مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۱۳۹-۱۳۱)

اثر چند شکلی آللی در اگزون ۳ ژن لپتین بر صفات رشد و تولید پشم در گوسفند نژاد نائینی

مجتبی نجفی[1]*، قدرت رحیمی[2]، زربخت انصاری[3] و فرشته جیواد۴
۱، ۲، ۳، مربی و اعضای هیات علمی گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴، گروه سم شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۳۱ - تاریخ تصویب: ۹۲/۴/۸)

چکیده

شناسایی ژن های عمده تاثیرگذار بر توازن انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوراک از اهداف مهم و استراتژیک در تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد دام می باشد. از میان ژن های عمده، ژن لپتین از جمله ژن های بزرگ اثری است که چند شکلی موجود در آن با صفات مهم اقتصادی در دام های اهلی مرتبط است. در این پژوهش نمونه های خون به طور تصادفی از ۱۰۰ راس گوسفند نژاد نائینی جمع آوری شد. DNA به روش نمکی بهینه یافته استخراج و یک قطعه ۲۷۵ جفت بازی از اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از واکنش زنجیره پلی مراز تکثیر شد. به منظور تعیین ژنوتیپ های مختلف از دو روش PCR-SSCP و توالی یابی DNA استفاده شد. نتایج این مطالعه یک جهش تک نوکلئوتیدی A به C در موقعیت باز ۴۹ قطعه تکثیری در این پژوهش (مطابق با موقعیت بازی ۲۰۰ توالی ثبت شده EF534370.1)که از نوع جهش خاموش بود را نشان داد. فراوانی هر یک از آلل های A و C و فراوانی دو ژنوتیپ AA و AC به ترتیب برابر با 0.73 و 0.27 برآورد شد. در این پژوهش، اثر SNP مشاهده شده روی صفات رشد و تولید پشم مورد بررسی قرار گرفت. وزن تولد در گوسفندان با ژنوتیپ AC به طور معنی داری بیشتر از گوسفندان با ژنوتیپ AA بود ($p<0.01$)، اما اثر ژنوتیپ های مشاهده شده روی دیگر صفات مورد مطالعه معنی دار نبود. می توان نتیجه گیری نمود که با انجام تحقیقات بیشتر در تحقیقات بعدی با اندازه نمونه های بزرگتر، احتمالا بتوان از این جایگاه نشانگری و یا دیگر جایگاه های مرتبط به ژن لپتین در برنامه های انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA بهره گرفت.

واژه های کلیدی: گوسفند نائینی، ژن لپتین، چند شکلی، صفات رشد، صفات تولید پشم، PCR-SSCP، توالی یابی DNA

مقدمه

لپتین هورمون مشتق شده از بافت چربی است که روی کنترل فیزیولوژیکی بسیاری از عملکردهای بیولوژیکی و تغذیه ای تاثیر دارد. در دام های اهلی، لپتین عامل شناخته شده ای است که در تنظیم صفات تولیدی، تولید مثلی و فعالیت های مختلف شامل مصرف غذا، تعادل انرژی و عملکرد سیستم ایمنی نقش بسزایی دارد و این امر از نقطه نظر اقتصادی در صنعت پرورش دام بسیار حائز اهمیت است (Van der lende et al. 2005). فعالیت بیولوژیکی لپتین بعد از اتصال آن به گیرنده اختصاصی حاصل می شود (Liefers et al, 2002). گیرنده لپتین در بسیاری از بافت ها از جمله مغز، چربی، معده، گنادها، عضلات، هیپوتالاموس و هیپوفیز یافت می شود (Houseknecht et al., 1998; Dyer et al., 1997). ژن

