

توسعه و بهینه سازی تکنیک مقرون به صرفه Tetra-primer ARMS PCR

به منظور بررسی جهش $g + 6723G > A$ ژن میوستاتین در گوسفند

قره گل

Development and optimization of cost-effective Tetra-primer ARMS PCR technique for detection of myostatin gene $g + 6723G > A$ polymorphism in Karakul sheep

داودعلی ساقی^{۱*}، لیلی سیمایی سلطانی^۲، فائزه قرائی کسمائی^۳

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران

۲- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد آمار زیستی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

Saghi DA^{*1}, Simaei Soltani L², Gharaei Kasmaei F³

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

2- PhD Student of animal breeding and genetics, Ferdowsi university, Mashhad, Iran

3- MSc Student of Biostatistics, Mashhad university of Medical Science, Mashhad, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲)

چکیده

میوستاتین که فاکتور رشد و تمایز ۸ (GDF8) نیز نامیده می شود به عنوان یک تنظیم کننده منفی رشد و توسعه عضلات عمل می نماید. بنابراین نقش آن در رشد حیوانات و تولید گوشت حائز اهمیت است. مطالعات عملکردی نشان داده است که یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه 3'UTR این ژن سبب حذف نقش مهارتی میوستاتین و در نهایت بروز فنوتیپ ماهیچه مضاعف در گوسفند می شود. روش tetra primer ARMS PCR یک روش آسان، سریع، قابل اعتماد و ارزان برای شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی می باشد. مطالعه حاضر با هدف شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی ژن میوستاتین ($g + 6723G > A$) با روش tetra primer ARMS PCR در ۸۶ رأس گوسفند قره گل انجام شد. بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از ۳ نمونه شاهد شامل هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته گوسفند نژاد شاروله صورت گرفت. تمامی نمونه های قره گل مورد بررسی دارای آلل G برای چندشکلی تک نوکلئوتیدی ذکر شده بودند و آلل جهش یافته A مشاهده نشد، بنابراین فراوانی آلل جهش یافته (A) و آلل وحشی (G) به ترتیب صفر و ۱۰۰ درصد می باشد. به منظور ارزیابی دقت تکنیک tetra primer ARMS PCR در این جایگاه، تمامی افراد آزمایش شده با روش PCR-RFLP نیز تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج حاصل، حاکی از تطابق دو روش با یکدیگر می باشد و از این رو می توان در جهت تعیین ژنوتیپ از روش Tetra Primer ARMS PCR به عنوان روشی مقرون به صرفه استفاده نمود.

واژه های کلیدی

گوسفند قره گل

ماهیچه مضاعف

میوستاتین

Tetra Primer ARMS PCR

گروه کنترل مقایسه شدند که در نهایت هیچ تفاوتی در توالی ژنوم آنها در ناحیه کدکننده ژن میوستاتین یافت نشد (Marcq et al. 2002). این شواهد حاکی از آن است که چند شکلی ای که سبب ماهیچه مضاعف می شود، ممکن است در نواحی غیر کدکننده و یا در ژنی پیوسته و بسیار نزدیک به ژن میوستاتین باشد (Miari et al. 2014).

با بررسی های لازم، دو چندشکلی تک نوکلئوتیدی دو آللی در ۱۰/۵ کیلوباز از DNA ژنوم گوسفند که حاوی ژن میوستاتین (با شماره دسترسی DQ530260) بود، شناسایی شد و بین گوسفندان تکسل با ماهیچه مضاعف و گروه شاهد از نظر فراوانی آللی اختلاف معنی داری مشاهده شد (Clop et al. 2006). اولین چندشکلی (g.-2449G>C) در ناحیه ۲/۵ کیلوبازی بالادست جایگاه شروع رونویسی می باشد و چندشکلی دوم (g+6223A) در ناحیه ۳' ترجمه نشده (3'UTR) ژن میوستاتین قرار دارد و به عنوان g + 6723G> A یا g + 6223G> A *1232 G> A شناخته می شود (Clop et al. 2006; Masri et al. 2011).

مطالعات عملکردی نشان دادند که وجود آلل جهش یافته (g+6223A) منجر به ایجاد یک موتیف اوکتامری (ACATTCCA) می شود و این امر سبب ایجاد محل اتصال miRNA های ۱ و ۲۰۶ می شود و این چنین مهار ترجمه میوستاتین صورت می گیرد و در نهایت صفت ماهیچه مضاعف بروز پیدا می کند (Clop et al. 2006).

