

## بررسی ارتباط چند شکلی ناحیه اگزون چهارم و ناحیه غیر کد شونده ' ۳' ژن فاکتور نکروز تومور آلفا با صفات رشد در گوسفندان ماکویی

### Analysis of association of polymorphism in the exon 4 and 3' UTR of *TNF $\alpha$* gene with growth traits in Makoei sheep

پریسا بیابانی<sup>۱\*</sup>، علی هاشمی<sup>۱</sup>، کریم مردانی<sup>۱</sup>، محمد قادرزاده<sup>۱</sup>، حافظعلی دلجویی‌لو<sup>۲</sup>، فاطمه پوربایرامیان<sup>۱</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناس ارشد، استادیار، دانشیار و کارشناسان ارشد، دانشگاه ارومیه

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه زنجان

Biabani P<sup>\*1</sup>, Hashemi A<sup>1</sup>, Mardani K<sup>1</sup>, Ghaderzadeh M<sup>1</sup>, Deljoisalo HA<sup>2</sup>, Purbayramian F<sup>1</sup>

1. MSc Student, Assistant Professor, Associate Professor and MSc Students, Urmia University

2. Graduated MSc Student, Zanjan University

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

(تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

#### چکیده

به منظور بررسی چند شکلی ناحیه اگزون چهارم و ناحیه غیر کد شونده ' ۳' (3'UTR) ژن فاکتور نکروز تومور آلفا از ۹۰ رأس گوسفند ماکویی به صورت تصادفی خوگیری به عمل آمد. DNA از نمونه های خون استخراج و واکنش زنجیره ای پلی مراز جهت تکنی قطعه ۲۷۳ جفت بازی ناحیه اگزون چهارم و ۳' UTR ' ۳' ژن فاکتور نکروز تومور آلفا انجام گرفت. روش تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد برای تعیین ژنوتیپ استفاده شد. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ڈل آکریل آمید انجام شد که بیانگر چندشکلی این جایگاه بود. در مجموع در گوسفندان مورد مطالعه سه ژنوتیپ EE، OE و RE به ترتیب با فراوانی های ۰/۴۶۶۷، ۰/۳۵۵۶ و ۰/۱۷۷۷ بدست آمدند. فراوانی های ژنوتیپی در جایگاه مورد مطالعه اخراج از تعادل هاردی- واینبرگ را نشان دادند. اثر ژنوتیپ های مشاهده شده روی صفات رشد نشان داد که ژنوتیپ های TNF $\alpha$ ، ارتباط معنی داری با وزن تولد و میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیر گیری دارند. مقایسه میانگین ها نشان داد که افراد دارای ژنوتیپ EE، وزن تولد و میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیر گیری بالاتری (به ترتیب ۴/۳۲ کیلو گرم و ۰/۲۲۴ کیلو گرم در روز) نسبت به ژنوتیپ های دیگر دارند. بین ژنوتیپ های TNF $\alpha$  با سایر صفات، ارتباط معنی داری یافت نشد.

#### واژه های کلیدی

ژن TNF $\alpha$   
صفات رشد  
گوسفند ماکویی  
DNA  
PCR-SSCP

## مقدمه

ناحیه کلاس III در مکان ژنی مجموعه اصلی سازگاری بافتی<sup>(۱)</sup> (MHC) روی کروموزوم ۲۰ قرار گرفته است (Dukkipati et al. 2006). چندین مطالعه، ارتباط بین MHC و مقاومت یا حساسیت به بیماری در گوسفند را نشان داده‌اند (Dukkipati et al. 2006 a). علاوه بر نقش اصلی MHC در سیستم ایمنی میزان، ارتباط ژنتیپ‌های MHC با صفات تولیدی، تولیدمثلی و رشد نیز در گوسفند، بز و گاو شناسایی شده است (Stear et al. 1989; Ye et al. 2003; Sheikh et al. 2006; Geldermann et al. 2006). ارتباط چندشکلی ژن *TNFα* با صفات وابسته به رشد و افزایش وزن در خوک، موس، میمون و انسان نشان داده شده است (Uysal et al. 1997; Pihlajamaki et al. 2003; Szydlowski et al. 2011; Gray et al. 2011). پژوهش‌ها نشان داده که بافت چربی یکی از منابع مهم تولید *TNFα* است و میزان بیان این سیتوکین با افزایش وزن در گوسفندان افزایش می‌یابد (Daniel et al. 2003). در نژادهای مختلف گوسفند اطلاعات کمی در مورد چندشکلی *TNFα* وجود دارد. در دهه ۱۹۹۰، ژن *TNFα* گوسفند توسط سه گروه مختلف تکثیر و توالی یابی شد. این توالی‌ها در دو مطالعه کاملاً مشابه بودند که در آنها ژن *TNFα* گوسفند، کدکننده یک توالی هدایت‌گر ۷۶ آمینواسیدی و یک پروتئین بالغ ۱۵۷ آمینواسیدی بود (Young et al. 1990; Green and Sargan 1991). توالی که در سومین مطالعه بدست آمد مشابه دو بررسی قبلی بود، به استثنای اینکه فاقد یک اسیدآمینه در توالی هدایت‌گر بود (*TNFα*). در یک مطالعه، چندشکلی ژن *TNFα* گوسفندان نژادهای *Latxa* و *Rasa* با استفاده از روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP<sup>۲</sup>) بررسی شد و سه جهش در ناحیه غیر کد شونده ۳' (UTR<sup>۳</sup>) این ژن گزارش شد. این جهش‌ها در یک حذف و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی<sup>(۴)</sup> (SNP) با هم اختلاف داشتند و هیچ تفاوتی در توالی آنها در دو نژاد پیدا نشد. این جهش‌ها با (حذف نوکلئوتید ۶۴)، (حذف نوکلئوتید ۰۲) (TNF\*01)