* نویسنده مسئول: مجتبی نجفی تلفن: ۰۹۱۳۲۶۲۵۰۲۰ E-mail: Mojtaba_najafy@yahoo.com

لپتین در گوسفند دارای ۲ اینترون و ۳ اگزون بوده که روی کروموزوم ۴ واقع است و مسئول سنتز یک پروتئین تک زنجیره ای به وزن ۱۶ کیلودالتون با ۱۶۷ اسید آمینه می باشد (Dela et al., 1996; Zhang et al., 1994). هورمون کامل (یا بالغ) شامل ۱۴۶ اسید آمینه می باشد که به طور کلی توسط سومین اگزون کد گذاری می شود. اگر چه وجود تفاوت های ژنتیکی در ژن لپتین نخستین بار در موش و انسان گزارش شد (Ohshiro., 2000; Halaas et al., 1995). اما در سال های اخیر مطالعات زیادی به منظور شناسایی تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی و همبستگی چند شکلی های موجود در این جایگاه با صفات تولیدی در گله گاوهای شیری (Fiona et al., 2002)، گوسفند (Boucher et al., 2006)، و طیور (Taouis et al., 1998) انجام گرفت. هم چنین مطالعه ای روی نقش لپتین در کنترل وزن بدن و ارتباط آن با بیماری چاقی گزارش شده است (Friedman and Halaas, 1998).

به اثبات رسیده است که تنوع در اگزون یک ژن لپتین انسانی، با میزان پایین لپتین سرم خون، چاقی و دیابت های غیر وابسته به انسولین همبستگی دارد (Hager et al, 1998).

چند شکلی های ژنتیکی در ژن لپتین گاوی و ارتباط آن با مصرف غذا (Kimchi-sarfaty et al, 2007)، تولید شیر (Lagonigro et al, 2003 و Buchanan et al, 2003)، صفات لاشه و کیفیت گوشت (Reicher et al, 2011) نیز گزارش شده است.

در بررسی تنوع ژنتیکی در ژن لپتین گوسفندی، همبستگی بین چند شکلی های تک نوکلئوتیدی در اگزون ۲ این ژن و صفاتی مانند افزایش وزن لاشه، افزایش چربی دم، کاهش وزن کشتار، کاهش وزن از شیرگیری (Barzehkar et al, 2009) و همچنین چند شکلی های تک نوکلئوتیدی ناحیه اگزون ۳ با صفات رشد (Shojaei et al, 2010) گزارش شده است. در حیوانات اهلی از جمله گاو و خوک پژوهش های متعددی در ارتباط با شناسایی تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی و صفات تولیدی انجام گرفته است اما مطالعات اندکی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی در این جایگاه ژنی در گوسفند و به ویژه گوسفندان ایرانی وجود دارد. هدف از این مطالعه شناسایی تنوع ژنتیکی در ژن لپتین با استفاده از روش اس اس سی پی[1] و تعیین توالی DNA[2] و بررسی ارتباط این جایگاه ژنی با صفات تولیدی در گوسفند نژاد نائینی بود.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه

گوسفند نژاد نائینی از دسته گوسفندان بومی دنبه دار استان اصفهان است که از مشخصات بارز آن می توان به اندازه کوچک و بلوغ زودرس در این نژاد اشاره نمود. گوسفند نائینی اگر چه در درجه اول به دلیل تولید پشم مناسب برای قالیبافی و صنعت نساجی مورد توجه قرار دارد ولی به دلیل جمعیت بالای آن در کشور، از نظر تولید گوشت نیز حائز اهمیت می باشد. فصل جفت گیری این حیوانات در اوایل مهر ماه می باشد. در سیستم پرورشی عموما بره ها تا سن سه ماهگی همراه مادران خود پرورش می یابند.

در گله های تحت رکورد در هنگام تولد علاوه بر مشخصات شجره ای (کد حیوان و کد والدین)، برخی دیگر از اطلاعات شامل جنس بره، نوع تولد، تاریخ تولد و وزن تولد به طور جداگانه ثبت می شود. رکوردگیری از صفات وزن نیز هر سه ماه یک بار پس از تولد صورت می گیرد. قابل ذکر است که در سال یک بار گوسفندان نائینی پشم چینی شده و در نتیجه رکوردهای مربوط به وزن پشم شسته شده نیز ثبت می شود. داده های مرتبط به صفات مذکور که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت در طی سال های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۷ توسط مرکز اصلاح نژاد جهاد کشاورزی استان اصفهان جمع آوری شد.

