ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۲
صفحه ۳۴۶ - ۳۳۹

توسعه و بهینه سازی تکنیک مقرون به‌صرفه Tetra-primer ARMS PCR به‌منظور بررسی جهش g + 6723G> A ژن میوستاتین در گوسفند قره‌گل

Development and optimization of cost-effective Tetra-primer ARMS PCR technique for detection of myostatin gene g + 6723G>A polymorphism in Karakul sheep

داودعلی ساقی*[۱]،لیلی سیمایی سلطانی[۲]، فائزه قارائی کسمائی[۳]

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۲- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد آمارزیستی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Saghi DA*[1],Simaei Soltani L[2], Gharaei Kasmaei F[3]

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran
2-PhD Student of animal breeding and genetics, Ferdowsi university, Mashhad, Iran
3- MSc Student of Biostatistics, Mashhad university of Medical Science, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: davoudali@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲)

چکیده

میوستاتین که فاکتور رشد و تمایز ۸ (GDF8) نیز نامیده می‌شود به‌عنوان یک تنظیم کننده منفی رشد و توسعه عضلات عمل می‌نماید. بنابراین نقش آن در رشد حیوانات و تولید گوشت حائز اهمیت است. مطالعات عملکردی نشان داده است که یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه 3'UTR این ژن سبب حذف نقش مهاری میوستاتین و در نهایت بروز فنوتیپ ماهیچه مضاعف در گوسفند می‌شود. روش tetra primer ARMS PCR یک روش آسان، سریع، قابل اعتماد و ارزان برای شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی ژن میوستاتین (g + 6723G> A) با روش tetra primer ARMS PCR در ۸۶ رأس گوسفند قره‌گل انجام شد. بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۳ نمونه شاهد شامل هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته گوسفند نژاد شاروله صورت گرفت. تمامی نمونه‌های قره گل مورد بررسی دارای آلل G برای چندشکلی تک نوکلئوتیدی ذکر شده بودند و آلل جهش‌یافته A مشاهده نشد، بنابراین فراوانی آلل جهش‌یافته (A) و آلل وحشی (G) به‌ترتیب صفر و ۱۰۰ درصد می‌باشد. به‌منظور ارزیابی دقت تکنیک tetra primer ARMS PCR در این جایگاه، تمامی افراد آزمایش شده با روش PCR-RFLP نیز تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج حاصل، حاکی از تطابق دو روش با یکدیگر می‌باشد و از این رو می‌توان در جهت تعیین ژنوتیپ از روش Tetra Primer ARMS PCR به‌عنوان روشی مقرون به صرفه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

گوسفند قره گل
ماهیچه مضاعف
میوستاتین
Tetra Primer ARMS PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

مقدمه

امروزه با توجه به نیاز روز افزون جهانی یکی از اهداف اصلی پرورش گوسفند تولید گوشت می‌باشد. از سوی دیگر با توجه به تخریب مراتع به‌دلیل چرای بیش از حد دام، تولید گوشت به میزان بیشتر به ازای هر رأس می‌تواند استراتژی معقول و هوشمندانه‌ای باشد. (Farhadian and Hashemi 2016). بنابراین پرورش دام با رشد سریع‌تر از حد معمول و وزن لاشه بیشتر به‌دلیل سود مستقیم، مورد توجه بسیاری از دامپروران و محققان قرار گرفته است (Grochowska et al. 2019).

امروزه اصلاح نژاد در دام سبک توسط بسیاری از ابزارهای ژنتیک مولکولی از جمله انتخاب به کمک نشانگرها انجام می‌شود. از مزیت‌های این روش می‌توان به مقرون به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی در عین افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در برخی از صفات رشد و یا لاشه اشاره نمود.

در بین ژن‌های شناسایی شده ی کاندید برای صفات رشد و وزن نهایی لاشه، ژن کد کننده میوستاتین که در واقع بیان آن به‌طور منفی رشد ماهیچه اسکلتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد را می‌توان به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در رشد و توسعه ماهیچه دانست از این رو می‌تواند گزینه مناسبی برای انتخاب به کمک نشانگر باشد (Grochowska et al. 2019).

میوستاتین یا فاکتور رشد و تمایز ۸ (GDF-8) یکی از اعضای خانواده تغییر دهنده فاکتور رشد بتا (TGF-β) می‌باشد. ژن میوستاتین در گوسفندان بر روی کروموزوم شماره ۲ قرار دارد (McPherron and Lee 1997) و مانند میوستاتین گاوی از سه اگزون و دو اینترون تشکیل شده است (Grobet et al. 1997). طول این ژن شامل ۶۷۵۷ جفت‌باز (شماره دسترسی: NC_040253.1) و طول ناحیه رونویسی ۱۱۲۸ جفت‌باز می‌باشد. هم‌چنین این ژن پروتئینی به طول ۳۷۵ اسیدآمینه را کد می‌نماید (Zerbino et al. 2018).

