

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 بختیارزاده^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 F², Bakhtiarizadh M¹

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 به کمک 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 به صورت 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 به صورت حذف را مشاهده کردیم، اما تغییری در آمینواسید حاصل و در نتیجه تغییری در ساختار پروتئین حاصل نشد. به علاوه 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*

نشانگرهای ژنتیکی

HRM

مقدمه

تحقیقات نشان داده شده است که تعداد بزه در هر زایش و میزان تخمک‌اندازی می‌توانند به صورت 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 تنظیم شود (Davis 2005; Drouilhet et al. 2009). از مهم‌ترین ژن‌های بزرگ اثر با جهش‌های متعدد می‌توان به ژن فاکتور رشد و تمایز (GDF9) و ژن گیرنده پروتئین مورفوزنیک استخوان (BMPR1B) و دسته BMP که معروف‌ترین آن‌ها پروتئین مورفوزنیک استخوان (BMP15) است اشاره کرد (Bodin et al. 2007). طی مطالعه‌ای روی نژاد شال با تکنیک PCR-RFLP، برای شناسایی چند شکلی در ژن‌های (FecGH) GDF9 و BMPR-IB، جهشی گزارش نشد (Ghaffari et al. 2009a; Ghaffari et al. 2009b). تمامی این جهش‌ها هنگامی که به صورت هتروزیگوت می‌باشند، تعداد بزه 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 قلوژیایی 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 به فرد (DLX3: c. * 803A> G) با جهش Fec^L مرتبط است. در بررسی جهش Fec^L دو چند شکلی g.36938224T> A در ناحیه 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 در حالت هموزیگوت میزان تخمک‌اندازی به صورت افزایشی و با ۱/۵ تخمک اضافی برای یک کپی از این ژن و سه تخمک برای دو کپی از ژن جهش یافته (Fec^L) همراه بود (Drouilhet et al. 2009; Drouilhet et al. 2013). این محققین در طی آزمایش ایمونوهیستوشیمی، ژن B4GALNT2 را به عنوان بهترین نامزد برای مکان‌یابی و بیان ژن Fec^L پیشنهاد نمودند. این ژن روی کروموزوم 11 گوسفند و در موقعیت: 3692982 – 36929322 با 11 اگزون قرار دارد (Drouilhet et al. 2013). بر اساس فنوتیپ تخمدان و عملکرد غدد درون‌ریز، جهش

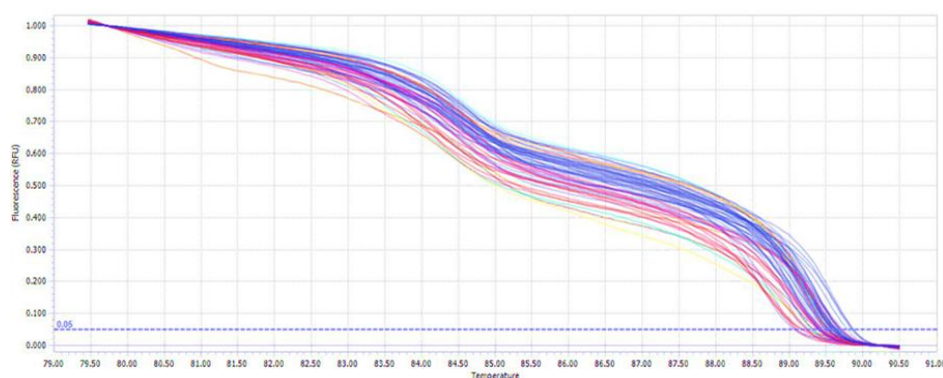
Fec^L در مقایسه با همه‌ی ژن‌های مؤثر بر سیستم پیام‌رسان پروتئین مورفوزنیک استخوان (BMPR1B, GDF9 و BMP15) عملکرد تخمدان را به شیوه‌ای متفاوت نسبت به دیگر جهش‌های مرتبط با صفات چندقلوژیایی شناخته شده در گوسفند تغییر می‌دهد (Drouilhet et al. 2009; Drouilhet et al. 2010). هدف از تحقیق حاضر بررسی شناسایی جهش‌های ژن B4GALNT2 با استفاده از چندشکلی G > 803A c. * DLX3، با روش HRM و ارتباط آن با صفت چندقلوژیایی در گوسفند زندی بود. برای انجام این تحقیق از ۱۰۰ رأس گوسفند زندی واقع در مزرعه قزاق پردیس ابوریحان دانشگاه تهران استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از خون با استفاده از کیت Easy Get DNA Extraction شماره ثبت: REF#FCT100 RUO طبق پروتکل شرکت تولید کننده صورت گرفت. برای ارزیابی مقدار خلوص DNA و آلودگی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری کدوراپ و بر اساس جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. جهت تکثیر اختصاصی ناحیه موردنظر در ژن B4GALNT2 با استفاده از چندشکلی (DLX3: c. * 803A> G) به طول 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)، آب مقطر استریل (۲- میکرولیتر) و نمونه DNA (۲- میکرولیتر) بود. تکثیر قطعه مورد نظر 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