از زمانی که جهش g + 6723G> A در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین توسط Clop و همکارانش در سال ۲۰۰۶ شناسایی شد تا به امروز برای تعیین ژنوتیپ، محققان عمدتاً از روش چندشکلی طول قطعات حاصل از هضم مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR-RFLP) به وسیله آنزیم محدودکننده HpyCH4IV استفاده می نمودند. شایان ذکر است که در کنار مزایا آن، روشی بسیار گران قیمت بوده و به انکوباسیون طولانی مدت نیاز دارد. در برخی شرایط نیز از روش های دیگری همچون توالی یابی و چندشکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) نیز استفاده می شود، اما این روش ها معایبی از قبیل هزینه بالا و صرف نیروی کار و زمان زیاد را داراست (Guan et al. 2014).

امروزه با توجه به نیاز روز افزون جهانی یکی از اهداف اصلی پرورش گوسفند تولید گوشت می باشد. از سوی دیگر با توجه به تخریب مراتع به دلیل چرای بیش از حد دام، تولید گوشت به میزان بیشتر به ازای هر رأس می تواند استراتژی معقول و هوشمندانه ای باشد. (Farhadian and Hashemi 2016). بنابراین پرورش دام با رشد سریع تر از حد معمول و وزن لاشه بیشتر به دلیل سود مستقیم، مورد توجه بسیاری از دامپروران و محققان قرار گرفته است (Grochowska et al. 2019).

امروزه اصلاح نژاد در دام سبک توسط بسیاری از ابزارهای ژنتیک مولکولی از جمله انتخاب به کمک نشانگرها انجام می شود. از مزیت های این روش می توان به مقرون به صرفه بودن از لحاظ اقتصادی در عین افزایش سرعت پیشرفت ژنتیکی در برخی از صفات رشد و یا لاشه اشاره نمود.

در بین ژن های شناسایی شده ی کاندید برای صفات رشد و وزن نهایی لاشه، ژن کد کننده میوستاتین که در واقع بیان آن به طور منفی رشد ماهیچه اسکلتی را تحت تأثیر قرار می دهد را می توان به عنوان یکی از عوامل مؤثر در رشد و توسعه ماهیچه دانست از این رو می تواند گزینه مناسبی برای انتخاب به کمک نشانگر باشد (Grochowska et al. 2019).

میوستاتین یا فاکتور رشد و تمایز ۸ (GDF-8) یکی از اعضای خانواده تغییر دهنده فاکتور رشد بتا (TGF-β) می باشد. ژن میوستاتین در گوسفندان بر روی کروموزوم شماره ۲ قرار دارد (McPherron and Lee 1997) و مانند میوستاتین گاوی از سه آگزون و دو اینترون تشکیل شده است (Grobet et al. 1997). طول این ژن شامل ۶۷۵۷ جفت باز (شماره دسترسی: NC_040253.1) و طول ناحیه رونویسی ۱۱۲۸ جفت باز می باشد. هم چنین این ژن پروتئینی به طول ۳۷۵ اسید آمینه را کد می نماید (Zerbino et al. 2018).

در سال ۱۹۹۸ Marcq و همکاران به منظور شناسایی ارتباط بین چندشکلی ژن میوستاتین و ماهیچه مضاعف، کل ناحیه کدکننده ژن میوستاتین را در گوسفندان تکسل توالی یابی نمودند (Marcq 1998). در مطالعه ی دیگری نژاد تکسل بلژیکی با ماهیچه مضاعف در مقابل گوسفندان رومانف با ماهیچه معمولی به عنوان

زنجیره سرد به آزمایشگاه بیوتکنولوژی و ژنتیک دام (مرکز شماره ۳ سازمان نظام مهندسی کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی) منتقل و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت دنازیست (شماره کاتالوگ: S-103-1-1) انجام گرفت.

ابتدا توالی ژن میوستاتین از پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) با شماره دسترسی DQ530260.1 استخراج شد و سپس جهش مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار (CLC Main (CLC bio, Aarhus, Denmark) Workbench 5.0 شناسایی و آغازگرها با نرم‌افزار Primer 5.0 (<http://www.premierbio.com/>) طراحی و به منظور سنتز آغازگرها، توالی‌ها به شرکت Metabion آلمان ارسال شد. در مرحله بعد به منظور شناسایی جهش $g + 6723G > A$ با استفاده از روش Tetra-primer ARMS PCR یک جفت آغازگر کنترل یا آغازگر بیرونی (Outer-F و Outer-R) و یک جفت آغازگر اختصاصی آلل و یا آغازگر داخلی (Inner-F و Inner-R) طراحی شد. وظیفه جفت آغازگرهای بیرونی بدین صورت می‌باشد که قطعه بزرگ‌تری از DNA ژنومی که حاوی محل جهش G6723A را تکثیر کند و در واقع این جفت آغازگر صحت انجام واکنش PCR را نشان می‌دهد. دو آغازگر اختصاصی آلل (داخلی) در جهت مخالف و در ترکیب با پرایمرهای بیرونی طراحی شده‌اند، به طوری که هم‌زمان هم آلل نوع وحشی و هم آلل جهش‌یافته تکثیر می‌شوند. براساس اصلی که توسط Ye و همکارانش (۲۰۰۱) بیان شده است به منظور افزایش اختصاصیت آغازگرهای درونی، علاوه بر باز ناهمخوان انتهای ۳'، باز ناهمخوان دیگری در موقعیت ۲ از انتهای ۳' در توالی آغازگرهای اختصاصی درونی قرار داده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر که شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی به غلظت ۵۰ نانوگرم، ۲/۵ پیکومول از هر یک از آغازگرهای بیرونی، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای اختصاصی درونی، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس پارس توس (2X Taq PCR Master Mix) و ۹/۲ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر می‌باشد، انجام شد. این واکنش در دستگاه

