مجله تولیدات دامی، دوره ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، ص ۴۰-۳۳

بررسی چندشکلی ژن میوستاتین در سه نژاد گوسفند ایرانی شال، زل و زندی

یونس میار [۱]، عبدالرضا صالحی [*۲]، سید احمد آل یاسین [۳] و سمیه رئوف‌زاده [۴]

(E-mail:arsalehi@ut.ac.ir)

تاریخ وصول: ۸۷/۱۲/۲۰ و تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۵

چکیده

میوستاتین (MSTN) که عامل رشد و تمایز شماره ۸ [۵] (GDF8) نیز نامیده می‌شود از گروه عوامل تغییر رشد بتا [۶] (TGFβ) می‌باشد که در کاهش رشد در پستانداران نقش دارد. یک چند شکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در ناحیه ترجمه نشده ۳' (3'UTR) ژن میوستاتین به عنوان عامل هایپرتروفی [۷] عضله در کروموزوم شماره ۲ (OAR2) نژادهای گوسفند اروپایی تشخیص داده شده است. در این تحقیق، برای شناسایی چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) ژن میوستاتین در نژادهای گوسفند شال، زندی و زل به‌ترتیب از ۲۰، ۲۴ و ۱۷ رأس بره خون‌گیری شد. از نمونه خون بره‌ها DNA استخراج و برای تکثیر قطعه ۱۰۰۳ جفت بازی ژن موردنظر PCR انجام و از روش توالی‌یابی برای تشخیص چندشکلی استفاده شد. با مقایسه توالی قطعه موردنظر با توالی موجود در بانک ژن در ناحیه ترجمه نشده ۳' (3'UTR) مشخص شد که کلیه گوسفندان دارای آلل G هستند که در ایجاد فنوتیپ عضله مضاعف نقش ندارد.

کلمات کلیدی: چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، ژن میوستاتین، گوسفند دنبه‌دار، گوسفند زل، PCR

---

1 - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت – ایران

۲ – دانشیار گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت – ایران **(نویسنده مسئول مکاتبات [*])**

۳ – استادیار گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران – ایران

۴ – کارشناس ارشد گروه ژنتیک پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران – ایران

5 - Growth and differentiation factor-8

6 - Transforming growth factor (TGF)-β superfamily

7 - Hypertrophy

مقدمه

برای تعیین درصد اجزای لاشه گوسفند (عضله و چربی) لازم است حیوان کشتار شود، لذا این عمل به‌طور غیرمستقیم و با استفاده از روشهای اولتراسونیک[1] و یا توموگرافی رایانه‌ای[2] انجام می‌شود، ولی هزینه انجام این روشها زیاد بوده و نیاز به امکانات و دستگاه‌های خاص می‌باشد. از طرفی با تشخیص ژن‌های بزرگ اثر[3] و نوکلئوتیدهای کنترل‌کننده صفت کمی[4] (QTN) مؤثر بر صفات عضله و لاشه می‌توان به بهبود صفت از طریق به‌کارگیری اطلاعات ژنتیکی (MAS) نیز اقدام نمود (۷).

تحقیقاتی در مورد ژن‌های بزرگ اثر مربوط به عضله و ترکیب چربی مانند کالیپیج[5]، ژن‌های عضله راسته[6] (REM یا کارول[7]) و ژن میوستاتین انجام گرفته است (۵، ۹ و ۱۴). قسمتی از کروموزوم ۲ گوسفند[8] (OAR2) که شامل ژن میوستاتین می‌باشد، دارای اثر عمده بر رشد عضله در گوسفند نژاد تکسل بلژیک و رشد عضله و عمق چربی گوسفند نژاد تکسل نیوزیلند، انگلستان و نژاد شاروله[9] می‌باشد (۸ و ۱۲). با تجزیه و تحلیل صفات زیادی در گوسفند نژاد تکسل نیوزیلندی آشکار شد که قوی‌ترین ارتباط برای صفات عضله و چربی در قسمت پا[10] قرار دارد (۸). همچنین در بررسی گوسفندان تکسل بلژیک با استفاده از کاربرد طرح F2 و تلاقی برگشتی[11] با میش‌های رومانف، یک QTL نیز کشف گردید که در تطابق با نتایج قبلی بود (۱۱). در یک تحقیق، متوالی تمام ناحیه کدکننده ژن میوستاتین (CDs) در گوسفند تکسل عضله مضاعف تعیین و مشخص شد که توالی آن با گروه شاهد (رومانف معمولی) تفاوتی ندارد (۱۲). این موضوع نشان داد که چندشکلی مؤثر در ایجاد عضله مضاعف ممکن است در بیرون از نواحی کدکننده و در نواحی تنظیم‌کننده و یا در ژنی پیوسته و بسیار نزدیک به میوستاتین باشد (۷ و ۸).

