بررسی چند شکلی ژنGPR54درگوسفند سنجابی به روشPCR-SSCP

ماریه قاسمی[۱]، علی هاشمی[۲*] و مهدی مخبر[۲]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه ارومیه
۲. عضو هیأت علمی گروه علوم دامی، دانشگاه ارومیه
* ایمیل نویسنده مسئول: Mariyaghasemi0310@gmail.com

چکیده

ژن GPR54 به‌عنوان یکی از ژن‌های مؤثر بر باروری شناخته شده است که در افزایش نرخ تخمک‌گذاری و چندقلوزایی مؤثر است.هدف از این پژوهش شناساییچندشکلی‌های موجود در ژن GPR54 درگوسفند با کمک روش چندشکلی تک رشته‌ای فضایی(SSCP) و بررسی ارتباط چندشکلی‌های موجود در ژن موردنظر با صفت چندقلوزایی بود. در این مطالعه از ۱۰۰ رأس گوسفند سنجابی از ایستگاه تحقیقاتی مهرگان واقع در استان کرمانشاه نمونه های خون جمع آوری شدکه به آزمایشگاه منتقل شد. DNAبا استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) استخراج گردید و واکنش زنجیره پلیمراز جهت تکثیر ژن GPR54 انجام گرفت. از چندشکلی فضایی تک رشته DNA (SSCP) برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، انجام گرفت. الکتروفورز عمودی نمونه‌ها روی ژل آکریل‌آمید ۸٪ به مدت ۴ ساعت و با ولتاژ ۲۰۰ صورت گرفت. رنگ آمیزی به روش نقره نیترات انجام شد که در نتیجه آن سه الگوی ژنوتیپی با فراوانی۳۶ و۲۴ و ۴۰ درصد مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن GPR54، دو قلوزایی، گوسفند سنجابی،PCR ، SSCP

مقدمه

بالابودن نرخ تخمک گذاری و بره‌زایی از مهم‌ترین عوامل موثر بر افزایش کارایی تولیدمثل و به دنبال آن افزایش کارایی اقتصادی در صنعت پرورش گوسفند به‌حساب می‌آیند. یکی از اعضای خانواده ردوپسین از گیرنده‌های متصل شونده به پروتئینG و گیرنده آندوژنوس کیسپپتین گیرنده ۵۴ متصل به پروتئین G (GPR54) می‌باشد (Chu et. al.,2012). ژن GPR54 در بافت‌های محیطی مختلفی ازجمله جفت، پانکراس، کلیه‌ها، بیضه‌ها وبه‌طور عمده در هیپوتالاموس بیان می‌شود. تعدادبره متولدشده در هرنوبت زایش تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند نرخ تخمک‌گذاری،نرخ لقاح و زنده ماندنی جنین قرار دارد (Shoenion& Burfening;1990). همچنین ازآن‌جایی که صفات تولیدمثلی نیز تحت تاثیرعوامل غیرژنتیکی می‌باشند،بنابراین با شناسایی این عوامل و کنترل آن‌ها می‌توان،توان تولید و تولیدمثل حیوان را افزایش داد (Savar-Sefli et al.,2010). سه دسته ژن به طور مؤثر بر رشد فولیکول‌ها و نرخ تخمک‌گذاری شناسایی شده است که عبارت‌اند از ALK6 یا BMPR1B ، GDF9 و دسته BMP که معروف‌ترین آنها BMP15 می‌باشد. تمامی این ژن‌ها جزو خانواده بزرگ TGFβبوده که بر تنظیم بیان و ترشح هورمون‌های مؤثر بر رشد فولیکولی و نرخ تخمک‌گذاری مؤثرند. از دیگر ژن‌های موثر بر فعالیت رشد فولیکول و تخمک‌گذاری ژن‌هایKissوGPR54 هستند که در بسیاری از گونه‌های جانداران یافت شده است. سیستم Kisspeptin-GPR54 عمدتا در سطح مغز برای کنترل عملکرد تولید مثل عمل میکند (Mekkawyetal., 2010) . گیرنده پروتئینی G (GPR54) ، که همچنین به نام AXOR12یاKiSS1R نامیده می‌شود،در ابتدا از مغز موش درسال ۱۹۹۹ جدا شد (Lee et al.,1999).Mingxing و همکاران(۲۰۱۲) پلی‌مورفیسم ژن‌های GPR54 و Kiss1 و ارتباط آن‌ها با تعداد بره در هر زایش را مورد بررسی قرار دادند نواحی اگزون ۱ از ژن kiss1 و اگزون ۱، اگزون۲و اگزون ۵ از ژن GPR54 به روش PCR-SSCP مورد مطالعه قرار گرفتند. انواع پلی‌مورفیسم در این نواحی تشخیص داده شد و نتیجه گرفتند که ژن Kiss1 و GPR54 ممکن است در ارتباط با چندقلوزایی در گوسفند باشد.انواری مجد (۱۳۹۵) پلی‌مورفیسم ژن GPR54 وارتباط آن با صفت دوقلوزایی درگوسفند نژاد مهربان را

مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردندکهچندشکلیمربوطبهمنطقهتنظیمی،اگزون 4 واگزون 5 ژن GPR54 ارتباط معنی-داریباصفتتولیدمثلیتعدادبرهدرهرزایش (LS) داشتندوهمچنینچندشکلی‌هایمشاهده شدهدر اگزون۴ژنGPR54 رابطه‌یمعنی-داریباصفاتتولیدمثلیوزنتولدبرهدرهرزایش (BW)، مجموعوزنبره‌هایمتولد شدهدرهمهزایش‌ها (SBWPs) ومیانگینمجموعوزنبره‌هایمتولد شدهدرهمهزایش‌ها (ABWPs) موردمطالعه داشتند. تحقیقاتی که تاکنون بر روی گوسفند انجام شده چندشکلی ژن GPR54 و اثر آن بر روی دو قلوزایی را نشان می‌دهد. باتوجه به اهمیت GPR54 به‌عنوان تنظیم کننده شروع بلوغ این احتمال وجود دارد که چندشکلی GPR54 با ویژگی های فنوتیپی چندقلوزایی(باروری) بالا و فحلی در طول سال در ارتباط باشد(Kaiser et.al.,2005). هدف از مطالعه‌ی حاصل بررسی وجود چندشکلیتک نوکلئوتیدی موجود در ژن GPR54 در گوسفند نژاد سنجابی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از ۱۰۰ راس گوسفند نژاد سنجابی از ایستگاه تحقیقاتی مهرگان واقع در استان کرمانشاه خون‌گیری شد و DNA آن‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) استخراج شد. با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی، یک قطعه ۳۲۱ جفت‌بازی ژن GPR54 به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز تکثیر شد که توالی پرایمرها به صورت زیر بود:

