ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲
صفحه ۱۱۶- ۱۱۱

بررسی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد قره‌گل با استفاده از نشانگر PCR-RFLP

Study on polymorphism of myostatin in Iranian Karakul sheep breed by PCR-RFLP marker

جلال زارع[۱]، سید ضیاالدین میر حسینی*[۲]
۱و۲- دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیار ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

Zare J[1], Mirhosseini SZ*[2]
1,2.MSc Student and Associat Professor, Guilan University, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: szmirhoseini@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۴)

چکیده

میوستاتین از اعضای خانواده TGF-β است که نقش مهمی در توسعه عضلات اسکلتی ایفا می کند. این ژن برروی کروموزوم شماره ۲ گوسفند قرار گرفته است. در تمام گونه‌ها، این ژن دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون است. تاکنون نه جهش در توالی ژن میوستاتین گزارش شده که باعث تغییرات غیرمشابه‌ای می‌شوند. این تحقیق با هدف بررسی چندشکلی موجود در اگزون شماره ۳ این ژن در گوسفند قره‌گل ایران با استفاده از تکنیک RFLP-PCR انجام شد. از صد رأس گوسفند قره‌گل ایستگاه سرخس به طور انفرادی و تصادفی خونگیری به عمل آمد. DNA نمونه‌ها با روش بهینه یافته clotted blood استخراج شد. با استفاده از یک جفت آغازگر طراحی شده، قطعه ۳۳۷ جفت بازی اگزون ۳ ژن میوستاتین نمونه‌ها تکثیر شد. جهت تشخیص ژنوتیپ‌های ژن میوستاتین، با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Hae*III قطعه تکثیر شده مورد هضم قرار گرفت. تمامی نمونه‌ها در این جایگاه تک‌شکل بودند و ژنوتیپ MM را نشان دادند. بر اساس گزارشات موجود و نتایج این بررسی مشاهده می‌شود که جایگاه این ژن در اکثر نژادهای ایرانی دارای چندشکلی بسیار پایینی است. لذا به نظر می‌رسد که پایین بودن فراوانی این ژن در نژادهای ایرانی از اختصاصات ژنتیکی گوسفندان ایرانی باشد.

واژه‌های کلیدی

چند شکلی، ژن میوستاتین، گوسفند قره‌گل، DNA، PCR-RFLP

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.12.4]

مقدمه

میوستاتین از اعضای خانواده TGF-β[1] است، که شامل گروهی از فاکتورهای رشد و تمایز می‌باشد و نقش مهمی در توسعه عضلات اسکلتی ایفا می کند. میوستاتین پس از سنتز در عضلهٔ اسکلتی، به گردش خون ترشح می‌شود و در سطح سلول عضلانی از طریق کاهش فاکتور های تنظیمی میوژنیک، تکثیر و تمایز سلول‌ها در میوفیبریل‌های بالغ را مهار می‌کند(McCroskery et al. 2003).

پروپتید میوستاتین ۳۷۶ اسید آمینه دارد که بعد از فرایند پروتئولیک به یک پپتید فعال تبدیل می‌شود. سپس به عنوان یک تنظیم کننده منفی در طی رشد عضله عمل می‌کند. میوستاتین در طی سیکل تکثیر سلول، فاز G_1 و G_2 را بلوکه می‌کند. زمانی که میوستاتین از محیط رشد حذف شود سلول مجدد شروع به تکثیر می‌کند(Julianna et al. 2002).

ژن میوستاتین در گوسفند برروی کروموزوم شماره دو قرار گرفته است که دارای ۳ اگزون و دو اینترون می‌باشد. میوستاتین(GDF8[2]) از ژن‌های کاندیدای موثر بر افزایش وزن بدن است که تاکنون چندشکلی های زیادی که مرتبط با افزایش وزن بدن می‌باشند در توالی این ژن در گوسفند و سایر گونه‌ها مشاهده شده است. اثر مستقیم جهش میوستاتین بر روی صفات لاشه دارای اهمیت می‌باشد. بررسی کیفیت گوشت در نژادهای آمیخته به اثر غیر قابل انکار جهش برروی کیفیت گوشت در بره‌های حامل آلل جهش یافته اشاره دارد(Masri et al. 2011).