گوسفند ماکویی، دارای بدن کشیده و دست و پای بلند است. در این نژاد رنگ بدن سفید یکدست و در اطراف چشم‌ها، پوزه، انتهای قلم دست و پا و گوش‌ها لکه‌های اختصاصی سیاه وجود دارد. اعضای بدن آن عضلانی و دارای خصوصیات گوسفندان گوشتی می‌باشد. محل اصلی پرورش این نژاد، نواحی شمالی آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی می‌باشد. (Khaldari 2003). انتخاب به کمک نشانگر که ترکیبی از اطلاعات ژنتیک مولکولی و داده‌های فنوتیپی صفت موردنظر می‌باشد، می‌تواند باعث افزایش صحت انتخاب و پیشرفت ژنتیکی حیوانات شود (Israel and Wellr 2002). صفات رشد به عنوان بخش مهمی از صفات اقتصادی در پرورش گوسفند مطرح هستند و چنانچه روش‌های به نژادی مناسبی برای بهبود این صفات بکار گرفته شود، می‌توان عملکرد حیوانات و به خصوص نژادهای گوشتی را به طور قابل توجهی افزایش داد که این امر، یکی از اهداف اصلی برنامه‌های اصلاح نژادی در کشور می‌باشد (Yazdi et al. 1997). برای رسیدن به این هدف، شناسایی ژن‌های موثر در رشد حیوان و بررسی میزان اثرات آنها بر روی صفات اقتصادی، امری ضروری به نظر می‌رسد. ژن فاکتور نکروز تومور آلفا (*TNFα*)، اصلی‌ترین میانجی شیمیایی پاسخ‌های التهابی حاد در مواجهه با عفونت با باکتری‌های گرم‌منفی و سایر میکروب‌های عفونتزا و مسئول بروز پاسخ ایمنی در عفونت‌های حاد است. اصلی‌ترین منبع تولید *TNFα*، سلول‌های بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای هستند و مهم‌ترین محرك آزادسازی این سیتوکین از ماکروفازها، لیپوبلی ساکارید است (Farid-Hoseyni et al. 2001). این پروتئین اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط کارسول کشف شد (Carswell et al. 1975). ژن کدکننده پروتئین *TNFα* دارای ۴ اگزون و ۳ ایترون است (Darlay et al. 2011). مشخص شده که *TNFα* قادر است همانند فاکتور رشد عمل کند (Vilcek and Palombella 1992) و به عنوان تکثیر دهنده سلولی بکار رود (Sugarman et al. 1985). همچنین *TNFα* می‌تواند تعدادی از سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و گیرنده‌های آنها را تحریک کند (Adachi et al. 1992; Hattori 1992).

<sup>2</sup> Major histocompatibility complex<sup>3</sup> Polymerase chain reaction- single strand conformation Polymorphism<sup>4</sup> Single nucleotide polymorphism<sup>۱</sup> Tumor necrosis factor alpha

استخراج DNA

استخراج DNA از ۰/۲ میلی لیتر خون کامل با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی (Fermentas, EU) و مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز یک درصد تهیه شده با بافر (0.5X TBE) شامل ۴۵ میلی مولار تریس بازی، ۴۵ میلی مولار اسید بوریک و یک میلی مولار EDTA با pH برابر ۸ حاوی اتیدیوم بروماید، ارزیابی شد.

با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی پیشنهاد شده توسط Alvarez-Busto et al. (2004) قطعه ۲۷۳ جفت بازی شامل قسمتی از ناحیه اگزون ۴ و ناحیه ۳' UTR  $TNF\alpha$  با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد که توالی آغازگرها ۵'-  
۵'-ovTNF-C2 CTGCCGGAATACCTGGACTA-3'  
۵'- TCCAGTCCTGGTGATGGT-3'

صحت توالی آغازگرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار PCR Amplifx مورد تأیید قرار گرفت (Jullien 2008). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۴ میکرولیتر dNTP ۱/۲۵ میلی مولار، یک میکرولیتر  $MgCl_2$  ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۲۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پایی مراز و ۴ میکرولیتر از DNA ژنومی انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۹۴ دقیقه و سپس مرحله اصلی تکثیر به تعداد ۳۵ چرخه (واسرشته سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه) و یک دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) Master cycler جهت گسترش زنجیره DNA استفاده شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پایی مراز، محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز شدند. قطعه تکثیر شده با استفاده از دستگاه ترانس-لومیناتور مشاهده و عکسبرداری شد. برای تشخیص اندازه-

