بررسی چند شکلی ژن گرلین با استفاده از روش PCR-SSCP در گوسفند بلوچی

طهمورث پور مجتبی[۱]، طاهری امیر[*,,۱]، وفایی واله مهدی[۱] و کریمی داوود[۱]**
۱- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، صندوق پستی ۱۱۶۳- ۹۱۷۷۵
am_ta839@stu-mail.um.ac.ir

چکیده

تنظیم فیزیولوژیکی مصرف خوراک، رشد، و انرژی در حیوانات تحت تأثیر ژن های متعددی قرار دارد. تنوع ژنتیکی این ژن ها می تواند در بروز صفات اقتصادی دام ها تأثیرگذار باشد. بر اساس اطلاعات توالی ژنوم گوسفند ، ژن گرلین به عنوان یک نشانگر برای صفات وابسته به رشد در گوسفند بلوچی ارزیابی شد. گرلین، یک هورمون پپتیدی است که توسط معده پستانداران تولید می شود و تحریک کننده ترشح هورمون رشد و افزایش مصرف خوراک می باشد. یکصد و دوازده گوسفند بلوچی از نتاج ۱۸ مادر به صورت تصادفی از دو گله گوسفند بلوچی در ایستگاه عباس آباد مشهد انتخاب و برای اگزون یک گرلین تعیین ژنوتیپ شدند. استخراج DNA به روش گوانیدین تیوسیانات-سیلیکاژل از نمونه خون کامل صورت گرفت. تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد PCR-SSCP برای تعیین ژنوتیپ نمونه ها استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR پس از تک رشته ای کردن قطعات بر روی ژل اکریل آمید صورت گرفت و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد. نتایج نشان دادند که چندشکلی در هیچ کدام از نمونه های مورد مطالعه وجود نداشت. عدم وجود تنوع دلالت بر عدم وجود چند شکلی در این ژن ندارد بلکه به این معنی است که آغازگر های مورد استفاده در یک منطقه دارای چند شکلی قرار نمی گیرند.

واژه‌های کلیدی: گرلین، چند شکلی، PCR-SSCP، گوسفند بلوچی

مقدمه

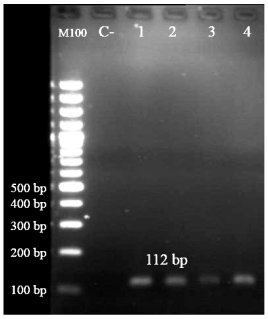
امروزه با توجه به رشد روز افزون جمعیت انسانی و نیاز به منابع پروتئینی حیوانی، رشد سریع حیوانات اهلی از اهمیت ویژه ای برخوردار شده است. در این بین گرلین به عنوان هورمونی پروتئینی که از معده ترشح می شود و در ترشح هورمون رشد و کنترل میزان مصرف خوراک تأثیرگذار می باشد توجه خاصی را برای بررسی می طلبد.گرلین برای نخستین بار در سال ۱۹۹۹ کشف شد و یک هورمون پپتیدی است که از معده موش، انسان و دیگر پستانداران ترشح می شود(۳). این ژن جزء ژن های کاندید چاقی در انسان نیز هست. بسیاری از تحقیقات نشان داده اند که گرلین اثرات زیادی در ترشح هورمون رشد، قدرت ماندگاری و ازدیاد سلول و تنظیم مصرف خوراک دارد(۲). پری پروگرلین در انسان از ۴ اگزون کد می شود که شامل ۱۱۷ اسید آمینه است: ۲۳ اسید آمینه از توالی سیگنال، ۲۸ اسید آمینه در پپتید نهایی، و ۶۶ اسید آمینه در پروپپتید. اوکلا و همکاران (۵) سه جهش را در ژن پری پروگرلین گرلین گزارش کردند که فقط یکی از آنها در محصول نهایی باقی می ماند که با چاقی در انسان مرتبط است. جانشینی (G356A) منجر به جایگزینی آرژنین بوسیله گلوتامین در کدون ۲۸ (آخرین اسید آمینه) گرلین بالغ می شود که حاملین آلل گلوتامین وزن پایین تری نسبت به حاملین آلل آرژنین دارند. دیکین و همکاران(۱) اگزون های ۱و۲ را در گوسفند و گاو تعیین توالی کردند. تمام نشخوارکنندگانی که مطالعه شدند دارای ۲۷ اسید آمینه در پپتید نهایی بودند. تک معده ای ها دارای هر دو فرم از گرلین هستند در حالی که نشخوار کنندگان فقط یک شکل از آن را دارند. این به علت حذف شدن یکی از جایگاه های پیرایش در نشخوار کنندگان می باشد. شرمن و همکاران (۴) یک پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی A/G را در ژن گرلین گزارش کرد که بر مصرف خوراک، ضریب تبدیل غذایی و به صورت جزیی در راندمان رشد گاو ها تاثیر دارد ($P<0.10$). در این مطالعه چند شکلی اگزون ۱ ژن گرلین با روش PCR-SSCP مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