نمونه گیری، استخراج دی ان ای و واکنش پی سی آر

از ۱۰۰ راس گوسفند نژاد نائینی (۱۶ راس قوچ و ۸۴ راس میش)، متعلق به سه گله مجزا (گله اول ۱۵ راس، گله دوم ۳۰ و گله سوم ۵۵ راس) نمونه های خون جمع آوری شد. نمونه ها بلافاصله با حفظ شرایط زنجیره سرد

1. SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
2. DNA Sequencing

به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از روش نمکی بهینه یافته (میلر و همکاران، ۱۹۸۸) و برای تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه ای به طول ۲۷۵ جفت باز از اگزون ۳ ژن لپتین تکثیر شد. توالی آغازگر های ژن لپتین شامل توالی رفت F: 5′- GCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCC-3′ و توالی برگشت 5′-TGTCCTGTAGAGACCCCTGTAGCCG : 3′- بود (Tahmoorespur et al, 2010).

واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10mM)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم پلیمراز (1 U)، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ میکرولیتر MgCl2 (1.6 mM) و یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (10 pM) انجام شد.

سپس چرخه های حرارتی PCR شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد جهت واسرشته سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۸ درجه سانتی گراد برای اتصال آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ۴۵ ثانیه به تعداد ۳۵ چرخه و بسط نهائی به مدت ۱۰دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. برای تایید اندازه قطعه تکثیر شده و هم چنین تعیین کمیت و کیفیت محصول PCR از ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر وزنی M100 از شرکت فرمنتاز[1] استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ

آنالیز اس اس سی پی [2]

برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان از روش PCR-SSCP و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید استفاده شد. در این روش تعیین ژنوتیپ، بر اساس اختلاف حرکت محصول PCR تکثیر شده در میدان الکتروفورز که ناشی از تغییر شکل فضایی DNA تک رشته ای است، صورت می پذیرد. برای تک رشته سازی، ۷ میکرولیتر از محصول PCR را با ۷ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخصوص ژل اکریل آمید (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue, and 0.025% xylene-cyanol) مخلوط و با استفاده از دستگاه PCR به مدت ۶ دقیقه با دمای ۹۶ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. در این پژوهش از ژل اکریل آمید ۱۲٪ استفاده شد. بعد از انجام الکترفورز محصولات PCR روی ژل اکریل آمید، از نیترات نقره برای رنگ آمیزی استفاده شد (Byun و همکاران، ۲۰۰۹).

در این پژوهش تعیین ژنوتیپ مستقیما از روی ژل انجام و با شمارش مستقیم الگوهای باندی، فراوانی آللی و ژنوتیپی برآورد شد.

تعیین توالی مستقیم

با توجه به نتایج حاصل از روش PCR-SSCP دو آلل A و C و دو ژنوتیپ AA و AC مشاهده شد. جهت تایید ژنوتیپ های به دست آمده، از هر ژنوتیپ دو نمونه برای تعیین توالی انتخاب شدند. بعد از تکثیر مجدد این قطعات توسط واکنش زنجیره پلی مراز، خالص سازی محصول پی سی آر توسط کیت تلخیص DNA از شرکت Roche و بر اساس دستورالعمل این شرکت صورت گرفت و برای تعیین توالی به شرکت بایونیر[3] کره جنوبی ارسال شد.

آنالیز آماری

آنالیز اثر ژنوتیپ ها بر صفت وزن بدن در هنگام تولد و ۳ ماهگی و همچنین صفت وزن پشم با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و بر اساس رویه مدل خطی عمومی صورت گرفت. لازم به ذکر است که سن در زمان وزن کشی در سه ماهگی به عنوان عامل همبسته (کواریت) در مدل قرار داده شد. مدل مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ijkl} = \mu + H_i + S_j + Y_l + G_k + e_{ijkl}$$

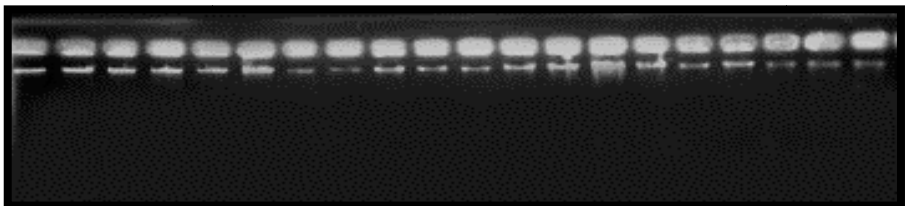
1. Fermentase
2. SSCP Analysis
3. Bioneer

