

بررسی بیوانفورماتیکی اگزون شماره دو ژن *BMP15* در بزهای تالی و بیتال

Bioinformatics analysis of the *BMP15* exon 2 in Tali and Beetal goats

مرتضی هادی زاده^۱، علی نیازی^{۲*}، محمدرضا محمدآبادی^۱، علی اسماعیلی زاده^۱، یاسر مهدی زاده گزویی^۲

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- به ترتیب دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه شیراز

Hadizadeh M¹, Niazi A^{*2}, Mohammad Abadi M³, Esmailizadeh A³, Mehdizadeh Gazooei Y⁴

1. Graduate MSc Student and Associate Professors, Shahid Bahonar University of Kerman.
2. Associate Professor, Graduate MSc Student, Shiraz University.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: niazi@shirazu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۴)

چکیده

به کارگیری فن آوری های مولکولی، منجر به کشف جهش هایی با اثر عمده بر بازدهی تولید مثل بز شده است. با توجه به اهمیت چندقلو زایی، در این پژوهش، وجود جهش ها در تحقیقات پیشین و جهش های نوین در ژن *BMP15* در دو نژاد بیتال و تالی بررسی شد. پس از استخراج DNA از خون بزهای بیتال و تالی و واکنش PCR، تعیین توالی ۹ فرآورده PCR (از بزهای دارای رکوردهای زایش متفاوت) از نژادهای یاد شده انجام شد. آنالیز توالی ها نشان داد که در نژاد بیتال تغییر نوکلئوتیدی مشاهده نشد. در نژاد تالی در نوکلئوتید شماره ۸۰۷ یک جهش هتروزایگوت وجود داشت که منجر به تغییر اسید آمینه گلوتامین به گلوتامیک اسید می شود. با توجه به جایگزینی یک اسید آمینه باردار به جای یک اسید آمینه بدون بار، به نظر می رسد که این جهش موجب تغییر در پتانسیل سطح الکتریکی و ساختار سه بعدی پروتئین حاصل شده که این رخداد فعالیت زیستی آن را به چالش می کشد.

واژه های کلیدی

بز بیتال
بز تالی
تعیین توالی
جهش
ژن *BMP15*

با پیشرفت علم ژنتیک، ژن به عامل اصلی در برنامه‌ریزی عملکرد سلول و به دنبال آن کنترل ویژگی‌های موجود زنده شناخته شد. به این ترتیب تمایل برای شناخت هرچه بیشتر ژن‌ها به منظور توجیه پدیده‌های زیستی افزایش یافت؛ تا حدی که در چند دهه‌ی اخیر، تجهیزات مورد نیاز در تحقیقات مولکولی به طور گسترده‌ای افزایش یافته‌است و امروزه تحقیقات مولکولی جزو مطالعات رایج آزمایشگاه‌های زیستی است. اطلاعات به دست‌آمده از تحلیل داده‌های زیستی به وسیله علم بیوانفورماتیک، در به خط کردن توالی‌ها در بانک‌های اطلاعاتی برای یافتن شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنی، پیش‌گویی ساختار و عملکرد محصولات ژن‌ها و یافتن ارتباط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و توالی‌های پروتئینی کمک می‌کند. پژوهش‌های انجام شده از سال ۱۹۸۰ در رابطه با الگوهای وراثت و آزمون DNA ژن‌های مهم در باروری نشان داده است که برخی ژن‌ها دارای پتانسیلی هستند که به طور معنی‌داری بازدهی تولید مثل را در گوسفندان افزایش می‌دهند. نرخ تخمک‌ریزی یکی از سازه‌های مهم در تعیین بازدهی تولیدمثلی است. در گونه‌های مختلف پستانداران، گونادوتروپین‌ها، هورمون‌های متابولیکی و فاکتورهای رشد پاراکرینی، گامه‌های فولیکول‌سازی و تخمک‌ریزی را کنترل می‌کنند (Hunter et al. 2004). پژوهش‌ها، نقش حیاتی فاکتورهای پاراکرینی مانند پروتئین مورفوژنتیک استخوان^{۱۵} (BMP15) را در رشد آغازین فولیکول و نرخ تخمک‌ریزی نشان دادند (McNatty et al. 2004). هنگام تکامل برون تنی، فاکتورهای تراوش شده به وسیله اووسیت، به ویژه BMP15، با اثر بر عملکرد یاخته‌های کومولوس، نرخ نمو اووسیت را افزایش می‌دهند. مشخص شد که جهش در ژن BMP15 موجب تغییر در رشد فولیکولی و باروری می‌شوند (Galloway et al 2000; Hanrahan et al. 2004). جهش‌های شناخته شده در این ژن، دربرگیرنده $FecX^G$ و $FecX^B$ (Hanrahan et al. 2004)، $FecX^L$ و $FecX^H$ (Galloway et al. 2000)، $FecX^L$ (Bodin et al. 2007) و $FecX^R$ (Martinez-Royo et al. 2008; Monteagudo et al. 2009) چنین اثری دارند. باروری یکی از صفات مهم اقتصادی در پرورش گوسفند و بز است. روشن است که هزینه نگهداری یک دام که دو یا چند قلو آبستن است به مراتب کمتر از هزینه