با بررسی ۱۰/۵ کیلو باز از DNA ژنومیک که شامل GDF8 بود (DQ530260) دو چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی دوآللی مشخص گردید که تفاوت فراوانی آللی آن‌ها در بین گوسفندان تکسل عضله مضاعف و گروه شاهد معنی‌دار بود (۴). نخستین چندشکلی (g. - 2449G>C) در ۲/۵ کیلو باز بالادست جایگاه شروع رونویسی میوستاتین بود. پس از تشخیص این چندشکلی، اثر آن بر عملکرد GDF8 (رشد عضله و چربی) بررسی نگردید. چندشکلی دوم (g. + 6223G>A) در ناحیه ترجمه نشده (3'UTR) قرار داشت (۷). در یک مطالعه دیگر، این جهش در سطح مولکولی در ناحیه 3'UTR تشخیص داده شد (۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که حضور آلل 6223A باعث ایجاد جایگاه نادرست اتصال miRNA[12] های ۱ و ۲۰۶ می‌گردد که در عضلات بدن به وفور وجود دارد و با اتصال به mRNA و ممانعت از ترجمه میسوتاتین منجر به فنوتیپ عضله مضاعف می‌شود. miRNA ها مولکول‌های RNA تک‌رشته‌ای با طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید هستند که تظاهر ژن را با اتصال به mRNA ها تنظیم می‌کنندبنابراین، به نظر می‌رسد که آلل A به عنوان عامل اصلی ژنتیکی افزایش عضله در گوسفندان تکسل عمل می‌کند و به عنوان نوکلئوتید کنترل‌کننده صفت کمی درنظر گرفته می‌شود (۷).

تاکنون نوکلئوتید کنترل‌کننده صفت کمی ژن میوستاتین که در 3'UTR قرار دارد در گوسفندهای ایرانی بررسی نشده است، ولی در جایگاه‌های دیگر در گوسفندان نژاد بلوچی ایران بخشی

1 - Ultrasonic scanning
2 - Computer tomography
3 - Major gene
4 - Quantitative trait nucleotides
5 - Callipyge
6 - Rib-Eye muscling
7 - Carwell
8 - Ovis Aries Chromosome 2
9 - Charollais
10 - Leg
11 - Backcross
12 - MicroRNA

از اینترون اول و دوم میوستاتین بررسی و مشخص شد که دارای چندشکلی بوده و ژنوتیپ‌های AB و BB با ارزش اصلاحی وزن تولد همبستگی دارد. همچنین، در گوسفندان نژاد سنجابی ایران نیز چندشکلی دیگری بررسی شد که فراوانی ژنوتیپ‌های ژن میوستاتین MM، Mm و mm به‌ترتیب ۲/۰، ۱/۳۳ و ۹۶/۷۶ درصد تشخیص داده شد و فراوانی آللی برای آلل‌های M و m نیز به‌ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۹۷ برآورد گردید (۲ و ۳).

نژاد زندی بومی منطقه ورامین و قم می‌باشد و جثه متوسطی دارد. نژاد شال بومی استان قزوین می‌باشد و از نژادهای سنگین وزن، بزرگ جثه و چند قلوزا است و نژاد زل بومی استان مازندران بوده و از نژادهای کوچک جثه و بی‌دنبه و دم‌دار ایران محسوب می شود (۱). در این تحقیق، وجود نوکلئوتید کنترل‌کننده صفت کمی مربوط به عضله در ژن میوستاتین در نژادهای گوسفند شال، زل و زندی بررسی شد تا در صورت همبستگی ژن با صفات رشد و ترکیب لاشه، در برنامه‌های انتخاب به کمک نشان‌گر[1] استفاده شود.