که در آن Y_{ijkl} ارزش صفت مورد مشاهده، μ : میانگین صفت، H_i : اثر گله *i* ام، S_j : اثر جنس *j* ام، Y_l اثر سال تولد l ام ، G_k اثـــر ژنوتیپ *k* ام و e_{ijkl} اثر بـــاقیمانده می باشد. در آنالیز هم ترازی این توالی ها با توالی مرجع که با شماره دسترسی EF534370 در بانک اطلاعات به ثبت رسیده است از نرم افزار BioEdit و برای آنالیز توالی پروتئینی از نرم افزار ExPASy (۲) استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج **DNA** و تعیین ژنوتیپ

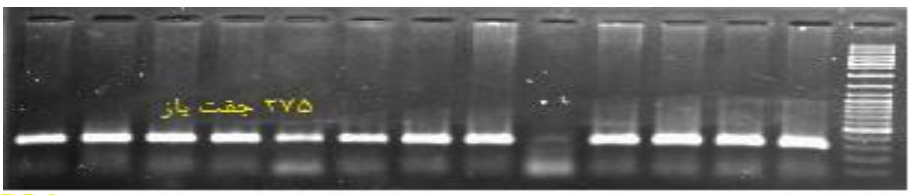
در این پژوهش از تعداد ۱۰۰ راس گوسفند نائینی خون گیری به عمل آمد و با استفاده از روش نمکی بهینه یافته استخراج DNA صورت گرفت. سپس برای تعیین کمیت و کیفیت سنجی DNA از ژل آگارز استفاده شد (شکل ۱).



شکل۱- نمونه‌ای از DNA های ژنومی استخراج شده از گوسفند نژاد نائینی

در این پژوهش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه ای به طول ۲۷۵ جفت باز از اگزون ۳ ژن لپتین تکثیر شد (شکل ۲). در این پژوهش همان طور که در شکل ۳ آمده است دو آلل A و C و دو ژنوتیپ AC و AA با فراوانی هر یک به ترتیب برابر با ۰/۷۳ و ۰/۲۷ در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد.

تاکنون چند شکلی های متعددی (تقریبا ۲۰ چندشکلی) در جایگاه ژنی لپتین شناسایی شده است. فراوانی این چند شکلی ها به میزان یک در هر ۸۴ جفت باز در نواحی اگزونی این ژن گزارش شده است (Liefers et al., 2005).



شکل ۲- الگو باندی حاصل از تکثیر ژن لپتین از DNA ژنومی در گوسفندان نژاد نائینی

281

شکل ۳- نمونه ای از ژنوتیپ های AA و AC از ژن لپتین بر مبنای باندهای حاصل از آنالیز SSCP در گوسفند نژاد نائینی

نتایج مطالعه طهمورث و همکاران (۱۳۸۷) نشان دهنده سه الگوی باندی L1, L2 و L3 در ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفند نژاد بلوچی بود که الگوی باندی L3 و L2 به ترتیب مشابه الگوی باندی AC و AA در مطالعه حاضر بود اما در مطالعه حاضر الگوی باندی L1 (CC) مشاهده نشد. نتایج فراوانی ژنوتیپی در ژنوتیپ L1 و L2 در مطالعه طهمورث و همکاران به ترتیب برابر با 0.25 و 0.56 بود. در مطالعه دیگری که توسط شجاعی و همکاران در همین ناحیه ژنی صورت گرفت ۱۰ الگوی باندی در گوسفند نژاد کرمانی مشاهده شد