در سال ۱۹۹۸ Marcq و همکاران به‌منظور شناسایی ارتباط بین چندشکلی ژن میوستاتین و ماهیچه مضاعف، کل ناحیه کدکننده ژن میوستاتین را در گوسفندان تکسل توالی‌یابی نمودند (Marcq 1998). در مطالعه‌ی دیگری نژاد تکسل بلژیکی با ماهیچه مضاعف در مقابل گوسفندان رومانف با ماهیچه معمولی به‌عنوان گروه کنترل مقایسه شدند که درنهایت هیچ تفاوتی در توالی ژنوم آن‌ها در ناحیه کدکننده ژن میوستاتین یافت نشد (Marcq et al. 2002). این شواهد حاکی از آن است که چند شکلی‌ای که سبب ماهیچه مضاعف می‌شود، ممکن است در نواحی غیر کدکننده و یا در ژنی پیوسته و بسیار نزدیک به ژن میوستاتین باشد (Miar et al. 2014).

با بررسی‌های لازم، دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی دو آللی در ۱۰/۵ کیلوباز از DNA ژنوم گوسفند که حاوی ژن میوستاتین (با شماره دسترسی DQ530260) بود، شناسایی شد و بین گوسفندان تکسل با ماهیچه مضاعف و گروه شاهد از نظر فراوانی آللی اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (Clop et al. 2006). اولین چندشکلی (g.-2449G>C) در ناحیه ۲/۵ کیلوبازی بالادست جایگاه شروع رونویسی می‌باشد و چندشکلی دوم (g+6223A) در ناحیه ′۳ ترجمه نشده (3'UTR) ژن میوستاتین قرار دارد و به‌عنوان g + 6723G> A، g + 6223G> A یا c.*1232 G> A شناخته می‌شود (Clop et al. 2006; Masri et al. 2011).

مطالعات عملکردی نشان دادند که وجود آلل جهش‌یافته (g+6223A) منجر به ایجاد یک موتیف اوکتامری (ACATTCCA) می‌شود و این امر سبب ایجاد محل اتصال miRNAهای ۱ و ۲۰۶ می‌شود و این چنین مهار ترجمه میوستاتین صورت می‌گیرد و در نهایت صفت ماهیچه مضاعف بروز پیدا می‌کند (Clop et al. 2006).

از زمانی‌که جهش g + 6723G> A در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین توسط Clop و همکارانش در سال ۲۰۰۶ شناسایی شد تا به امروز برای تعیین ژنوتیپ، محققان عمدتاً از روش چندشکلی طول قطعات حاصل از هضم مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR-RFLP) به‌وسلیه آنزیم محدودکننده HpyCH4IV استفاده می‌نمودند. شایان ذکر است که در کنار مزایا آن، روشی بسیار گران قیمت بوده و به انکوباسیون طولانی مدت نیاز دارد. در برخی شرایط نیز از روش‌های دیگری همچون توالی‌یابی و چندشکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP) نیز استفاده می‌شود، اما این روش‌ها معایبی از قبیل هزینه بالا و صرف نیروی کار و زمان زیاد را داراست (Guan et al. 2014).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

تکنیک Tetra-primer ARMS PCR با نام کامل Tetra-primer Amplification Refractory Mutation system–polymerase chain reaction روشی مبتنی بر PCR در جهت تشخیص وجود چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژنوم بوده و تکنیکی است که در عین سادگی و دقت بالا، کم هزینه و مقرون به صرفه نیز می‌باشد (Lajin et al. 2012). از این رو این تکنیک می‌تواند جایگزینی مناسب برای روش‌های ذکرشده باشد.

یکی از نژادهای پوستی–گوشتی ایرانی قره گل خراسان می‌باشد که دارای زیست‌بوم بیابانی بوده و با جمعیتی بالغ بر ۱۳۲ هزار رأس در منطقه سرخس یافت می‌شود (Saghi et al. 2022). با وجود مطالعات مختلفی که درجهت شناسایی ژن میوستاتین بر روی نژادهای مختلف ایرانی و خارجی انجام گرفته است تا کنون مطالعه‌ای در خصوص شناسایی جهش g + 6723G> A در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین برای این نژاد صورت نگرفته است. از سوی دیگر عمده این مطالعات از تکنیک‌هایی همچون PCR-RFLP و یا SSCP-PCR بهره برده‌اند.

