تولیدات دامی
دوره ۱۵ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه‌های ۱۰۷-۱۰۱

چندشکلی اگزون شمارهٔ ۲ ژن پروتئین مؤثر بر تمایز استخوانی ۱۵ (BMP15) و ارتباط آن با صفت چندقلوزایی در بز نژاد نجدی

الهام جاودان[۱]*، جمال فیاضی[۲]، صالح طباطبایی[۳]، محمدتقی بیگی نصیری[۳]

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین (خوزستان)، ملاثانی-ایران
۲. دانشیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین (خوزستان)، ملاثانی-ایران
۳. استادیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین (خوزستان)، ملاثانی-ایران

تاریخ وصول مقاله:۱۳۹۲/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۱۲/۰۳

چکیده

هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی چندشکلی ژن BMP15 که در کنترل شرح و بسط فولیکول در تخمدان، نرخ تخمک‌گذاری، و باروری نقش حیاتی دارد، است. نمونه‌های خون از ۹۱ بز نجدی مربوط به سه موقعیت جغرافیایی شمال غربی، جنوب شرقی، و مرکز استان خوزستان به‌طور تصادفی انتخاب شدند. بعد از استخراج DNA، تکثیر قطعهٔ ۲۳۵ جفت بازی از اگزون دو ژن BMP15 با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام شد و قطعات مورد نظر توالی‌یابی شدند. سپس رابطهٔ بین ژن مذکور و صفت چندقلوزایی با نرم‌افزار آماری SAS بررسی شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی با نرم‌افزار Vector NTI، سه جهش در باز ۵۲۹ از نوع T به G و در باز ۵۳۰ از نوع C به G و در باز ۵۷۶ از نوع T به C را مشخص کرد. همچنین بیشترین میانگین چندقلوزایی مربوط به الگوی AA بود. به‌طورکلی، جهش‌های نقطه‌ای یافت‌شده در ژن مورد بررسی، بر نرخ تخمک‌گذاری در بز مؤثر است. ازاین رو امید است با انتخاب براساس نشانگر بتوان صفت مطلوب چندقلوزایی را در جمعیت بز نجدی افزایش داد.

کلیدواژه‌ها: بز نجدی، توالی‌یابی، ژن BMP15، نرخ تخمک‌گذاری، PCR-SSCP

* نویسنده مسئول Email: javdan_e@yahoo.com

مقدمه

خانوادهٔ عامل بتای تغییر شکل‌دهندهٔ رشد (TGFβ) بیش از ۴۰ عضو دارد که نقش اکثر آنها در تنظیم باروری به اثبات رسیده است (۶). از جدیدترین اعضای این خانواده پروتئین مؤثر بر تمایز استخوانی ۱۵(BMP15) است (۷، ۸ و ۱۴). جهش‌هایی در ژن BMP15 شناسایی شده‌اند که علت اصلی تغییرات رشد فولیکولی و نازایی مشاهده‌شده در گوسفندان اینوردل، هانا، کمبریج، و بلکلر هستند (۹). پروتئین BMP15 برای توسعهٔ طبیعی فولیکول در گوسفند ضروری است. این یافته‌ها نقش مهم تخمدان در تنظیم رشد طبیعی فولیکولی و نرخ تخمک‌گذاری را نشان می‌دهند (۵). در آزمایشی ارتباط عوامل رشد و تمایز -۹ (GDF9) و BMP15 برای رشد فولیکول در پستانداران با نرخ تخمک‌گذاری و غلظت پروژسترون بررسی و نشان داده شد که وجود GDF9 و BMP15 برای فعالیت و رشد طبیعی فولیکول در قبل و بعد از رشد ضروری است (۱۳). در آزمایشی دیگر، چندشکلی‌های ژن‌های GDF9 و BMP15 و ارتباط آنها با افزایش نرخ تخمک‌گذاری در نژادهای بلکلر و کمبریج بررسی شد. در این نژادها، میش‌های هموزیگوت فنوتیپ عقیمی را نشان دادند و در حالت هتروزیگوتی نرخ تخمک‌گذاری افزایش یافت (۱۰). در موش و انسان پروتئین BMP15 توسط ۲ اگزون کد می‌شود به نحوی که اگزون اول، پپتید پیام‌دهندهٔ ۱۷ اسیدآمینه‌ای و اولین بخش از ناحیهٔ پروپپتید و اگزون دوم باقی‌ماندهٔ ناحیهٔ پروپپتید و تمام ناحیهٔ کامل‌شدهٔ ۱۲۵ اسیدآمینهٔ محاسبه‌شده را کد می‌کنند (۹). ژن BMP15 روی کروموزوم X قرار دارد. در گوسفند طول کامل ناحیهٔ کدکنندهٔ پروتئین، ۱۱۸۲ جفت باز است و پروتئینی با ۳۹۳ اسیدآمینه را تولید می‌کند. این ژن با حدود ۶/۶ کیلو باز دارای دو اگزون است که اگزون‌های یک و دو به‌ترتیب دارای طول ۳۲۸ و ۳۲۹ جفت باز هستند. این دو اگزون با یک اینترون به طول ۵/۳ کیلو باز جدا می‌شوند (۱۱).