تکنیک Tetra-primer ARMS PCR با نام کامل Tetra-primer Amplification Refractory Mutation system-polymerase chain reaction روشی مبتنی بر PCR در جهت تشخیص وجود چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژنوم بوده و تکنیکی است که در عین سادگی و دقت بالا، کم هزینه و مقرون به صرفه نیز می‌باشد (Lajin et al. 2012). از این رو این تکنیک می‌تواند جایگزینی مناسب برای روش‌های ذکر شده باشد.

یکی از نژادهای پوستی-گوشتی ایرانی قره گل خراسان می‌باشد که دارای زیست‌بوم بیابانی بوده و با جمعیتی بالغ بر ۱۳۲ هزار رأس در منطقه سرخس یافت می‌شود (Saghi et al. 2022). با وجود مطالعات مختلفی که در جهت شناسایی ژن میوستاتین بر روی نژادهای مختلف ایرانی و خارجی انجام گرفته است تا کنون مطالعه‌ای در خصوص شناسایی جهش $g + 6723G > A$ در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین برای این نژاد صورت نگرفته است. از سوی دیگر عمده این مطالعات از تکنیک‌هایی همچون PCR-RFLP و یا SSCP-PCR بهره برده‌اند.

با توجه به مزایا یاد شده برای روش Tetra Primer ARMS PCR در مطالعه پیش‌رو ابتدا با استفاده از این تکنیک به بررسی وجود و یا عدم وجود جهش $g + 6723G > A$ در ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین در گوسفندان قره‌گل پرداخته شد، سپس دقت این تکنیک با روش PCR-RFLP مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر با هدف شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی ژن میوستاتین ($g + 6723G > A$) با استفاده از تکنیک tetra primer ARMS PCR برای ۱۰ درصد از جامعه در دسترس از نژاد مورد نظر که شامل ۸۶ رأس گوسفند می‌باشد، انجام شد.

در این پژوهش از ۱۰ درصد از گوسفندان قره‌گل ایستگاه اصلاح نژاد سرخس که شامل ۸۶ رأس گوسفند می‌باشد، نمونه‌گیری تصادفی انجام گرفت و ۳ رأس گوسفند نژاد شاروله (هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته) نیز به عنوان گروه شاهد به منظور بهینه سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به روش Tetra-primer ARMS PCR مورد استفاده قرار گرفت. با کمک لوله‌های حاوی EDTA نمونه‌گیری خون با حفظ شرایط

ساعت هضم شد. واکنش در حجم نهایی ۱۵/۵ میکرولیتر شامل، ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۹ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، ۱ میکرولیتر بافر R (10x) و ۵ واحد آنزیم برشی انجام شد.

پس از بهینه سازی واکنش زنجیره ای پلیمرز، DNA ژنومی تمامی ۸۶ نمونه قره گل با هردو روش Tetra-primer ARMS PCR و PCR-RFLP مورد آزمایش قرار گرفتند.

توالی آغازگرهای طراحی شده در روش Tetra-primer ARMS PCR و PCR-RFLP به همراه الگوی ژنوتیپی حاصل از آن‌ها در جدول (۱) آورده شده است.

محصولات حاصل از هضم آنزیمی و تکنیک Tetra-primer ARMS PCR، بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی GelStain (GreenTM (LOT.5B0818-07) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. سپس به منظور مشاهده قطعات تکثیر شده و تعیین ژنوتیپ هر دام، ژل آگارز در دستگاه ژل داگ مدل Gel Doc WiFi ساخت شرکت فرژن قرار داده شد و عکس برداری صورت گرفت.