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 (محور X) 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.

برگشت هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، آب استریل ۱۳ میکرولیتر، و کیت HRM تهیه شده از شرکت زیست فناوری پیشگام با شماره ثبت (۰۸-۳۱-۰۰۰۰۱) به مقدار ۴ میکرولیتر توسط دستگاه Light Cyclser 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 زیست فناوری پیشگام ارسال شد. الکتروفوروز محصولات تکثیر شده نشان داد که قطعه مورد نظر ژن



شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفوروز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده نشانگر 100bp ژنتیکی شرکت سینا ژن ایران



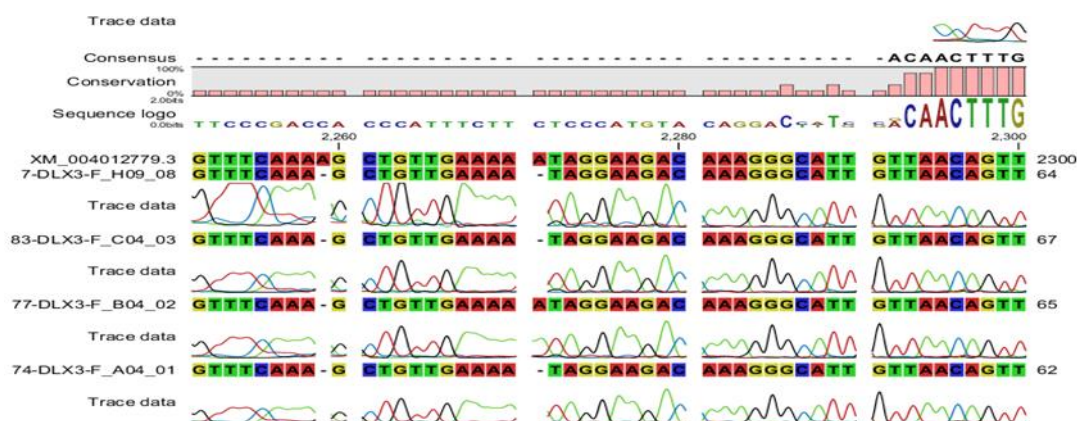
شکل ۲- نمودارهای تفاوت براساس منطقه ذوب

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 ($G > 803A^*$) در مکان

به‌دلیل وجود پیک‌های متفاوت چهارنمونه برای تعیین توالی و اطمینان از صحت انجام کار به شرکت زیست فناوری 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

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 B4GALNT2 برای جایگاه مورد بررسی در این نژاد، بررسی سایر ژن‌های عمده مؤثر بر صفت تعداد نتاج در هر زایش برای این نژاد پیشنهاد می‌شود.

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 $FecL$ 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



شکل ۳- 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 Viguié, 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-Reviere, 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.