نجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
3-5 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران
The 5th National Biotechnology Congress of Iran
24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

کاربرد یک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در تعیین جنسیت در یک گله شترمرغ یک روزه

دکتر باسامی محمدرضا،دکتر طرقی رضا، ماهوتی خورده چشمه امیر***

دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

خلاصه:

در سالهای اخیر پرورش شتر مرغ بطور معنی داری در سراسر جهان گسترش یافته است. تعیین جنسیت جوجه شترمرغ ها در مادران مولد و شترمرغ های پرواری به منظور تولید گوشت، واجد اهمیت فراوان می باشد. در پرورش صنعتی شترمرغ این امر به راحتی میسر نمی باشد، زیرا تا سنین بالا قابلیت تفریق این دو جنس وجود ندارد. لذا برای پرورش دهنده بسیار مهم می باشد که بتواند هر چه زودتر جنسیت پرنده های خود را بداند تا بر اساس آن برنامه ریزی نماید. امروزه روشهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) یکی از کاراترین، سریعترین و آسان ترین راههای تعیین جنسیت جوجه های شتر مرغ در سطح پرورش صنعتی به شمار می رود. در این بررسی 15 نمونه جوجه شتر مرغ مربوط به یک واحد پرورشی در روز های اولیه تولد به روش PCR مورد آزمون واقع شدند. در این راستا از هر پرنده دو نمونه پر اخذ و جهت انجام استخراج DNA به روش Alkaline Extraction فرآوری گردید. جهت انجام واکنش PCR از دو جفت پرایمر انتخاب شده از منابع منتشره به صورت مولتی پلکس استفاده گردید. از این دو جفت پرایمر یک جفت بعنوان کنترل داخلی و جفت دیگر بعنوان تست جهت شناسایی جنس ماده استفاده گردید. محصول کنترل داخلی جهت تایید کینتیک واکنش، و محصول نمونه تست جهت تایید جنس ماده کارایی داشت. نمونه هایی که در آنها نمونه تست منفی بود به عنوان نر ارزیابی گردیدند. از15 نمونه تست شده جنسیت 7 جوجه نر و 8 جوجه ماده تعیین گردید. نتایج بدست آمده از این تست با تعیین توالی به روش تعیین سکانس مستقیم و نیز با بروز صفات ثانویه جنسی درسن بلوغ تایید گردید. تست استفاده شده شاید بتواند به عنوان یک تست بسیار سریع و قابل اعتماد در غربالگری و تشخیص جنسیت در جمعیت های اندک و فراوان بکار گرفته شود.

کلمات کلیدی: شتر مرغ، تعیین جنسیت مولکولی، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) ،

مقدمه

در سالیان اخیر پرورش شترمرغ به صورت چشمگیری رو به افزایش نهاده است. تقاضا برای شترمرغ با موضوعاتی چون کم چرب بودن گوشت، چرم مطلوب، روغن مرغوب و پرهای تزیینی زیبا مرتبط می باشد. از طرفی پرورش شترمرغ بدلیل مقاومت بالای این حیوان در برابر گرما و کم آبی در میان تولید کنندگان یک شاخصه ویژه می باشد(1). این حیوان نسبت به حیوانات اهلی دیگر از میزان زاد و ولد و سرعت رشد بالاتری برخوردار است. تعیین جنسیت شترمرغ در میان جوجه ها تنها بعد از 6 ماهگی امکان پذیر است و این در حالی است که تشخیص جنسیت این حیوان در صنعت از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تعیین جنسیت این حیوان مفید یکی از مشکلات بزرگ تولید کنندگان بشمار می رود (2). روشهای تشخیص جنسیت باید به گونه ای اعمال گردند که صحیح، ارزان، سریع و بی خطر باشند. در روشهای مرسوم تشخیص جنسیت بسیار مشکل بوده و بر پایه