در صورت وجود ارتباط بین چندشکلی‌های مشاهده شده در ژن میوستاتین و صفات اقتصادی در یک نژاد، شناسایی آلل جهش یافته این ژن می‌تواند به عنوان یک نشانگر برای انتخاب والدین نسل بعد بسیار موثر باشد. با انتخاب افراد دارای آلل مطلوب در طی نسل‌های متوالی، فراوانی آلل مطلوب تا حد زیادی افزایش می‌یابد و به این طریق می‌توان ظرفیت تولیدی جمعیت را افزایش داد.

برای بررسی چند شکلی جایگاه میوستاتین، در نژادهای ایرانی بررسی‌های مختلفی صورت گرفته است. استفاده از تکنیک-های مولکولی مختلف نشان داده است که نژادهای ایرانی شال، زندی و زل در جایگاه ژن میوستاتین فاقد آلل جهش یافته هستند(Moradi et al. 2009; Miar et al. 2009). در بررسی صورت گرفته در نژاد سنجابی، درصد پایینی از افراد در این جمعیت دارای آلل جهش یافته بودند(Soufy et al. 2009).

چند شکلی یک ژن در یک جمعیت می‌تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی انتخاب مورد استفاده قرار گیرد. انتخاب براساس نشانگرهای ژنتیکی (MAS[3]) علاوه بر افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی، باعث افزایش معیار صحت انتخاب و به دنبال آن افزایش پاسخ به انتخاب نیز می‌شود (Beuzen et al. 2000).

نژاد قره‌گل یکی از مهم‌ترین نژادهای پوستی دنیا است که کمتر از یک در صد گله‌های گوسفند را در ایران تشکیل می-دهد. در این مطالعه از تکنیک PCR-RFLP برای تشخیص چند شکلی در اگزون ۳ ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات اقتصادی رشد گوسفند نژاد قره‌گل استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در این پژوهش از گوسفندان ایستگاه اصلاح نژاد قره‌گل سرخس که دارای رکوردهای ثبت شده بودند نمونه‌برداری صورت گرفت. به طور تصادفی و انفرادی از یک صد راس گوسفند (۳۱ نر و ۶۹ ماده) نمونه خون تهیه شد. نمونه خون کامل از سیاهرگ وداج و با استفاده از لوله‌های خلاء گرفته شد.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی با روش بهینه یافته clotted blood صورت گرفت (Luis et al. 1998). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده

[1] Transforming growth factor β
[2] Growth and differentiation factor 8
[3] Marker assisted selection

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.12.4]

شد. با استفاده ار نشانگر اندازه لامبدا و اسپکتوفتومتر، نمونه‌ها ی DNA با غلظت ng/µl ۴۰-۳۰ برای تکثیر آماده شده ودر ۲۰- درجه نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

برای بررسی میزان چند شکلی، قطعه اگزون ۳ این ژن، با استفاده از آغازگر اختصاصی تکثیر شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از جفت آغازگر اختصاصی رفت و برگشت با توالی 5' - CCGGAGAGACTTTGGGCTTGA - 3' و 5'- CATGAGCACCCACAGCGGTC - 3' استفاده شد (Smith et al. 1997). غلظت نهایی واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد و اجزاء واکنش دارای غلظت‌های زیر بودند: (MgCl2 دو میلی‌مولار، dNTPs ۰/۲ میلی‌مولار، هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت ۰/۲ پیکومول، یک واحد DNA پلیمراز *Taq*، PCR buffer 1X و دو میکرولیتر DNA با غلظت ۴۰-۳۰ نانوگرم در میکرولیتر).