مواد و روشها

از ورید وداج بره‌های سه نژاد شال (۲۰ رأس)، زل (۱۷ رأس) و زندی (۲۴ رأس) موجود در مزرعه آموزشی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران خون‌گیری و به آزمایشگاه گروه ژنتیک پزشکی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری منتقل گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت DIAtom DNA Prep100 انجام شد. برای تعیین غلظت DNA استخراج شده از ۱۰۰ میکرولیتر نمونه خون از روش مقایسه الگوی DNA استخراج شده با مارکر غلظتی از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد و ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت استفاده شد (شکل ۱). برای تعیین چندشکلی تک نوکلئوتیدی g. + 6223G>A از یک جفت آغازگر براساس توالی ژنومی گوسفند (DQ530260[2]) که قبلاً طراحی شده بود، استفاده شد (شکل ۲) (۴).

این آغازگر یک قطعه دارای ۱۰۰۳ جفت باز از ناحیه 3'UTR ژن میوستاتین گوسفند را تکثیر می‌کند. واکنش PCR[3] در حجم ۲۵ میکرولیتر با محتویات یک میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰X، ۰/۵ میکرولیتر داکسی نوکلئوتیدها با غلظت ۱۰ میکرومولار، یک میکرولیتر کلرید منیزیم با غلظت ۵۰ میکرومولار، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز با غلظت پنج واحد در هر میکرولیتر و ۱۸/۸ میکرولیتر آب انجام شد. واکنش با برنامه حرارت ۹۵°C برای واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه و تعداد ۳۰ چرخه در دمای ۹۵°C برای واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه، دمای ۵۵°C به منظور اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲°C برای بسط آغازگرها به مدت یک دقیقه و برای بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت پنج دقیقه در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز یک درصد و ولتاژ ۸۰ به مدت یک ساعت استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. چون هدف تعیین چندشکلی تک نوکلئوتیدی با استفاده از روش توالی‌یابی بود، خالص کردن کلیه نمونه‌های حاصل از PCR و تعیین توالی[4] ۶ قطعه موردنظر توسط شرکت ماکروژن[5] کشور کره جنوبی انجام گرفت. برای مقایسه و مطابقت توالی‌ها با یکدیگر و با توالی مرجع در سایت NCBI از نرم‌افزار SeqMan (DNASTAR) استفاده شد.

1 - Marker assisted selection (MAS)

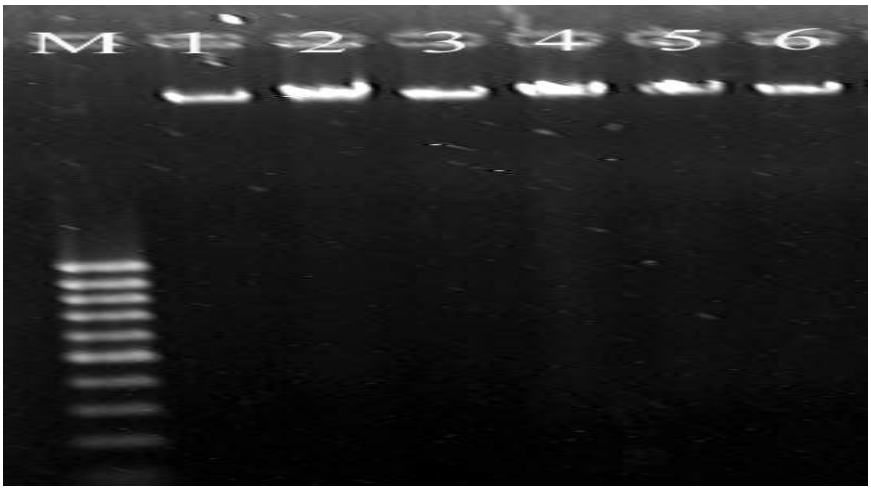
2 - Accession number

3 - Polymerase chain reaction

4 - Sequencing

5 - Macrogene

6 - National Center for Biotechnology Information



شکل ۱ – DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد و M مارکر غلظتی (۱۰۰ جفت باز)