ریخت شناسی حیوان استوار است. این روشها مانند اندوسکوپی و لمس کلوآک تهاجمی بوده و به حیوان استرس فراوانی وارد می سازد(2). از طرفی انجام این روش ها مشکل بوده و از درصد خطایی بالا در حدود 40٪ برخوردار است. ضمن اینکه جراحات احتمالی ممکن است در ارزش مادی حیوان تاثیر منفی بگذارد (2). حیوان ماده دارای دو کروموزوم جنسی Z وW بوده و این در حالی است که حیوان نر تنها دارای کروموزوم Z می باشد. این تفاوت می تواند پایه تشخیص جنسیت از طریق روشهای مبتنی برPCR قرار گیرد. در این روش که تنها به یک یا دو پرحیوان احتیاج است، به حیوان استرسی بسیار اندک وارد آمده و نیازی به حضور محقق در فیلد نمی باشد(4).

مواد و روش کار:

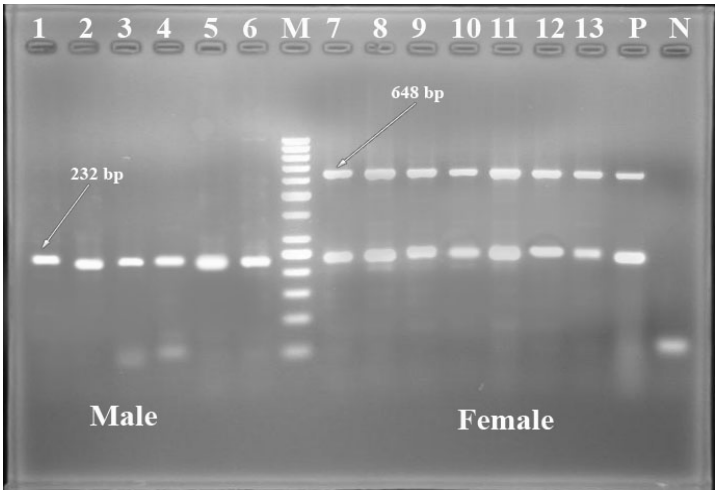
تعداد 15 جوجه شترمرغ در روز های اولیه پرورش برای تعیین جنسیت مورد استفاده قرار گرفت. در نمونه برداری از هـر پرنـده دو عدد پر حاوی پیاز پر جهت استخراجِ DNA با استفاده از روش قلیایی (Alkaline Extraction) اخذ گردید. برای این کـار Bulb هر پر در 20µl از NaOH (0.2 N) در یک میکروتیوب 1/5 ml قرار گرفـت. میکروتیـوب در بـن مـاری 75 ºC بـرای مدت 20 دقیقه انکوبه گردید. سپس با اضافه کردن 180µl ازمحلول Tris-Hcl 0/04 نرمال (pH 7.0) محلول NaOH حاوی پر خنثی گردید (5). پرایمر های اختصاصی برای جنس ماده بر اساس منابع منتشره به ترتیب شامل پرایمر SS1 و SS2 بـا تـوالی های'5-TCTACACCTAAGGAGTCCCATATT-3 و'5-GGTCTACACCTGTTGAAAAT CATT- 3 بودند. در هر واکنش از یک جفت پرایمر استاندارد OSM5 که نواحی اقماری[1] را تکثیر می کند جهت کنترل داخلی استفاده شد. توالی ایـن پرایمرهـا بـه ترتیـب '5-GTGGATCAGTTCAATCCTTGC-3 و'5-GCCCAA GAAAATGATGGAGA-3 بـود. واکنش PCR مورد استفاده به صورت مولتی پلکس[2] انجام گردید.واکنش مولتی پلکس PCR در حجم 25 µl و با غلظت نهـایی بافرPCR 1X، 10 pmol از هر پرایمر، یک واحد ازآنزیم Taq DNA polymerase، 2.0 mM $MgCl_2$ ، 200 µM از mixed dNTP ، 2µl ازDNA استخراجی و آب دیونیزه به انجام رسید. برنامه سیکل های واکـنش زنجیـره ای پلیمـراز شـامل واسرشـته سازی در دمای 94 درجه بمدت 45 ثانیه، 30 ثانیه دردمای 56 درجه برای اتصال و 60ثانیه در دمای 72 درجه برای بسـط بـود. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده، و توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیـزی گردیـد. تصـویر حاصـل از آن ثبت گردید.