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی چندشکلی اگزون شمارهٔ ۲ ژن BMP15 و ارتباط آن با صفت چندقلوزایی در بزهای نجدی است.

مواد و روش‌ها

خون‌گیری با لوله‌های خلأ چهار میلی‌لیتری حاوی مادهٔ ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ گردن ۹۱ رأس بز نجدی سه موقعیت جغرافیایی استان خوزستان انجام گرفت. نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین منتقل و تا زمان استخراج DNA، در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. DNA نمونه‌ها با کیت DIATOM (شرکت سینا ژن) استخراج و کیفیت آنها با روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. آغازگرها از شرکت تکاپوزیست ایران و به‌صورت لیوفیلیزه غیر حساس به دما دریافت و طبق دستورالعمل کارخانهٔ سازنده با آب دو بار تقطیر رقیق و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعهٔ ۲۳۵ جفت بازی جایگاه ژنی BMP15 با ۳۵ چرخه (۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت و ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال، ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای بسط) در دستگاه ترموسایکلر انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. توالی آغازگرهای استفاده‌شده F: 5'-TACAGACCCTGGACTTTCCTCT-3' و R: 5'-GCCCAACATGTTCCATGATATCC-3' بود. بعد از فرایند PCR برای تعیین ژنوتیپ‌ها از روش SSCP استفاده شد. براساس الگوی باندی مشاهده‌شده، تعداد هفت نمونه از محصولات PCR برای توالی‌یابی به شرکت سینا ژن فرستاده شدند. سپس نتیجهٔ توالی‌یابی با نرم‌افزار Vector NTI بررسی شد. به‌منظور بررسی رابطهٔ بین

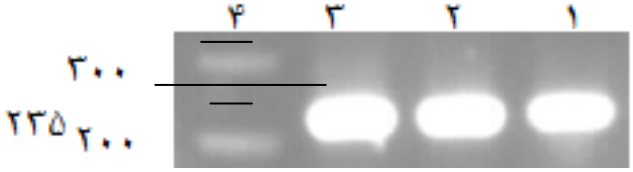
جهش‌های یافت‌شده اگزون شمارهٔ ۲ ژن BMP15 و صفت چندقلوزایی، آنالیز آماری با رویهٔ GLM نرم‌افزار آماری SAS برای مدل آماری ۱ انجام شد.

$$Y_{ij}=\mu+G_i+e_{ij} \quad \text{(رابطهٔ ۱)}$$

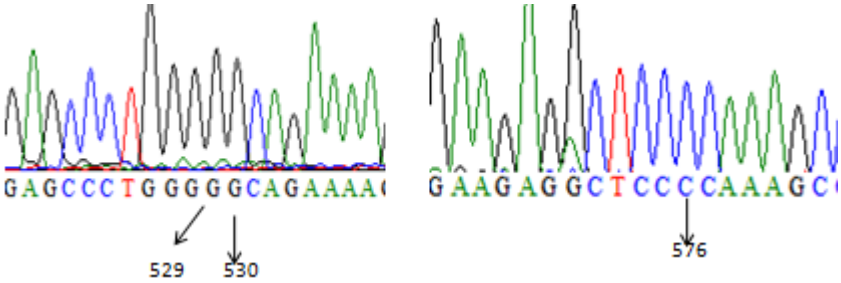
در این رابطه، Y_{ij} مشاهدات (چندقلوزایی)، μ میانگین جامعه، G_i اثر ژنوتیپ به‌صورت اثر ثابت، و e_{ij} تأثیر باقیمانده (اشتباه آزمایشی) به‌صورت اثر تصادفی است.