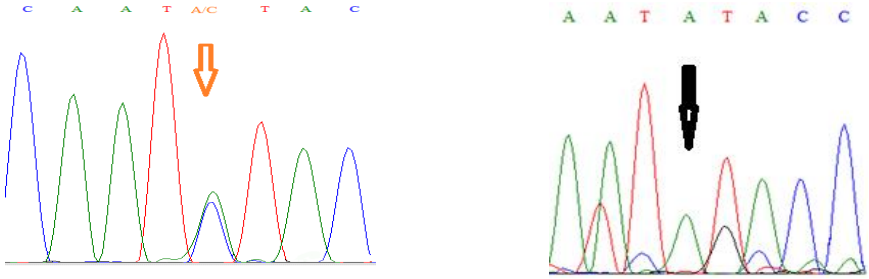
(Shojaei, et al, 2010). نتایج مطالعه هاشمی و همکاران نمایانگر ۵ الگوی باندی حاصل از آنالیز PCR-SSCP در قطعه ای به طول ۴۷۱ جفت باز در ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفند نژاد ماکویی بود (Hashemi, et al, 2011). Zhou و همکاران نیز ۵ الگوی باندی در قطعه ای به طول ۴۷۱ جفت باز از اگزون ۳ ژن لپتین را در تحت دو شرایط متفاوت PCR-SSCP در ۶ نژاد مختلف نیوزلند (Dorset, Suffolk, Romney, Merino, Coopworth, Corriedale, Poll) گزارش کردند (Zhou, et al, 2008). نتایج حاصل از تعیین توالی این دو ژنوتیپ نشان داد که یک جهش تک نوکلئوتیدی از نوع جانشینی C به A در موقعیت ۴۹ قطعه تکثیر شده رویداده است (شکل ۴).

```
          10      20      30      40      50      60      70
     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
51=75  GCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCAATNTACCAACAGATCCTCGCCAGT
70=72  GCTCCACCCTCTCCTGAGTTTGTCCAAGATGGACCAGACATTGGCAATATACCAACAGATCCTCGCCAGT

          80      90     100     110     120     130     140
     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
51=75  CTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAATATCTAATGACCTGGAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGG
70=72  CTGCCTTCCAGAAATGTGATCCAAATATCTAATGACCTGGAGAACCTCCGGGACCTTCTCCACCTGCTGG

         150     160     170     180     190     200     210
     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
51=75  CCGCCTCCAAGAGCTGCCCCTTGCCGCAGGTCAGGGCCCTGGAGAGCTTGGAGAGCCTGGGCGTCGTCCT
70=72  CCGCCTCCAAGAGCTGCCCCTTGCCGCAGGTCAGGGCCCTGGAGAGCTTGGAGAGCCTGGGCGTCGTCCT

         220     230     240     250     260     270
     ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
51=75  GGAAGCCTCCCTCTACTCCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTACAGGGGTCTCTACAGGACA
70=72  GGAAGCCTCCCTCTACTCCACCGAGGTGGTGGCCCTGAGCCGGCTACAGGGGTCTCTACAGGACA
```



شکل ۴- هم ترازی ژنوتیپ های حاصل از روش توالی یابی DNA با استفاده از نرم افزار BioEdit

هر چند گزارشات قبلی تنوع را در در اگزون ۳ نشان داده بودند ولی جهش مشاهده شده در این پژوهش تا به حال گزارش نشده است. در مطالعه Zhou و همکاران (۲۰۰۸)، ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از دو شرایط متفاوت PCR-SSCP مورد آزمون قرار گرفت که پنج الگوی باندی اس اس سی پی و چهار چند شکلی تک نوکلئوتیدی که شامل $C/T^{۱۰۷}$، $G/A^{۲۷۱}$، $C/A^{۳۱۶}$ و $G/T^{۳۸۷}$ بودند، مشاهده شد که با جهش (C/A) مطالعه حاضر مطابقت نداشت. در ادامه، با بررسی های انجام گرفته روی توالی پروتئینی این توالی ها در مطالعه حاضر مشخص شد که در اثر این جهش تک نوکلئوتیدی، توالی کدون وحشی (ATC) به توالی کدون جهش یافته (ATA) تبدیل شده است. در اثر این تبدیل، هیچ تغییری در اسید آمینه در موقعیت مورد نظر در توالی رشته پروتئینی صورت نمی گیرد. به عبارتی جهش مذکور یک موتاسیون خاموش می باشد (جدول ۱). اگر چه جهش های از نوع خاموش روی عملکرد و فعالیت پروتئین تاثیری ندارند ولی ممکن است روی فرایند اسپلاسینگ[1] یا کنترل رونویسی،

1. Splicing

کارکرد اختصاصی سوبسترا ها (Kimchi-sarfaty et al, 2007) و یا به دلیل تغییر در افزایش پایداری mRNA روی بیان ژن تاثیر گذار باشند (Capon et al, 2004; Liu et al, 2009).