آغازگر پیشرو	**'C -3 GGA TAA CAG TTA TTT ATA GGT 5'- TTT**
آغازگر پسرو	**5'- TAA ATA GTG TTG CAC TTA AGG ATT C -3'**

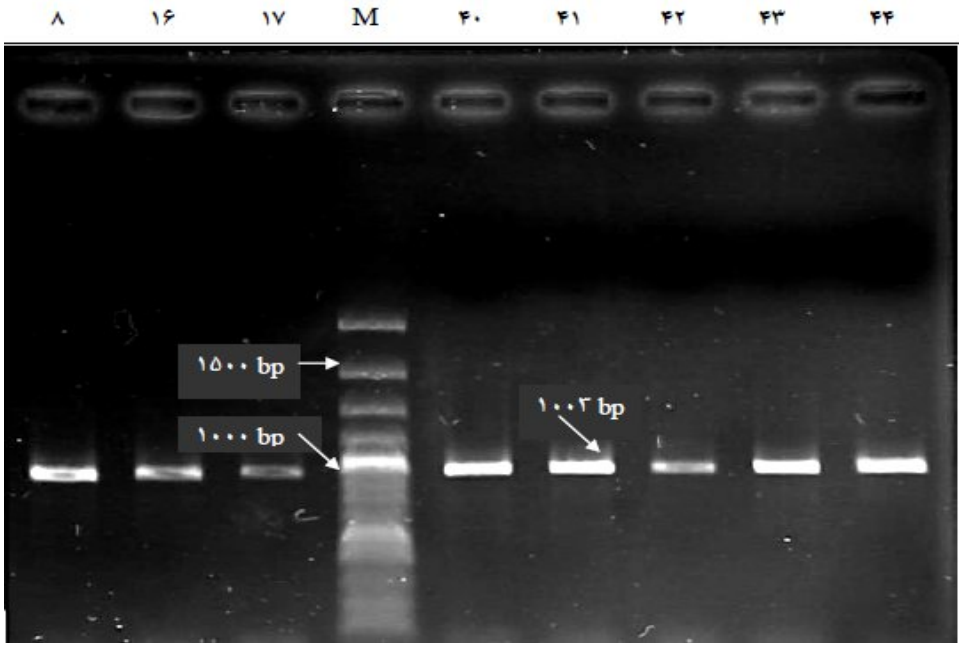
شکل ۲ – توالی‌های آغازگر پیشرو و پسرو

نتایج و بحث

قطعه دارای ۱۰۰۳ جفت باز از ژن میوستاتین با واکنش زنجیره پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، برنامه حرارتی مناسب بدون قطعات غیراختصاصی تکثیر شد و با نتایج دیگر محققین مطابقت داشت (شکل ۳) (۴ و ۷).

عملیات تعیین توالی نشان داد که کلیه نمونه‌ها برای چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی موردنظر دارای آلل G بودند (شکل ۴). بدین‌ترتیب فراوانی آلل وحشی (G)، ۱۰۰ و آلل جهش یافته (A)، صفر درصد بود که عدم نوکلئوتید کنترل‌کننده صفت کمی (QTN) یا آلل A در جمعیت مورد را نشان می‌دهد و مشابه با برخی تحقیقات دیگر می‌باشد (۴ و ۶). این امر نشان می‌دهد که توالی ژن میوستاتین در این نژادها بسیار حفاظت شده[1] است. تحقیقات دیگر نیز نشان داده‌اند که ژن میوستاتین در گونه‌های مختلف بسیار محافظت شده است یعنی کمتر دچار جهش و تغییر نوکلئوتیدی شده است (۱۰ و ۱۳). آغازگرهایی که براساس ژن میوستاتین گاوی طراحی و سنتز شده بودند برای ژن میوستاتین گوسفند بلوچی نیز تکثیر شده‌اند. این امر دلیل بر محافظت شده بودن توالی ژن میوستاتین است (۳). فراوانی آلل جهش یافته A در سایر نژادهای گوسفند نظیر رومانف، سافولک، مرینوس، لدو فرانس، بلانک دوسنترال کوپ ورث، لیستر، رامنی، سات دان، تیبتان و بریچون دوچر نیز صفر درصد گزارش شده است. فراوانی آلل جهش یافته A در نژادهای لینکلن، پل درست، تکسل و وایت سافولک به‌ترتیب ۱۲/۵، ۱۲/۵، ۹۴/۶ و ۹/۳ درصد گزارش شده است (۴ ، ۷ و ۱۰).