نتایج و بحث

در این تحقیق برای اولین بار اگزون شمارهٔ ۲ ژن BMP15 در نژاد نجدی توالی‌یابی شد و طول این اگزون ۲۳۵ جفت بازی تعیین گردید. نتایج الکتروفورز نشان داد که قطعهٔ ۲۳۵ جفت بازی اگزون شمارهٔ ۲ ژن BMP15 به‌صورت اختصاصی تکثیر یافت و هیچ‌گونه باند غیر اختصاصی در الکتروفورز مشاهده نشد (شکل ۱). هم‌ترازسازی توالی‌های بزهای نجدی با توالی‌های گرفته‌شده از بانک ژن و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار Vector NTI، سه جهش در جایگاه ۵۲۹ که نوکلئوتید تیمین (T) را جایگزین گوانین (G)، در جایگاه ۵۳۰ نوکلئوتید سیتوزین (C) را جایگزین گوانین (G)، و در جایگاه ۵۷۶ نوکلئوتید تیمین (T) را جایگزین سیتوزین (C) شناسایی کرد (شکل‌های ۲ و ۳). بعد از ترجمهٔ توالی DNA یادشده به توالی‌های پروتئینی، با هم‌ردیف‌سازی توالی پروتئینی بز نجدی با توالی‌های موجود در بانک ژن مشخص شد که در جایگاه‌های یادشده تغییر در توالی اسیدآمینه‌ها رخ داده است. در واقع در فرایند هم‌ردیف‌سازی مشخص شد که اسیدآمینه‌های (Val۱۵۵Gly و Ser۱۷۱Pro) جایگزین شده‌اند (شکل ۴). در الگوی AA که سه نوکلئوتید جابه‌جا شدند میانگین چندقلوزایی ۲/۱۶۷ بود که این بیانگر تأثیر زیاد این توالی بر چندقلوزایی است (جدول ۱).



شکل ۱. ستون‌های ۱، ۲، ۳، محصولات پی. سی. آر (قطعهٔ ۲۳۵ جفت بازی) و ستون ۴، مارکر صد جفت بازی، روی ژل آگارز یک درصد



شکل ۲. بخش‌هایی از توالی ژن و مکان‌های جهش

```
Query  61   CTGGGGGCAGAAAA  CTCCCCAAAGCC  120
            |||||  |||||||  |||| |||||||
Sbjct  524  CTGGGTCCAGAAAA  CTCCTCAAAGCC  583
```

شکل ۳. مکان‌های جهش با توالی رفرنس در NCBI

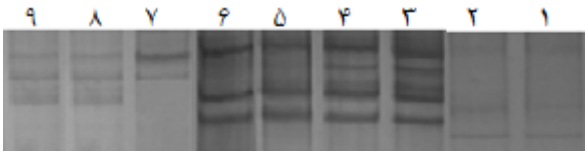
```
EPWGQKSPTNHFPSSGRGSPKPSL
EPW QKSPTNHFPSSGRGS KPSL
EPWVQKSPTNHFPSSGRGSSKPSL
            ↓           ↓
            160         170
```

شکل ۴. مکان‌های تغییر اسیدآمینه با توالی رفرنس در NCBI

جدول ۱. تأثیر اثر الگوهای مشاهده‌شده بر صفت چندقلوزایی در بزهای نجدی

الگوها	میانگین چندقلوزایی
AA	۲/۱۶۷[a]
BB	۲/۰۰۰[a]
EE	۱/۸۷۵[ab]
AD	۱/۶۶۷[b]
AB	۱/۶۰۰[b]

a-b: میانگین‌های با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).