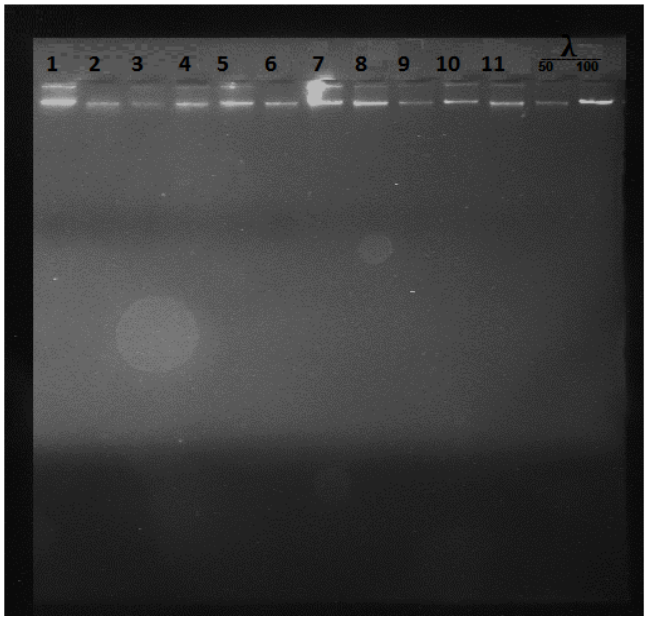
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه حرارتی زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۳ سیکل با واسرشت‌سازی DNA طی ۳۰ثانیه و ۹۴درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۶۰ ثانیه و ۵۸ درجه سانتی‌گراد، بسط اغازگر طی ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی طی ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کمک آنزیم برشی *Hae*III در دمای ۳۷ درجه طی مدت ۳ ساعت مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. این آنزیم در دسته آنزیم‌های ۴ باز بر است و در توالی GG/CC برش ایجاد می‌کند. در توالی تکثیر شده این آنزیم دارای دو جایگاه برش است و در صورت هضم، ۳ قطعه به طول ۸۳، ۱۲۳ و ۱۳۱ جفت باز تولید می‌کند.

برای مشاهده قطعات هضم شده از ژل آکریل‌آمید واسرشت-ساز ۶ درصد و قدرت ۹۰ وات به مدت یک ساعت استفاده شد.

نتایج و بحث

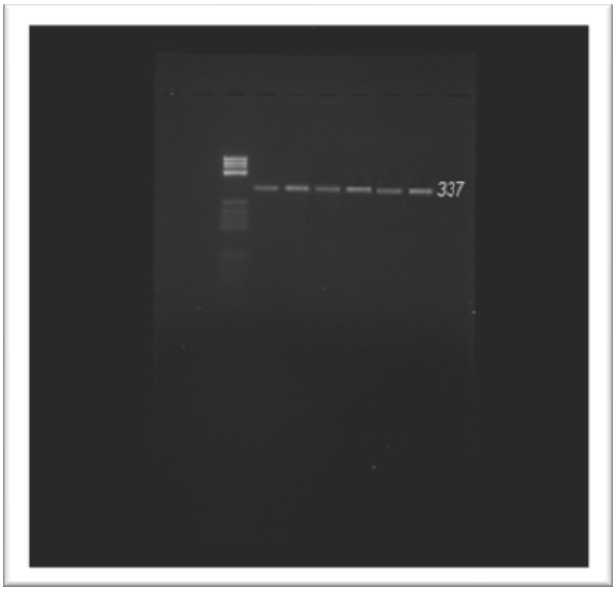
تقریبا DNA استخراج شده تمامی نمونه‌ها کمیت و کیفیت قابل قبولی داشتند (شکل۱). همانطور که انتظار می‌رفت یک قطعه از DNA به طول ۳۳۷ جفت بازی از اگزون ۳ ژن میوستاتین بدون هیچ باند اضافه تکثیر شد.