نگهداری دو یا چند دام است که هر یک تک قلو آبستن هستند. در گله‌های با نرخ زایش بالا، به ازای هزینه‌های نگهداری صرف شده، نوزادان بیشتری و در نتیجه فرآورده‌های دامی بیشتری در واحد زمان تولید می‌شود. خاستگاه بز تالی کشورهای حوزه خلیج فارس است، وزن تولد، وزن بلوغ و دوقلوایی در این نژاد به ترتیب ۲/۵ کیلوگرم، ۳۰ کیلوگرم و ۲۷ درصد می‌باشد (Mobaraki A and Vatankhah 2002). خاستگاه بز بیتال هم کشورهای هندوستان و پاکستان است. وزن تولد، وزن بلوغ و دوقلوایی در نژاد بیتال به ترتیب ۲/۸ کیلوگرم، ۴۷ کیلوگرم و ۵۲/۶ درصد گزارش شده است (GOATWORDS 2012). هدف از اجرای این پژوهش، بررسی وجود جهش‌های شناخته شده و یا جهش‌های نوین در اگزون دوم BMP15 و بررسی بیوانفورماتیکی آن‌ها در دو نژاد بیتال و تالی بود. در ایستگاه اصلاح نژاد بز تالی در شهرستان بندرعباس، تعداد ۶۰ نمونه خون از بزهای تالی و ۵۰ نمونه خون از بزهای بیتال از گله‌های مردمی در شهرستان زرنند و مناطق اطراف شهر کرمان جمع‌آوری شد، نمونه‌گیری از این نژادها به صورت شجره‌ای بود. نمونه‌های خون در هر نژاد در دو گروه نمونه‌های حاصل از افراد دارای رکوردهای زایش پایین (تک قلوایی متوالی) و نمونه‌های حاصل از افراد دارای رکوردهای زایش بالا (دوقلوایی متوالی) گروه-بندی شدند. استخراج DNA از خون به روش نمکی انجام گرفت (Miller et al. 1998). برای انجام واکنش PCR، از آغازگرهای پیشرو با توالی نوکلئوتیدی 5'-TGCAGGCTCCTGGCACATACAGAC-3' و پیرو 5'-TCACCTGCATGTGCAGGACTGGG-3' استفاده شد (Xue-qin et al. 2009). چرخه‌های حرارتی PCR به صورت زیر انجام گرفت: واسرشت‌سازی آغازین در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه) که با ۳۰ چرخه گرمایی با گامه‌های متوالی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای یک دقیقه و در پی آن‌ها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه ادامه یافت. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرو لیتر و با استفاده از مواد استاندارد آن انجام شد. پس از واکنش PCR، درستی اندازه قطعه تکثیر شده (۸۶۴ جفت بازی) با ژل آگارز یک درصد تایید (شکل ۱) و تعداد ۵ نمونه از