TNF\*03 و TNF\*02 در نوکلوتید (۲۴۸) توصیف شده- اند (Alvarez-Busto et al. 2004). محققان دیگری، چندشکلی  $TNFA$  را با روش کروماتوگرافی مایع با کارابی بالا تحت حرارت (dHPLC) در گوسفند نژاد *Charollais* بررسی کردند اما موفق به شناسایی چندشکلی در این جایگاه ژنی نشدند در صورتی که توالی cDNA منتشر شده در بانک ژن، چندشکلی  $A>G$  را در ناحیه 3' پیشنهاد کرد. در مرحله بعد، آنها این چندشکلی را با آنزیم محدود کننده *TspRI* شناسایی کردند (Darlay et al. 2011). مطالعات در خصوص مکانیابی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات کمی (QTL) در گاو نشان داده که چندشکلی‌های ژن  $TNFA$ ، ارتباط معنی‌داری با لوکوز گاوی (Konnai et al. 2006; Yudin et al. 2006; Bojariojc-Nosowicz et al. 2011) و رومپستان (Xu et al. 2010) و قوع اولین تخمک- گذاری پس از زایمان (Shirasuna et al. 2011) دارند. در گوسفند، ارتباط چندشکلی ژن  $TNFA$  با صفات رشد و بیماری بطور محدود بررسی شده است. طبق مطالعات انجام شده، تکنیک PCR-SSCP برای شناسایی چندشکلی ژن  $TNFA$  در گوسفند مناسب ارزیابی شده است (Alvarez-Busto et al. 2004). تا بحال، هیچ گزارشی مبنی بر وجود چندشکلی در ژن  $TNFA$  در بین گوسفندان ایران ارائه نشده است. لذا اهداف این پژوهش شامل شناسایی چندشکلی اگزون ۴ و 3' UTR ژن  $TNFA$  و ارزیابی ارتباط چندشکلی‌های احتمالی با داده‌های فنتویی صفات رشد در جمعیت گوسفندان ماکویی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این پژوهش، از نمونه‌های خون ۹۰ رأس از گوسفندان نژاد ماکویی مرکز اصلاح نژاد و پرورش گوسفند ماکویی واقع در شهرستان ماکو که دارای شجره و رکورد بودند، استفاده شد. نمونه‌گیری به صورت تصادفی و از ورید و داجی توسط لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت. نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

---

<sup>1</sup> Denaturing high-performance liquid chromatography

میزان تنوع در جمعیت است، بر اساس منبع Lewontin and Hubby (1966)  $I = \sum_i p_i \ln(p_i)$

که حداقل مقدار  $I$  برابر  $\ln(n)$  می‌باشد. برای ارزیابی اثر ژنتیک‌های زن  $TNF\alpha$  بر صفات رشد از مدل آماری زیر استفاده شد:

$$Y_{ijklmn} = \mu + LS_i + YB_j + G_k + Sex_l + Age_m + e_{ijklmn}$$

( $Y_{ijklmn}$  مقدار صفت برای هر دام،  $\mu$  میانگین جامعه،  $LS_i$  اثر ثابت<sup>۱</sup> امین چگونگی تولد (تیپ تولد)،  $YB_j$  اثر ثابت<sup>۲</sup> امین سال تولد،  $G_k$  اثر تصادفی  $k$  امین ژنتیک (Sex<sub>l</sub>) اثر ثابت<sup>۳</sup> امین تولد،  $Age_m$  اثر  $m$  امین سن رکورددگیری (بر حسب روز) به جنس،  $e_{ijklmn}$  اثرات باقیمانده (خطای آزمایش).

عوامل تیپ تولد، سال تولد و جنس دام در تمامی صفات مورد بررسی اثر معنی‌داری نشان دادند و اثرات مادری، سن مادر، فصل تولد و ماه تولد در هیچ کدام از صفات اثر معنی‌داری نداشتند و در مدل وارد نشده‌اند. صفات مورد بررسی شامل رکوردهای وزن تولد (BW)، وزن از شیرگیری (WW)، وزن ۶ ماهگی (W6)، وزن ۹ ماهگی (W9)، وزن ۱۲ ماهگی (W12)، میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری (ADG3) و میانگین افزایش وزن روزانه از شیرگیری تا شش ماهگی (ADG6) بودند. علاوه بر رکوردهای مربوط به صفات رشد، اطلاعات مربوط به جنس و سن رکورددگیری (به عنوان عوامل ثابت) نیز در دسترس بودند که در مدل آماری وارد شدند. این اطلاعات در طی پنج سال یعنی سال‌های ۱۳۸۵ - ۱۳۸۹ جمع‌آوری شده بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها از با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام شد (SAS Institute Inc 2004). نرم‌افزاری داده‌های صفت وزن ۹ ماهگی که از توزیع نرمال برخوردار نبودند با روش Box-Cox انجام شد که در این روش با کمک نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه Transreg ابتدا یک مقدار به نام لامبدا ( $\lambda$ ) بدست آورده شد، سپس با کمک فرمول زیر داده‌ها نرمال شد:

$$X(n) = (x^\lambda)^{-1/\lambda}$$

که در آن  $X(n)$  داده نرمال شده و  $X$  داده غیر نرمال می‌باشد. صفات مورد بررسی، توسط رویه GLM نرم افزار SAS 9.1 مورد تجزیه قرار گرفتند. مقایسات میانگین با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

قطعات تکثیر شده از نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی (سیناژن- ایران) استفاده شد.

### روش SSCP

برای تجزیه محصولات PCR به روش SSCP، ابتدا محصولات PCR، تک رشته‌ای شدند. برای این منظور دو میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل فرمامید ۹۵ درصد، (pH=8) EDTA ۰/۰۲ مولار، بروموفنیلو ۰/۰۵ درصد و گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد) مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموماسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به روی یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن دویاره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید (Mousavizadeh et al. 2009). برای مشاهده ژنتیک‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی به ابعاد ۲۰×۱۸×۰/۱ سانتی‌متر و از ژل آکریلامید غیرواسرت‌ساز ۸ درصد استفاده شد (Shojaei et al. 2010). نمونه‌ها در ژل آکریلامید با ولتاژ ۲۰۰ ولت و به مدت ۸ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و با بافر (0.5 X TBE) جهت مشاهده تقاضوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند. برای مشاهده ژنتیک‌ها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Herring et al. 1982).