شکل۱- نمونه‌هایی از DNA ژنومی استخراج شده از گوسفندان قره‌گل

جهت تایید صحت تکثیر قطعه حاصله، از نشانگر اندازه M5 استفاده شد (شکل۲). آنزیم محدودالاثر *Hae*III با ایجاد دو برش در این قطعه ۳۳۷ جفت بازی، ۳ قطعه به طول‌های ۱۳۱، ۱۲۳ و ۸۳ جفت بازی تولید کرد. قطعات حاصل از هضم توسط آنزیم *Hae*III وجود ژنوتیپ وحشی (++) ژن میوستاتین را در نژاد قره‌گل به خوبی نشان می‌دهد (شکل۳) گرچه در گوسفندان نژادهای اروپایی برای جایگاه ژن میوستاتین چندشکلی بالایی مشاهده می‌شود، ولی در مطالعات صورت گرفته بر روی نژادهای ایرانی، در جایگاه این ژن چند-شکلی قابل توجهی مشاهده نشده است. نتایج این مطالعه که با نتایج آزمایش انجام شده بر روی نژادهای زل و ماکویی مطابقت دارد، نشان‌دهنده این امر است (Moradi 2009). همچنین در مطالعه دیگر صورت گرفته بر روی نژاد سنجابی، کمتر از ۳

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.12.4]



شکل۲- قطعه ۳۳۷ جفت بازی تکثیر شده از اگزون ۳ ژن میوستاتین در چندین نمونه از گوسفندان قره‌گل

درصد از نمونه‌ها در جایگاه این ژن دارای آلل جهش یافته بودند و سطح پایینی از چندشکلی در این جایگاه مشاهده شد (Soufy et al. 2009).

در مطالعه انجام شده بر روی نژاد تکسل که یک نژاد گوشتی اروپایی است، چند شکلی بالایی در جایگاه میوستاتین این نژاد مشاهده شد. به‌طوری‌که تقریباً نیمی از نمونه‌ها حامل آلل جهش یافته بودند و همچنین ارتباط معنی‌داری بین وجود این آلل و صفات لاشه و وزن بدن مشاهده شد(Masri et al. 2011).

آلل جهش یافته این ژن در سایر نژادهای اروپایی مانند لینکلن، سافوک، دورست‌هورن (Kijas et al. 2007) و رامنی به فراوانی مشاهده می‌شود و ارتباط معنی‌داری با صفات رشد نشان داده است. به‌طوری‌که بررسی صورت گرفته در نژاد رامنی نشان داد، وزن تولد افراد دارای ژنوتیپ نرمال(GG) برابر ۵/۸ کیلوگرم ودر مقایسه افراد هتروزیگوت با ژنوتیپ AG دارای وزن تولد ۶/۲ کیلوگرم بودند(Han et al. 2010).

نتایج بررسی‌ها در خصوص سایر نشخوارکنندگان نیز وجود ارتباط بین چندشکلی ژن میوستاتین با صفات عملکردی رشد را ثابت می‌کند به طوری‌که مطالعه صورت گرفته در بزهای نژاد Boer در ناحیه 5'UTR[1] از اگزون شماره یک این نژاد دو جهش مشاهده شد که افراد حامل آلل جهش یافته دارای سرعت رشد بالا و عملکرد بهتری نسبت به افراد نرمال می‌باشند (Chunyan et al. 2011). همچنین در گاو، فنوتیپی که به عنوان DM (عضله مضاعف) شناخته می‌شود به جهش در ژن میوستاتین نسبت داده می‌شود که باعث افزایش ۲۰ درصدی در حجم عضله می‌شود. چندین جهش شناسایی شده‌اند که مسئول این فنوتیپ در نژادهای مختلف گاو هستند (Genxi et al. 2011).

یکی از اختصاصات ژنتیکی نژاد قره‌گل، سازگاری با شرایط آب و هوایی گرم است. جثه نسبتا کوچک این نژاد این سازگاری را ایجاد کرده و موجب عملکرد بهتری در این شرایط شده است. به دلیل وجود اثر متقابل بین انتخاب و جهش، این احتمال وجود دارد که در صورت بروز جهش در جایگاه ژن میوستاتین، آلل جهش یافته که باعث ایجاد جثه بزرگتر می‌شود، در اثر انتخاب طبیعی حذف شود و ژنوتیپ نرمال (MM) در این نژاد تثبیت گردد.

