ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۱۲۰-۱۱۷

بررسی بیوانفورماتیکی اگزون شماره دو ژن *BMP15* در بزهای تالی و بیتال

Bioinformatics analysis of the *BMP15* exon 2 in Tali and Beetal goats

مرتضی هادی‌زاده[۱]، علی نیازی*[۲]، محمدرضا محمدآبادی[۱]، علی اسماعیلی‌زاده[۱]، یاسر مهدی‌زاده‌گزویی[۲]

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشیاران، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- به ترتیب دانشیار و دانش آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه شیراز

Hadizadeh M[1], Niazi A*[2], Mohammad Abadi M[3], Esmailizadeh A[3], Mehdizadeh Gazooei Y[4]

1. Graduate MSc Student and Associate Professors, Shahid Bahonar University of Kerman.
2. Associate Professor, Graduate MSc Student, Shiraz University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: niazi@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۷- تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۴)

چکیده

به کارگیری فن‌آوری‌های مولکولی، منجر به کشف جهش‌هایی با اثر عمده بر بازدهی تولید مثل بز شده است. با توجه به اهمیت چندقلو زایی، در این پژوهش، وجود جهش‌ها در تحقیقات پیشین و جهش‌های نوین در ژن *BMP15* در دو نژاد بیتال و تالی بررسی شد. پس از استخراج DNA از خون بزهای بیتال و تالی و واکنش PCR، تعیین توالی ۹ فرآورده PCR (از بزهای دارای رکوردهای زایش متفاوت) از نژادهای یاد شده انجام شد. آنالیز توالی‌ها نشان داد که در نژاد بیتال تغییر نوکلئوتیدی مشاهده نشد. در نژاد تالی در نوکلئوتید شماره ۸۰۷ یک جهش هتروزایگوت وجود داشت که منجر به تغییر اسید آمینه گلوتامین به گلوتامیک اسید می شود. با توجه به جایگزینی یک اسید آمینه باردار به جای یک اسید آمینه بدون بار، به نظر می‌رسد که این جهش موجب تغییر در پتانسیل سطح الکتریکی و ساختار سه بعدی پروتئین حاصل شده که این رخداد فعالیت زیستی آن را به چالش می-کشد.