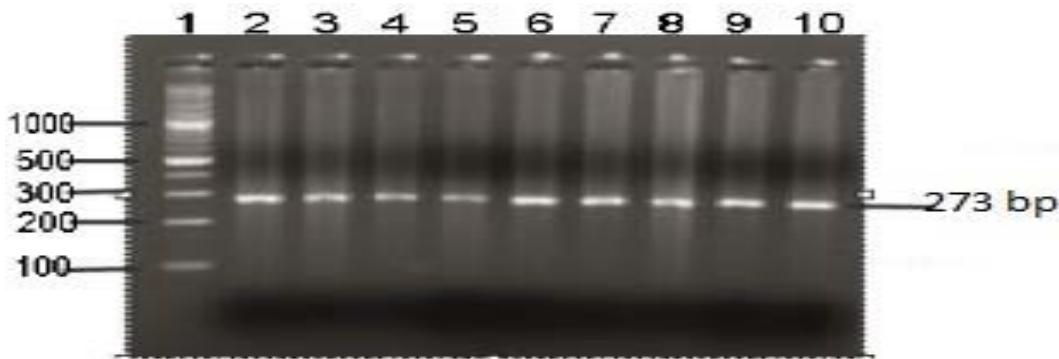
### تجزیه و تحلیل آماری

عموماً اندازه‌گیری تنوع درون جمعیتی توسط شاخص‌های مرسوم نظری هتروزیگوستی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوستی موردناظار (He)، هتروزیگوستی مورد انتظار نالریب یا شاخص نشی (Nei)، متوسط هتروزیگوستی (تنوع زنی) و شاخص شانون (I) مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنتیکی، شاخص هتروزیگوستی، اندازه مؤثر آللی و آزمون مریع-کای از نرم افزار PopGene32 نسخه ۱/۳۱ استفاده شد (Yeh et al. 1999) که در آن شاخص هتروزیگوستی بر اساس رابطه تنوع زنی نی (Nei 1973) به صورت احتمال متفاوت بودن دو آلل که به طور تصادفی از یک جمعیت گرفته می‌شود، محاسبه می‌شود:  $(H = I - \sum_i P_i^2)$  به طوری که  $P_i$  فراوانی آلل است. اندازه مؤثر آللی (تعداد آلل‌های مؤثر در تنوع درون جمعیت) بر اساس رابطه Kimura and Crow (1979) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) که بیانگر

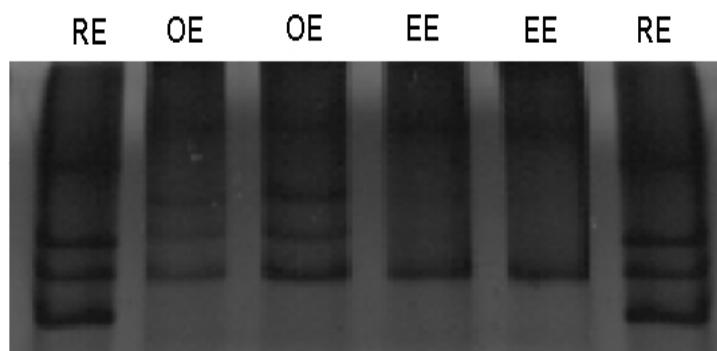
گوسفند با استفاده از روش‌های دیگر مانند روش PCR-RFLP در پژوهش Engwerda et al. (1996) و روش dHPLC در مطالعه Darlay et al. (2011) برای شناسایی چندشکلی در ژن *TNF $\alpha$*  ناموفق بوده است، ولی همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر و مطالعه Alvarez-Busto et al. (2004) نشان داد، روش PCR-SSCP می‌تواند برای شناسایی چندشکلی ژن *TNF $\alpha$*  در گوسفند مناسب باشد. آزمون مربع کای انجام شده بر روی نمونه‌های مطالعه شده در این پژوهش، عدم برقراری تعادل هاردی - واینبرگ را از لحاظ ژن *TNF $\alpha$*  نشان داد ( $P \leq 0.05$ ) که مخالف با نتایج Alvarez-Busto et al. (2004) بود. عدم تعادل مشاهده شده در گله گوسفند ماکویی می‌تواند به دلیل کوچک بودن اندازه نمونه مورد بررسی و وجود عوامل برهم زننده تعادل، نظیر جهش و انتخاب به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی در جمعیت مورد بررسی باشد. یکی از خصوصیات نشانگر مولکولی، تعداد آلل موثر است. در گوسفند ماکویی در جایگاه مورد مطالعه از ژن *TNF $\alpha$* ، تعداد آلل واقعی (Na) برابر سه و تعداد آلل موثر (Ne) برابر ۱/۷۳ محاسبه شد که نزدیکی مقادیر این دو عدد به همدیگر می‌تواند نشان دهنده کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی و تنوع ژنتیکی بالا باشد. هتروزیگوستی مورد انتظار در این پژوهش ۰/۴۲۵۱ براورد شد به طوری که مقدار هتروزیگوستی مورد انتظار گزارش شده توسط Alvarez-Busto et al. (2004) Rasa به ترتیب ۰/۴۸۰ و ۰/۵۱۹ بود. شاخص نی، هتروزیگوستی مشاهده شده و شاخص شانون به ترتیب برابر ۰/۴۲۲۷، ۰/۵۳۳۳ و ۰/۷۴۹۷ براورد شد که حاکی از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا این جمعیت از نظر ژن *TNF $\alpha$*  می‌باشد (جدول ۲). توجه به این نکته ضروری است که در صورت کاهش تنوع ژنتیکی، قدرت انتخاب‌های ژنتیکی کاهش می‌یابد (Barker 1994). چندشکلی این ژن در سایر حیوانات بررسی شده است. در چندین مطالعه، چندشکلی ژن *TNF $\alpha$*  در نژادهای مختلف گاو و در نواحی مختلفی از این ژن بررسی شده است که همگی دو آلل و سه ژنوتیپ مختلف برای این جایگاه ژنی بدست آوردند (Yudin et al. 2006; Xu et al. 2010; Bojarojce-Nosowicz et al. 2011; Shirasuna et al. 2011)