خونگیری از تعداد ۱۱۲ رأس گوسفند بلوچی مرکز اصلاح نژاد عباس آباد مشهد به عمل آمد. استخراج DNA از خون کامل به روش گوانیدین تیوسانات-سیلیکاژل صورت گرفت. غلظت DNA استخراج شده و میزان خلوص آن بوسیله نور سنجی اندازه گیری شد و DNA در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد. جفت آغازگر (Forward: 5′-cct-gct-ctg-gat-gga-ctt-ggc-3′, Reverse: 5′-ggc-ttg-ggg-cat-tta-gga-cg-3′) با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 بر اساس توالی گوسفند(GenBank accession number: AY455983) طراحی شدند. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از جفت آغازگر طراحی شده برای تکثیر قطعه ۱۱۲ جفت بازی از ژن گرلین توسط دستگاه ترموسایکلر (T personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد. واکنش زنجیره پلی مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از کیت خشک شامل ۱/۵ میکرولیتر DNA ژنومی، ۳ میکرو لیتر از مخلوط پرایمرها، ۱۰ میکرولیتر PCR Dilluent ، ۳ میکرولیتر Master Mix و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه با استفاده از برنامه حرارتی زیر: سیکل اول ۵ دقیقه در دمای°C ۹۵و ۴۰ ثانیه در دمای°C ۹۴ ، ۳۰ ثانیه در دمای°C ۵۹ و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲˚C و ۵ دقیقه در دمای°C ۷۲ بهینه شد. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۰ و مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت و ژل مربوطه پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر اشعه ماورای بنفش بررسی شدند. به منظور انجام واکنش SSCP، رشته های DNA تکثیر شده با استفاده از SSCP dye به نسبت ۱به ۱ به مدت زمان ۵ دقیقه در دمای°C ۹۵ تک رشته ای شدند که بلافاصله پس از این مرحله در داخل یخ قرار گرفتند.محصولات تک رشته ای شده بر روی ژل اکریل آمید ۱۴ درصد (۳۹:۱) با ولتاژ V ۲۵۰ به مدت ۴ ساعت جهت مشاهده چند شکلی ها الکتروفورز گردیدند. رنگ آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره صورت گرفت.

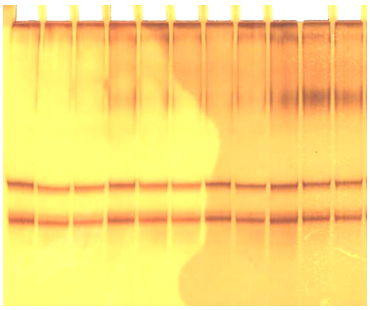
نتایج و بحث

نتایج نورسنجی نشان داد که DNA های استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار هستند. الگوی باندی مربوط به تکثیر قطعه ۱۱۲ جفت بازی ژن گرلین موید اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده برای اگزون ۱ بودند زیرا باند غیر اختصاصی، دایمر و اسمیر مشاهده نشد و باند ها همگی شفاف بودند. از طرفی عدم مشاهده باند در کنترل منفی نشان دهنده دقت و صحت آزمایش است(شکل ۱).



شکل ۱_ الکتروفورز محصولات PCR برای آزمون اختصاصی بودن جفت آغازگر طراحی شده. شماره های۱،۲،۳ و۴ (DNA گوسفند)، -C کنترل منفی، M نشانگر وزنی مورد استفاده(M100) برای تعییت اندازه محصولات PCR.

تمامی الگوهای باندی حاصل از تک رشته ای کردن محصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید مشابه با یکدیگر بودند (شکل ۲).



شکل ۲_ الکتروفورز قطعات تک رشته ای شده محصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید

به سبب عدم مشاهده الگوهای باندی متفاوت (چندشکلی) بر روی ژل اکریل آمید می توان چنین نتیجه گرفت که در نمونه های جمع آوری شده چند شکلی ژنتیکی در جایگاه مورد نظر وجود ندارد. بنابراین نیاز به بررسی تعداد نمونه بیشتر برای اعمال نظر کلی در این نژاد می باشد.

تشکر و قدردانی

از قطب علمی علوم دامی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد به سبب فراهم نمودن امکانات پژوهشی و همکاران مرکز اصلاح ایستگاه عباس آباد مشهد (استان خراسان رضوی) صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Dickin, J.C., Thue, T.D. and Buchanan, F.C. An alternative splice site in ghrelin is missing in ruminants. Anim. Genet., 2004, 35 (5), 411-412.
2. Kojima, M. and Kangawa, K., Ghrelin: structure and function. Physiol. Rev., 2005, 85:495-522.
3. Kojima, M. Hosoda, H. Date, Y. Nakazato, M. Matsuo, H. Kangawa, K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature, 1999, 402: 656-660.

