بررسی ارتباط چند شکلی ژن IGF-I با ارزش اصلاحی صفات رشد در گوسفندان نژاد ماکوئی

عباس حاجی حسینلو[۱*]، علی هاشمی[۲]، نصراله پیرانی[۳] ، قربان الیاسی زرین قبایی[۴]، شجاع جعفری[۵]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح دام ارومیه۲-استادیار گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه ۳-دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز ۴- قربان الیاسی، عضو هیئت علمی (مربی پژوهشیار) مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی، استان آذربایجان شرقی ۵-دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح دام ارومیه

*abbas_hajihosseinlo@yahoo.com

واژگان کلیدی: چند شکلی،IGF-I ، PCR-SSCP ، ارزش اصلاحی، صفات رشد، گوسفند ماکوئی

چکیده

ژن IGF-I یافاکتور رشد شبه انسولین که بر روی کروموزوم شماره ۳ گوسفند قرار دارد،یکی از ژن های کاندیدا برای نرخ رشد و تولید گوشت بوده و در تزاید و تمایز سلول های غدد پستانی و پس روی این اندام حایز نقش مهمی میباشد. به منظور بررسی چند شکلی ژن IGF-I از تعداد۱۰۰ رأس گوسفند نر و ماده ماکویی ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند ماکویی در ماکو به طور تصادفی خونگیری شد. استخراج DNA و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۲۶۵ جفت بازی از اگزون۱ این ژن انجام گرفت. چند شکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) محصولات PCR تعیین شد. برای این جایگاه از ژن IGF-I دو آلل B,A به ترتیب با فراوانی های۷۳/۰و ۲۷/۰بدست آمد. برای ژن IGF-I سه الگوی باندی(ژنوتیپ)I3، I2 و I1 با فراوانیهای ۰/۰۶و۰/۴۲، ۰/۵۲ به ترتیب ، بدست آمد. ارزیابی رابطهIGF-1 با ارزش اصلاحی مستقیم ومادری وزن تولد ، وزن از شیرگیری، وزن ۶ ماهگی،وزن ۹ ماهگی،وزن یک سالگی نشان داد که ارتباط معنی داری بین الگوی یا ژنوتیپ AG برای ژن IGF-1 و ارزش اصلاحی مستقیم و مادری وزن ۶ ماهگی پیدا شد.

مقدمه

تشخیص چندشکلی های نوکلوتیدی در پروموتور مهم میباشد، زیرا جانشین شدن نوکلوتید در ناحیه ای همچون جایگاه باند شدن عامل رونویسی در ژنوم ممکن است مقدار بیان ژن را تغییر دهد. یکی از این نشانگرها ژن فاکتور رشد شبه انسولین(IGF-1) است.IGF-1 بر روی رشد جنین،رشد پس از تولد،متابولیسم کربوهیدرات ها و پروتئین ها دخالت دارد.این عامل افزایش دهنده جذب گلوکز در بافت های محیطی بوده که باعث تحریک ساخت گلیکوژن شده و واجد اثری شبیه انسولین میباشد که با افزایش جذب اسیدامینه،باعث ساخت پروتئین میشود(3). ژن IGF-1 دارای ۶ اگزون و ۵ انترون بوده و در ۵/۷۳ سانتی مورگانی کروموزوم ۵ گاو نقشه یابی شده است (اولین بار جی و همکاران(۱۹۹۷) با استفاده از تکنیک SSCPیک موتاسیون تک نوکلوتیدی در ژن IGF-1را گزارش نمودند. سپس جی و همکاران(۲۰۰۱) مشخص کردند که در ناحیه ′۵ این ژن و ۵۱۲ جفت قبل از اولین کدون اگزون اول(ATG) ،یک جایگزینی نوکلوتید

