع، انجام مطالعاتی از این دست با تعداد نمونه‌های بیشتر می‌تواند به یک نتیجه‌گیری قاطع و قابل اتکایی در زمینه ارتباط چندشکلی‌های ژن *TNFα* و صفات رشد منجر شود و در کنار فاکتورهای رشد دیگر به معرفی یک نشانگر ژنتیکی جدید مؤثر بر صفات رشد کمک نماید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقای مهندس شجاع جعفری مسئول محترم مرکز پرورش و اصلاح‌نژاد گوسفند ماکویی به خاطر در اختیار گذاشتن اطلاعات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Adachi K, Belser P, Render H, Li D, Rodeck U, Benveniste EN, Woo D, Schmiegel WH, Herlyn D (1992) Enhancement of epidermal growth factor receptor expression on glioma cells by recombinant tumor necrosis factor α. Cancer Immunology, Immunotherapy 34:370-376.

Alvarez-Busto J, Ruiz-Nunez A, Mazon LI, Jugo BM (2004) Detection of polymorphisms in tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep. European Journal of Immunogenetics 31: 155-158.

Barker JSF (1994) A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5th World congress on Genetics Applied to Livestock Production. University of Guelph, Guelph Canada 21: 501-508.

Bojarojc-Nosowicz B, Kaczmarczyk E, Stachura A, Kotkiewicz M (2011) Polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene in cattle herds naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus. Polish Journal of Veterinary Sciences 14: 671-673.

Brand E, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J, Distler A, Sharma AM (2001) Tumor Necrosis Factor-308 G/A polymorphism in obese Caucasians. International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders 25: 581-585.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL. Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 72: 3666-3670.

Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID (2002) Association of the TNF-α -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. Journal of Obesity Research 10: 401-407.

Daniel JA, Elsasser TH, Morrison CD, Keisler DH, Whitlock BK, Steele B, Whitlock K, Sartin JL (2003) Leptin, tumor necrosis factor-a (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep. Journal of Animal Science 18: 2590-2599.

Darlay RJ, McCarthy AJ, Illot NE, Smith JE, Shaw MA (2011) Novel polymorphisms in ovine immune response genes and their association with abortion. Animal Genetics 42: 535-543.

Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A (2006a) 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. New Zealand Veterinary Journal 54: 153- 160.

