ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحه ۹۰ - ۸۷

مطالعه جهش‌های ژن B4GALNT2 (*FecL*) با روش تجزیه نقطه ذوب با وضوح بالا (HRM) در گوسفند زندی

Study of B4GALNT2 (Fec^L) gene mutation by using High Resolution Melting (HRM) technique in Zandi sheep

عبدالرضا صالحی*[۱]، فرنوش رستمی[۲]،محمدرضا بختیاری زاده[۱]

۱- دانشیاران، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، ژنتیک و اصلاح نژاد دام پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Salehi*[1], Rostami F[2], Bakhtiarizadh M[1]

1- Associate Professors, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Graduated MSc Student, Department of Animal and Poultry Science, College of Aburaihan, University of University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arsalehi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸)

چکیده

از معیارهای مهم بررسی توان تولیدمثل، تعداد نتاج متولد شده در هر زایمان می‌باشد. با توجه به تأثیر این صفت در سودمندی گله‌ها، بهبود ژنتیکی آن به‌کمک فناوری‌های مولکولی مورد توجه قرار گرفته است. تحقیقات نشان داده است که ژن‌های عمده اثر شامل GDF9, BMP15, ALK6 و B4GALNT2 (*FecL*) با صفت تعداد نتاج در هر زایش مرتبط بوده‌اند. تأثیر جهش ژن FecL در حالت هموزیگوت به‌صورت افزایشی بوده و منجر به آزاد شدن سه تخمک برای دو کپی از این ژن می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی چندشکلی DLX3: c. * 803A>G در شناسایی ژن B4GALNT2 (*FecL*) روی کروروموزم ۱۱ با استفاده از روش ذوب با وضوح بالا (HRM)، در گوسفند زندی و ارتباط این ژن با صفت چندقلوزایی بود. آنالیز HRM روشی است که میزان کاهش فلورسنت را در طی فرآیند شیب حرارتی ذوب DNA در اثر خروج رنگ اندازه‌گیری می‌نماید. نتایج حاصل از HRM با نتایج تعیین توالی در تطابق کامل بود. هیچ‌گونه تغییری در توالی نوکلئوتیدی جایگاه مورد نظر در جمعیت گوسفند زندی مورد بررسی مشاهده نشد، از این رو مکان مورد بررسی برای ژن B4GALNT2 یک شکل (مونومورف) می‌باشد. ما در تمامی توالی‌های مورد نظر تغییرات نوکلئوتیدی به‌صورت حذف را مشاهده کردیم، اما تغییری در آمینواسید حاصل و در نتیجه تغییری در ساختار پروتئین حاصل نشد. به‌علاوه دو جهش شامل جهش A>G در جایگاه ۲۲۴۲ در نمونه ۷ و جهش C>G در جایگاه ۲۲۴۱ در نمونه ۷۷ مشاهده شد. بررسی جهش در ژن‌های عمده اثر دیگری برای این نژاد پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
چندقلوزایی
ژن *FecL*
نشانگر های ژنتیکی
HRM