در پایان به عنوان شاهد از DNA ژنومی ۳ نمونه خون گوسفند نژاد شاروله که شامل یک رأس هموزیگوت وحشی، یک رأس هتروزیگوت و یک رأس هموزیگوت جهش یافته بودند، استفاده شد. لازم به ذکر است که به منظور تأیید صحت ژنوتیپ نمونه‌های شاهد DNA این نمونه‌ها به وسیله یک جفت آغازگر بیرونی تکثیر، به شهر شیراز ارسال و با دستگاه Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzers به روش سنگر^۱ تعیین توالی شدند.

نتایج و بحث

در تکنیک Tetra-primer ARMS PCR، طراحی آغازگرها به گونه ای انجام می شود که بعد از بهینه سازی شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز، در مجموع ۳ قطعه با اندازه متفاوت در محصول PCR قابل مشاهده می باشد که این سه قطعه شامل: یک قطعه بزرگ به طول ۶۷۵ جفت باز که به عنوان قطعه کنترل، قطعه ۴۶۲ جفت بازی به عنوان آلل جهش یافته (A) و قطعه ۲۵۴

ترموسایکلر LifeEco Bioer مدل TC-96/G/H(b)C با برنامه دمایی به شرح زیر انجام گرفت:

مرحله اول واسرشت سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد

مرحله دوم ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه

مرحله سوم دمای اتصال در ۵۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه
مرحله چهارم بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه

مرحله پنجم بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه

از سوی دیگر با بهره گیری از روش PCR-RFLP دقت روش Tetra-primer ARMS PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین صورت که از یک جفت پرایمر بیرونی طراحی شده در روش Tetra-primer ARMS PCR برای روش PCR-RFLP استفاده شد.

برای این تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر که شامل: ۱۰ میکرولیتر مستر میکس پارس توس (2XTaq PCR Master Mix)، ۵ پیکومول از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت و ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم بود، انجام گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمرز با برنامه دمایی به شرح زیر انجام گرفت:

مرحله اول واسرشت سازی اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد

مرحله دوم ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه

مرحله سوم دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه
مرحله سوم بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه

مرحله چهارم مرحله بسط نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه .

در ادامه نیز قطعه تکثیر شده حاصل از واکنش زنجیره پلیمرز با آنزیم محدودکننده HpyCH4IV شرکت Thermo Fisher Scientific ترکیب و در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶

¹ Sanger sequencing

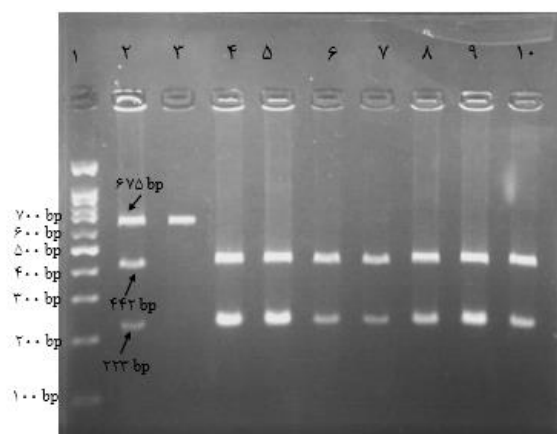
هموزیگوت (AA) تنها قطعه ۶۷۵ جفت‌بازی تکثیر یافتند (شکل ۲). تمامی ۸۶ نمونه قره‌گل با هر دو روش PCR-RFLP و Tetra- primer ARMS PCR تعیین ژنوتیپ شدند و نتایج حاصل از این دو روش با یکدیگر مطابقت کامل داشتند.

به‌منظور اعتبارسنجی آغازگرهای طراحی شده در روش Tetra- primer ARMS PCR، DNA ژنومی نمونه شاهد هتروزیگوت، هموزیگوت وحشی و هموزیگوت جهش‌یافته به‌وسیله یک آغازگر بیرونی تکثیر و بعد از تخلیص برای توالی‌یابی به شهر شیراز ارسال شد و پس از بررسی نتایج توالی‌یابی، بین نتایج آغازگرهای بهینه شده در روش Tetra- primer ARMS PCR، روش PCR-RFLP و نتایج توالی‌یابی مطابقت کامل وجود داشت در ادامه نتایج توالی‌یابی در شکل ۳ نشان داده شده‌است.