Archive of SID

www.SID.ir

Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A (2006b) 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. Genetics and Molecular Research 5: 581-608.
Engwerda CR, Dale CJ, Sandeman RM (1996) IgE, TNFα, IL1β, IL4 and IFNγ gene polymorphisms in sheep selected for resistance to fleece rot and flystrike. International Journal for Parasitology 26: 787-791.
Farhadian M, Hashemi A, Mardani K, Darvishzadeh R, Jafari S (2012) Polymorphisms in the ovine myostatin gene are associated with birth weight but not with weight gain in Iranian Makoei sheep. Genetics and Molecular Research 11: 3568-3575.
Farid-Hoseyni R, Mahmoodi M, Rezayi SA (2001) Cellular and molecular immunology, Jahad Daneshgahi publication, Mashhad, Iran. (in Farsi).
Geldermann H, Mir MR, Kuss AW, Bartenschlager H (2006) OLA-DRB1 microsatellite variants are associated with ovine growth and reproduction traits. Genetics Selection Evolution 38: 431- 444.
Gray SB, Langefeld CD, Ziegler JT, Hawkins GA, Wagner JD, Howard TD (2011) Single-nucleotide polymorphisms in the TNF gene are associated with obesity-related phenotypes in Vervet Monkeys. Obesity 19: 1427-1432.
Green IR, Sargan DR (1991) Sequence of the cDNA encoding ovine tumor necrosis factor-alpha: problems with cloning by inverse PCR. Gene 109: 203-210.
Hattori A, Tanaka E, Murase T, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, Hayashi K, Kohno M (1993) Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. Journal of Biological Chemistry 268: 2577-2582.
Hermann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F (1998) Polymorphisms of the Tumor Necrosis Factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. European Journal of Clinical Investigation 28: 59-66.
Herring AJ, Inglis NF, Ojeh C, Snodgrass DR, Menzies JD (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. Journal of Clinical Microbiology 16: 473-477.
Israel C, Weller JI (2002) Estimation of quantitative trait loci effects in dairy cattle populations. Journal of Dairy Science 85:1285-1297.
Jullien N (2008) Amplifx version 1.5.4 (software). Available at: http:// ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page.
Khaldari M (2003) Sheep and goat husbandry. Jahad Daneshgahi publication, (in Farsi).
Kimura M, Crow J (1979) The number of alleles that can be maintained in a finite Population. Genetics 49: 725-738.
Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K Ohashi K, Onuma M (2006) Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. Microbes and Infection 8: 2163-2171.
Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics 54: 595-609.
Mousavizadeh A, Mohammad Abadi M, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailizadeh Koshkoieh A (2009) Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian Journal of Biotechnology 7: 51-53.
Nash AD, Barcham GJ, Brandon MR, Andrews AE (1991) Molecular cloning, expression and characterization of ovine TNFα. Immunology Cell Biology 69: 273-283.
Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 70: 3321-3323.
Pihlajamaki J, Ylinen M, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M (2003) The effect of the -308A allele of the TNF-α gene on insulin action is dependent on obesity. Journal of Obesity Research 11: 912-917.
SAS Institute Inc (2004) SAS/STAT User's Guide, Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
Schmiegel W, Roeder C, Schmielau J, Rodeck U, Kalthoff H (1993) Tumor necrosis factor induces the expression of transforming growth factor α and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 90: 863-867.
Sheikh FD, Bhattacharya TK, Kumar P, Sharma A (2006) DRB3.2 gene polymorphism and its association with pashmina production in Changthangi goat. International Journal of Immunogenetics 33: 271-276.
Shirasuna K, Kawashima C, Murayama C, Aoki Y, Masuda Y, Kida K, Matsui M, Shimizu T, Miyamoto A (2011) Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. Journal of Reproduction and Development 57: 135-142.
Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, Esmailizadeh KA, Ferdowsi MH, Torabi A, Tayyarzadeh M, Mirzakhani H (2010) Using PCR-SSCP Technique to Investigate Polymorphism of Leptin Gene in Kermani Sheep. Journal of Animal Science Reaserch 2: 115-122. (In Farsi).
Stear MJ, Pokarny TS, Echternkamp SE, Lunstra DD (1989) The influence of the BoLA-A locus on reproductive traits in cattle. International Journal of Immunogenetics 16: 77-88.
Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Shepard HM (1985) Recombinant tumor necrosis factor - α: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. Science 230: 943-45.
Szydlowski M, Buszka A, Mackowski M, Lechniak D, Switonski M (2011) Polymorphism of genes encoding cytokines IL6 and TNF is associated with pig fatness. Livestock Science 136: 150-156.
Tahmoorespur M, Karimi D (2011) Assessment Association Between CAPN3 and ADRB3 Genes Polymorphism and Estimated Breeding Values (EBVs) of

Archive of SID
www.SID.ir

Growth Traits in Baluchi Sheep. Iranian Journal of Animal Science Research 3: 74-80. (In Farsi).
Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-a function. Nature 389: 610-614.
Vilcek J, Palombella VJ (1992) TNF as a growth factor. In: Aggarwal BB and Vileck J (eds) Tumor necrosis factors: structure function and mechanism of action. Dekker, New York 269-287.
Xu AJ, Liu XL, Guo JZ, Xia Z (2010) Polymorphism of bovine TNF-a gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. Hereditas 32: 929-934.
Yazdi MH, Engstrom G, Nasholm A, Johansson K, Jorjani H, Liljedahl LE (1997) Genetic parameters for lamb weight at different ages and wool production in Baluchi sheep. Journal of Animal Science 65: 247-255.
Ye SC, Chu MX, Chen GH (2003) Progress on MHC polymorphism and its relationship with economic traits in dairy cattle. Hereditas 25: 89-92.
Yeh FC, Boyle T, Yang R (1999) POPGENE version 1.31. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Canada.
Young AJ, Hay JB, Chan JY (1990) Primary structure of ovine tumor necrosis factor alpha cDNA. Nucleic Acids Research 18: 6723.
Yudin NS, Vasil'eva LA, Kobzev VF, Kuznetsova TN, Ignatieva EV, Oshchepkov DY, Voevoda MI, Romaschenko AG (2006) Association study of SNP of the TNF-alpha gene with bovine leukosis and evaluation of its functional significance. Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk, Russia 3:245-248.

Archive of SID

www.SID.ir