## نتایج و بحث

بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به متضور اطمینان از صحبت قطعه تکثیر شده (273 bp) از ژن *TNF $\alpha$* ، از ژل آکارز دو درصد استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، فقط یک باند 273 bp و بدون باند اضافی به دست آمد که حاکی از اختصاصی بودن آغازگرها است. تجزیه و تحلیل باندهای حاصل از الکتروفورز با ژل آکریلامید غیرواسرسته‌ساز ۸ درصد و رنگ-آمیزی با نیترات نقره با استفاده از روش SSCP منجر به شناسایی سه الگوی باندی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه شد (شکل ۲). ملاک تشخیص و نحوه نامگذاری و تعیین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نتایج مطالعه Alvarez-Busto et al. (2004) در اینجا شد. در این پژوهش، با استفاده از الکتروفورز محصولات PCR تکرشته‌ای شده براساس روش SSCP، ۳ ژنوتیپ و ۳ آلل شناسایی شدند. فراوانی ژنوتیپ‌های OE و RE به ترتیب ۰/۴۶۷، ۰/۳۵۵۶ و ۰/۱۷۷۸ و فراوانی آلل‌های E و R به ترتیب ۰/۷۳۳۳، ۰/۷۳۳۳ و ۰/۱۷۷۷ و ۰/۰۸۸۹ محاسبه شد (جدول ۱). نتایج بدست آمده نشان داد که آلل E و ژنوتیپ EE به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۷۳۳۳ و ۰/۴۶۷ دارای بیشترین فراوانی بودند. Alvarez-Busto et al. (2004) سه ژنهش در ناحیه اگرون ۴ و ۳' UTR ژن *TNF $\alpha$*  در گوسفندان نژادهای Rasa و Latxa گزارش کردند که منجر به شناسایی ۵ نوع ژنوتیپ OO، OR، RR، OO و سه آلل O، R و E برای این ناحیه شد. نتایجی که از مطالعه حاضر به دست آمد تقریباً مشابه نتایج گزارش شده توسط Alvarez-Busto et al. (2004) بود به طوری که در این مطالعه نیز ۳ آلل O و شناسایی شد ولی سه ژنوتیپ بدست آمد که دو ژنوتیپ RE و OE مشابه نتایج آنها ولی ژنوتیپ EE متفاوت از نتایج آنها بود. این تفاوت در نوع و تعداد ژنوتیپ‌ها ممکن است مربوط به تفاوت در پتانسیل ژنتیکی نوع نژادهای مورد مطالعه، کوچک بودن تعداد نمونه‌های گرفته شده از جمعیت ماکویی در مطالعه حاضر و همچنین به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی و مهاجرت باشد. البته از آنجا که هیچ گونه پژوهشی غیر از مطالعه Alvarez-Busto et al. (2004) در گوسفند به شکل فوق گزارش نشده، نمی‌توان مقایسات کافی در این مورد انجام داد و نظر قطعی صادر نمود. تلاش‌های دیگر در



شکل ۱- محصولات PCR با رگذاری شده بر روی ژل آکارز دو درصد. چاهک یک نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp (سیناژن، ایران)، چاهکهای ۲-۱۰ محصولات PCR (قطعه ۲۷۳ جفت بازی) ژن *TNFα* ۲۷۳



شکل ۲- الگوهای مختلف SSCP مشاهده شده ژن *TNFα* در گوسفندان ماکویی بر روی ژل آکریلامید ۸ درصد.

جدول ۱- فراوانی‌های آللی و ژنتیکی و آزمون مریع کای مشاهده شده برای ژن *TNFα* در گوسفندان ماکویی. خطای استاندارد فراوانی‌ها ۰/۰۲۸ می‌باشد.

فرافرانی آلل‌ها						$\chi^2$
EE	OE	RE	E	O	R	
۰/۴۶۶۷	۰/۳۵۵۶	۰/۱۷۷۷	۰/۷۳۳۳	۰/۱۷۷۸	۰/۰۸۸۹	۱۱/۶۱*

جدول ۲- پارامترهای تنوع ژنتیکی ژن *TNFα* در گوسفندان ماکویی

شاخص شانون	هموزیگوستی مشاهده شده	هتروزیگوستی مشاهده شده	هموزیگوستی موردنظر	هتروزیگوستی موردنظر	هموزیگوستی Nei
۰/۴۲۲۷	۰/۴۲۵۱	۰/۵۷۴۹	۰/۵۳۳۳	۰/۴۶۶۷	۰/۷۴۹۷

که ژنتیک‌های حاصل از ژن *TNFα* تاثیر معنی‌داری روی صفات وزن شیرگیری، وزن‌های ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی و میانگین افزایش وزن روزانه از شیرگیری تا ۶ ماهگی نداشت اما روی صفت وزن تولد و میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری، اثر معنی

از آنجا که *TNFα* یکی از سیتوکین‌هایی است که همانند فاکتور رشد عمل می‌کند (Vilcek and Palombella 1992)، ژن آن می‌تواند یکی از ژن‌های انتخابی جهت بررسی صفات مرتبط با رشد باشد. تجزیه و تحلیل داده‌های فنتیکی در مطالعه حاضر، نشان داد