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

مقدمه

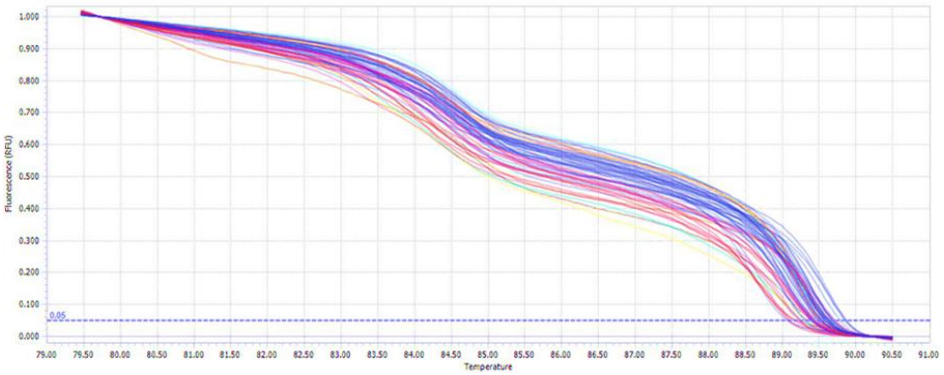
تحقیقات نشان داده شده است که تعداد بره در هر زایش و میزان تخمک‌اندازی می‌توانند به‌صورت ژنتیکی توسط بسیاری از ژن‌های مختلف کوچک اثر (Ricordeau et al. 1990) و یا توسط گروهی از ژن‌های بزرگ اثر که ژن‌های باروری (Fec) نامیده می‌شوند نتظیم شود (Davis 2005; Drouilhet et al. 2009). از مهم‌ترین ژن‌های بزرگ اثر با جهش‌های متعدد می‌توان به ژن فاکتور رشد وتمایز (GDF9) و ژن گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان (BMPR1B) ودسته BMP که معروف‌ترین آن‌ها پروتئین مورفوژنیک استخوان (BMP15) است اشاره کرد (Bodin et al. 2007). طی مطالعه‌ای روی نژاد شال با تکنیک PCR-RFLP، برای شناسایی چند شکلی در ژن‌های GDF9 (*Fec*GH) و BMPR-IB، جهشی گزارش نشد (Ghaffari et al. 2009a.; Ghaffari et al. 2009b.). تمامی این جهش‌ها هنگامی که به‌صورت هتروزیگوت می‌باشند، تعداد بره در هر زایش و میزان تخمک‌اندازی را در میش افزایش می‌دهند، اما با توجه به نوع جهش و در حالت هموزیگوت، اثرات آن‌ها ممکن است، از چند قلوزایی بالا تا عقیمی گوسفند متفاوت باشد (Nicol et al. 2009). طی یک مطالعه روی نژاد گوشتی گوسفند لکون در یک گله تجاری در فرانسه، محققان نشان دادند که چندشکلی منحصر به‌فرد (DLX3: c. * 803A> G) با جهش Fec^L مرتبط است. در بررسی جهش Fec^L دو چند شکلی g.36938224T> A درناحیه اینترون ۷ از ژن B4GALNT2 دیده شد و جهش g.37034573A> G در بین توالی ژن *B4GALNT2* و *EZR* شناسایی شده‌اند. همانند جهش Fec^B، تاثیر جهش Fec^L درحالت هموزیگوت میزان تخمک اندازی به‌صورت افزایشی و با ۱/۵ تخمک اضافی برای یک کپی از این ژن وسه تخمک برای دو کپی از ژن جهش یافته ($FecL^L$) همراه بود (Drouilhet et al. 2013; Drouilhet et al. 2009). این محققین در طی آزمایش ایمونوهیستوشیمی، ژن B4GALNT2 را به‌عنوان بهترین نامزد برای مکان‌یابی و بیان ژن Fec^L پیشنهاد نمودند. این ژن روی کروموزوم 11 گوسفند و در موقعیت: 36992982 – 36929322 با 11 اگزون قرار دارد (Drouilhet et al. 2013). بر اساس فنوتیپ تخمدان و عملکرد غدد درون‌ریز، جهش Fec^L در مقایسه با همه‌ی ژن‌های مؤثر بر سیستم پیام‌رسان پروتئین مورفوژنتیک استخوان (BMPR1B، GDF9 وBMP15) عملکرد تخمدان را به شیوه‌ای متفاوت نسبت به دیگر جهش‌های مرتبط با صفات چندقلوزایی شناخته شده در گوسفند تغییر می‌دهد (Drouilhet et al. 2009; Drouilhet et al. 2010). هدف از تحقیق حاضر بررسی شناسایی جهش‌های ژن B4GALNT2 با استفاده از چندشکلی DLX3: c. * 803A> G، با روش HRM و ارتباط آن با صفت چندقلوزایی در گوسفند زندی بود. برای انجام این تحقیق از ۱۰۰ رأس گوسفند زندی واقع در مزرعه قزلاق پردیس ابوریحان دانشگاه تهران استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از خون با استفاده از کیت Easy Get DNA Extraction با شماره ثبت: REF#FCT100 RUO طبق پروتکل شرکت تولید کننده صورت گرفت. برای ارزیابی مقدار خلوص DNA و آلودگی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومترپیکودراپ و بر اساس جذب در۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. کمیت و کیفت DNA استخراج شده به روش الکتروفروز ژل آگارز تعیین شد. جهت تکثیر اختصاصی ناحیه موردنظر در ژن B4GALNT2 با استفاده از چندشکلی (DLX3: c. * 803A> G) به‌طول ۲۳۲ جفت‌باز، آغازگر مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 Plus طراحی شد. صحت و درستی عملکرد آغازگرها در تکثیر قطعات هدف با استفاده از سایت NCBI*11 و نرم‌افزار Analyzer و نرم‌افزار UCSC بررسی شد. توالی آغازگرهای رفت و برگشت عبارت تست از: F: 5′- CCGACCACCCATTTCTTCT و R: 5′- GGTTTGCTTTCCTGGTGTG. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و اجزای آن شامل کیت PCR تهیه شده از شرکت زیست فناوری پیشگام (با شماره ثبت: ۵۰ – ۱۸۰۳۰۱) به میزان ۲۵ میکرولیتر، از هرکدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۱- میکرولیتر)، آب‌مقطر استریل (۲- میکرولیتر) و نمونه DNA (۲- میکرولیتر) بود. تکثیر قطعه مورد نظر با با برنامه حرارتی تنظیم شده در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ ولت به مدت ۹۰ دقیقه با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. واکنش HRM Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیت DNA (400 ng/µL)، آغازگرهای رفت و