با توجه به مزایا یاد شده برای روش Tetra Primer ARMS PCR در مطالعه پیش‌رو ابتدا با استفاده از این تکنیک به بررسی وجود و یا عدم وجود جهش g + 6723G> A در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین در گوسفندان قره‌گل پرداخته شد، سپس دقت این تکنیک با روش PCR-RFLP مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با هدف شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی ژن میوستاتین (g + 6723G> A) با استفاده از تکنیک tetra primerARMS PCR برای ۱۰ درصد از جامعه در دسترس از نژاد مورد نظر که شامل ۸۶ رأس گوسفند می‌باشد، انجام شد.

در این پژوهش از ۱۰ درصد از گوسفندان قره‌گل ایستگاه اصلاح نژاد سرخس که شامل ۸۶ رأس گوسفند می‌باشد، نمونه‌گیری تصادفی انجام گرفت و ۳ راس گوسفند نژاد شاروله (هموزیگوت وحشی، هتریوزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته) نیز به‌عنوان گروه شاهد به‌منظور بهینه سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش Tetra-primer ARMS PCR مورد استفاده قرارگرفت. با کمک لوله‌های حاوی EDTA نمونه‌گیری خون با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه بیوتکنولوژی و ژنتیک دام (مرکز شماره ۳ سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی) منتقل و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت دنازیست (شماره کاتالوگ: S-103-1-1) انجام گرفت.

ابتدا توالی ژن میوستاتین از پایگاه NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) با شماره دسترسی DQ530260.1 استخراج شد و سپس جهش مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.0 (CLC bio, Aarhus, Denmark) شناسایی و آغازگرها با نرم‌افزار Primer 5.0 Primier (http://www.premierbio soft.com/) طراحی و به‌منظور سنتز آغازگرها، توالی‌ها به شرکت Metabion آلمان ارسال شد. در مرحله بعد به‌منظور شناسایی جهش g + 6723G> A با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR یک جفت آغازگر کنترل یا آغازگر بیرونی (Outer-F و Outer-R) و یک جفت آغازگر اختصاصی آلل و یا آغازگر داخلی (Inner-F و Inner-R) طراحی شد. وظیفه جفت آغازگرهای بیرونی بدین صورت می‌باشد که قطعه بزرگ‌تری از DNA ژنومی که حاوی محل جهش G6723A را تکثیر کند و در واقع این جفت آغازگر صحت انجام واکنش PCR را نشان می‌دهد. دو آغازگر اختصاصی آلل (داخلی) در جهت مخالف و در ترکیب با پرایمرهای بیرونی طراحی شده‌اند، به‌طوری که هم‌زمان هم آلل نوع وحشی و هم آلل جهش‌یافته تکثیر می‌شوند. براساس اصلی که توسط Ye و همکارانش (۲۰۰۱) بیان شده است به‌منظور افزایش اختصاصیت آغازگرهای درونی، علاوه بر باز ناهمخوان انتهای ′۳، باز ناهمخوان دیگری در موقعیت ۲ از انتهای ′۳ در توالی آغازگرهای اختصاصی درونی قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر که شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی به غلظت ۵۰ نانوگرم، ۲/۵ پیکومول از هریک از آغازگرهای بیرونی، ۱۰ پیکومول از هریک از آغازگرهای اختصاصی درونی، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس پارس توس (2X Taq PCR Master Mix) و۹/۲ میکرولیتر آب‌مقطر دوبار تقطیر می‌باشد، انجام شد. این واکنش در دستگاه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

ترموسایکلر LifeEco Bioer مدل TC-96/G/H(b)C با برنامه دمایی به شرح زیر انجام گرفت:

مرحله اول واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد

مرحله دوم ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب در درمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه

مرحله سوم دمای اتصال در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه

مرحله چهارم بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه

مرحله پنجم بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه

از سوی دیگر با بهره‌گیری از روش PCR-RFLP دقت روش Tetra-primer ARMS PCR مورد ارزیابی قرارگرفت. بدین صورت که از یک جفت پرایمر بیرونی طراحی شده در روش Tetra-primer ARMS PCR برای روش PCR-RFLP استفاده شد.

برای این تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که شامل: ۱۰ میکرولیتر مستر میکس پارس توس (2XTaq PCR Master Mix)، ۵ پیکومول از هریک از آغارگرهای رفت و برگشت و ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم بود، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه دمایی به شرح زیر انجام گرفت:

مرحله اول واسرشت‌سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد

مرحله دوم ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه

مرحله سوم دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه

مرحله سوم بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه

مرحله چهارم مرحله بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه .