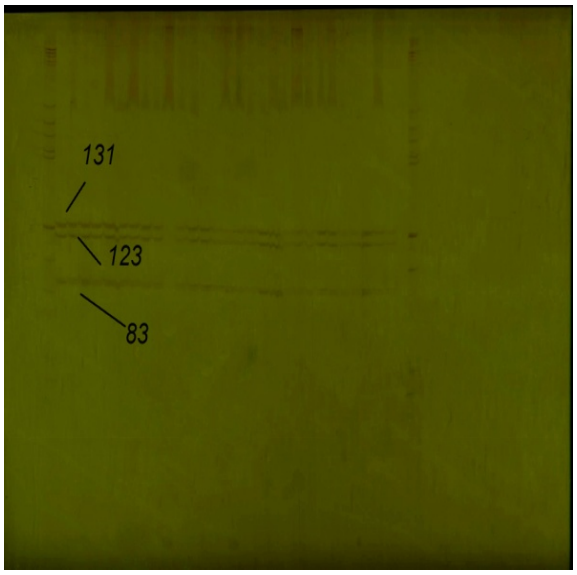
با توجه به اهمیت اقتصادی آلل جهش یافته، بدلیل انتقال تجاری نژادهای اروپایی، آلل جهش یافته به راحتی بین نژادها منتقل می‌شود ولی با عنایت به اینکه در اصلاح نژاد گوسفندهای ایرانی در حال حاضر از نژادهای خارجی استفاده نشده است، لذا تنوع آلل جهش یافته میوستاتین، در این نژادها بسیار پایین است. همچنین با تکثیر قطعه خاصی از DNA، به دلیل محدودیت تعداد جایگاه برش برای آنزیم برشی در توالی تکثیر شده، نشانگر RFLP قادر به شناسایی تمام جهش‌های صورت گرفته در این توالی نیست و لازم است برای شناسایی جهش‌های صورت گرفته در این توالی از نشانگرهای دیگر مرتبط با این بررسی استفاده شود.

تاکنون ۲۳ SNP[2] در توالی ژن میوستاتین گوسفند شناسایی شده است که نشان دهنده تنوع در ساختار این ژن وتعداد بالای هاپلوتیپ است و می‌تواند اطلاعات مفیدی در اختیار قرار دهد (Hickford et al. 2009).

[1] Untranslated region

[2] Single nucleotide polymorphism

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.12.4]



شکل۳- محصول PCR هضم شده اگزون ۳ ژن میوستاتین توسط آنزیم محدودالاثر *Hae*III در چندین نمونه از گوسفندان قره‌گل

در ناحیه غیر ترجمه‌ای (3'UTR) ژن میوستاتین یک SNP، 6223G→A شناسایی شده است که باعث افزیش حجم عضله می‌شود. در بررسی انجام شده در سه نژاد ایرانی زل، شال و زندی این SNP مشاهده نشده است (Miar et al. 2009)، در حالی‌که در نژادهای اروپایی مانند تکسل و رامنی، علاوه بر این SNP سه SNP: g.-2449G>C، g.+6723G>A و c.*1232 G>A به فراوانی در توالی ژن میوستاتین مشاهده شده و ارتباط معنی داری با صفات لاشه نشان داده‌اند و به عنوان نشانگرهای سودمند محسوب می‌شوند (Julianna et al. 2002).

با مقایسه نتایج حاصل از بررسی چندشکلی ژن میوستاتین در نژادهای مختلف این فرضیه تقویت می‌یابد که، مقدار بروز و حتی شکل عمل اثر جهشی میوستاتین برروی فنوتیت احتمالاً تحت تاثیر زمینه ژنتیکی نژادی است. به‌طوری که در نژاد تکسل، آلل جهش یافته و مطلوب این ژن دارای فراوانی بالایی است و تقریباً به شکل ثابت در آمده است (Hadjipavlou et al. 2008) و در اکثر نژادهای ایرانی فراوانی این آلل در حد بسیار پایینی است.