آغازگر رفت: 5′-GGGTCTTCAACAGGGCTCT-3′

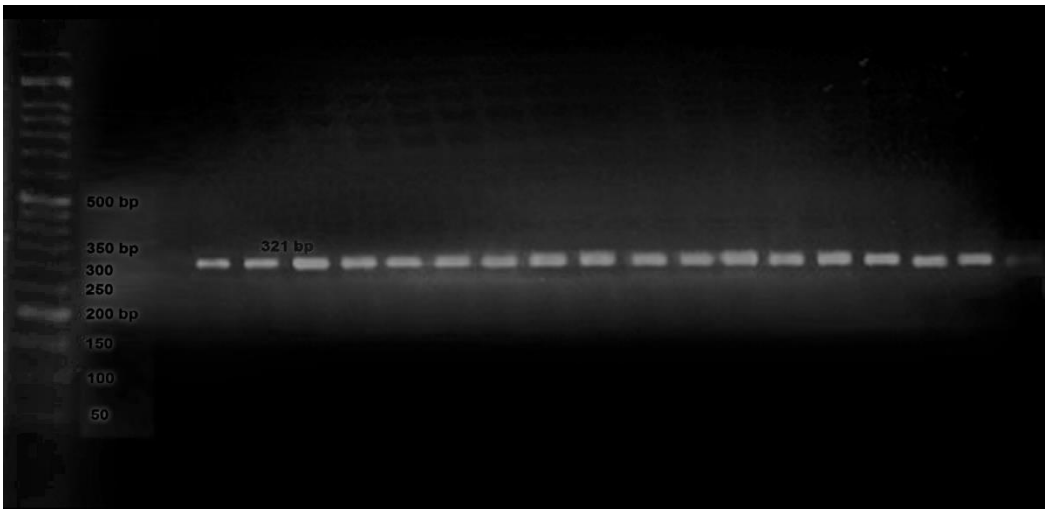
آغازگربرگشت: 5′-GTAGATGCGCCTCACTCCC-3′

قطعهPCR مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشت‌سازی ºC ۹۵به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی ºC ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها C ۶۲ ° به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر C ۷۲ ° به مدت ۳۰ ثانیه) و یک دمای تکثیر نهایی C ° ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه جهت گسترش زنجیره انجام گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه الکتروفورز افقی مشاهده و به کمک دستگاه ژل داک عکسبرداری از آنها انجام گرفت. سپس ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۴ میکرولیتر بافر SSCP و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس بر روی یخ منتقل گردید. محصولات PCR بر روی ژل آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز شده و در نهایت از رنگ‌آمیزی نیترات نقره برای رویت باندهای مورد نظر و تعیین آلل‌ها استفاده شد.