¹ Bone morphogenetic protein 15

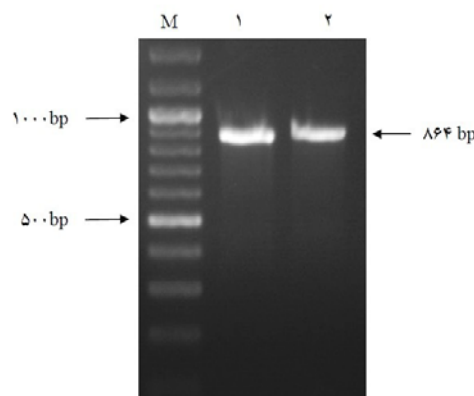
پس از ترجمه توالی DNA یاد شده و توالی‌های اسید آمینه به دست آمده از GenBank، و با ردیف آرایی به وسیله نرم‌افزار Vector NTI، مشخص شد که در ریشه ۲۶۹ (ریشه یک پپتید بالغ) تغییری در توالی اسیدآمینه‌ها رخ داده است. در واقع در ردیف آرایی اسیدهای آمینه در جایگاه یاد شده، اسیدآمینه گلوتامیک اسید (با نام اختصاری E) جایگزین گلوتامین (با نام اختصاری Q) شده بود (شکل ۳). در تعیین توالی اولیه، در دو نمونه تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شد و از آنجایی که این تغییر نوکلئوتیدی سبب تغییر در توالی اسید آمینه شده بود، این دو نمونه دوباره تعیین توالی شد. در تعیین توالی دوم نیز این جهش تایید شد (در یکی از دو نمونه).

	241	240	250	260	270	280	290
Tali	117	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRAREAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Beetal	125	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Jining	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Teddy	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
black	131	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Boer	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Guizhou	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Lezhi	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Tibetan	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			
Yunling	241	QSVQTKKPLPKGLKEFTEKDP	SLLLRRARQAGSIASEV	PGPSREHDPESNQ			

شکل ۳- تغییر اسید آمینه گلوتامین به گلوتامیک اسید در ریشه ۲۶۹، در مقایسه با نژادهای دیگر

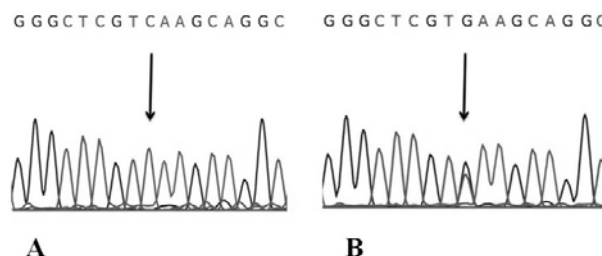
هفت مورد از ۲۰ اسیدآمینه زنجیرهای جانبی دارند که به راحتی یونیزه می‌شوند. این هفت اسیدآمینه می‌توانند با دادن یا گرفتن پروتون سبب تسهیل واکنش شوند و از طرفی تولید پیوندهای یونی کنند. این هفت اسیدآمینه عبارتند از: Tyr, Cys Arg, Lys, His, Asp & Glu (Mohammadi 2009). مدلینگ جهش اخیر از لحاظ تغییر بار، شباهت زیادی به جهش ($FecX^I$) دارد، در $FecX^I$ یک تغییر نوکلئوتیدی T به A وجود دارد که والین آب گریز و بدون بار را برای آسپارتیک اسید دارای بار منفی در ریشه ۳۱ پپتید بالغ BMP15 جایگزین می‌کند. جهش $FecX^I$ موجب جایگزینی محافظت نشده اسیدآمینه در ریشه ۳۱ پروتئین بالغ BMP15 می‌شود. میس‌های داری جهش‌های $FecX^I$ فنوتیپ همانندی را نشان می‌دهند زیرا جهش $FecX^I$ که موجب ایجاد کدون پایانی در ریشه‌های ۲۳۹ پروپروتئین BMP15 می‌شوند، از تولید شکل بالغ و فعال از نظر بیولوژیکی جلوگیری می‌کنند. بنابراین، این جهش‌ها موجب از دست رفتن کنش‌های BMP15 و

فرآورده‌های PCR از نژاد تالی (۳ نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی بالا و ۲ نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی پایین) و ۴ نمونه از نژاد بیتال (۲ نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی بالا و دو نمونه از افراد دارای رکوردهای متوالی پایین) تعیین توالی و نتیجه آن به وسیله نرم‌افزار Vector NTI بررسی شد.