جدول ۳- مقایسه میانگین ژنتیپ‌های مختلف ژن  $TNF\alpha$  برای صفات رشد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) در گوسفند ماکوبی

صفت (کیلوگرم)	ژنتیپ		
	(۴۲)EE	(۳۲)OE	(۱۶)RE
وزن تولد	۴/۳۲ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>	۴/۱۴ $\pm$ ۰/۲۲ <sup>ab</sup>	۴/۰۷ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>ab</sup>
وزن شیرگیری	۲۴/۳۹ $\pm$ ۱/۲۵ <sup>a</sup>	۲۱/۴۷ $\pm$ ۱/۳۶ <sup>a</sup>	۱۸/۹۵ $\pm$ ۰/۱ <sup>a</sup>
وزن ۶ ماهگی	۳۰/۷۵ $\pm$ ۲/۲۵ <sup>a</sup>	۳۰/۶۶ $\pm$ ۱/۰۹ <sup>a</sup>	۲۸/۸ $\pm$ ۰/۸۹ <sup>a</sup>
وزن ۹ ماهگی	۲۸/۶ $\pm$ ۱/۸ <sup>a</sup>	۳۹/۳۵ $\pm$ ۱/۱ <sup>a</sup>	۳۸/۳۳ $\pm$ ۱/۱۹ <sup>a</sup>
وزن ۱۲ ماهگی	۴۱/۹ $\pm$ ۲/۹ <sup>a</sup>	۲۴/۲ $\pm$ ۱/۱ <sup>a</sup>	۴۰/۸ $\pm$ ۲/۹ <sup>a</sup>
میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری	۰/۲۲۴ $\pm$ ۰/۰۴ <sup>a</sup>	۰/۱۸۱ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>ab</sup>	۰/۱۷۶ $\pm$ ۳/۰۳ <sup>ab</sup>
میانگین افزایش وزن روزانه از شیرگیری تا ۶ ماهگی	۰/۰۷۸ $\pm$ ۰/۰۰۲ <sup>a</sup>	۰/۰۸۲ $\pm$ ۰/۰۰۳ <sup>a</sup>	۰/۰۹۷ $\pm$ ۰/۰۰۱ <sup>a</sup>

\*در هر ردیف هر دو میانگین با حروف لاتین غیر مشابه، معنی دار در سطح احتمال پنج درصد. اعداد داخل پرانتز، تعداد دام است.

مریبوط به ناحیه راهانداز این ژن در نژادهای مختلف خوک است (Gray et al. 2011). (Szydlowski et al. 2011) که نوع ۸ SNP (-809G, -756A, -352C, -322A, +1285T, +2405, +2133T, +2362A, +2405) در ژن  $TNF\alpha$ ، ارتباط معنی داری با صفات وابسته به چاقی از جمله شاخص توده بدنی (BMI)، دور کمر و کلسترول پلاسمایی ( $P<0.05$ ) در میمون‌های Vervet دارند. در انسان نیز چندین مطالعه، ارتباط چاقی یا افزایش وزن را با یک نوع SNP در ناحیه راهانداز ژن  $TNF\alpha$  (G-308A) بررسی کردند و تفاوت معنی داری را بین این SNP با چاقی نشان دادند (Hermann et al. 1998; Brand et al. 2001; Dalziel et al. 2002; Pihlajamaki et al. 2003). نتایج پژوهش حاضر بر روی گوسفند ماکوبی تا حدودی مشابه با پژوهش‌های قبلی بوده به طوری که در پژوهش حاضر نیز اثر چندشکلی ژن  $TNF\alpha$  روی افزایش وزن روزانه قبل از شیرگیری معنی دار بود. اثر چندشکلی این ژن روی وزن تولد و سایر وزن‌ها در مطالعات قبلی بررسی نشده است. با توجه به نقش اصلی این جایگاه ژنی بر سیستم ایمنی، اثر معنی دار مشاهده شده در پژوهش حاضر، ممکن است به علت تفاوت‌ها در مقاومت به بیماری بین گوسفندان دارای ژنتیپ‌های مختلف  $TNF\alpha$  باشد که می‌تواند روی عملکرد رشد

داری ( $P<0.05$ ) داشت (جدول ۳). دلیل این امر احتمالاً به دلیل اثرات تیپ تولد، سال تولد و جنس دام باشد که در صفات مورد بررسی اثر معنی داری نشان دادند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد دام‌های با ژنتیپ EE دارای بیشترین میانگین وزن تولد و افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری (به ترتیب ۴/۳۲ کیلوگرم و ۰/۲۲۴ کیلوگرم در روز) و دام‌های با ژنتیپ RE دارای کمترین میانگین وزن تولد و افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری (به ترتیب ۰/۱۷۶ کیلوگرم و ۰/۰۷۷ کیلوگرم در روز) نسبت به ژنتیپ‌های دیگر هستند. با توجه به عملکرد بالای ژنتیپ EE در این صفات نسبت به دیگر ژنتیپ‌ها، احتمالاً ژنتیپ در بهبود این صفات در گوسفند موثر باشد. همچنین مشاهده شد که اختلاف ژنتیپ EE با سایر ژنتیپ‌ها معنی دار نیست. چندشکلی‌های ژن  $TNF\alpha$  و ارتباط آنها با صفات مرتبط با رشد و چاقی یا افزایش وزن در سایر حیوانات نیز بررسی شده است. در یک مطالعه، اثر تنوع ژنتیپی ژن  $TNF\alpha$  بر صفات چاقی از جمله افزایش وزن روزانه، میزان تولید گوشت بدون چربی و ضریب تبدیل غذایی در نژادهای مختلف خوک بررسی شد و ارتباط معنی داری بین صفات چاقی و SNP در ناحیه راهانداز ژن  $TNF\alpha$  (g.6464 C>T) بدست آمد که نشان می‌دهد این ارتباط معنی دار

## سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای مهندس شجاع جعفری مسئول محترم مرکز پرورش و اصلاح نژاد گوسفند ماکویی به خاطر در اختیار گذاشتن اطلاعات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

- Adachi K, Belser P, Render H, Li D, Rodeck U, Benveniste EN, Woo D, Schmiegel WH, Herlyn D (1992) Enhancement of epidermal growth factor receptor expression on glioma cells by recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Cancer Immunology, Immunotherapy* 34:370-376.
- Alvarez-Busto J, Ruiz-Nunez A, Mazon LI, Jugo BM (2004) Detection of polymorphisms in tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep. *European Journal of Immunogenetics* 31: 155-158.
- Barker JSF (1994) A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceeding of the 5<sup>th</sup> World congress on Genetics Applied to Livestock Production. University of Guelph, Guelph Canada 21: 501-508.
- Bojarczyc-Nosowicz B, Kaczmarczyk E, Stachura A, Kotkiewicz M (2011) Polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene in cattle herds naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 14: 671-673.
- Brand E, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J, Distler A, Sharma AM (2001) Tumor Necrosis Factor-308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25: 581-585.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 72: 3666-3670.
- Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID (2002) Association of the TNF- $\alpha$  -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Journal of Obesity Research* 10: 401-407.
- Daniel JA, Elsasser TH, Morrison CD, Keisler DH, Whitlock BK, Steele B, Whitlock K, Sartin JL (2003) Leptin, tumor necrosis factor-a (TNF), and CD14 in ovine adipose tissue and changes in circulating TNF in lean and fat sheep. *Journal of Animal Science* 18: 2590-2599.
- Darlay RJ, McCarthy AJ, Illot NE, Smith JE, Shaw MA (2011) Novel polymorphisms in ovine immune response genes and their association with abortion. *Animal Genetics* 42: 535-543.
- Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A (2006a) 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. *New Zealand Veterinary Journal* 54: 153- 160.

افراد موثر باشد (Geldermann et al. 2006). ارتباط چندشکلی ژن‌های دیگر نیز با صفات رشد در گوسفند ماکویی بررسی شده است. Farhadian et al. (2012) چندشکلی ژن میوستاتین را در گوسفند ماکویی با روش PCR-SSCP بررسی کردند و ۴ الگوی ژنتیپی مختلف (AD, AC, AE و BC) بدست آوردند. ارتباط این ژنتیپ‌ها با صفات رشد بررسی شد و آشکار شد که این ژنتیپ‌ها با وزن تولد ارتباط معنی‌داری دارند ( $P<0.05$ ) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Tahmoorespur et al. (2011) با بررسی چندشکلی جایگاه‌های ژنی کالپین و گیرنده آندروژنی  $\beta_3$  با ارزش ارشی برآورد شده صفات رشد در گوسفند بلوچی با استفاده از روش PCR-SSCP موفق به شناسایی سه الگوی ژنتیپی (AB, AA و BB) مختلف شدند، که مشابه پژوهش حاضر ژنتیپ‌های کالپین رابطه معنی‌داری با ارزش‌های ارشی برآورد شده با صفت وزن تولد داشتند. Shojaei et al. (2010) در پژوهشی با بررسی چندشکلی ژن لپتین در گوسفند کرمانی به روش PCR-SSCP موفق به شناسایی ۱۰ الگوی مختلف ژنتیپی شدند. لذا می‌توان گفت تکنیک PCR-SSCP در شناسایی چندشکلی ژنتیپی در گوسفندان بومی کشور موفق و کارآمد بوده و به عنوان روشی کم‌هزینه و مناسب در بررسی چندشکلی ژنتیپی در گوسفندان کشور توصیه می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، تعداد نمونه‌های مورد استفاده در این پژوهش کافی به نظر نمی‌رسد، لذا بهتر است در مطالعات آینده در مورد ژن  $TNF\alpha$  و ارتباط چندشکلی آن با صفات رشد از تعداد نمونه‌های بزرگتری جهت تعیین نتایج آنها به جمعیت‌های مورد بررسی استفاده شود. در مجموع، انجام مطالعاتی از این دست با تعداد نمونه‌های بیشتر می‌تواند به یک نتیجه‌گیری قاطع و قابل اعتماد در زمینه ارتباط چندشکلی‌های ژن  $TNF\alpha$  و صفات رشد منجر شود و در کنار فاکتورهای رشد دیگر به معرفی یک نشانگر ژنتیکی جدید مؤثر بر صفات رشد کمک نماید.