جدول ۱- مشخصات جهش تک نوکلئوتیدی جدید مشاهده شده در اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفند نائینی

ژن	SNP	ناحیه ژن	جانشینی اسید آمینه	تغییر در تقارن و بار الکتریکی	موقعیت جهش در نوکلئوتید	موقعیت جهش در پروتئین
لپتین	C/A	اگزون ۳	بدون تغییر	بدون تغییر	۴۹	۱۶

تجزیه و تحلیل آماری

ارتباط اثر SNP مشاهده شده روی صفات رشد (وزن تولد و وزن از شیرگیری) و صفت وزن پشم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که اثر SNP موجود در اگزون ۳ ژن لپتین روی صفت وزن بدن در هنگام تولد معنی دار ($p<0.01$) در صورتی که این اثر روی دیگر صفات مورد مطالعه معنی دار نبوده است. در این پژوهش در تجزیه و تحلیل آماری برآورد اثر ژنوتیپ ها روی صفات مورد مطالعه، از تعداد ۶۰ رکورد برای وزن تولد و ۴۶ رکورد برای وزن در ۳ ماهگی استفاده شد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر عوامل موثر بر صفات رشد در گوسفند نژاد نائینی

منبع تغییرات	وزن تولد		وزن شیر گیری	
	df	MS	df	MS
سال تولد	۷	۰.۰۸۴۲^{ns}	۶	۳۴.۶۹۴۸**
جنس	۱	۰.۴۸۶۲**	۱	۵.۰۵۴۴^{ns}
گله	۱	۰.۵۳۶۷**	۱	۸.۱۰۲۳^{ns}
ژنوتیپ	۱	۰.۷۴۴۶**	۱	۰.۰۰۷۱^{ns}
خطا	۴۹	۰.۰۵۶۶	۳۶	۵.۸۳۵۹

** و ns به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۱ خطا و غیر معنی دار بودن را نشان می هد.

همان طور که در جدول ۲ آمده است نتایج تجزیه واریانس نشان دهنده این مطلب می باشد که اثر عوامل جنس حیوان، گله و ژنوتیپ بر صفت وزن تولد معنی دار در صورتی که بر صفت وزن سه ماهگی فقط اثر سال تولد معنی دار بوده است.

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی و مقایسه میانگین حداقل مربعات بین صفات مورد مطاله در جمعیت گوسفند نژاد نائینی

منابع تغییرات	ژنوتیپ		احتمال معنی داری
	CC	AA	
فراوانی ژنوتیپی (درصد)	۰/۲۷	۰/۷۳	-
وزن تولد (کیلوگرم)	۳/۶۷ ±۰/۰۷	۳/۴۰ ±۰/۰۷	۰/۰۰۰۷**
وزن از شیرگیری (کیلوگرم)	۲۳/۱۰ ±۱/۱۵	۲۲/۸۹ ±۰/۰۷	۰/۸۱۴۸ ns
وزن پشم (کیلوگرم)	۰/۹۸ ±۰/۰۶	۰/۹۲ ±۰/۰۲	۰/۳۸۰۱ ns

** و ns به ترتیب به معنی دار بودن در سطح احتمال ۰/۰۱ خطا و غیر معنی دار بودن است.

تا به حال در مطالعات متعددی همبستگی بین ژن لپتین و صفات تولیدی در دام های اهلی مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله بررسی های صورت گرفته می توان به میزان اسید های چرب، اسیدهای چرب غیراشباع (Orru et al, 2011) با چند شکلی های تک نوکلئوتیدی در نواحی اگزون ۲ و ۳ ژن لپتین، تعداد بچه خوک های متولد شده در هر زایش در چهار نژاد از خوک های چینی با چند شکلی در ناحیه اگزون ۳ ژن

