ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۱۷۸- ۱۷۵

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:52 +0430 on Monday April 19th 2021

# بررسی چند شکلی اگزون ۹ و۱۱ ژن گیرنده لپتین در مرغ بومی مازندران با روش PCR-RFLP

شهاب الدین قره ویسی*[۱]، مهرداد ایرانی[۲]، روح الله عبدالله پور[۳]، حسین‌علی عباسی[٤]

۱، ۲، ۳ و ۴- دکتری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائم شهر، گروه علوم دامی، قائم شهر، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:S.gharavysi@googlemail.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

## چکیده

**لپتین هورمون پلی پپتیدی است که به عنوان ماده مترشحه اصلی بافت چربی شناخته می‌شود. این هورمون در تنظیم مصرف غذا، متابولیسم انرژی و تولیدمثل نقش دارد. هدف این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ژن گیرنده لپتین در جمعیت مرغ بومی مازندران به کمک روش PCR-RFLP است. در این پژوهش نمونه‌های خون از ۱۰۰ مرغ بومی واقع در ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی ساری اخذ شد. استخراج DNA به کمک روش نمکی بهینه یافته (Salting out) انجام و با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. جهت تکثیر قطعه ۳۷۴ جفت بازی از اگزون شماره ۹ و۱۱ گیرنده ژن لپتین مورد استفاده قرار گرفت. قطعه تکثیر شده به وسیله آنزیم برشی *Hae*III جهت تشخیص ژنوتیپ‌های ژن گیرنده لپتین مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. با مشاهده نتایج الگوی باندی از هضم با *Hae*III مشخص شد که جهش مسئول ژن گیرنده لپتین در مرغ بومی مازندران وجود ندارد و به صورت مونومورف می‌باشد.**

**واژه‌های کلیدی**

**چند شکلی،**
**ژن گیرنده لپتین،**
**مرغ بومی مازندران،**
***Hae*III،**
**PCR-RFLP.**

## مقدمه

در پرواربندی دام و طیور افزایش وزن بدن حیوان که ناشی از تولید گوشت و چربی است، اهمیت دارد. به همین دلیل در مطالعات علمی جنبه ژنتیکی مربوط به تولید گوشت و چربی بررسی می‌شود. در حیوانات مزرعه‌ای پیش بینی و کنترل چاقی از نظر اقتصادی اهمیت دارد. رشد بیش از حد بافت چربی بر متابولیسم کل بدن، قابلیت تولید، تولید مثل و کیفیت گوشت اثرمنفی می‌گذارد (Tartaglia et al. 1995). در طیور رشد بالا همراه افزایش چربی است. افزایش چربی سبب اختلال در فعالیت‌های تولیدمثلی، کاهش راندمان رشد عضلانی و افزایش مرگ و میر می‌شود. هورمون‌های متعددی نظیر هورمون رشد، انسولین و فاکتورهای رشد بر اعمال تولیدمثلی تأثیر دارند. لپتین کاندیدای خوبی در رابطه بین متابولیسم و تولیدمثل است (Taouis et al. 1998). لپتین (هورمون پلی‌پپتیدی که به عنوان ماده مترشحه اصلی بافت چربی شناخته شده است) در تنظیم مصرف غذا، متابولیسم انرژی و تولیدمثل نقش دارد.

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:52 +0430 on Monday April 19th 2021