1 - Conservative



شکل ۳ – محصولات PCR ناحیه 3'UTR ژن GDF8 با ۱۰۰۳ جفت باز روی ژل آگارز یک درصد و M مارکر غلظتی (۱۰۰ جفت باز)

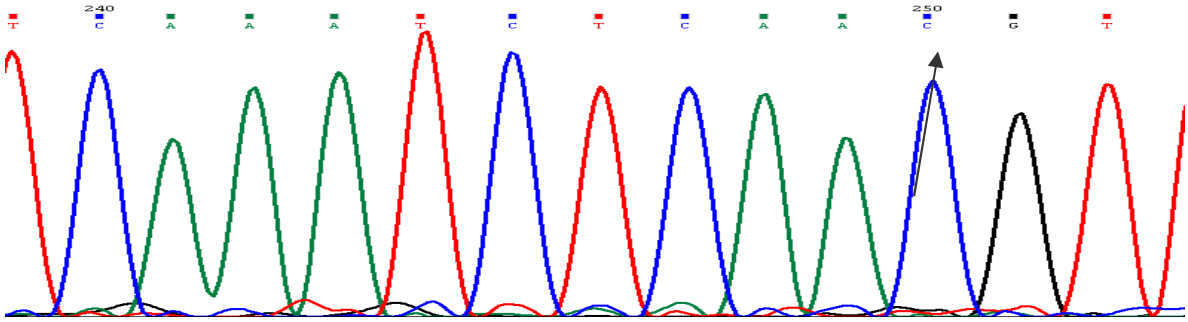
آلل A از ترجمه میوستاتین جلوگیری کرده و منجر به افزایش توده عضلانی و رشد می‌گردد. لذا به عنوان متغیر ژنتیکی اصلی افزایش عضله در گوسفندان و نوکلئوتید کنترل‌کننده صفت کمی درنظر گرفته می‌شود که در صورت مشاهده می‌توان از آن به عنوان نشانگر مناسبی در برنامه‌های انتخاب استفاده کرد (۴ و ۷).

فنوتیپ عضله مضاعف در نژادهای گوسفند شال، زل و زندی وجود ندارد، اما عدم مشاهده این فنوتیپ دلیلی بر عدم آلل A نمی‌باشد. به عنوان مثال، در نژادهای لینکلن، پل درست و وایت سافولک که این عضله مضاعف نیستند ولی دارای آلل A هستند (۱۰). اثر آلل A در این سه نژاد بر افزایش عضله معنی‌دار است (۱۰).

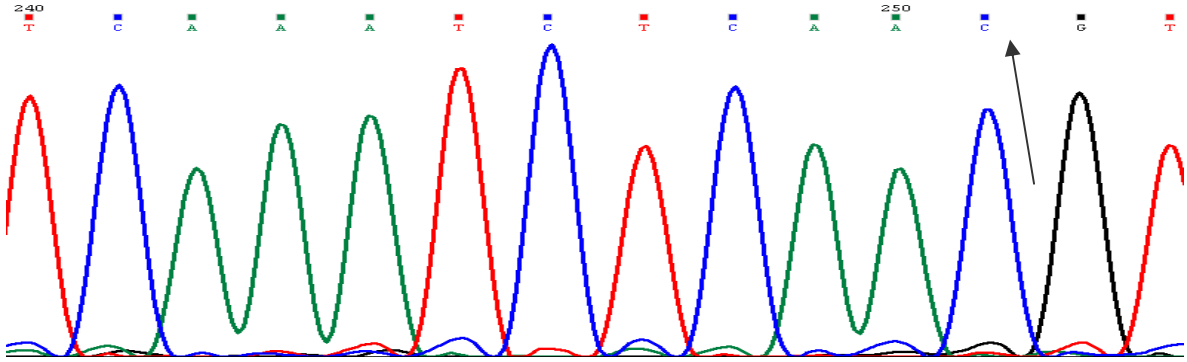
بخش‌های دیگر ژن میوستاتین در گوسفندان بلوچی و سنجابی ایران مطالعه شده است. ارتباط ارزش اصلاحی وزن تولد گوسفندان بلوچی با ژنوتیپ‌های AB و BB ژن میوستاتین معنی‌دار بود ($P<$ ۰/۰۵) (۳). در نژاد سنجابی فقط بررسی‌های مولکولی انجام شده و مطالعات همبستگی ژن میوستاتین انجام نشده است (۲). براساس اطلاعات موجود، تاکنون در مورد این نوکلئوتید کنترل‌کننده صفت کمی در ژن میوستاتین نژادهای مختلف گوسفند ایرانی تحقیقی انجام نشده است و نمی‌توان این نتایج را با سایر نژادهای ایران مقایسه نمود.