مذکور (Ding et al, 2011)، طول دوره آبستنی در گاوهای هلشتاین ایرانی با چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه اگزون ۳ (Yazdani et al, 2010) و هم چنین صفات رشد در گوسفندان نژاد بلوچی (Tahmoorespur et al, 2010) اشاره کرد. اثر چند شکلی ژن لپتین بر ارزش اصلاحی برآورد شده برای وزن بدن در سه ماهگی در گوسفند نژاد بلوچی معنی دار اما این اثر روی دیگر صفات مورد مطالعه از جمله وزن در هنگام تولد، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی معنی دار نبوده است (Tahmoorespur et al, 2010). این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر برای صفت وزن سه ماهگی مغایرت دارد. در پژوهش حاضر معنی دار نشدن اثر این SNP برصفت وزن بدن بدن در سه ماهگی ممکن است به دلیل اندازه کوچک جمعیت مورد مطالعه باشد. مطالعه ای به منظور شناسایی چند شکلی های ژن لپتین و همبستگی آن با صفات رشد و صفات لاشه در سه نژاد گوسفند ایرانی (زل، زندی و شال) صورت گرفت. در این مطالعه اثر چند شکلی در اگزون ۲ و بخشی از اینترون ۲ این ژن مورد آزمون قرار گرفت. نتایج مطالعه مذکور وجود دو ژنوتیپ AA و AG در جمعیت گوسفندان مورد مطالعه را تایید و نیز اثر معنی دار SNP های مشاهده شده روی صفات لاشه در نژادهای شال و زل را نشان داد (Barzehkar et al, 2009). همچنین در مطالعه ای آنالیز همبستگی بین چند شکلی های تک نوکلئوتیدی ناحیه اینترون ۱ و اگزون ۳ ژن لپتین و صفات تولیدی، وزن زنده، تعادل انرژی، مصرف غذا و باروری در گوساله های هلشتاین صورت گرفت که نتایج مطالعه مذکور اثر معنی دار این جایگاه (اگزون ۳) را روی میزان ماده خشک مصرفی، میانگین وزن زنده و وزن در ۱۵ هفتگی را نشان داد (Liefers et al, 2002). در نژاد کرمانی نیز چند شکلی ناحیه اگزون ۳ ژن لپتین مورد آزمون قرار گرفت و ۱۰ ژنوتیپ در جایگاه مورد مطالعه گزارش شد. همچنین نتایج مطالعه مذکور نشان داد که صفات رشد تحت تاثیر ژنوتیپ ها قرار گرفته به طوری که ژنوتیپ های A/B/E, A/C, A/B/C/F و A/B/C/F به ترتیب دارای بیشترین وزن بدن در سنین ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی بوده ا ند (Shojaei et al 2010). نتایج مطالعه حاضر در گوسفند نژاد نائینی یک جهش تک نوکلئوتیدی که یک جهش خاموش بود را نشان داد. آنالیز ارتباط اثر بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی مورد نظر و صفات مورد مطالعه نشان داد که همبستگی معنی داری بین این چند شکلی و صفت وزن تولد در گوسفند نژاد نائینی وجود دارد. در صورت تکرار نتایج حاصل از اثر ژنوتیپ بر صفت وزن تولد در مطالعات با تعداد نمونه های با اندازه بزرگتر، امکان این که بتوان از این جایگاه نشانگری و یا دیگر جایگاه های مرتبط به ژن لپتین در برنامه های انتخاب بر اساس نشانگر در گوسفندان نژاد نائینی بهره گرفت، وجود دارد.

REFERENCES

۱. طهمورث پور, م, نصیری, م, ر, انصاری, م , هروی موسوی, ع, وفای واله, م و افتخار شاهرودی,ف. ۱۳۸۷. بررسی چند شکلی ژن لپتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. سومین کنگره علوم دامی کشور. ص ۱-۳.

2. Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, Nucleic Acids Res, 40(W1):W597-W603, 2012.
3. Barzehkar, R., Salehi, A., Mahjoubi, F. (2009). Polymorphisms of the ovine Leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. *Iranian Journal of Biotechnology*, 7, 241-246.
4. Boucher, D., Palin, M.F., Castonguay, F., Gariepy, C and Pothier, F. (2006). Detection of polymorphisms in the ovine Leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian journal of animal science*, 31-35.
5. Buchanan, F. C., Van Kessel, A. G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B & Schmutz, S. M. (2003). Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86, 3164–3166.
6. Byun, S.O., Fang, Q., Zhou, H & Hickford, J.G.H. (2009). An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 385, 174–175.