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

برگشت هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، آب استریل۱۳ میکرولیتر، و کیت HRM تهیه شده از شرکت زیست فناوری پیشگام با شماره ثبت (۰۸-۳۱-۰۰۰۰۱) به مقدار ٤ میکرولیتر توسط دستگاه Light Cycler 96 (Roch) انجام پذیرفت. شرایط بهینه برای انجام واکنش طبق پروتکل انجام گرفت سپس گروه‌بندی (بر اساس تفکیک نقطه ذوب) DNA توسط تجزیه و تحلیل HRM انجام شد. جهت تعیین توالی و حصول حجم مناسب از واکنش زنجیرهای پلیمراز برای توالی‌یابی، نمونه‌های منتخب مجدد تحت واکنش PCR قرار گرفته و پس از صحت انجام آن و عدم وجود آلودگی به شرکت زیست‌فناوری پیشگام ارسال شد. الکتروفوروز محصولات تکثیر شده نشان داد که قطعه مورد نظر ژن B4GALNT2 (Fec^L) به‌خوبی تکثیر یافته است (شکل ۱). از نمودارهای ذوب به‌دست آمده از آنالیز (HRM) برای قطعه ۲۳۲ جفت‌بازی، نمودار منحنی‌های ذوب استاندارد شده ارائه شده است شکل (۲). با توجه به شکل به‌نظر می‌رسد که هتروزیگوت وجود داشته باشد و هموزیگوتی دیده نمی‌شود. آلل هموزیگوت در توالی‌ها معمولاً توسط تغییر درجه حرارت (محورx) مشاهده شده در منحنی ذوب HRM مشخص می‌شود در حالی‌که هتروزیگوت‌ها معمولاً با تغییر شکل منحنی ذوب تولید شده از عدم همبستگی جفت‌بازها و در نتیجه ناپایداری اتصال (hetero duplex) در بین تیپ وحشی در گونه‌های مختلف حکایت دارد.



شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد با استفاده نشانگر 100 bpژنتیکی شرکت سینا ژن ایران