در ادامه نیز قطعه تکثیر شده حاصل از واکنش زنجیره پلیمراز با آنزیم محدودکننده HpyCH4IV شرکت Thermo Fisher Scientific ترکیب و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت هضم شد. واکنش در حجم نهایی ۱۵/۵ میکرولیتر شامل، ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۹ میکرولیتر آب‌مقطر دو بار تقطیر، ۱ میکرولیتر بافرR (10x) و ۵ واحد آنزیم برشی انجام شد.

پس از بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، DNA ژنومی تمامی ۸۶ نمونه قره‌گل با هردو روش Tetra-primer ARMs PCR و PCR-RFLP مورد آزمایش قرارگرفتند.

توالی آغازگرهای طراحی شده در روش Tetra-primer ARMS PCR و PCR-RFLP به‌همراه الگوی ژنوتیپی حاصل از آن‌ها در جدول (۱) آورده شده است.

محصولات حاصل از هضم آنزیمی و تکنیک Tetra-primer ARMS PCR، بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی GelStain-GreenTM (LOT.5B0818-07) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. سپس به‌منظور مشاهده قطعات تکثیر شده و تعیین ژنوتیپ هر دام، ژل آگارز در دستگاه ژل داک مدل Gel Doc WiFi ساخت شرکت فرژن قرار داده شد و عکس‌برداری صورت گرفت.

در پایان به‌عنوان شاهد از DNA ژنومی ۳ نمونه خون گوسفند نژاد شاروله که شامل یک رأس هموزیگوت وحشی، یک راس هتروزیگوت و یک راس هموزیگوت جهش‌یافته بودند، استفاده شد. لازم به ذکر است که به‌منظور تأیید صحت ژنوتیپ نمونه‌های شاهد DNA این نمونه‌ها به‌وسیله یک جفت آغازگر بیرونی تکثیر، به شهر شیراز ارسال و با دستگاه Applied Biosystes 3130/3130xl Genetic Analyzers به روش سنگر[1] تعیین توالی شدند.

نتایج و بحث

در تکنیک Tetra-primer ARMS PCR، طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام می‌شود که بعد از بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، در مجموع ۳ قطعه با اندازه متفاوت در محصول PCR قابل مشاهده می‌باشد که این سه قطعه شامل: یک قطعه بزرگ به طول ۶۷۵ جفت‌باز که به‌عنوان قطعه کنترل، قطعه ۴۶۲ جفت‌بازی به‌عنوان آلل جهش یافته (A) و قطعه ۲۵۴

[1] Sanger sequencing

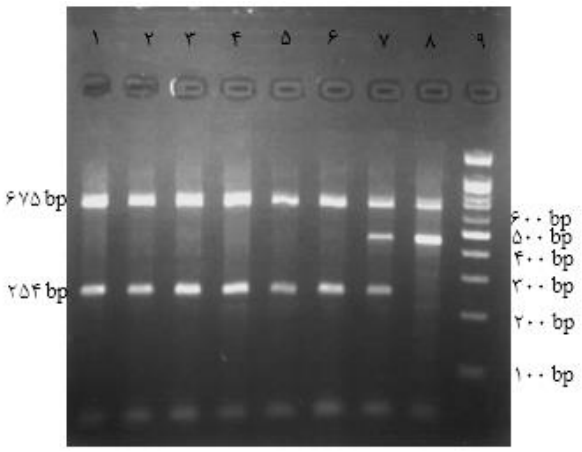
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

جفت‌بازی به‌عنوان آلل وحشی (G) در نظرگرفته می‌شود. بنابراین در دام هتروزیگوت (AG) سه قطعه ۶۷۵، ۴۶۲ و ۲۵۴ جفت‌بازی، در دام هموزیگوت جهش‌یافته (AA) قطعات ۶۷۵ و ۴۶۲ جفت‌بازی و در دام هموزیگوت وحشی (GG) قطعات ۶۷۵ و ۲۵۴ جفت‌بازی قابل مشاهده هستند (شکل ۱). در روش PCR-RFLP قطعه ۶۷۵ جفت‌بازی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از یک جفت آغازگر بیرونی بدون تکثیر قطعات غیراختصاصی به‌خوبی تکثیر پیداکرد. با بررسی الگوی باندی مشاهده شده در محصولات PCR حاصل از هضم آنزیمی در ۳ نمونه شاهد، سه قطعه ۶۷۵، ۲۳۳ و ۴۴۲ جفت‌بازی مشاهده شدند. در نمونه با ژنوتیپ وحشی (GG) قطعات ۲۳۳ و ۴۴۲ جفت‌بازی، در نمونه هتروزیگوت (AG) قطعات ۲۳۳، ۴۴۲ و قطعه برش نخورده ۶۷۵ جفت‌بازی و در نمونه با ژنوتیپ هموزیگوت (AA) تنها قطعه ۶۷۵ جفت‌بازی تکثیر یافتند (شکل ۲). تمامی ۸۶ نمونه قره‌گل با هر دو روش PCR-RFLP و Tetra-primer ARMS PCR تعیین ژنوتیپ شدند و نتایج حاصل از این دو روش با یکدیگر مطابقت کامل داشتند.