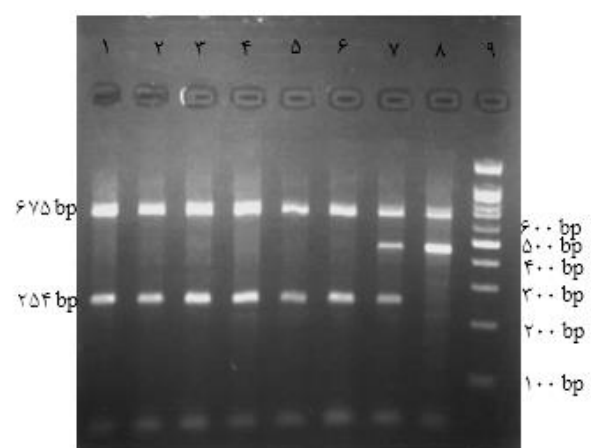
جفت‌بازی به‌عنوان آل وحشی (G) در نظر گرفته می‌شود. بنابراین در دام هتروزیگوت (AG) سه قطعه ۶۷۵، ۴۶۲ و ۲۵۴ جفت‌بازی، در دام هموزیگوت جهش‌یافته (AA) قطعات ۶۷۵ و ۴۶۲ جفت‌بازی و در دام هموزیگوت وحشی (GG) قطعات ۶۷۵ و ۲۵۴ جفت‌بازی قابل مشاهده هستند (شکل ۱). در روش PCR-RFLP قطعه ۶۷۵ جفت‌بازی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از یک جفت آغازگر بیرونی بدون تکثیر قطعات غیراختصاصی به‌خوبی تکثیر پیدا کرد. با بررسی الگوی باندهای مشاهده شده در محصولات PCR حاصل از هضم آنزیمی در ۳ نمونه شاهد، سه قطعه ۶۷۵، ۲۳۳ و ۴۴۲ جفت‌بازی مشاهده شدند. در نمونه با ژنوتیپ وحشی (GG) قطعات ۲۳۳ و ۴۴۲ جفت‌بازی، در نمونه هتروزیگوت (AG) قطعات ۲۳۳، ۴۴۲ و قطعه برش نخورده ۶۷۵ جفت‌بازی و در نمونه با ژنوتیپ

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده به‌منظور شناسایی جهش $A > G + 6723g$ ژن میوستاتین و الگوی ژنوتیپی حاصل از آن‌ها

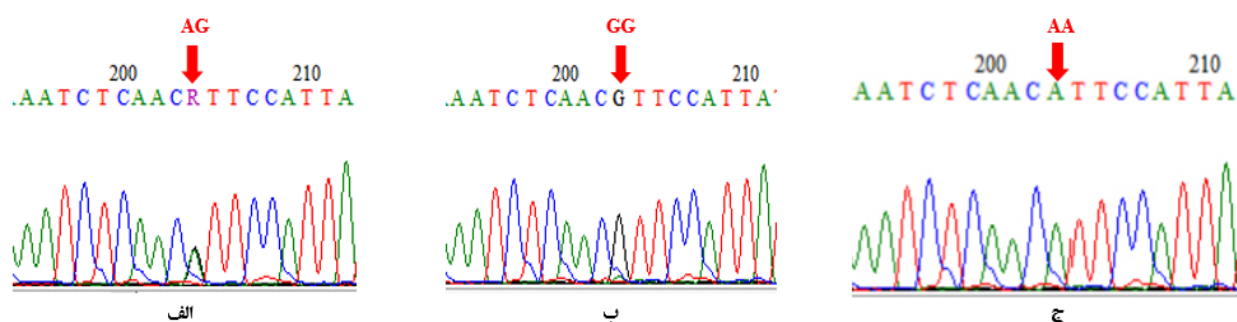
روش	توالی پرایمر	آنزیم محدود کننده	الگوی ژنوتیپ (جفت‌باز)
TETRA-PRIMER ARMS PCR	F(outer):GTATTAAGGCACAAAGACAT	-	۶۷۵(control) / ۴۶۲ (A) / ۲۵۴(G)
	R(outer):AAAGCAACTTGACCAGAACC		
	F(inner): TCATTGTATTCAAATCTCAAGA		
	R(inner): AAGTATTTAAAAATAATGGACC		
PCR-RFLP	F(outer): GTATTAAGGCACAAAGACAT	HpyCH4IV	۶۷۵ (AA) / ۶۷۵ + ۴۴۲ + ۲۳۳(AG) / ۴۴۲ + ۲۳۳(GG)
	R(outer): AAAGCAACTTGACCAGAACC		



شکل ۲- تصویر ژل آگارز هضم آنزیمی ژن میوستاتین با آنزیم HpyCH4IV. چاهک ۱: نشانگر ۱۰۰ bp، چاهک ۲: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هتروزیگوت (AG)، چاهک ۳: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته (AA)، چاهک ۴-۱۰: نمونه‌های قره‌گل با ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (GG)



شکل ۱- تصویر ژل آگارز محصول Tetra-primer ARMS PCR ژن میوستاتین. چاهک‌های ۱ الی ۶: نمونه‌های قره‌گل با ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (GG)، چاهک ۷: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هتروزیگوت (AG)، چاهک ۸: نمونه شاروله شاهد با ژنوتیپ هموزیگوت جهش‌یافته (AA)، چاهک ۹: نشانگر ۱۰۰ bp