CباT اتفاق افتاده است که ژنوتیپBBدر این جایگاه به طور مثبتی با اضافه وزن بدن در ۲۰ روز پس از شیرگیری ارتباط داشت(۱) . موقعیت کروموزومی ژن IGF-1 در حیوانات مختلف مانند گوسفند روی کروموزوم ۳ ، در گاو روی کروموزوم شماره ۵، در خوک روی کروموزوم ۵ ، در جوجه روی کروموزوم ۱، در انسان روی کروموزوم ۱۲ مشخص شده است(5). با توجه به این که IGF-1 میانجی بسیاری از اثرات هورمون رشد میباشد فعالیت های بیولوژیکی اش توسط پروتین های پیوندی در بدن تعدیل میشود.پروتین پیوندی فاکتور رشد انسولین مانند(IGFBP) دارای میل ترکیبی بالا با فاکتورهای رشد انسولین مانند بوده و با اتصال به گیرنده های IGF-1 باعث کاهش فعالیت زیستی آن ها میشود(4).

مواد و روش ها

از ۱۰۰ راس گوسفندان نر و ماده ماکویی ایستگاه اصلاح نژاد ماکو به طور تصادفی خونگیری به عمل آمد.استخراج DNA به روش نمکی (میلر۱۹۹۸)انجام گرفت. آغازگرهای زن فاکتور رشد شبه انسولین بر اساس توالی DNAدر اگزون شماره۱ ژن IGF-1به شماره شناسایی(AY803775)طراحی شد.واکنش PCRجهت تکثیر قطعات مورد نظر در حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از آغازگر رفت :-'5 ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3' (forward primer)

-اغازگر برگشت :(reverseprimer) 5'-CACATCTGCTAATACACCTTACCCG-3' انجام شد.غلظت نهایی مواد PCRعبارت بودند از :بافر 1X PCR،200میکرومولار dNTP، 1/5میکرو مولار MgCl2،0/5پیکو مول از هر پرایمر،1 unitآنزیم تک پلیمراز و ۱۰۰ نانوگرم DNAجهت واکنش زنجیرهای پلیمراز برنامه حرارتی به صورت :مرحله اول،واسرشت اثلیه در ۹۵درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه،مرحله دوم شامل واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه،اتصال ۵۸ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و تکثیر در۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۴ دقیقه و تکرار در ۳۱ سیکل انجام گرفت.صحت قطعه به دست آمده از محصول PCR، 5میکرولیتر از محصولات را با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری(6X)مخلوط شد و به همراه نشانگر وزنی M100بر روی ژل آگارز۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد تایید و ارزیابی قرلر گرفتند.جهت انجام SSCP،مقدار ۱۰-۷ میکرولیتر از محصولات با ۷ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد برای مشاهده ژنوتیپ ها از روش رنگ آمیزی نیترت نقره استفاده شد.الگوهای باندی ایجاد شده مورد شمارش قرار گرفتند و بر اساس قرار گرفتن الگوهای باندی ژنوتیپ حیوانات تعیین شد و سپس با استفاده از نرم ازار POP GENE32معیارهای مربوط به چند شکلی ژن IGF-1در این جمعیت مورد محاسبه قرار گرفتند. ارزش های ارثی حیوانات با استفاده از نرم افزار DFRMEL و طبق معادله زیر برآورد شد.

$$Y_{ijklm}= \mu+ YR_i + SX_j + BT_k + AD_l + AN_m + E_{ijklm}$$

μ: میانگین جامعه ،i: اثر ثابت i امین سال ۲۱، . . . ، ۲، ۱ ، j:اثر ثابت jامین جنس حیوان ۲، ۱ ، k:اثر ثابت kامین نحوه تولد ۳، ۲، ۱ ، AD1 : اثر ثابت lامین سن مادر ۷، . . . ، ۲، ۱=l، ANm :اثر تصادفی ژنتیکی افزایشی mامین حیوان تعداد حیوان برای هر صفت ،$Eijkl_m$: اثر تصادفی باقیمانده ijklm امین مشاهده. ارتباط بین ارزش های ارثی حیوانات با ژنوتیپ های مشاهده شده با استفاده از نرم افزارSAS و رویه GLM محاسبه گردید.

