Archive of SID

سومین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی
3rd National Conference on New Concepts in Agriculture
دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
دانشکده کشاورزی
پنج شنبه ۲۶ آذرماه ۱۳۹۴

آنالیز تنوع ژنتیکی و تعادل هاردی وینبرگ در یک جمعیت گوسفند نژاد شال برای ژن $IGFBP_3$

ابراهیم قرینی*، علی قاضی خانی شاد، محمد هادی رسولی
گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
Email: Ebrahimgharini@gmail.com

چکیده

هورمون فاکتور رشد شبه انسولین یا IGF در مایعات بیولوژیکی به یکی از ٦ پروتئین باند شونده (IGFBP) وصل می شوند که عمده ترین آنها پروتئین تیپ ۳ می باشد. این پروتئین ها دارای نقش های متفاوتی در تنظیم فعالیت بیولوژیکی IGF میباشند. پروتئین باند شونده تیپ ۳ به عنوان حامل IGF عمل کرده و نیمه عمر آن را طولانی تر می کند و در سطح سلولی IGFBP هامی توانند سبب فعال یا غیر فعال شدن فعالیت بیولوژیکی هورمون IGF شوند. این ژن بر روی کروموزوم ٤ گوسفند قرار دارد. تحقیق حاضر با هدف آنالیز ژنتیکی و بررسی وضعیت تعادل هاردی وینبرگ در اینترون ٤ این ژن در گوسفندان نژاد شال به روش PCR-RFLP بود. بدین منظور، DNA ژنومی از ۱۰۰ راس گوسفند نژاد شال و با کمک کیت اختصاصی DNAfast استخراج شد. ناحیه ژنی مورد نظر با طول ۲٤۹ جفت کیلو باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. قطعات مورد تکثیر نیز با کمک آنزیم HaeIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که سه ژنوتیپ برای این جایگاه ژنی وجود دارد که فراوانی ژنوتیپی این سه ژنوتیپ به ترتیب ۵۹، ۳٦ و ۵ درصد برای ژنوتیپهای CT،CC و TT بدست آمد. همچنین نتایج نشان داد که در این جمعیت برای جایگاه ژنی مذکور تعادل برقرار است.

واژگان کلیدی: آنالیز ژنتیکی، تعادل هاردی وینبرگ، پلی مورفیسم، ژن IGFBP3، گوسفند شال

مقدمه

زیست فناوری همگام با ورود در سایر بخشهای تحقیقاتی کشور، در بخش کشاورزی و خصوصاً دامپروری تاثیرات بسزایی از خود نشان داده است. از اوایل دهه۸۰ میلادی نشانگرهای جدید DNA پیشنهاد و معرفی شدند و در طی یک دهه تکاملی شگرف و تحسین بر انگیز داشتند. انواع مختلفی از این نشانگرها با تفاوت‌های بسیار از لحاظ تکنیکی و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازبندی، تجزیه وتحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و معرفی گردیده‌اند (مردانی، ۱۳۸۲). وظیفه پروتئینهای باند شونده (IGFBP) که عمده ترین آنها پروتئین تیپ ۳ می باشد در تنظیم فعالیت بیولوژیکی هورمون رشد شبه انسولین (IGF) است. پروتئین باند شونده تیپ ۳ به عنوان حامل IGF نیمه عمر آن را طولانی تر میکند و در سطح سلولی IGFBP ها میتوانند سبب فعال یا غیر فعال شدن فعالیت بیولوژیکی هورمون IGF شوند.

کیومار و همکاران(۲۰۰٦) اولین بار با استفاده از تکنیکRFLP تک موتاسیون تک نوکلوتئدی در ژن IGFBP-3 را در ۵ نژاد گوسفند مختلف گزارش کردند. Ali و همکاران (۲۰۰۷) به مطالعه تنوع ژنتیکی قطعه ای ٦۵٤ بازی از ژن IGFBP3

www.SID.ir

Archive of SID

در ٤ نژاد گوسفند مصر (Awasi، Rahmani، Ossimi و Barki) پرداختند. آنها فراوانی های ژنی وژنوتیپی متفاوتی را در این ٤ نژاد برای جایگاه ژنی مورد نظر گزارش کردند.Lan و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه ارتباط بین یک جایگاه تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن IGFBP3 و صفت تعداد فرزندان در هر زایمان در بزهای نژاد غالب چینی دریافتند که ارتباط معنی داری بین این SNP و تعداد بزغاله های متولد شده وجود دارد.Lan و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه ارتباط بین یک جایگاه تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن IGFBP3 و صفت تعداد فرزندان در هر زایمان در بزهای نژاد غالب چینی دریافتند که ارتباط معنی داری بین این SNP و تعداد بزغاله های متولد شده مجود دارد.

این تحقیق با هدف بررسی وجود تنوع ژنتیکی و بررسی وضعیت تعادل هاردی وینبرگ در اینترون ٤ این ژن در گوسفندان نژاد شال به روش PCR-RFLP است.

مواد و روش‌ها

به منظور استخراج DNA ژنومی، عمل خونگیری از ۱۰۰ راس میش خالص نژاد شال موجود در مجتمع دامداری و کشاورزی موقوفه بیمارستان آیت الله گلپایگانی (ره) قم به عمل آمد. بدین منظور مقدار ۵ میلی لیتر نمونه خون از رگ وداج گردن با استفاده از لوله های ونجکت حاوی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته و به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج DNA از نمونه ها با کمک کیت اختصاصی DNAfast(جوانمرد و همکاران) انجام شد. از دو روش اسپکتوفتومتری و الکتروفوز بر روی ژل آگارز ویژگیهای کمی و کیفی DNA تعیین گردید.