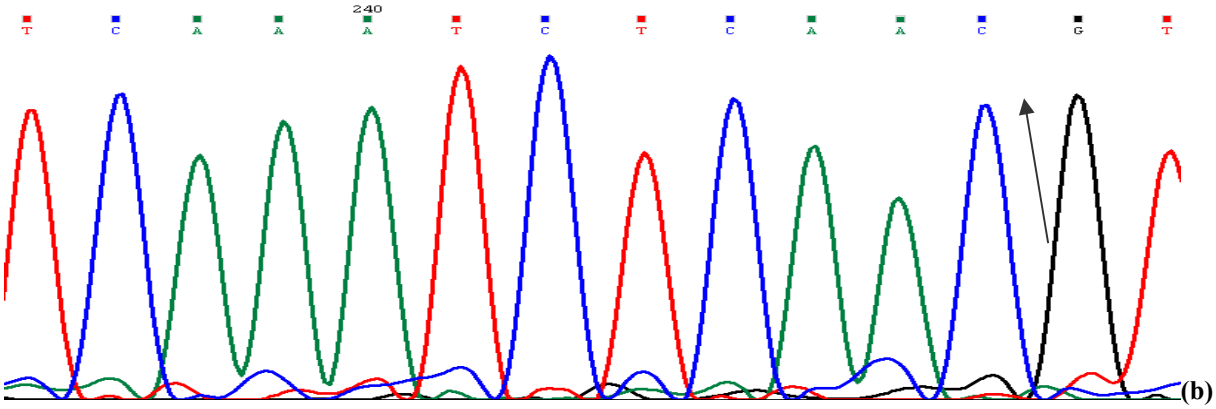
تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری قدردانی می‌گردد.



(a)





(b)

(c)

CAAATCTCAAC(A/G)TTCCAATA

(d)

شکل ۴ – مقایسه توالی‌های 3'UTR ژن میوستاتین در نژادهای گوسفند زندی (a)، زل (b) و شال (c) با توالی مرجع بانک ژن (d) (۱) و فلش مربوط به آلل وحشی

منابع مورد استفاده

۱ . خالداری م (۱۳۸۷) پرورش بز و گوسفند چاپ دوم، انتشارات جهاددانشگاهی، تهران، ۵۶۰ ص.

۲ . صوفی ب.، شجاعیان ک.، محمدآبادی م.، باقی‌زاده ا. و فراستی س (۱۳۸۶) چندشکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی به کمک نشانگرهای مولکولی، پنجمین کنگره ملی بیوتکنولوژی ایران، تهران.

۳ . مسعودی ا.، عمرانی ح.، عباسی ا.، نجاتی جوارمی ا.، کونیدا ت.، فرهنگ خ.، اسماعیل خانیان س. و ضیایی ف (۱۳۸۴) بررسی چندشکلی ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات رشد در گوسفند بلوچی با روش PCR-SSCP، پنجمین کنگره ملی بیوتکنولوژی ایران، تهران.

4 . Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C and Georges M (2006) A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the *myostatin* gene affects muscularity in sheep. Nat Genet. 38: 813-818.

5 . Cockett NE, Jackson SP, Shay TL, Nielsen D, Moore SS, Steele MR, Barendse W, Green RD and Georges M (1994) Chromosomal localization of the callipyge gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine markers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91: 3019-3023.