نتیجه‌گیری

با توجه با تعداد پایین گله‌های گوسفند نژاد قره‌گل، و شرایط بسته پرورش و عدم ارتباط با سایر جمعیت‌ها این نژاد دارای هم‌خونی نسبتا بالایی است و در بیشتر جایگاه‌های ژنی دارای هموزیگوسیتی بالایی است. علاوه بر این به دلیل ارتباط آلل جهش یافته با صفات رشد و انتخاب برای بهبود صفات رشد، آلل جهش یافته در نژادهای اروپایی فراوانی بالایی دارد و بین نسل ها منتقل می‌شود. ولی در بیشتر نژادهای ایرانی بدلیل استفاده ار قوچ‌های فاقد ژنوتیپ مشخص برای صفات رشد، فراوانی این آلل پایین می‌باشد. با توجه به اهمیت تولید گوشت بررسی برای پیدا کردن سایر ژن‌های مرتبط با رشد و یا بررسی دیگر روش‌های شناسایی جهش مانند توالی‌یابی مستقیم این جایگاه، اهمیت زیادی برای تثبیت جهش و افزایش تولید دارد.

منابع

Beuzen N, Stear DMJ, Chang KC (2000) Molecular markers and their use in animal breeding. The Veterinary Journal 160: 42-52.

Chunyan Zh, Yun L, Deqing X, Qunying W, Xiang L,Wenmin Zh, Liguo Y (2011) Polymorphisms of myostatin gene (MSTN) in four *goat* breeds and their effects on Boer goat growth performance. Molecular Biology Reports 39:3081-3087.

Genxi Zh, Ding F, Wang J, Dai G, Xie K, Zhang L, Wang W, Zhou Sh (2011) Polymorphism in exons of the myostatin gene and its relationship with body weight traits in the Bian chicken. Biochemical Genetics 49:9-19.

Hadjipavlou G, Matika O, Clop A, Bishop SC (2008) Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (*GDF8*) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. Animal Genetics 39:346-353.

Han J, Zhou H, Forrest RH, Sedcole JR, Frampton CM, Hickford JGH (2010) Effect of myostatin (MSTN) g+6223G>A on production and carcass traits in New Zealand Romney sheep. Asian-Australian Journal Animal Science 2:863-866.

Hickford JGH, Forrest RH, Zhou H, Fang Q, Han J, Frampton CM, Horrell AL (2009) Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. Animal Genetics 41:64-72.

Julianna K, Gócza E (2002) The role of the myostatin protein in meat quality. Archiv Tierzucht 45:159-170

Kijas JW, McCulloch R, Edwards JE, Oddy VH, Lee SH, Van der Werf J (2007) Evidence for multiple alleleseffecting muscling and fatness at the Ovine GDF8 Locus. BioMed Central Genetic 8:80-90.

Luis A, Salazar M, Hirata H, Cavalli AS, Machado MO, Rosario DC (1998) Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. Clinical Chemistry 44:1748-1750.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.12.4]

Masri AY, Lambe NR, Macfarlane JM, Brotherstone S, Haresign W, Bünger L (2011) Evaluating the effects of a single copy of a mutation in the myostatin gene (c.*1232 G>A) on carcass traits in crossbred lambs. Meat Science 87:412-418.

McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulate satellite cell activation and self-renewal. Journal of Cell Biology 162:1135-1147.

Miar Y, Salehi AR, Aleyasi SR, Kolbehdari D, Raoofzadeh S (2009) Polymorphisms in myostatin gene and its association with growth and carcass traits in Iranian sheep. The 6th National Biotechnology Congress of Tehran Iran (In Farsi).

Moradi Shahr baback H, (2009) Association polymorphism of calpastatin gene, myostatin, leptin and potassium genes with economic important trait, blood metabolite and carcass traits in Persian Makoui, Lori-Bakhtiari and Zel sheep breeds. Dissertation, Tehran University, Iran. (In Farsi).

Smith TPL, Lopez-Corrales NL, Kappes SM, Sonstegard TS 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. Mammalian Genome. 8:742-744.

Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009) Evaluation of myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Iranian Journal of Animal Sciences 1:81-89. (In Farsi).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1392.8.1.12.4]