لپتین مترشحه از سلول‌های چربی از طریق گردش خون به مغز رفته و در آنجا روی گیرنده‌های هیپوتالاموس اثر نموده و سبب کاهش اشتها می‌شود. چندشکلی ژن لپتین با صفات اقتصادی مرتبط است. Vernon and Houseknecht (2000) گزارش دادند که در طیور، لپتین اثرات منفی گرسنگی روی اعمال تخمدان را کاهش می‌دهد. تزریق لپتین در طول گرسنگی، توقف تخم گذاری را به تأخیر می‌اندازد، پسروی سلسله مراتب فولیکول‌های زرده را کاهش داده و تولید استروئید را در تخمدان افزایش می‌دهد. لپتین و گیرنده آن ساختمانی شبیه به سیتوکینین دارند که توسط ۱۳۰ جفت‌باز کنترل می‌شود و عضوی از خانواده اینترلوکین ۶ می‌باشد. Taouis et al. (1998) ژن لپتین را در طیور همسانه‌سازی و گزارش کردند که بیان شدن لپتین در کبد طیور احتمال دارد با نقش کلیدی این اندام در گونه‌های پرندگان در کنترل لیپوژنز در ارتباط باشد.Dunn et al. (2001) ژن گیرنده لپتین در روی کروموزوم ۸ را نقشه یابی کرده و چند شکلی این ژن را با استفاده از روش SSCP گزارش کردند. همچنین فرم کوتاه mRNA گیرنده ژن لپتین طیور را همسانه‌سازی مولکولی کرده و توزیع بافتی آن را بررسی نمودند و گزارش دادند که گیرنده ژن لپتین طیور به‌طور متناوب در تولید حداقل یک ایزوفرم کوتاه، به همان صورتی‌که در پستانداران وجود دارد به هم می‌پیوندند. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات پژوهش‌گران مشاهده می‌شود که لپتین یک هورمون مهم است که با بررسی تنوع ژنتیکی آن در جوامع مختلف، می‌توان ارتباط آن را با صفات اقتصادی نظیر صفات رشد پیدا کرد. تنوع ژنتیکی در یک جمعیت نشان دهنده خصوصیات و توانائی‌های آن جمعیت است، بنابراین دامپروران از تنوع ژنتیکی برای دستیابی به حیوانات اهلی، منطبق بر اهدافشان بهره می‌گیرند. روش‌های اصلاحی کلاسیک در حیوانات مبتنی بر جمع‌آوری اطلاعات و روش‌های پیچیده تجزیه و تحلیل آماری گسترش یافته‌اند که با فرآیندی پیچیده و مشکل همراه است. پیشرفت‌های زیادی در ژنتیک مولکولی و فناوری زیستی انجام شده که در نتیجه آن ابزارهای قدرتمند و جدیدی برای اصلاح ژنتیکی حیوانات فراهم شده است. یکی از مفیدترین این ابزارها، نشانگرهای DNA است. نشانگرهای مذکور قابل توارث بوده و تفاوت‌های ژنتیکی (توالی اسیدهای نوکلئیک روی رشته DNA) بین افراد در داخل و بین جمعیت را نشان می‌دهد (Dridi et al. 2005). نژادهای بومی در هر کشور به عنوان سرمایه ملی و استراتژیک مطرح بوده که حفظ و تکثیر این نژاد ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. برای حفاظت از نژاد مرغان ابتدا باید اقدام به شناسایی آن ها از کلیه جوانب از جمله بعد ژنتیکی کرد. پس از کسب اطلاعات مناسب از جامعه هدف می‌توان اقدامات علمی و استراتژی‌های مناسب را طراحی و اجرا کرد. هدف از این تحقیق، شناسایی ژنوتیپ های مربوط به ژن گیرنده لپتین و محاسبه فراوانی آلل های آن در جمعیت مرغ بومی مازندران به کمک روش مولکولی PCR-RFLP بود.

## مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این تحقیق به‌صورت تصادفی ۱۰۰ قطعه مرغ از گله مرغان بومی ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران واقع در شهرستان ساری انتخاب شد. نمونه گیری از چهار سالن موجود در ایستگاه که در هر سالن مرغان یک هچ نگهداری می‌شدند به انجام رسید. خون‌گیری از محل ورید زیر بال و توسط سرنگ ۲ میلی‌لیتری حاوی محلول ضد انعقاد (EDTA 0.5M; PH=8) انجام شد. نمونه‌ها در فلاسک یخ نگهداری و پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط دمایی۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA در یخچال نگهداری شدند.

استخراج DNA

DNA ژنومی از ۰/۵ میلی‌لیتر خون با استفاده از روش بهینه یافته نمکی توسط بافرهای جداکننده ( $Mgcl_2$ 5 mM, 0.32 M و Sucrose 0.32 و Hcl 15 mM PH=7.5 و Triton 100 x 1%) و لیزکننده (Tris-Hcl 15 mM و SDS 10% Nacl 400 Mm) تخلیص و سپس توسط اتانول مطلق رسوب داده شد. بعد از شستشو در اتانول ۷۰ درصد در TE (Tris Hcl 10 mM و EDTA 1 mM) حل و بعد از انجام آزمایش‌های کمی و کیفی برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای این تحقیق یک جفت ۲۴ و ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که قطعه ۳۷۴ جفت بازی از ژن گیرنده لپتین را در مرغ بومی تکثیر می‌نمایند. آغازگر براساس توالی DNA در اگزون ۱۱-۹ ژن گیرنده لپتین با استفاده