6 . Gan SQ, Du Z, Liu SR, Yang YL, Shen M, Wang XH, Yin JL, Hu XX, Fei J, Fan JJ, Wang JH, He QH, Zhang YS and Li N (2008) Association of SNP haplotypes at the myostatin gene with muscular hypertrophy in sheep. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 21(7): 928-935.

7 . Hadjipavlou G, Matika O, Clop A and Bishop SC (2008) Two single nucleotide polymorphisms in the *myostatin* (GDF8) gene have significant association with muscle depth of commercial Charollais sheep. Animal Genetic. 3: 346-353.

8 . Johnson PL, McEwan JC, Dodds KG, Purchas RW and Blair HT (2005) A directed search in the region of GDF8 for quantitative trait loci affecting carcass traits in Texel sheep. Animal Science 83: 1988-2000.

9 . Kambadur R, Sharma M, Smith TP and Bass JJ (1997) Mutations in *myostatin* (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Research 7: 910-916.

10 . Kijas JM, McCulloch R, Hocking Edwards JE, Oddy VH, Lee SH and van der Werf J (2007) Evidence for multiple alleles effecting muscling and fatness at the ovine GDF8 locus. BMC Genetics. URL: http://www.biomedcentral.com/1471-2156/8/80. NCBI

11 . Laville E, Bouix J, Sayd T, Bibe B, Elsen JM, Larzul C, Eychenne F, Marcq F and Georges M (2004) Effects of a quantitative trait locus for muscle hypertrophy from Belgian Texel sheep on carcass conformation and muscularity. Anim. Sci. 82: 3128-3137.

12 . Marcq F, Larzul C, Marot V, Bouix J, Eychenne F, Laville E, Bibe´ B, Leroy PL, Georges M and Elsen JM (2002) Preliminary results of a whole-genome scan targeting QTL for carcass traits in a Texel × Romanov intercross. Proceedings of the 7th World Congress on Applied Livestock Production, Montpellier, Pp. 19-23. August, France. 02-14. (Abst.)

13 . McPherron AC, Lawler AM and Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. Nature 387: 83-90.

14 . Nicoll GB, Burkin HR, Broad TE, Jopson NB, Greer GJ, Bain WE, Wright CS, Dodds KG, Fennessy PF and McEwan JC (1998) Genetic linkage of microsatellite markers to the Carwell locus for rib-eye muscling in sheep. Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 26: 529-532.

Study of polymorphism in *myostatin* gene in Chaal, Zel and Zandi Iranian sheep Breeds

Y. Miar [1], A. R. Salehi [2*], S. A. AleYasin [3] and S. Raoufzadeh [4]

(E-mail:arsalehi@ut.ac.ir)

Abstract

Myostatin (MSTN), also known as growth and differentiation factor-8 (GDF8), is a member of the transforming growth factor beta (TGF-β) superfamily that decreases growth in mammals. A single nucleotide polymorphism (SNP) in the myostatin (GDF8) 3'UTR of OAR2 has been known as responsible for muscular hypertrophy in foreign breeds. In this study, in order to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) in the myostatin (GDF8) gene, blood samples were collected from a population set of Chaal (n = 20), Zandi (n = 24) and Zel sheep (n = 17) lambs. Genomic DNA was extracted from the whole blood samples and polymerase chain reaction (PCR) was carried out in order to amplify a 1003 bp fragment of the target gene and PCR products sequenced to detect single nucleotide polymorphism (SNP). Comparison of the sequence of the target gene in Gene Bank with our results of sequencing showed all animals had the g. + 6223G allele in the 3'UTR of myostatin which do not cause double muscle (DM) phenotype.

Keywords: Fat-tailed sheep, Myostatin, PCR, Single Nucleotide Polymorphisms, Zel sheep

1 - M.Sc., Department of Animal and Poultry Sci., College of Aboureihan, University of Tehran, Pakdasht - Iran

2 - Associate Professor, Department of Animal and Poultry Sci., College of Abureihan, University of Tehran, Pakdasht – Iran

(Corresponding Author *)

3 - Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran - Iran

4 - M.Sc., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran - Iran