شکل ۱- فرآورده‌های PCR برای آغازگر BMP15

با ردیف آرایی^۱ توالی‌ها بزهای بیتال و تالی با توالی‌های گرفته شده از GenBank به وسیله نرم‌افزار Vector NTI و پس از آنالیز داده‌ها مشخص شد که در نژاد بیتال تغییری در توالی نوکلئوتیدی BMP15 رخ نداده است. اما در نژاد تالی یک جهش تک نوکلئوتیدی در جایگاه ۸۰۷ bp دیده شد. بررسی گراف‌ها نشان داد که این تغییر به شکل هتروزیگوت است. در این تغییر نوکلئوتید گوانین (G) جایگزین سیتوزین (C) شده بود (شکل ۲). این نمونه مربوط به فردی دو قلوزا بود. مشابه این جهش در همین جایگاه برای افراد دارای رکورد پایین (تک‌قلوزا) مشاهده نشد.



شکل ۲- جابجایی نوکلئوتیدی در ژن BMP15 که منجر به جایگزینی یک گوانین به جای یک سیتوزین شد (B)، در مقایسه با توالی نوع وحشی نژاد تالی (A).

^۱ Alignment

یک اسید آمینه باردار قطبی (Glu) جایگزین یک اسید آمینه بدون بار قطبی (Gln) شد. این جابجایی در شکل‌گیری دایمر تاثیر دارد، به گونه‌ای که سبب تغییر در پتانسیل سطح الکتریکی در منطقه جابجایی می‌شود که این رخداد فعالیت زیستی را به چالش می‌کشد (Galloway et al. 2002).

افزایش نرخ تخم‌کریزی و یا ناباروری به ترتیب در هتروزیگوت و یا هموزیگوت‌های موتانت می‌شوند. (Galloway et al. 2002). از آن جایی که فعالیت زیستی پروتئین فاکتور رشد و تمایز ۹ (GDF9) و BMP15 بصورت دایمر (Dimer) است؛ چه به صورت همودایمر (GDF9-GDF9) و یا (BMP15-BMP15) و چه به صورت هتروداایمر (GDF9-BMP15) (Hanrahan et al. 2004). در جابجایی اسید آمینه گلوتامیک اسید به جای گلوتامین،

منابع

Bodin L, Di Pasquale E, Fabre S, Bontoux M, Monget P, Persani L, Mulsant P (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.

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics* 25:279-283.

Galloway SM, Gregan SM, Wilson T, McNatty KP, Juengel JL, Ritvos O, Davis GH (2002) BMP15 mutations and ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 191:15-18.

GOATWORLD (2012) Agricultural research service united state department of agriculture. Available at <http://www.goatworld.com/breeds/beetal.shtml>.

GOATWORLD, Colorado, USA.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology Reproduction* 70:900-909.

Hunter MG, Robinson RS, Mann GE, Webb R (2004) Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science* 82-83: 461-477.

Martinez-Royo A, Jurado JJ, Smulders JP, Marti JJ, Alabart JL, Roche A, Fantova E, Bodin L, Mulsant P, Serrano M, Folch J, Calvo JH (2008) A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 39: 294-297.

McNatty KP, Moore LG, Hudson NL, Quirke LD, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan JP, Smith P, Groome NP, Laitinen M, Ritvos O, Juengel JL (2004) The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 128:379-386.

Mobaraki A, Vatankhah M (2002) The introduction of goat breeds in Iran, Research final Report. Research, Agriculture organization, Mashhad, Iran (In Farsi).

Mohammadi R (2009) *Biochemistry*, Aeezh publisher, Tehran, Iran. (In Farsi).

Monteagudo LV, Ponz Ricardo, Tejedor M, Teresa, Lavina Adolfo, Sierra Isidro (2009) A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science* 110. 139-146.

Xue-qin R, Jian-bin LD, Zhi-yong Q, Cheng W, Jia-fu (2009). Diversity of BMP15 and GDF9 genes in White Goat of Guizhou Province and Evolution of the Encoded Proteins. *Zoological* 30:593-602.