شکل ۳- ژنوتیپ هتروزیگوت (شکل الف)، ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (شکل ب)، ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته (شکل ج)

(۲۰۱۵)، بیان نمودند که ۸۰٪ از جمعیت Merino که در مطالعه آنها مورد آزمایش قرار گرفته است حامل دو نسخه از آلل A و ۲۰٪ حامل دو نسخه از آلل G بوده‌اند. Kolenda و همکارانش (۲۰۱۹) مطالعه‌ای را بر روی دو نژاد Kamieniec و Pomeranian انجام دادند و توانستند سه ژنوتیپ AA، AG و GG را مشاهده نمایند در نهایت نیز با بررسی‌های لازم فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی در دو نژاد مورد بررسی را متفاوت گزارش نمودند. از سوی دیگر اثر معنی‌دار آلل A را بر وزن دام در روز ۵۶ و افزایش وزن روزانه را تنها در نژاد Kamieniec مشاهده کردند. با توجه به تمامی مطالعات انجام شده، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که فراوانی آلل A در نژادهای مختلف گوسفند متفاوت می‌باشد و این موضوع نشان‌دهنده این است که حضور آلل A و تعداد کپی‌های هر آلل به نژاد گوسفند بستگی دارد. بنابراین، با توجه به تأثیراتی که این آلل بر روی صفات رشدی دارد، بررسی این موضوع که آیا نژادهای بومی ایران دارای آلل A هستند یا خیر، حائز اهمیت است.

در مطالعه حاضر تکنیک Tetra-primer ARMS PCR جهت تعیین ژنوتیپ چندشکلی $A > 6723G + g$ ژن میوستاتین در گوسفند قره‌گل به صورت کامل انجام شد و به منظور ارزیابی صحت روش Tetra-primer ARMS PCR در تعیین ژنوتیپ چندشکلی تک نوکلئوتیدی موردنظر، روش PCR-RFLP نیز انجام و تطابق ۱۰۰ درصدی بین هر دو روش مشاهده شد. Aboelhassan و همکاران (۲۰۲۱) نیز از روش Tetra-primer ARMS PCR در تعیین ژنوتیپ ۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی

تمامی نمونه‌های مورد بررسی برای چندشکلی تک نوکلئوتیدی دارای آلل G بوده و آلل جهش‌یافته‌ی A در هیچ یک از نمونه مشاهده نشد. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که فراوانی آلل وحشی (G) و آلل جهش‌یافته (A) به ترتیب ۱۰۰ و صفر درصد می‌باشد. عدم حضور آلل A در سه نژاد ایرانی شال، زل و زندی (Yonus et al. 2011)، گوسفند مریوس لهستانی (Grochowska et al. 2019) و نژادهای کوپ ورث، بلک سافولک، مریوس، سات داون، انگلیش لیستر، پل وارث، رامنی و تبتی (Kijas et al. 2007; Hadjipavlou et al. 2008) نیز گزارش شده است. Han و همکارانش (۲۰۱۰) نیز فراوانی آلل جهش‌یافته A در گوسفندان رامنی نیوزلند (New Zealand (NZ) Romney) بررسی نموده و این فراوانی را پایین و برابر با ۲/۷۹٪ گزارش نمودند (Han et al. 2010) فراوانی پایین آلل جهش‌یافته A در نژادهای وایت سافولک، پل درست و لینکلن نیز به ترتیب ۹/۳، ۱۲/۵ و ۱۲/۵٪ گزارش شده است (Kijas et al. 2007). در مطالعه دیگری نیز فراوانی آلل جهش‌یافته A در نژاد شاروله در سطح متوسط (۳۰ درصد) گزارش شده و با بررسی‌های لازم نشان داده شد که ارتباط معنی‌داری بین عمق ماهیچه و این جهش وجود دارد (Hadjipavlou et al. 2008). از سوی دیگر Clop و همکاران (۲۰۰۶)، فراوانی آلل جهش‌یافته A در جمعیت گوسفند تکسل نزدیک به تثبیت (۹۹٪) گزارش کرده‌اند و پیشنهاد کردند که این جهش ممکن است خاص آن نژاد باشد (Clop et al. 2006). مطالعه دیگری که بر روی گوسفندان East Frisian انجام شده است نشان داد که فراوانی آلل A در این گوسفندان نیز بالا (۶۳٪) می‌باشد (Bignell et al. 2010). Trukhachev و همکاران

تبدیل شده است. اصل روش tetra-primer ARMS PCR بدین صورت می باشد که Taq DNA پلیمرز فاقد فعالیت اگزونوکلاز ۳'←۵' است، بنابراین نرخ بسط و گسترش در انتهای ۳' پرایمر ناهمخوان (mismatched primer) کندتر از پرایمر با انتهای ۳' معمولی می باشد و یا اینکه نمی تواند بسط و گسترش پیدا کند.