7. Capon, F., Allen, M.H., Ameen, M., Burden, A. D., Tilman, D., Barkerand, J.N. & trembath, R. C. (2004). A synonymous SNP of the corneodesmosin gene leads to increased mRNA stability and demonstrates association with psoriasis across diverse ethnic groups. *Human Mol. Genet*., 13, 2361-2368.
8. Dela, B.F.C, Shan, B, Chen, J.L. (1996). Identification of the promoter of the mouse obese gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 4096-4101.
9. Ding, W., Yan, Y., Zhang, C., Ding, Y and Yin, Z. (2011). Association of Leptin Gene polymorphisms with litter performance traits in four Chinese Indigenous Pig breeds. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 663-667.
10. Dyer, C.J, Simmons, J.M, Matteri, R.L, Keisler, D.H. (1997). Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well- fed and feed-restricted ewes. *Domest Anim Endocrinol*. 14, 119-128.
11. Fiona, C, B, Carolyn, J., Andrew, G, V, Tracey, D, T, Dianne, C, W, Sheila, M, S. (2002). Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genet Sel Evol. 34, 105-116.
12. Friedman, J.M & Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763–770.
13. Hager, J., Clement, K., Francke, S., Dina, C., Raison, J. & Lahlou, N. (1998). A polymorphism in the 5 untranslated region of the human ob gene is associated with low Leptin levels. *International Journal of Obesity*, 22, 200–205.
14. Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley, & J. M. Friedman.(1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269, 543–546.
15. Hashemi, A., Mardani, K., Farhadian, M., Ashrafi, I & Ranjbari, M. (2011). Allelic polymorphism of Makoei sheep Leptin gene identified by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *African Journal of Biotechnology*, 10, 17903-17906.
16. Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME (1998). The biology of leptin: A review. *Journal of Animal Science*. 76, 1405-1420.
17. Kimchi-sarfaty, c., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S.V & Gottesman, M.M. (2007). A silent polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Sciences*, 315, 525-528.
18. Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J. A. & Williams, J. L. (2003). A new mutation in the coding region of thebovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*, 34, 371–374.
19. Liefers, S. C., te Pas, M. F., Veerkamp, R. F & van der Lende, T. (2002). Associations between Leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 85, 1633–1638.
20. Liefers, S.C., R.F. Veerkamp, M.F.W. TePas, C. Delavaud, Y. Chilliard, M. Platje and T. Van-der-Lende, (2005). Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. *Anim. Genet*., 36, 111-118.
21. Liu, y., lu, x., luo, y.r., zhou, j.p., liu, x.y., zhang, q. and yin, z.j. (2009). Effect of single nucleotide polymorphism of IRF1 gene on cytokine traits in three pig breeds. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 18, 2346-2350.
22. Miller, S.A, Dykes, D.D, Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 11; 16: 1215.
23. Ohshiro, Y., Ueda, K., Nishi, M., Ishigame, M & Wakasaki, H. (2000). A polymorphic marker in the Leptin gene associated with Janpanese morbid obesity. *J.M. Med*., 78, 516-520.
24. Orru, L., Cifuni, G.F., Piasentier, E., Corazzin, M., Bovolenta, S & Moioli, B. (2011). Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. *Meat Science*, 87, 344–348.
25. Reicher, S., Gertler, A., Seroussi, E and Gootwine, E. (2011). Polymorphism in the ovine leptin gene (oLEP) affects leptin-binding affinity and activity. *9th world Congress on Genetic Applied to Livestock.* pp, 397.
26. Shojaei, M., Mohammad Abadi, M.r., AsadiFozi, M., Dayani, O., Khezri A. & Akhondi. M. (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2, 67-73.
27. Tahmoorespur, M., Taheri, A., Vafaye Valeh, M., Saghi, D.A. & Ansary, M. (2010). Assessment relationship between Leptin and Ghrelin genes polymorphisms and estimated breeding values of growth traits in Baluchi sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, 2460- 2465.

28. Taouis, M, Chen, J.W, Daviaud, C, Dupont, J, Derouet, M, Simon, J. (1998). Cloning the chicken leptin gene. *Gene*, 208, 239-242.
29. Van der lende, T., Te Pas, M.F., Veerkamp, R.F & Liefers, S.C. (2005). Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamins and Hormones*, 71, 373–404.
30. Yazdani, H., Rahmani, H. R., Edris, M. A & Dirandeh, E. (2010). Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of Iranian Holstein. *African Journal of Biotechnology*, 9, pp. 5997-6000.
31. Zhang,Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.
32. Zhou H., Hickford J. G. H. & Gong H. (2008). Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Molecular Biotechnology*, 41, 22–25.