واژه‌های کلیدی

بز بیتال
بز تالی
تعیین توالی
جهش
ژن *BMP15*

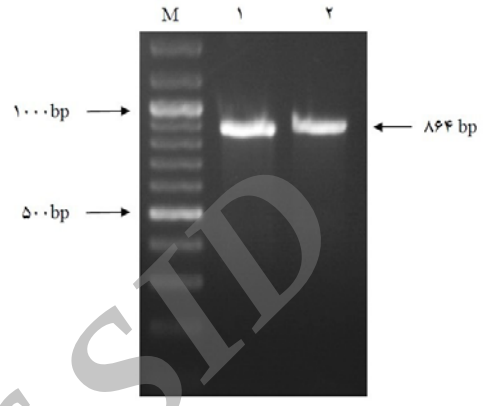
Archive of SID
www.SID.ir

با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه‌ی اخیر، تجهیرات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به طور گسترده‌ای افزایش یافته‌است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به دست‌آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می کند. پژوهش‌های انجام شده از سال ۱۹۸۰ در رابطه با الگوهای وراثت و آزمون DNA ژن‌های مهم در باروری نشان داده است که برخی ژن‌ها دارای پتانسیلی هستند که به طور معنی‌داری بازدهی تولید مثل را در گوسفندان افزایش می‌دهند. نرخ تخمک‌ریزی یکی از سازه‌های مهم در تعیین بازدهی تولیدمثلی است. در گونه‌های مختلف پستانداران، گونادوتروپین‌ها، هورمون‌های متابولیکی و فاکتورهای رشد پاراکرینی، گامه‌های فولیکول‌سازی و تخمک-ریزی را کنترل می‌کنند (Hunter et al. 2004). پژوهش‌ها، نقش حیاتی فاکتورهای پاراکرینی مانند پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۱۵[1] (BMP15) را در رشد آغازین فولیکول و نرخ تخمک‌ریزی نشان دادند (McNatty et al. 2004). هنگام تکامل برون تنی، فاکتورهای تراوش شده به وسیله اووسیت، به ویژه BMP15، با اثر بر عملکرد یاخته‌های کومولوس، نرخ نمو اووسیت را افزایش می‌دهند. مشخص شد که جهش در ژن *BMP15* موجب تغییر در رشد فولیکولی و باروری می‌شوند (Galloway et al 2000; Hanrahan et al. 2004). جهش‌های شناخته شده در این ژن، دربرگیرنده $FecX^G$ و $FecX^B$ (Hanrahan et al. 2004)، $FecX^I$ و $FecX^H$ (Galloway et al. 2000)، $FecX^L$ (Bodin et al. 2007) و $FecX^R$ (Martinez-Royo et al. 2008; Monteagudo et al. 2009) چنین اثری دارند. باروری یکی از صفات مهم اقتصادی در پرورش گوسفند و بز است. روشن است که هزینه نگهداری یک دام که دو یا چند قلو آبستن است به مراتب کمتر از هزینه نگهداری دو یا چند دام است که هر یک تک قلو آبستن هستند. در گله‌های با نرخ زایش بالا، به ازای هزینه‌های نگهداری صرف شده، نوزادان بیشتری و در نتیجه فرآورده‌های دامی بیشتری در واحد زمان تولید می‌شود. خاستگاه بز تالی کشورهای حوزه خلیج فارس است، وزن تولد، وزن بلوغ و دوقلوزایی در این نژاد به ترتیب ۲/۵ کیلوگرم، ۳۰ کیلوگرم و ۲۷ درصد می‌باشد (Mobaraki A and Vatankhah 2002). خاستگاه بز بیتال هم کشورهای هندوستان و پاکستان است. وزن تولد، وزن بلوغ و دوقلوزایی در نژاد بیتال به ترتیب ۲/۸ کیلوگرم، ۴۷ کیلوگرم و ۵۲/۶ درصد گزارش شده است (GOATWORDS 2012). هدف از اجرای این پژوهش، بررسی وجود جهش‌های شناخته شده و یا جهش‌های نوین در اگزون دوم *BMP15* و بررسی بیوانفورماتیکی آن‌ها در دو نژاد بیتال و تالی بود. در ایستگاه اصلاح نژاد بز تالی در شهرستان بندرعباس، تعداد ۶۰ نمونه خون از بزهای تالی و ۵۰ نمونه خون از بزهای بیتال از گله‌های مردمی در شهرستان زرند و مناطق اطراف شهر کرمان جمع‌آوری شد، نمونه‌گیری از این نژادها به صورت شجره‌ای بود. نمونه‌های خون در هر نژاد در دو گروه نمونه‌های حاصل از افراد دارای رکوردهای زایش پایین (تک قلوزایی متوالی) و نمونه‌های حاصل از افراد دارای رکوردهای زایش بالا (دوقلوزایی متوالی) گروه-بندی شدند. استخراج DNA از خون به روش نمکی انجام گرفت (Miller et al. 1998). برای انجام واکنش PCR، از آغازگرهای پیشرو با توالی نوکلئوتیدی 5'- TGCAGGCTCCTGGCACATACAGAC -3' و پیرو 5'- TCACCTGCATGTGCAGGACTGGG -3' استفاده شد (Xue-qin et al. 2009). چرخه‌های حرارتی PCR به صورت زیر انجام گرفت: واسرشت‌سازی آغازین در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه) که با ۳۰ چرخه گرمایی با گامه های متوالی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و در پی آن ها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه ادامه یافت. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرو لیتر و با استفاده از مواد استاندارد آن انجام شد. پس از واکنش PCR، درستی اندازه قطعه تکثیر شده (۸۶۴ جفت بازی) با ژل آگارز یک درصد تایید (شکل۱) و تعداد ۵ نمونه از