آغازگرهای این مقاله بر اساس تحقیق Maciulla و همکاران (۱۹۹۷) به شرح زیر طراحی گردید:

Forward 5`- CCA AGC GTG AGA CAG AAT AC-3`
Reverse 5`-AGG AGG GAT AGG AGC AAG AT-3`

با استفاده از این آغازگرهای اختصاصی قطعه ای به طول ۲٤۹ جفت باز از ژن IGFBP3 تکثیر گردید. دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با برنامه حرارتی زیر استفاده شد: واسرشت سازی اولیه DNA به مدت ۱ دقیقه و ۹٤ درجه سانتیگراد، انجام ۳۳ سیکل با واسرشت سازی DNA طی ۳۰ ثانیه و ۹٤ درجه سانتیگراد، اتصال آغازگر به DNA طی ٦۰ ثانیه و ۵۸ درجه سانتیگراد و بسط آغازگر طی ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد و بسط انتهایی ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد. جهت مشاهده محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز، از ژل آگارز۲٪ و ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی ژلها نیز با اتیدیوم بروماید انجام شد. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراژ به کمک آنزیم محدود کننده (برشی) HaeIII و در دمای ۳۷ درجه مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. برای آنزیم HaeIII در داخل این قطعه ۲٤۹ جفت بازی یک جایگاه برشی وجود دارد که قطعات ۲۱٦ و ۳۳ بازی تولید میکند. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) انجام شد و جهت مشاهده باندها از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد. برآورد فراوانی آللی و ژنوتیپی در این جامعه و همچنین برآورد فراوانیهای مشاهده شده برای ژنوتیپ ها و مقایسه آنها با فراوانیهای مورد انتظار بدست آمده با استفاده از فراوانیهای آللی بدست آمده و بررسی تعادل هاردی- وینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای اسکور (X2) انجام شد. در این مطالعه احتمال برقراری تعادل هاردی- وینبرگ، با استفاده از هر دو معیار مربع‌کای و نسبت درستنمایی با استفاده از نرم افزار POPGENE ۳۲ مورد آزمون قرار گرفت (Yeh و همکاران، 1999).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

درخشندگی و وضوح باندهای به دست آمده نشان دهنده غلظت بالای DNAی استخراج شده و نیز عدم وجود آلودگی پروتئینی، RNA و باندهای غیر اختصاصی بود. سنجش مقدار DNA و میزان آلودگی نمونه‌ها با دستگاه نانوداراپ ارزیابی شد که میانگین نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر حدود ۲ بود. حاصل هضم آنزیم HaeIII بر روی قطعه مذکور قطعات ۲۱۳ و ۳۶ جفت بازی بود. در ژنوتیپ CC هیچگونه هضمی صورت نگر فت و بنابراین قطعه تکثیر شده ۲۴۹ جفت بازی مشاهده شد، در نمونه های با ژنوتیپ TT آنزیم محدود کننده برش ایجاد نمود و بنابراین قطعات ۲۱۳ و ۳۶ جفت بازی در این میشها مشاهده شد و در میشهای با ژنوتیپ CT نیز هر سه قطعه ۲۴۹، ۲۱۳ و ۳۶ جفت بازی مشاهده گردید.

قطعه تکثیر شده در محلی بین ۲۰۰ و ۳۰۰ جفت باز مارکر نشانگر بود (۲۴۹ جفت باز). بنابراین می‌توان این نتیجه را گرفت که این قطعات با محصولات PCR محققانی چون SHEN Min و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت.

تعداد ژنوتیپهای مشاهده شده از نمونه های هضم شده توسط آنزیم در جدول ۱ آمده است. از بین ۱۰۰ نمونه DNA استخراج شده در ۹۰ نمونه PCR قطعه مورد نظر و هضم آنزیمی انجام شده است که نتایج آن در جدول مذکور آمده است.

جدول ۱- نتایج آزمون کای اسکور (XT2) برای تعادل هاردی- وینبرگ

Genotypes	Obs.(O)	Exp.(E)	$(O-E)^2/E$	X_T^2	Df	X_T^2	Probability X_T^2
CC	۵۳	۵۳/۳۶	۰/۰۰۲				
CT	۳۲	۳۱/۸۷	۰/۰۲۳	**۰/۰۳۷**	۱	**۳/۳۸**	Ns
TT	۵	۴/۷۶	۰/۰۱۲				

نتایج حاصل از آزمون کای اسکور در جدول ۱ که شامل مقدار کای اسکور محاسبه شده بر اساس تفاوت مقادیر مشاهده شده و مقادیر مورد انتظار برای سه ژنوتیپ مربوط به این جایگاه ژنی برابر با ۰/۰۳۷ بوده که در مقایسه با کای اسکور جدول (۳/۳۸) بسیار کوچکتر است ($p>0.05$) و بنابراین در این جایگاه ژنی (اینترون ٤ ژن IGFBP3) در این جمعیت میتوان گفت که تعادل هاردی وینبرگ برقرار است. به عبارت دیگر فراوانیهای مشاهده شده برای این ژنوتیپها و فراوانیهای مورد انتظار آنها در حالت تعادل هاردی وینبرگ در جمعیت حاضر اختلاف معنی داری از نظر آماری وجود ندارد و تعادل برقرار است. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان میدهد که در جمعیت شال مورد بررسی فراوانیهای آللی و فراوانیهای ژنوتیپی از یک نسل به نسل دیگری ثابت مانده و تحت تاثیر عوامل برهم زننده فراوانیهای ژنی از جمله جهش ژنتیکی، انتخاب، مهاجرت و نیز عوامل غیرسیستماتیک از جمله رانش ژنتیکی قرار نگرفته است. دلیل احتمالی این امر میتواند

www.SID.ir