با ارزیابی مطالعه حاضر و مطالعات مختلف ذکر شده می توان نتیجه گیری نمود که روش توسعه یافته tetra-primer ARMS PCR از صحت و دقت کافی جهت شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی برخوردار است و ساده تر از روش PCR-RFLP می باشد. از سوی دیگر روش توسعه یافته مقرون به صرفه و به اندازه کافی سریع می باشد و این ویژگی این امکان را در اختیار ما قرار می دهد که بتوانیم در مدت زمانی کوتاه تعداد زیادی از نمونه ها را مورد آزمایش قرار دهیم. علاوه بر این روش tetra-primer ARMS PCR باعث حذف آنزیم برشی می شود و از این رو می تواند اثرات برش آنزیم، به ویژه هضم ناقص آنزیم را به حداقل برساند.

روش tetra-primer ARMS PCR مزایای زیادی نسبت به PCR-RFLP و تعیین توالی DNA به لحاظ هزینه، صرف وقت را دارا می باشد و از این رو می توان حتی در آزمایشگاه هایی با تجهیزات معمولی آن را اجرایی نمود (Etlik et al. 2011).

به طور خلاصه در بین روش های مختلف برای تشخیص SNP ها، روش tetra-primer ARMS PCR یک روش آسان، سریع، قابل اعتماد و ارزان است.

شناخته شده ژن فاکتور رشد و تمایز ۹ (GDF9/FecG) استفاده کردند و تمامی جهش ها با موفقیت تکثیر شدند.

Niu و همکاران (۲۰۲۱) به منظور شناسایی جهش ژن BMP15 در گوسفند، از روش tetra-primer ARMS PCR استفاده نمودند. براساس نتیجه مطالعه آن ها هر سه نوع ژنوتیپ هموزیگوت وحشی، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش یافته در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد.

نتایج بررسی از چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن Boule در بز با استفاده از روش tetra-primer ARMS PCR که توسط Song و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد نیز بیانگر دقت و موفقیت بالای این روش در تعیین ژنوتیپ چندشکلی های تک نوکلئوتیدی است. مطالعه دیگری با هدف تعیین ژنوتیپ جهش تک نوکلئوتیدی V397I ژن GDF9 انجام شد که در این مطالعه نیز روش مورد استفاده tetra-primer ARMS PCR می باشد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه جهش مورد مطالعه با موفقیت تکثیر شد (Mamutse et al. 2022).

محمدی و همکاران (۲۰۲۲) نیز از روش tetra-primer ARMS PCR برای شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی ژن FecB در گوسفند بهره بردند و تطابق کامل را بین نتایج حاصل از روش توسعه یافته آن ها با نتایج روش PCR-RFLP و تعیین توالی گزارش نمودند (Mohammadi et al. 2022).

از زمانی که روش tetra-primer ARMS PCR با جزئیات توسط Ye و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شده است، این روش به یکی از متداول ترین روش های مورد استفاده برای تعیین ژنوتیپ SNP ها

منابع

Aboelhassan DM, Darwish AM, Ali NI, Ghaly IS, Farag IM (2021) A study on mutation points of GDF9 gene and their association with prolificacy in Egyptian small ruminants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19:1-11.

Bignell CW, Malau-Aduli AEO, Nichols PD, McCulloch R, Kijas J W (2010) East Friesian sheep carry a Myostatin allele known to cause muscle hypertrophy in other breeds. *Animal genetics* 41:445-446.

Boman IA, Klemetsdal G, Blichfeldt T, Nafstad O, Våge DI (2009) A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN) affects carcass conformation

and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Animal genetics* 40:418-422.

Boman IA, Våge DI (2009) An insertion in the coding region of the myostatin (MSTN) gene affects carcass conformation and fatness in the Norwegian Spælsau (*Ovis aries*). *BMC Research Notes* 2:1-5.

Boman IA, Klemetsdal G, Nafstad O, Blichfeldt T, Våge DI (2010) Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Genetics Selection Evolution* 42:1-7.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Georges M (2006) A mutation creating a potential

- illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature genetics* 38:813-818.
- Etlík O, Koksál V, Arican-Baris ST, Baris I (2011). Development and validation of a cost-effective in-house method, tetra-primer ARMS PCR assay, in genotyping of seven clinically important point mutations. *Molecular and cellular probes* 25:177-181
- Farhadian M, Hashemi A (2016) Molecular characterization and phylogeny based analysis of intron i sequence of myostatin (MSTN) gene in Iranian Makuei sheep breed. *Annals of Animal Science* 16:1007.
- Gan SQ, Du Z, Liu SR., Yang YL, Shen M, Wang XH, ... Li, N (2008) Association of SNP haplotypes at the myostatin gene with muscular hypertrophy in sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 21:928-935.
- Grobet L, Martin LJR, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Georges M (1997) A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature genetics* 17:71-74
- Grochowska E, Borys B, Mroczkowski S (2019) Effects of intronic SNPs in the myostatin gene on growth and carcass traits in colored Polish merino sheep. *Genes* 11:2.
- Guan F, Shi G, Wan P, Dai R, Tang H, Wang H, Luo Y (2014) Development of cost-effective tetra-ARMS PCR for detection of FecB genotype in sheep. *Animal Science Papers and Reports* 32:229-237.
- Hadjipavlou G, Matika O, Clop A, Bishop SC (2008) Two single nucleotide polymorphisms in the myostatin (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. *Animal genetics* 39:346-353.
- Han J, Zhou H, Forrest RH, Sedcole JR, Frampton CM, Hickford JGH (2010) Effect of myostatin (MSTN) g+6223G> A on production and carcass traits in New Zealand Romney sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 23:863-866.
- Kijas JW, McCulloch R, Edwards JEH, Oddy VH, Lee SH, Van der Werf J (2007) Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. *BMC genetics* 8:1-11.
- Kolenda M, Grochowska E, Milewski S, Mroczkowski, S (2019) The association between the polymorphism in the myostatin gene and growth traits in Kamieniec and Pomeranian sheep breeds. *Small Ruminant Research* 177:29-35.
- Lajin B, Alachkar A, Sakur AA (2012) Triplex tetra-primer ARMS-PCR method for the simultaneous detection of MTHFR c. 677C> T and c. 1298A> C, and MTRR c. 66A> G polymorphisms of the folate-homocysteine metabolic pathway. *Molecular and cellular probes* 26:16-20.
- Mamutse J, Purwantini D, Susanto A, Sodiq A (2022, March). Determining the Polymorphism of V397I SNP of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene in Indonesian Saanen Goats. In International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021) (pp. 155-158). Atlantis Press.
- Masri AY, Lambe NR, Macfarlane JM, Brotherstone S, Haresign W, Bünger L (2011) Evaluating the effects of a single copy of a mutation in the myostatin gene (c.* 1232 G> A) on carcass traits in crossbred lambs. *Meat science* 87:412-418.
- Marcq F (1998) El Barkouki S, Elsen JM, Grobet L, Royo L, Leroy PL, Georges M. Investigating the role of myostatin in the determinism of double muscling characterizing Belgian Texel sheep. *Proc XXVIth Intern Con! Anim Genet Auckland New Zealand* 75.
- Marcq F, Larzul C, Marot V, Bouix J, Eychenne F, Laville E, Elsen JM (2002) Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in a Texel× Romanov intercross. *Proc 7th World Congr Genet Appl Livest Prod Montpellier* 19-23.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature* 387:83-90.
- Miar Y, Salehi A, Kolbehdari D, Aleyasin, SA (2014) Application of myostatin in sheep breeding programs: A review. *Molecular Biology Research Communications* 3:33.
- Mohammadi F, Saghi DA, Simaie Soltani L (2022) Detection of FecB gene polymorphisms in sheep using rapid and low-cost tetra-ARMS PCR. *Animal Sciences Journal* 34:147-156.
- Saghi DA, Banabazi MA, Saghi R, Ashkanifar R, (2022) Karakul sheep. *Agricultural Research, Education and Extension Organization* 5-58
- Song X, Li J, Fei P, Zhang X, Pan C, Chen H, Lan X (2019) Polymorphisms within the boule gene detected by tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (t-arms-pcr) are significantly associated with goat litter size. *Animals* 9:910.
- Trukhachev V, Belyaev V, Kvochko A, Kulichenko A, Kovalev D, Pisarenko S, Krivoruchko A (2015) Myostatin gene (MSTN) polymorphism with a negative effect on meat productivity in Dzhalginsky Merino sheep breed. *Journal of BioScience and Biotechnology* 4(2).
- Niu ZG, Qin J, Jiang Y, Ding XD, Ding YG, Tang S, Shi HC (2021) The Identification of Mutation in BMP15 Gene Associated with Litter Size in Xinjiang Cele Black Sheep. *Animals* 11:668.
- Ye S, Dhillion S, Ke X, Collins AR and Day IN (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research* 29:e88-e88
- Younus Miar, A Reza Salehi, SA Aleyasin, Somayeh Raouf zadeh (2011) Study of polymorphism in myostatin gene in Chaal, Zel and Zandi Iranian sheep Breeds 13:40-33 (in farsi)
- Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Flicek P (2018) Ensembl. *Nucleic acids research* 46:D754-D761.