به‌منظور اعتبارسنجی آغازگرهای طراحی شده در روش Tetra-primer ARMS PCR، DNA ژنومی نمونه شاهد هتروزیگوت، هموزیگوت وحشی و هموزیگوت جهش‌یافته به‌وسیله یک جفت آغازگر بیرونی تکثیر و بعد از تخلیص برای توالی‌یابی به شهر شیراز ارسال شد و پس از بررسی نتایج توالی‌یابی، بین نتایج آغازگرهای بهینه شده در روش Tetra-primer ARMS PCR، روش PCR-RFLP و نتایج توالی‌یابی مطابقت کامل وجود داشت در ادامه نتایج توالی‌یابی در شکل ۳ نشان داده شده‌است.

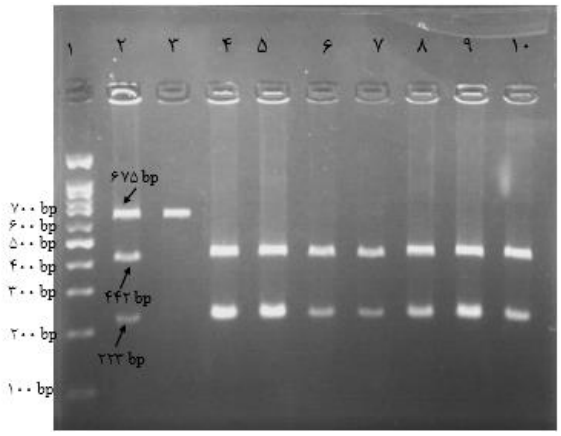
جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده به‌منظور شناسایی جهش g + 6723G> A ژن میوستاتین و الگوی ژنوتیپی حاصل از آن‌ها

روش	توالی پرایمر	آنزیم محدود کننده	الگوی ژنوتیپ (جفت‌باز)
TETRA-PRIMER ARMS PCR	F(outer):GTATTAAGGCACAAAGACAT	-	۶۷۵(control) /۴۶۲ (A) /۲۵۴(G)
	R(outer):AAAGCAACTTGACCAGAACC		
	F(inner): TCATTGTATTCAAATCTCAAGA		
	R(inner): AAGTATTAAAATAATGGACC		
PCR-RFLP	F(outer): GTATTAAGGCACAAAGACAT	HpyCH4IV	۶۷۵ (AA) /۶۷۵ + ۴۴۲ + ۲۲۳(AG) /۴۴۲ + ۲۲۳(GG)
	R(outer): AAAGCAACTTGACCAGAACC		



شکل ۱- تصویر ژل آگارز محصول Tetra-primer ARMs PCR ژن میوستاتین.

چاهک‌های ۱ الی ۶: نمونه‌های قره گل با ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (GG)، چاهک ۷: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هتروزیگوت (AG)، چاهک ۸: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته (AA)، چاهک ۹: نشانگر bp ۱۰۰

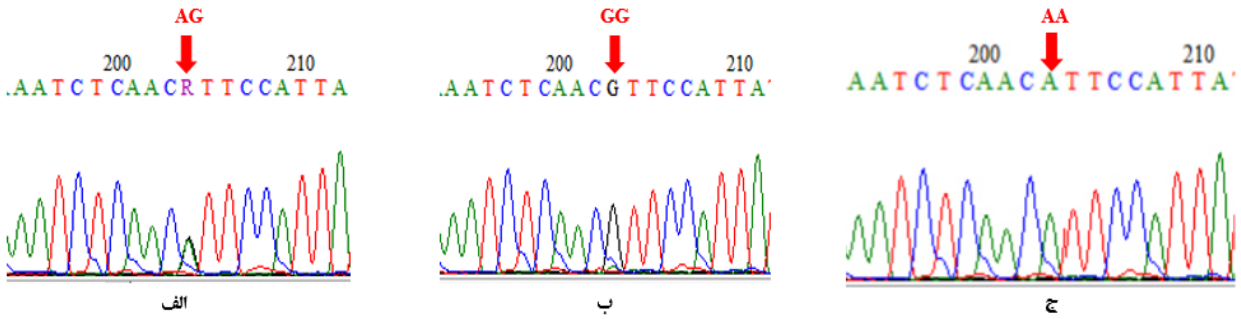


شکل ۲- تصویر ژل آگارز هضم آنزیمی ژن میوستاتین با آنزیم HpyCH4IV.