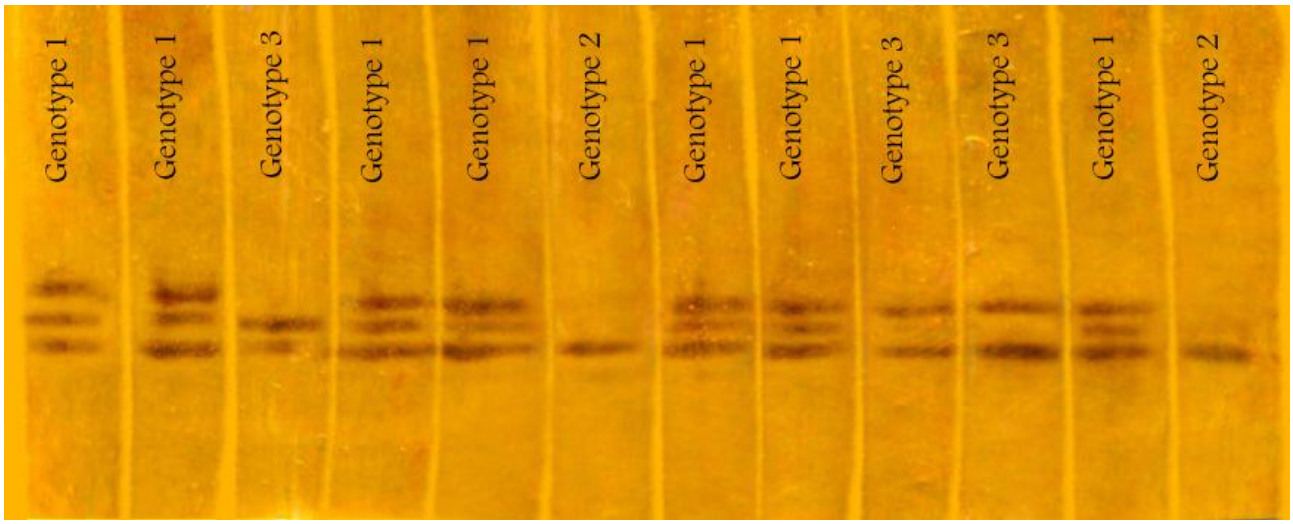
نتایج و بحث

جهت تایید تکثیر قطعه ۳۲۱ جفت بازی از ژن مورد مطالعه از ژل آگارز ۱ درصد همراه با استاندارد وزن مولکولی(Ladder 1000 bp)استفاده شد، که نتایج نشان دهنده تکثیر قطعه موردنظر بود(شکل۱). چندشکلی فضایی تک رشته‌ای (SSCP) جایگاه ژنی GPR54 گوسفند، با موفقیت انجام شد و برای آن سه الگوی باندی مشاهده شد(شکل ۲). نتایج نشان داد که روش SSCP برای تعیین ژنوتیپ‌های جایگاه مورد مطالعه ژن GPR54در گوسفند مناسب است. نتایج حاصل از بررسی الگوی تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) روی ژل آکریل‌آمید ۸ درصد، نشان داد که ژن GPR54در تمامی گوسفندان بررسی شده پلی‌مورفیک بوده و چند شکلی در این ژن در گوسفند سنجابی مشاهده شد.مطالعات مختلفی در ارتباط با چند شکلی این ژن در گوسفند و بز انجام شده است و در برخی از این پژوهش‌ها چند شکل بودن این ژن در حیوانات مشخصگردیده است. نتایج این تحقیق با نتایج انوری مجد وهمکاران که در سال ۱۳۹۵بر روی گوسفند مهربان انجام شده است و این جایگاه را پلی‌مورفیک معرفی نمود مطابقت دارد.

با توجه به اینکه این جایگاه ژنیGPR54 در گوسفند نژاد سنجابی پلی‌مورف بوده لذا از این جایگاه می‌توان به عنوان یک مارکر خوب در اصلاح نژاد دام برای صفات تولید مثلی استفاده کرد.



شکل۱- محصولات PCR تکثیرشده بر روی ژل۱٪



شکل۲- محصولات حاصل از SSCP

منابع

خالداری،م.۱۳۸۴ . اصول پرورش گوسفند و بز.جهاددانشگاهی واحد تهران.

Chu, M.X., Xiao, C., Feng, T., Fu, Y., Cao, G., Fang, L., Di, R., Tang, Q., Huang, D.W., Ma, Y., Li, K., Li, N.(2012) “Polymorphisms of KiSS-1 and GPR54 genes and their relationships with litter size in sheep. MolBiol Rep. sci. 39: 3291–3297.

Kaiser, U.B., Kuohung, W.(2005) “KiSS-1 and GPR54 as new players in gonadotropin regulation and puberty. Endocrine. 26: 277–284.

Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., O'Dowd, B.F., 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. FEBS Lett. 446,103–107.

Mekkawy, W., Roehe, R., Lewis, R.M., Davies, M. H., Bu¨ nger, L., Simm, G. and Haresign, W. 2010. Comparison of repeatability and multiple trait threshold models for litter size in sheep using observed and simulated data in Bayesian analyses. J. Anim. Breed. Genet. 127: 261–27.

Shoenion, S.G. and Burfening, P.J. 1990. Ovulation rate, lambing rate, litter size and embryo survival of Rambouillet sheep selected for high and low reproductive rate. J. Anim. Sci. 68: 2263-2270.

Savar-Sefli, S., Nejati-Javaromi, A., Abbasi, M.A., Vaez-Torshizi, R. and Chamani, M. 2010. Genetic parameters estimate of reproduction traits in Moghani sheep. The 4th congress Animal science In Tehran, 3366-3639. (In Persian)

Polymorphism of Sheep GPR54 Gene by Using PCR-SSCP

Mariya ghasemi[1], Ali Hashemi[2*], Mehdi mokhber[2]
1. Department of Animal science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Department of Animal science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
* Corresponding Author's Email: Mariyaghasemi0310@gmail.com

Abstract

G protein-coupled receptor 54 (GPR54) is one of the major genes significantly affect ewe ovulation rate. Blood samples were collected of 100 sanjabi sheep from Mehregan Research Station of Kermanshah. Genomic DNA was extracted from blood sample using kit method and polymerase chain reactions were performed for amplification of a part of GPR54 gene. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) was used for genotyping. For this purpose, vertical electrophoresis of PCR products was performed on 8% acrylamide gel, at 200 V, for 4 h. Silver-staining of gels, resulted three genotypic patterns with frequencies of 36%, 26% and 74%.

Keywords: Polymorphism, GPR54 Gene, Litter size, Sanjabi sheep, PCR-SSCP