[1]. Micro satellites regions

[2] . Multiplex

نتایج و بحث:

روش استخراج DNA در محیط بازی که در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت باعث استخراج DNA موجود در پیاز پر می گردد. در این تست پرایمرهای مربوط به ماهوارک SS محصولی حدود 648 bp ایجاد کرده که در جوجه های ماده اختصاصی می باشد. مشاهده این محصول نشان دهنده ماده بودن جوجه شترمرغ است. ما از این مجموعه پرایمرها جهت تعیین جنسیت 15 جوجه شترمرغ استفاده گردید. جنسیت 7 جوجه نر و 8 جوجه ماده تعیین گردید. صحت نتایج بدست آمده از این تست با تعیین توالی و همچنین با بروز صفات ثانویه جنسی درسن بلوغ تایید گردید. پرایمر های کنترل داخلی صحت انجام مراحل قبل از PCR از جمله استخراج DNA و نیز صحت کینتیک واکنش را در تمام نمونه ها تایید نمود. لذا در آن دسته از جوجه ها که در آنها محصول PCR کنترل داخلی تکثیر گردید ولی توالی هدف در جنس ماده در آن ها رد یابی نگردید، به عنوان جوجه های نر محسوب گردیدند. در این بررسی یک تست معرفی شده در منابع به عنوان یک تست صحیح، سریع، بی خطر و ارزان جهت تعیین جنسیت جوجه های شتر مرغ در سطح صنعتی به کار گرفته شد. روش سریع استخراج DNA که در این بررسی مورد استفاده گردید توانست با حداقل هزینه و بدون نیاز به فنل و کلروفرم با موفقیت DNA الگو را برای تکثیر به روش PCR فراهم نماید. کاربرد تست مورد استفاده در این پژوهش به عنوان یک تست مقبول در برنامه های مدیریت شترمرغ توصیه می گردد.



1-6:Male Samples

M: DNA ladder 50 bp

7-13: Female Samples

P: Positive Control

N: Negative Control

منابع:

1. Hinckley J.D., Park R.L., Xiong S., Andersen W.R. and Kooyman D.L. (2005) Identification and Development of Sex Specific DNA Markers in the Ostrich Using Polymerase Chain Reaction. International Journal of Poultry Science 4 (9): 663-669

2. Malago W.Jr. , Franco H.M., Matheucci E.Jr., Medaglia A. and Henrique-Silva F. (2002) Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers.BMC Biotechnology, 2:19
3. Griffiths R. (2000) Sex identification in Birds. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 9:14
4. http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=1294&bd=1&pg=1&lg=en
5. Rudbeck L., Dissing J. (1998) Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. Biotechniques. 25(4):588-90, 592.

نجمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران

3-5 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران

The 5th National Biotechnology Congress of Iran

24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

Application of a polymerase chain reaction for molecular sexing of baby ostriches

Abstract

Ostrich (Struthio camelus) breeds have been gaining increasing significance around the world. The large-scale sex determination of chicks is an important task in the development of these breeds. In this study fifteen baby ostrich were examined for sex determination by a polymerase chain reaction. Two feather bulbs were collected and the DNA was extracted by alkaline method. DNA extracted were subjected to a PCR assay using two set of primers for sex determination and confirming the kinetic of PCR reactions. The gender of ostriches was determined correctly. According to the sequence analysis of PCR products and phenotypic changes during maturity the accuracy of PCR assay was confirmed. The assay is recommended as a fast, safe, accurate and inexpensive procedure for large-scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. This procedure is useful for the gender identification of chicks in the first days of nestling life.

Key words: Ostrich, Sex typing, Polymerase chain reaction (PCR)