چاهک ۱: نشانگر bp ۱۰۰، چاهک ۲: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هتروزیگوت (AG)

چاهک ۳: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته (AA)، چاهک ۱۰-۴: نمونه‌های قره گل با ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (GG)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]



شکل ۳- ژنوتیپ هتروزیگوت (شکل الف)، ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (شکل ب)، ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته (شکل ج)

تمامی نمونه‌های مورد بررسی برای چندشکلی تک نوکلئوتیدی دارای آلل G بوده و آلل جهش‌یافته‌ی A در هیچ یک از نمونه مشاهده نشد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که فراوانی آلل وحشی (G) و آلل جهش‌یافته (A) به‌ترتیب ۱۰۰ و صفر درصد می‌باشد. عدم حضور آلل A در سه نژاد ایرانی شال، زل و زندی (Yonous et al. 2011)، گوسفند مرینوس لهستانی (Grochowska et al. 2019) و نژادهای کوپ ورث، بلک سافولک، مرینوس، سات داون، انگلیش لیسستر، پل وارث، رامنی و تبتی (Kijas et al. 2007; Hadjipavlou et al. 2008) نیز گزارش شده است. Han و همکارانش (۲۰۱۰) نیز فراوانی آلل جهش‌یافته A در گوسفندان رامنی نیوزلند (New Zealand (NZ) Romney) بررسی نموده و این فراوانی را پایین و برابر با ۲/۷۹٪ گزارش نمودند (Han et al. 2010) فراوانی پایین آلل جهش‌یافته A در نژادهای وایت سافولک، پل درست و لینکلن نیز به‌ترتیب ۹/۳، ۱۲/۵و ۱۲/۵ گزارش شده است (Kijas et al. 2007). در مطالعه دیگری نیز فراوانی آلل جهش‌یافته A در نژاد شاروله در سطح متوسط (۳۰ درصد) گزارش شده و با بررسی‌های لازم نشان داده شد که ارتباط معنی‌داری بین عمق ماهیچه و این جهش وجود دارد (Hadjipavlou et al. 2008). از سوی دیگر Clop و همکاران (۲۰۰۶)، فراوانی آلل جهش یافته A در جمعیت گوسفند تکسل نزدیک به تثبیت (۹۹٪) گزارش کرده‌اند و پیشنهاد کردند که این جهش ممکن است خاص آن نژاد باشد (Clop et al. 2006). مطالعه دیگری که برروی گوسفندان East Frisian انجام شده است نشان داد که فراوانی آلل A در این گوسفندان نیز بالا (۶۳٪) می‌باشد (Bignell et al. 2010). Trukhachev و همکاران (۲۰۱۵)، بیان نمودند که ۸۰٪ از جمعیت Merino که در مطالعه آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفته است حامل دو نسخه از آلل A و ۲۰% حامل دو نسخه از آلل G بوده‌اند. Kolenda و همکارانش (۲۰۱۹) مطالعه‌ای را بر روی دو نژاد Kamieniec و Pomeranian انجام دادند و توانستند سه ژنوتیپ AA، AG و GG را مشاهده نمایند در نهایت نیز با بررسی‌های لازم فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در دو نژاد مورد بررسی را متفاوت گزارش نمودند. از سوی دیگر اثر معنی‌دار آلل A را بر وزن دام در روز ۵۶ و افزایش وزن روزانه را تنها در نژاد Kamieniec مشاهده کردند. با توجه به تمامی مطالعات انجام شده، می توان نتیجه‌گیری نمود که فراوانی آلل A در نژادهای مختلف گوسفند متفاوت می‌باشد و این موضوع نشان‌دهنده این است که حضور آلل A و تعداد کپی‌های هر آلل به نژاد گوسفند بستگی دارد. بنابراین، با توجه به تأثیراتی که این آلل بر روی صفات رشدی دارد، بررسی این موضوع که آیا نژادهای بومی ایران دارای آلل A هستند یا خیر، حائز اهمیت است.

در مطالعه حاضر تکنیک Tetra-primer ARMS PCR جهت تعیین ژنوتیپ چندشکلی g + 6723G> A ژن میوستاتین در گوسفند قره‌گل به‌صورت کامل انجام شد و به‌منظور ارزیابی صحت روش Tetra-primer ARMS PCR در تعیین ژنوتیپ چندشکلی تک نوکلئوتیدی موردنظر، روش PCR-RFLP نیز انجام و تطابق ۱۰۰ درصدی بین هر دو روش مشاهده شد. Aboelhassan و همکاران (۲۰۲۱) نیز از روش Tetra-primer ARMs PCR در تعیین ژنوتیپ ۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

شناخته شده ژن فاکتور رشد و تمایز ۹ (GDF9/FecG) استفاده کردند و تمامی جهش‌ها با موفقیت تکثیر شدند.