4. Sherman, E. L. Nkrumah, J. D. Murdoch, B. M. Li, C. Wang, Z. Fu, A. and Moore, S. S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. Anim Sci. 2008, 86:1-16.
5. Ukkola, O. Ravussin, E. Jacobson, P. Snyder, E. E. Chagnon, M. Sjostrom, L. Bouchard, C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. Clin. Endocr. Metab., 2001, 86: 3996-3999.

An investigation to SSCP polymorphisms at the Ghrelin (GHRL) gene in Baluchi sheep

Tahmoorespour Mojtaba[1], Taheri Amir[* 1], Vafaye Valeh Mehdi[1] and Karimi Davood[1]**
1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, P.O. Box 91775-1163, Mashhad, I.R. Iran
** Corresponding Author: am_ta839@stu-mail.um.ac.ir

Abstract
The physiological regulation of feed intake, growth, and energy partitioning in animals is under the control of multiple genes, which may be important candidates for unraveling the genetic variation in economically relevant traits in farm animals. On the basis of sheep genome mapping information the ovine ghrelin gene was examined as a possible genetic marker for growth traits in sheep. Ghrelin, a peptide hormone produced by the stomach in mammals, stimulates growth hormone release and feed intake. One-hundred and two purebred Baluchi sheep, progeny of 18 rams, were randomly selected from 2 separate research flocks of Baluchi sheep kept at the Abbasabad Sheep Breeding Station. DNA samples were extracted from whole blood using Guanidin Thiocyanate-silica gel method. The genotypes for exon 1 of ghrelin gene were determined by the PCR-SSCP method. The PCR products were denatured and subjected to non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis to detect SSCP. The gels were stained using silver staining method. In our study, ghrelin exon 1 was monomorphic. The absence of diversity does not imply that gene is not polymorphic. It only means that the primers used do not delimitate a polymorphic region.

Key words: Ghrelin, polymorphism, PCR-SSCP, Baluchi sheep

۱۴۸	بررسی پلی مورفیسم ژن PEPCK-C در طیور بومی منطقه سیستان	جلال عمرانی بیدی -مسعود علیپناه -آدم ترکمن زهی - مصطفی یوسف الهی -مهری مهدوی نژاد	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	343
۹۰	بیوتکنولوژی تولید جوجه های ترانس ژنیک	مهدی اسماعیل زاده	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	344
۱۰۵	بررسی تنوع ژنتیکی ماهیان قزل آلای رنگین کمان فرانسوی با استفاده از نشانگر RAPD	لعیا خوشکار -مجتبی افضلی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	345
۴۶۸	ردیابی باکتری بروسلا در شیر با روش مولکولی PCR	سید مهدی موسوی -علیرضا ترنگ ترنگ -سید محمد فرهاد وحیدی -مهدی نیکبختی -نریمان میراعلمی -سید مهدی موسوی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	346
۵۲۲	کاربرد مهندسی ژنتیک در طراحی و ساخت واکسن نوترکیب جهت پیشگیری و درمان بیماری بورس فابریسیوس در طیور	بهمن فاضلی نسب -هوشنگ علیزاده -علی اشرف مهرابی -فرشید فتاح نیا	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	347
۵۵۷	بررسی پلی مورفیسم ژن میوستاتین با استفاده از روش PCR-RFLP در گاوهای بومی استان کرمان	کمال شجاعیان ، محمد رضا محمد آبادی ، امین باقی زاده ، اکرم محمدی، بهاره صوفی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	348
۳۴۸	چند شکلی ژن میوستاتین در سه نژاد گوسفند ایرانی شال، زل و زندی	یونس میار -عبدالرضا صالحی -سید احمد آل یاسین -داود کلبه داری -سمیه رئوف زاده	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	349
۱۲۲۲	بررسی چند شکلی ژن گرلین با استفاده از روش PCR-SSCP در گوسفند بلوچی	مجتبی طهمورث پور -امیر طاهری قهفرخی -مهدی وفایی واله -داوود کریمی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	350
۱۱۴۹	بکارگیری متابولیتهای استخراج شده از ارگانیسمهای دریایی جهت مهار ویروس ایدز	سارا کوهی لای، ندا خسروپناه	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	351
۱۲۴۹	بررسی بیماری ژنتیکی نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز (DUMPs) به روش PCR-RFLP در گاوهای بومی سرابی ایران	محمد دوستی -شاهرخ قوّتی -مجتبی طهمورث پور - مرتضی مهدوی -مهدی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	352