Downloaded from mg.genetics.ir at 11:52 +0430 on Monday April 19th 2021

از نرم افزار (۲۰۰۰) Primer Premier 3 طراحی شد. سپس با استفاده نرم افزارBLAST 2 Sequences مربوط به NCBI، توالی حاصل با توالی ثبت شده مورد مقایسه قرار گرفت. جفت آغازگر فوق از شرکت سیناژن و به صورت لیوفیلیزه(غیر حساس به دما) خریداری شدند. طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دوبار تقطیر رقیق و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

توالی آغازگر رفت:۳´-GTGTGATAGCTTTGAATGTTGGTG-۵´

توالی آغازگر برگشت:۳´-CTCTTCTGTTGCCAGCTGTGAT-۵´

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

در تکثیر DNA مجموعه فعالیت‌های زیر به ترتیب انجام شد: واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۲/۲ میکرولیتر بافر PCR 1 X، ۰/۶ میکرولیتر دی کلرید کلسیم ۲/۵ میلی‌مولار، ۰/۷ میکرولیتر آغازگر، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs ۲۰۰ میلی‌مولار، ۰/۱۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase 1 unit و ۱/۵ میکرولیتر الگوی DNA ۲۰۰ نانو گرمی انجام شد. شرایط دمایی در نظر گرفته شده برای PCR به شرح زیر بود: در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه واسرشته سازی اولیه، در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه اتصال، در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه بسط اولیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه بسط نهایی انجام شد.

هضم آنزیمی(RFLP)

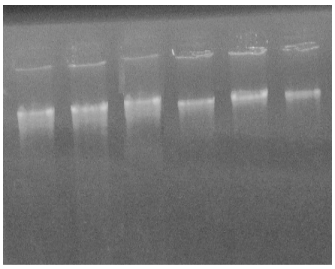
بر اساس دستورالعمل هضم آنزیمی محصولات PCR برای هضم ۸ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی، ۱/۵ میکرولیتر بافر آنزیم و ۵ میکرولیتر آب مقطر در نظر گرفته شد. در بررسی چندشکلی قطعه مورد مطالعه، از آنزیم برشی *Hae*III یا *BsuR*I استفاده شد. این آنزیم توالی ۳´-GGCC-۵´ را در طول قطعه شناسایی کرده و آن را به دو قطعه‌ی دارای ۳´-CC و GG-۵´ می‌شکند.

الکتروفورز

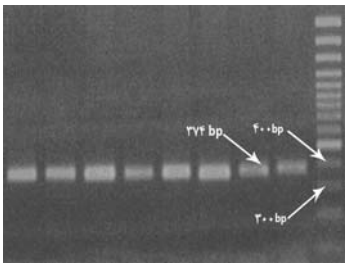
برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک درصد و ولتاژ ۸۰-۱۰۰ ولت به مدت یک ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام شد. قطعه تکثیر شده زیر نور لامپ UV با طول موج ۲۳۰ نانومتر مشاهده و عکس برداری گردید.

## نتایج و بحث

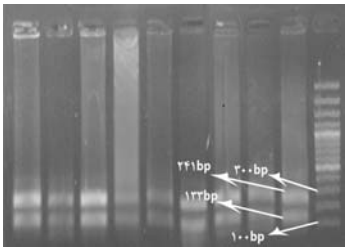
استفاده از روش نمکی بهینه یافته برای استخراج DNA از نمونه خون برتری خوبی را از لحاظ کمیت و کیفیت و صرف زمان لازم در استحصال DNA نشان داد (شکل۱).