- Dukkipati VSR, Blair HT, Garrick DJ, Murray A (2006b) 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Research* 5: 581-608.
- Engwerda CR, Dale CJ, Sandeman RM (1996) IgE, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL4 and IFN $\gamma$  gene polymorphisms in sheep selected for resistance to fleece rot and flystrike. *International Journal for Parasitology* 26: 787-791.
- Farhadian M, Hashemi A, Mardani K, Darvishzadeh R, Jafari S (2012) Polymorphisms in the ovine myostatin gene are associated with birth weight but not with weight gain in Iranian Makoei sheep. *Genetics and Molecular Research* 11: 3568-3575.
- Farid-Hoseyni R, Mahmoodi M, Rezayi SA (2001) Cellular and molecular immunology, Jahad Daneshgahi publication, Mashhad, Iran. (in Farsi).
- Geldermann H, Mir MR, Kuss AW, Bartenschlager H (2006) OLA-DRB1 microsatellite variants are associated with ovine growth and reproduction traits. *Genetics Selection Evolution* 38: 431-444.
- Gray SB, Langefeld CD, Ziegler JT, Hawkins GA, Wagner JD, Howard TD (2011) Single-nucleotide polymorphisms in the TNF gene are associated with obesity-related phenotypes in Vervet Monkeys. *Obesity* 19: 1427-1432.
- Green IR, Sargan DR (1991) Sequence of the cDNA encoding ovine tumor necrosis factor-alpha: problems with cloning by inverse PCR. *Gene* 109: 203-210.
- Hattori A, Tanaka E, Murase T, Ishida N, Chatani Y, Tsujimoto M, Hayashi K, Kohno M (1993) Tumor necrosis factor stimulates the synthesis and secretion of biologically active nerve growth factor in non-neuronal cells. *Journal of Biological Chemistry* 268: 2577-2582.
- Hermann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F (1998) Polymorphisms of the Tumor Necrosis Factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *European Journal of Clinical Investigation* 28: 59-66.
- Herring AJ, Inglis NF, Ojeh C, Snodgrass DR, Menzies JD (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology* 16: 473-477.
- Israel C, Weller JI (2002) Estimation of quantitative trait loci effects in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science* 85:1285-1297.
- Jullien N (2008) Amplifx version 1.5.4 (software). Available at: <http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Homepage>.
- Khaldari M (2003) Sheep and goat husbandry. Jahad Daneshgahi publication, (in Farsi).
- Kimura M, Crow J (1979) The number of alleles that can be maintained in a finite Population. *Genetics* 49: 725-738.
- Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M (2006) Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes and Infection* 8: 2163-2171.
- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Mousavizadeh A, Mohammad Abadi M, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailizadeh Koshkoieh A (2009) Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7: 51-53.
- Nash AD, Barcham GJ, Brandon MR, Andrews AE (1991) Molecular cloning, expression and characterization of ovine TNF $\alpha$ . *Immunology Cell Biology* 69: 273-283.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 70: 3321-3323.
- Pihlajamaki J, Ylinen M, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M (2003) The effect of the -308A allele of the TNF- $\alpha$  gene on insulin action is dependent on obesity. *Journal of Obesity Research* 11: 912-917.
- SAS Institute Inc (2004) SAS/STAT User's Guide, Version 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schmiegel W, Roeder C, Schmielau J, Rodeck U, Kalthoff H (1993) Tumor necrosis factor induces the expression of transforming growth factor  $\alpha$  and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 90: 863-867.
- Sheikh FD, Bhattacharya TK, Kumar P, Sharma A (2006) DRB3.2 gene polymorphism and its association with pashmina production in Changthangi goat. *International Journal of Immunogenetics* 33: 271-276.
- Shirasuna K, Kawashima C, Murayama C, Aoki Y, Masuda Y, Kida K, Matsui M, Shimizu T, Miyamoto A (2011) Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* 57: 135-142.
- Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, Esmailizadeh KA, Ferdowsi MH, Torabi A, Tayyazadeh M, Mirzakhani H (2010) Using PCR-SSCP Technique to Investigate Polymorphism of Leptin Gene in Kermani Sheep. *Journal of Animal Science Reaserch* 2: 115-122. (In Farsi).
- Stear MJ, Pokarny TS, Echternkamp SE, Lunstra DD (1989) The influence of the BoLA-A locus on reproductive traits in cattle. *International Journal of Immunogenetics* 16: 77-88.
- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA, Shepard HM (1985) Recombinant tumor necrosis factor -  $\alpha$ : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230: 943-45.
- Szydlowski M, Buszka A, Mackowski M, Lechniak D, Switonski M (2011) Polymorphism of genes encoding cytokines IL6 and TNF is associated with pig fatness. *Livestock Science* 136: 150-156.
- Tahmoorespur M, Karimi D (2011) Assessment Association Between CAPN3 and ADRB3 Genes Polymorphism and Estimated Breeding Values (EBVs) of

Growth Traits in Baluchi Sheep. Iranian Journal of Animal Science Research 3: 74-80. (In Farsi).

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 389: 610-614.

Vilcek J, Palombella VJ (1992) TNF as a growth factor. In: Aggarwal BB and Vileck J (eds) Tumor necrosis factors: structure function and mechanism of action. Dekker, New York 269-287.

Xu AJ, Liu XL, Guo JZ, Xia Z (2010) Polymorphism of bovine TNF- $\alpha$  gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. *Hereditas* 32: 929-934.

Yazdi MH, Engstrom G, Nasholm A, Johansson K, Jorjani H, Liljedahl LE (1997) Genetic parameters for lamb weight at different ages and wool production in Baluchi sheep. *Journal of Animal Science* 65: 247-255.

Ye SC, Chu MX, Chen GH (2003) Progress on MHC polymorphism and its relationship with economic traits in dairy cattle. *Hereditas* 25: 89-92.

Yeh FC, Boyle T, Yang R (1999) POPGENE version 1.31. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Canada.

Young AJ, Hay JB, Chan JY (1990) Primary structure of ovine tumor necrosis factor alpha cDNA. *Nucleic Acids Research* 18: 6723.

Yudin NS, Vasil'eva LA, Kobzev VF, Kuznetsova TN, Ignatieva EV, Oshchepkov DY, Voevoda MI, Romaschenko AG (2006) Association study of SNP of the TNF-alpha gene with bovine leukosis and evaluation of its functional significance. Proceedings of the Fifth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure, Novosibirsk, Russia 3:245-248.