Niu و همکاران (۲۰۲۱) به‌منظور شناسایی جهش ژن BMP15 در گوسفند، از روش tetra-primer ARMS PCR استفاده نمودند. براساس نتیجه مطالعه آن‌ها هر سه نوع ژنوتیپ هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد.

نتایج بررسی از چندشکلی تک نوکلوئتیدی ژن Boule در بز با استفاده از روش tetra-primer ARMS PCR که توسط Song و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد نیز بیانگر دقت و موفقیت بالای این روش در تعیین ژنوتیپ چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی است. مطالعه‌ی دیگری با هدف تعیین ژنوتیپ جهش تک نوکلئوتیدی V397I ژن GDF9 انجام شد که در این مطالعه نیز روش مورد استفاده tetra-primer ARMS PCR می‌باشد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه جهش مورد مطالعه با موفقیت تکثیر شد (Mamutse et al. 2022).

محمدی و همکاران (۲۰۲۲) نیز از روش tetra-primer ARMS PCR برای شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی ژن FecB در گوسفند بهره بردند و تطابق کامل را بین نتایج حاصل از روش توسعه یافته آن‌ها با نتایج روش PCR-RFLP و تعیین توالی گزارش نمودند (Mohammadi et al. 2022).

از زمانی‌که روش tetra-primer ARMS PCR با جزئیات توسط Ye و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شده است، این روش به یکی از متداول ترین روش‌های مورد استفاده برای تعیین ژنوتیپ SNPها تبدیل شده است. اصل روش tetra-primer ARMS PCR بدین صورت می‌باشد که Taq DNA پلیمراز فاقد فعالیت اگزونوکلئاز ′۳←′۵ است، بنابراین نرخ بسط و گسترش در انتهای ′۳ در پرایمر ناهمخوان (mismatched primer) کندتر از پرایمر با انتهای ′۳ معمولی می‌باشد و یا اینکه نمی‌تواند بسط و گسترش پیدا کند.

با ارزیابی مطالعه حاضر و مطالعات مختلف ذکر شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که روش توسعه یافته tetra-primer ARMS PCR از صحت و دقت کافی جهت شناسایی چندشکلی تک نوکلوئتیدی برخوردار است و ساده‌تر از روش PCR-RFLP می‌باشد. از سوی دیگر روش توسعه یافته مقرون به صرفه و به اندازه کافی سریع می‌باشد و این ویژگی این امکان را در اختیار ما قرار می‌دهد که بتوانیم در مدت زمانی کوتاه تعداد زیادی از نمونه‌ها را مورد آزمایش قرار دهیم. علاوه بر این روش tetra-primer ARMS PCR باعث حذف آنزیم برشی می‌شود و از این رو می‌تواند اثرات برش آنزیم، به‌ویژه هضم ناقص آنزیم را به حداقل برساند.

روش tetra-primer ARMS PCR مزایای زیادی نسبت به PCR-RFLP و تعیین توالی DNA به لحاظ هزینه، صرف وقت را دارا می‌باشد و از این رو می‌توان حتی در آزمایشگاه‌هایی با تجهیزات معمولی آن را اجرایی نمود (Etlik et al. 2011).

به‌طورخلاصه در بین روش‌های مختلف برای تشخیص SNPها، روش tetra-primer ARMS PCR یک روش آسان، سریع، قابل اعتماد و ارزان است.

منابع

Aboelhassan DM, Darwish AM, Ali NI, Ghaly IS, Farag IM (2021) A study on mutation points of GDF9 gene and their association with prolificacy in Egyptian small ruminants. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 19:1-11.

Bignell CW, Malau-Aduli AEO, Nichols PD, McCulloch R, Kijas J W (2010) East Friesian sheep carry a Myostatin allele known to cause muscle hypertrophy in other breeds. Animal genetics 41:445-446.

Boman IA, Klemetsdal G, Blichfeldt T, Nafstad O, Våge DI (2009) A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). Animal genetics 40:418-422.

Boman IA, Våge DI (2009) An insertion in the coding region of the myostatin (MSTN) gene affects carcass conformation and fatness in the Norwegian Spælsau (*Ovis aries*). BMC Research Notes 2:1-5.