شکل ۱- غلظت DNA استخراج شده بر روی آگارز




شکل ۲- محصولات حاصل از PCR نمونه های مختلف




شکل ۳- نمونه های هضم شده که بر روی ژل آگارز تفکیک شده اند

تکثیر قطعه ۳۷۴ جفت بازی از اگزون ۹ و ۱۱ گیرنده ژن لپتین به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت. خط کش مولکولیSM0331 با نشانگر ۱۰۰ جفت بازی در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تأیید کرد (شکل۲). در شکل ۳ تفکیک قطعات ۲۴۱ و ۱۳۳ جفت بازی را پس از هضم آنزیمی قطعه ۳۷۴ جفت بازی به وسیله آنزیم *Hae*III به خوبی می‌توان مشاهده کرد. محصولات آنزیمی تمامی نمونه‌ها در آغازگر طراحی شده گیرنده ژن لپتین یک نوع ژنوتیپ BB را نشان داده که حاکی از مونومورف بودن یک شکلی گیرنده ژن لپتین در این جایگاه می-باشد. آنزیم مورد استفاده یک آنزیم ۴ باز بر است و انتظار می‌رود

که با احتمال $۴^{۴}$ در قطعه DNA برش ایجاد کند. بر اساس نتایج حاصل، در این قطعه ۳۷۴ جفت بازی فقط یک محل برش با آنزیم *Hae*III در آلل *BB* دیده می شود. قابل ذکر است که این قطعه ۳۷۴ جفت بازی از اگزون ۱۰ کامل و قسمتی از اگزون ۹ و۱۱ را به همراه اینترون‌های ۹ و۱۰ شامل می شود. در پژوهش Mokhtar Zadeh (2008) چندشکلی ژن گیرنده لپتین در جمعیت مرغان بومی خوزستان مطالعه شد. با استفاده از آنزیم *Hae*III سه ژنوتیپ AA، AB و BB گزارش شد. Zhang et al. (1994) گیرنده لپتین را به وسیله روش کلونینگ مورد مطالعه قرار دادند و گزارش دادند که شش گیرنده لپتین به شکل ایزوفرم های مختلف وجود دارد که یکی از آن ها به شکل ایزوفرم بلند است. در تحقیق Dridi et al. (2005) ژن لپتین کلونینگ شد و مشخص شد که این ژن شامل سه اگزون است که در مناطق جدا توسط دو اینترون بیان می شود. در پژوهشی دیگر که توسط Taouis et al. (1998) mRNA ژن لپتین طیور مطالعه شد، حدود ۱۸ اگزون کدکننده ژن گیرنده لپتین توالی‌یابی شد. همچنین با همسانه‌سازی ژن لپتین در طیور گزارش دادند که احتمال بیان شدن لپتین در کبد طیور وجود دارد. نتایج تحقیقات مذکور با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد. دلایل عمده آن می‌تواند جامعه و نژاد مورد مطالعه و حجم نمونه باشد. همانطور که ذکر شد، در این تحقیق یک نوع ژنوتیپ BB مشاهده شد که حاکی از مونومورف بودن ژن گیرنده لپتین در نمونه بررسی شده مرغ بومی مازندران برای این آغازگر اختصاصی می‌باشد. از آنجا که در هیچ یک از مطالعات فوق آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق به کار نرفته است، بنابراین عدم مطابقت نتایج این تحقیق با سایر تحقیقات توجیه پذیر است.

## منابع


Dridi S, Buyse J, Decuypere E, Taouis, M (2005) Potential role of leptin in increase of fatty acid synthase gene expression in chicken liver. Domestic Animal Endocrinology 29: 646-660.

Dunn IC, Girishvarma G, Talbot RT, Waddington D, Boswell T, Sharp PJ (2001) Evidence for low homology between the chicken and mammalian leptin genes. In: Dawson A, Chaturvedi CM, (Eds.), Avian Endocrinology. Narosa Publishing House, New Delhi, 327–336.

Mokhtarzadeh S (2008) Evaluation of Leptin receptor polymorphism using PCR-RFLP at the native chicken population of Khuzestan. In: Proceeding of 3th National Congress of Animal Sciences, Mashhad. Ferdowsi University. (In Farsi).

Taouis M, Chen JW, Daviaud C, Dupont J, Derouet M, Simon J (1998) Cloning the chicken leptin gene. Gene 208: 239–242.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campweld LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell 83: 1263–1271.

Vernon RG, Houseknecht KL (2000) Adipose tissue: beyond an energy reserve. In: Cronje PB, editor. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth, and reproduction. CABI Publishing, 171–186.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425–432.




Downloaded from mg.genetics.ir at 11:52 +0430 on Monday April 19th 2021