[1] Bone morphogenetic protein 15

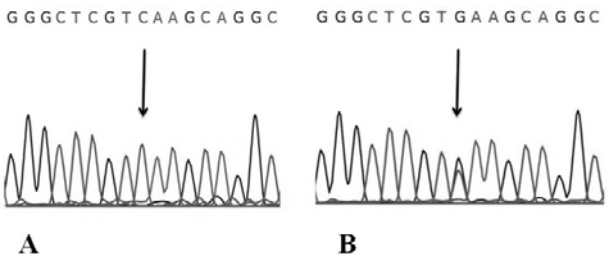
Archive of SID
www.SID.ir

فرآورده‌های PCR از نژاد تالی (۳ نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی بالا و ۲ نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی پایین) و ۴ نمونه از نژاد بیتال (۲ نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی بالا و دو نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی پایین) تعیین توالی و نتیجه آن به وسیله نرم‌افزار Vector NTI بررسی شد.



شکل ۱- فرآورده‌های PCR برای آغازگر BMP15

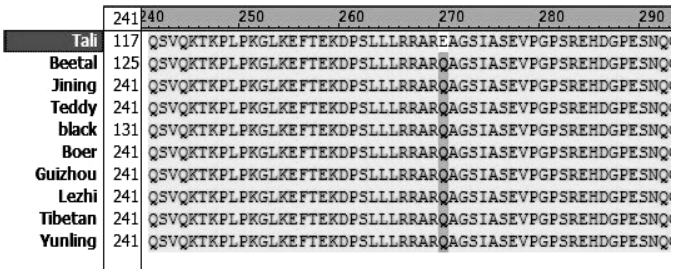
با ردیف آرایی[1] توالی‌ها بزهای بیتال و تالی با توالی‌های گرفته شده از GenBank به وسیله نرم‌افزار Vector NTI و پس از آنالیز داده‌ها مشخص شد که در نژاد بیتال تغییری در توالی نوکلئوتیدی BMP15 رخ نداده است. اما در نژاد تالی یک جهش تک نوکلئوتیدی در جایگاه bp ۸۰۷ دیده شد. بررسی گراف‌ها نشان داد که این تغییر به شکل هتروزایگوت است. در این تغییر نوکلئوتید گوانین (G) جایگزین سیتوزین (C) شده بود (شکل۲). این نمونه مربوط به فردی دو قلوزا بود. مشابه این جهش در همین جایگاه برای افراد دارای رکورد پایین (تک‌قلوزا) مشاهده نشد.



شکل۲- جابجایی نوکلئوتیدی در ژن *BMP15* که منجر به جایگزینی یک گوانین به جای یک سیتوزین شد (B)، در مقایسه با توالی نوع وحشی نژاد تالی (A).

[1] Alignment

پس از ترجمه توالیDNA یاد شده و توالی‌های اسید آمینه به دست آمده از GenBank، و با ردیف آرایی به وسیله نرم‌افزار Vector NTI، مشخص شد که در ریشه ۲۶۹ (ریشه یک پپتید بالغ) تغییری در توالی اسیدآمینه‌ها رخ داده است. در واقع در ردیف آرایی اسیدهای آمینه در جایگاه یاد شده، اسیدآمینه گلوتامیک اسید (با نام اختصاری E) جایگزین گلوتامین (با نام اختصاری Q) شده بود (شکل۳). در تعیین توالی اولیه، در دو نمونه تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شد و از آنجایی که این تغییر نوکلئوتیدی سبب تغییر در توالی اسید آمینه شده بود، این دو نمونه دوباره تعیین توالی شد. در تعیین توالی دوم نیز این جهش تایید شد (در یکی از دو نمونه).