$$Y_{ijklm}= \mu + G_i+S_j+ T_k + G_i\times LS_k+e_{ijklm}$$

Y_{ijklm} =ارزش اصلاحی صفات رشد , μ = میانگین تصحیح شده , G_i= اثر ژنوتیپ , S_j=اثر جنس , T_k=اثر تیپ تولد ,

$G_i \times LS_k$= اثرلت متقابل ژنوتیپ و جنس, e_{ijklm}= اثر تصادفی باقیمانده

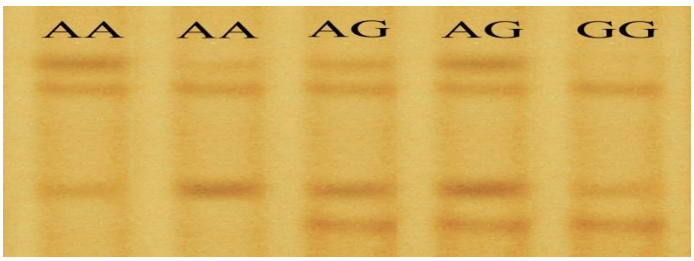
نتایج

به منظور تایید تکثیر قطعه مورد نظر محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل اگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند،مشاهده تنها یک باند ۲۶۵ جفت بازی نشان دهنده تکثیر درست قطعه انتخاب شده از اگزون شماره ۱ ژن فاکتور رشد شبه انسولین و صحت انجام PCR بود که با نتایج بدست امده از تحقیق طهمورث پور و همکاران مطابقت داشت(۲). برای مشاهده قطعات حاصل از ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد که چند شکلی فضایی تک رشتهای (SSCP) محصولات PCRتعیین شد.برای ژن IGF-1سه الگوی باندی(ژنوتیپ)I1،I2،I3 با فراوانی های ۰/۰۶و۰/۴۲، ۰/۵۲ به ترتیب بدست آمد،شاخص هتروزیگوتی و تعداد الل موثر برای این جایگاه به ترتیب ۳۹درصد ، ۱/۶۵ بدست آمد.آزمون کای اسکوار نشان داد که جمعیت گوسفندان ماکویی در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد. با مشخص کردن ژنوتیپ مورد مطالعه و هم چنین بدست آوردن ارزش اصلاحی صفات وزن تولد، وزن های ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی برای گوسفند ماکوئی ارتباط با صفات مذکور انجام گرفت. ارزیابی رابطه IGF-1 با ارزش اصلاحی مستقیم و مادری وزن تولد ، وزن از شیرگیری، وزن ۶ ماهگی،وزن ۹ ماهگی،وزن یک سالگی نشان داد که ارتباط معنی داری بین IGF-I و ارزش اصلاحی مستقیم ومادری وزن ۶ ماهگی پیدا شد.این اولین کار برای ژن فاکتور رشد شبه انسولین در گوسفند ماکویی بود. نتایج این پژوهش نشان داد که چندشکلی ژنتیکی در جایگاههای ژنی فاکتور رشد شبه انسولین وجود دارد . همچنین با توجه به اینکه اثر ژنوتیپها با و ارزش اصلاحی مستقیم ومادری وزن ۶ ماهگی معنی دار بود ممکن اس ت بتوان از آن بعنوان یک شاخص در انتخاب گوسفندان بلوچی حداقل برای دوره اول رشد استفاده نمود.