Boman IA, Klemetsdal G, Nafstad O, Blichfeldt T, Våge DI (2010) Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). Genetics Selection Evolution 42:1-7.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Georges M (2006) A mutation creating a potential

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]

illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nature genetics 38:813-818.
Etlik O, Koksal V, Arican-Baris ST, Baris I (2011). Development and validation of a cost-effective in-house method, tetra-primer ARMS PCR assay, in genotyping of seven clinically important point mutations. Molecular and cellular probes 25:177-181
Farhadian M, Hashemi A (2016) Molecular characterization and phylogeny based analysis of intron i sequence of myostatin (MSTN) gene in Iranian Makuei sheep breed. Annals of Animal Science 16:1007.
Gan SQ, Du Z, Liu SR., Yang YL, Shen M, Wang XH, ... Li, N (2008) Association of SNP haplotypes at the myostatin gene with muscular hypertrophy in sheep. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 21:928-935.
Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Georges M (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double–muscled phenotype in cattle. Nature genetics 17:71-74
Grochowska E, Borys B, Mroczkowski S (2019) Effects of intronic SNPs in the myostatin gene on growth and carcass traits in colored Polish merino sheep. Genes 11:2.
Guan F, Shi G, Wan P, Dai R, Tang H, Wang H, Luo Y (2014) Development of cost-effective tetra-ARMS PCR for detection of FecB genotype in sheep. Animal Science Papers and Reports 32:229-237.
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-Australasian Journal of Animal Sciences 23:863-866.
Kijas JW, McCulloch R, Edwards JEH, Oddy VH, Lee SH, Van der Werf J (2007) Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. BMC genetics 8:1-11.
Kolenda M, Grochowska E, Milewski S, Mroczkowski, S (2019) The association between the polymorphism in the myostatin gene and growth traits in Kamieniec and Pomeranian sheep breeds. Small Ruminant Research 177:29-35.
Lajin B, Alachkar A, Sakur AA (2012) Triplex tetra-primer ARMS-PCR method for the simultaneous detection of MTHFR c. 677C> T and c. 1298A> C, and MTRR c. 66A> G polymorphisms of the folate-homocysteine metabolic pathway. Molecular and cellular probes 26:16-20.
Mamutse J, Purwantini D, Susanto A, Sodiq A (2022, March). Determining the Polymorphism of V397I SNP of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene in Indonesian Saanen Goats. In International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021) (pp. 155-158). Atlantis Press.
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.
Marcq F (1998) EI Barkouki S, Elsen JM, Grobet L, Royo L, Leroy PL, Georges M. Investigating the role of myostatin in the determinism of double muscling characterizing Belgian Texel sheep. Proc XXVIth Intern Con! Anim Genet Auckland New Zealand 75.
Marcq F, Larzul C, Marot V, Bouix J, Eychenne F, Laville E, Elsen JM (2002) Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in a Texel× Romanov intercross. Proc 7th World Congr Genet Appl Livest Prod Montpellier 19-23.
McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. Nature 387:83-90.
Miar Y, Salehi A, Kolbehdari D, Aleyasin, SA (2014) Application of myostatin in sheep breeding programs: A review. Molecular Biology Research Communications 3:33.
Mohammadi F, Saghi DA, Simaie Soltani L (2022) Detection of FecB gene polymorphisms in sheep using rapid and low-cost tetra-ARMS PCR. Animal Sciences Journal 34:147-156.
Saghi DA, Banabazi MA, Saghi R , Ashkanifar R, (2022) Karakul sheep. Agricultural Research, Education and Extension Organization 5-58
Song X, Li J, Fei P, Zhang X, Pan C, Chen H, Lan X (2019) Polymorphisms within the boule gene detected by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (t-arms-pcr) are significantly associated with goat litter size. Animals 9:910.
Trukhachev V, Belyaev V, Kvochko A, Kulichenko A, Kovalev D, Pisarenko S, Krivoruchko A (2015) Myostatin gene (MSTN) polymorphism with a negative effect on meat productivity in Dzhalginsky Merino sheep breed. Journal of BioScience and Biotechnology 4(2).
Niu ZG, Qin J, Jiang Y, Ding XD, Ding YG, Tang S, Shi HC (2021) The Identification of Mutation in BMP15 Gene Associated with Litter Size in Xinjiang Cele Black Sheep. Animals 11:668.
Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR and Day IN (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic acids research 29:e88-e88
Yonous Miar, A Reza Salehi, SA Aleyasin, Somayeh Raouf zadeh (2011) Study of polymorphism in myostatin gene in Chaal, Zel and Zandi Iranian sheep Breeds 13:40-33 (in farsi)
Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Flicek P (2018) Ensembl. Nucleic acids research 46:D754-D761.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-21]