شکل ۳- تغییر اسید آمینه گلوتامین به گلوتامیک اسید در ریشه ۲۶۹، در مقایسه با نژادهای دیگر

هفت مورد از ۲۰ اسیدآمینه زنجیرهای جانبی دارند که به راحتی یونیزه می‌شوند. این هفت اسیدآمینه می‌توانند با دادن یا گرفتن پروتون سبب تسهیل واکنش شوند و از طرفی تولید پیوندهای یونی کنند. این هفت اسیدآمینه عبارتند از: Tyr, Cys Arg, Lyz, His, Asp & Glu (Mohammadi 2009). مدلینگ جهش اخیر از لحاظ تغییر بار، شباهت زیادی به جهش (*FecX*^{I}) دارد، در *FecX*^{I} یک تغییر نوکلئوتیدی T به A وجود دارد که والین آب گریز و بدون بار را برای آسپارتیک اسید دارای بار منفی در ریشه ۳۱ پپتید بالغ BMP15 جایگزین می‌کند. جهش *FecX*^{I} موجب جایگزینی محافظت نشده اسیدآمینه در ریشه ۳۱ پروتئین بالغ BMP15 می‌شود. میش‌های داری جهش‌های *FecX*^{I} فنوتیپ همانندی را نشان می‌دهند زیرا جهش *FecX*^{I} که موجب ایجاد کدون پایانی در ریشه‌های ۲۳۹ پروپروتئین BMP15 می‌شوند، از تولید شکل بالغ و فعال از نظر بیولوژیکی جلوگیری می‌کنند. بنابراین، این جهش‌ها موجب از دست رفتن کنش‌های BMP15 و

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش نرخ تخمک‌ریزی و یا ناباروری به ترتیب در هتروزیگوت و یا هموزیگوت‌های موتانت می‌شوند. (Galloway et al. 2002). از آن جایی که فعالیت زیستی پروتئین فاکتور رشد و تمایز ۹ (GDF9) و BMP15 بصورت دایمر (Dimer) است؛ چه به صورت همودایمر (GDF9-GDF9) و یا (BMP15-BMP15) و چه به صورت هترودایمر (GDF9-BMP15) (Hanrahan et al. 2004). در جابجایی اسیدآمینه گلوتامیک اسید به جای گلوتامین، یک اسید آمینه باردار قطبی (Glu) جایگزین یک اسید آمینه بدون بار قطبی (Gln) شد. این جابجایی در شکل‌گیری دایمر تاثیر دارد، به گونه‌ای که سبب تغییر در پتانسیل سطح الکتریکی در منطقه جابجایی می‌شود که این رخداد فعالیت زیستی را به چالش می-کشد (Galloway et al. 2002).

منابع

Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P (2007) A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. Endocrinology148:393-400.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitenen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetics 25:279-283.

Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH (2002) BMP15 mutations and ovarian function. Molecular and Cellular Endocrinology 191:15-18.

GOATWORLD (2012) Agricultural research service united state department of agriculture. Available at http://www.goatworld.com/breeds/beetal.shtml. GOATWORLD, Colorado, USA.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). Biology Reproduction 70:900-909.

Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R (2004) Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. Animal Reproduction Science 82-83: 461-477.

Martinez-Royo A, Jurado JJ,. Smulders JP, Martı JI, Alabart JL, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P, Serrano M, Folch J, Calvo JH (2008) A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. International Society for Animal Genetics, Animal Genetics. 39: 294-297.

McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL (2004) The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. Reproduction 128:379-386.

Mobaraki A, Vatankhah M (2002) The introduction of goat breeds in Iran, Research final Report. Research, Agriculture organization, Mashhad, Iran (In Farsi).

Mohammadi R (2009) Biochemistry, Aeezh publisher, Tehran, Iran. (In Farsi).

Monteagudo LV, Ponz Ricardo, Tejedor M, Teresa, Lavina Adolfo, Sierra Isidro (2009) A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. Animal Reproduction Science 110. 139-146.

Xue-qin R, Jian-bin LD, Zhi-yong Q, Cheng W, Jia-fu (2009). Diversity of BMP15 and GDF9 genes in White Goat of Guizhou Province and Evolution of the Encoded Proteins. Zoological 30:593-602.

Archive of SID

www.SID.ir