فراوانی های ژنی و ژنوتیپی ژن فاکتور رشد شبه انسولین

ژنوتیپ	AA	AB	BB
فراوانی ژنوتیپی(درصد)	٪ ۵۲	٪ ۴۲	٪۶
آلل	A		B
فراوانی آللی	۰/۷۳		۰/۲۷
$\chi^2 = ۰/۱۵^{ns}$	شاخص شانون = ۰/۵۸		تعداد الل موثر = ۱/۶۵

ژن IGF-1	هموزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مشاهده شده	هموزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی Nei	متوسط هتروزیگوتی
اگزون ۱	۰/۵۸	۰/۴۲	۰/۶۰۱۸	۰/۳۹۸۲	۰/۳۹۴۲	۰/۳۹۴۲



چند شکلی فضایی تک رشته ای جایگاه اگزون ۱ ژن IGF-1 در گوسفندان نژاد ماکویی در شکل زیر قابل مشاهده می باشد

حداقل مربعات ارزش های اصلاحی وزن تولد، وزن۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی در گوسفندان نژاد ماکوئی با ژنوتیپ های مختلف

	Weight estimated matenal breeding values (means ± SE, kg)				
IGF-1	BW	W3	W6	W9	W12
AA	0.006±0.02	0.595±0.14	1.02±0.27[ab]	0.401±0.12	0.130±0.595
AG	0.005±0.03	0.873±0.17	1.45±0.34[a]	0.356±0.16	0.155±0.14

GG	0.026±0.04	0.294±0.24	0.158±0.48[b]	0.165±0.22	0.171±0.2
P value	0.3[ns]	2.32[ns]	2.93[*]	0.52[ns]	0.02[ns]

منابع

1-Ge, W., M. E. Davis, H. C. Hines, K. M. Irvin, and R. C. M. Simmen. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulinlike growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. J. Anim. Sci. 79:1757–1762.

	Weight estimated breeding values (means ± SE, kg)				
IGF-1	BW	W3	W6	W9	W12
AA	-.063±0.04	1.18±0.28	1.45±0.47[ab]	0.965±0.25	0.304±0.30
AG	-.083±0.05	1.75±0.35	2.4±0.59[a]	0.945±0.31	0.285±0.37
GG	-0.24±0.07	0.588±0.51	0.155±0.83[b]	0.527±0.44	0.337±0.53
P value	2.5[ns]	2.33[ns]	2.95*	0.48[ns]	0.0[ns]

2-Mojtaba Tahmoorespur, Mehdi VafayeValeh, Mohammad Reza Nasiry, mousavi and Ansary. Association of the polymorphism in the 5 flanking region of the ovine IGF-1 gene With growth trait in the baluchisheep .South African Journal of Animal Science 2009.

3-X.F.De la Rosa Reyna,. Polymorphism in the IGF-1 gene and their effect on growth Traits in Mexican beef cattle.genetic and molecular Resarch.9(2):875-883(2010)

4-Duan C, & Xu Q. 2005. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF action.General and Comparative Endocrinology, 142: 44-52.

5-Imam-Ghali, M. I., Saidi-Mehtar, N., and Guerin, G. 1991. Sheep gene mapping: additional DNA markers included (CASB, CASK, LALBA, IGF-I and AMH). *Animal Genetics.* 22:165.

Abstract:

IGF-1 gene that has located on chromosome3 in sheep is a marker for growth rate and meets production and has a important role in mammary glands cell differentiation and proliferation. For analysis of IGF-1 Gene Polymorphism in Makui Sheep the blood were collected of one hundred male and female Makui Sheep that rearing in breeding cenyer of city Maku . Total DNA extractions were mad with a modified salting out metod(Miller et al.,1998) and the polymorphism was detected by PCR-SSCP metod at a 265bp fragment for genotyping.Two alleles of A and B with frequencies of 0.73 and 0.27 were detected. Genotype frequencies were 0.52,0.42,0.06 for AA,AG,GG, respectively. The evaluation of an association effect between these SSCP patterns with additive and matenal breeding values birth weight (BW), weaning weight (WW), Six month Weight (SW), nine month Weight (9W),yearling weight(yw) suggest a positive effect of pattern AG with additive and matenal breeding value for Six month Weight (SW).

Key words: growth traits, breeding value , Makui sheep, PCR-SSCP, Polymorphism, IGF-1