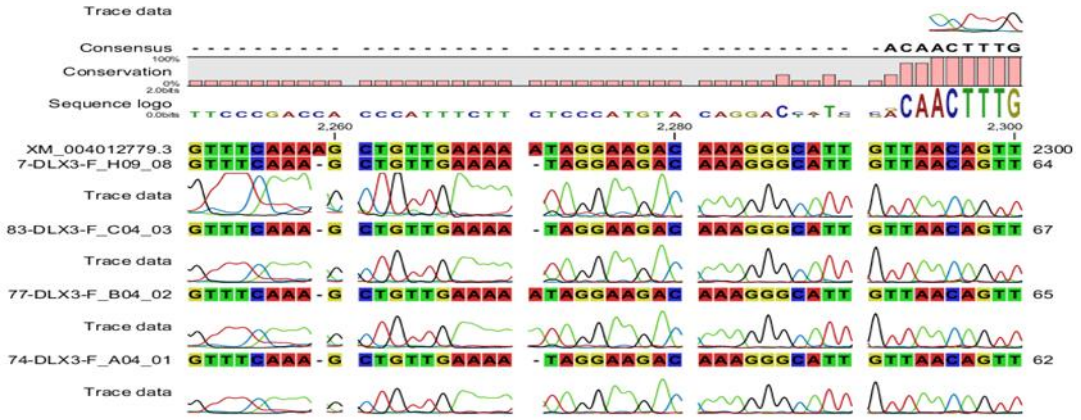


شکل ۲- نمودارهای تفاوت براساس منطقه ذوب

به‌دلیل وجود پیک‌های متفاوت چهارنمونه برای تعیین توالی و اطمینان از صحت انجام کار به شرکت زیست‌فناوری پیشگام فرستاده شدند. نتایج همترازی نمونه‌های توالی‌یابی شده با ژنوم گوسفند به‌منظور شناسایی جهش‌های احتمالی در شکل ۳ ارائه شده است. برای اطمینان از صحت نمونه‌های تعیین توالی شده و تشخیص جهش‌های احتمالی، تمام نمونه‌ها به‌طور مجزا با توالی موجود در NCBI، توسط نرم‌افزار CLC مقایسه و همترازی شد. نتایج حاصل از همترازی نمونه‌های توالی‌یابی شده با ژن B4GALNT2 نشان داد که نمونه‌ها همگی یک شکل (مونومورف) بوده و در نتیجه جهشی (803A> G *) در مکان

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

۲۲۸۸ در این ژن مشاهده نشد. اما دو جهش شامل جهش A>G در جایگاه ۲۲۴۲ در نمونه ۷ و جهش C>G در جایگاه ۲۲۴۱ در نمونه ۷۷ مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر با نتایجی که در گوسفند تیل‌هان و در گوسفند مهربان روی ژن B4GALNT2 مرتبط با جایگاه Fec^L و مشارکت این چندشکلی با تعداد بره در هر زایش در گوسفندان مورد بررسی قرار دادند مطابقت دارد (Talebi et al. 2018). نتایج محققان بر روی گوسفند نژاد گوشتی لکون مبنی بر وقوع جهش ژن $FecL^L$ با نتایج این مطالعه همخوانی نداشت (Drouilhet et al. 2013;Martin et al. 2014). بنابراین با توجه به یک شکل بودن (مونومورف) ژن B4GALNT برای جایگاه مورد بررسی در این نژاد، بررسی سایر ژن‌های عمده مؤثر بر صفت تعداد نتاج در هر زایش برای این نژاد پیشنهاد می‌شود.



شکل۳ –همترازی توالی چندشکلی DLX3 در ژن B4GALNT2 با نرم‌افزار CLC . شماره نمونه در کنار ردیف‌های بازی نوشته شده و قسمت توالی مرجع مربوط به ژنوم اصلی است.

منابع

Bodin L, E Di Pasquale, S Fabre, M. Bontoux P, Monget L, Persani and P Mulsant (2007) A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. Endocrinology 148:393-400.

Davis GH (2005) Major genes affecting ovulation rate in sheep. In: Genetics Selection Evolution p S11.

Drouilhet L, F Lecerf, L Bodin, S Fabre, and P Mulsant (2009) Fine mapping of the FecL locus influencing prolificacy in Lacaune sheep. Animal genetics 40:804-812.

Drouilhet L, C Mansanet, JSarry, K Tabet, P Bardou, F Woloszyn, J Lluch, G Harichaux, C Viguie, and D Monniaux (2013) The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the B4GALNT2 gene within the ovary. PLoS genetics 9:e1003809.

Drouilhet L, C Taragnat, J Fontaine, A Duittoz, P Mulsant, L Bodin, and S Fabre (2010) Endocrine characterization of the reproductive axis in highly prolific lacaune sheep homozygous for the FecLL mutation. Biology of reproduction 82:815-824.

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi G (2009a) Detection of polymorphism in BMPR-IB gene associated with twining in Shal sheep using PCR-RFLP method Int. J. Agric. Biol 11:97-99

Ghaffari M, Nejati-Javaremi A, Rahimi-Mianji G (2009 b) Lack of polymorphism in the oocyte derived growth factor (GDF9) gene in the Shal breed of sheep. South African Journal of Animal Science 39.

Martin P, J Raoul, and L Bodin (2014) Effects of the FecL major gene in the Lacaune meat sheep population. Genetics Selection Evolution 46:48.

Nicol L, SC Bishop, R Pong-Wong, C Bendixen, LE Holm, SM Rhind, and AS McNeilly (2009) Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. Reproduction 138:921.

Ricordeau G, J Thimonier, J Poivey, M Driancourt, M Hochereau-de-Reviers, and L Tchamitchian (1990) INRA research on the Romanov sheep breed in France: a review. Livestock Production Science 24:305-332.

Talebi R, A Ahmadi, FAfraz, J Sarry, F Woloszyn, and S Fabre (2018) Detection of single nucleotide polymorphisms at major prolificacy genes in the Mehraban sheep and association with litter size. Annals of Animal Science 18:685-698.

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