شکل ۵. ستون‌های ۱ و ۲، ژنوتیپ EE؛ ستون‌های ۳ و ۴، ژنوتیپ AD؛ ستون‌های ۵ و ۶، ژنوتیپ AA؛ ستون ۷، ژنوتیپ BB، و ستون‌های ۸ و ۹، ژنوتیپ AB

نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققان در گوسفند کمبریج (۱۰) و در بز نژاد چینی (۱۶) و همچنین در گوسفند نژاد سنجابی (۱) مبنی بر چندشکلی مشاهده‌شده و ارتباط آن با باروری مطابقت دارد. محققانی برای ژن BMP15 در دو نژاد بز چینی چهار جهش از نوع T به G، C به G، T به C، و C به T را گزارش کردند (۱۶). در این تحقیق، سه نوع از این جهش‌ها در توالی بز نجدی مشاهده شد. در تناقض با نتایج این تحقیق، هیچ‌گونه جهشی در بز سرخ جبال (۲) (روش PCR-RFLP)، بزهای چینی، برای ژن‌های اصلی Fec^B و Fec^X (۱۲)، بزهای مرخز ایران (۴)

(با روش PCR-SSCP و PCR-RFLP با آنزیم برشی DdeI)، میش شال برای $FecX^G$ و $FecX^L$ (۱۷) (با روش PCR-RFLP و PCR-SSCP)، و گوسفندان لری‌بختیاری (۱۵) (روش PCR-SSCP) مشاهده نشده است.

جهش‌های مورد بحث در این پژوهش که به جابجایی اسیدآمینه‌های Gly(G) به جای Val(V) و Pro (P) به جای Ser(S) انجامید، هتروزیگوت هستند. از سوی دیگر، مشخص‌شده که BMP15 میزان تخمک‌ریزی را در بزهای مادر موتانت هتروزیگوت افزایش می‌دهد. این رخداد احتمالاً به‌دلیل وجود پروتئین تغییریافته‌ای است که حساسیت سلول‌های گرانولوزا را به هورمون FSH افزایش می‌دهد، این امر باعث رشد سریع فولیکول و در پی آن تخمک‌ریزی زودرس با تخمک‌های کوچک می‌شود (۱۶). از آنجا که در این پژوهش، بزهایی با درصد باروری بالا دارای جهش‌های یادشده بودند، به نظر می‌رسد این جهش‌ها سبب تغییر در ساختمان پروتئین BMP15 و در نتیجه تغییر عملکرد آن می‌شوند. در موقعیت ۱۵۵، اسیدآمینهٔ گلایسین جایگزین والین شده است. گلایسین ساده‌ترین اسیدآمینهٔ غیر قطبی است که در زنجیرهٔ جانبی فقط دارای یک اتم هیدروژن است. اسیدآمینهٔ والین غیر قطبی و در زنجیرهٔ جانبی خود گروه آلیفاتیک دارد. زیرواحدهایی مانند آلانین، گلوتامیک، و لوسین تمایل دارند در مارپیچ α شرکت کنند، در حالی‌که واحدهایی مانند والین و ایزولوسین تمایل به وجود در رشته‌های β دارند. گلایسین تمایل بیشتری برای ایجاد پیچ‌ها دارد و این تمایل به ساختار پروتئین‌ها و پپتیدهای سنتزی مربوط است. برای نمونه شاخه‌داربودن ایزولوسین، والین، و ترئونین به‌دلیل ممانعت فضایی در اتم کربن β سبب ناپایدارکردن مارپیچ α می‌شود، در حالی‌که این اسیدهای آمینه به‌آسانی در رشته‌های β قرار می‌گیرند چون در این رشته‌ها زنجیرهای جانبی از صفحه‌ای که زنجیرهٔ اصلی در آن قرار دارد، به سمت خارج جهت‌گیری می‌کنند (۳). بنابراین باتوجه به اینکه دو اسیدآمینهٔ والین و گلایسین در ساختار و همچنین در تمایل به شرکت در ایجاد صفحات بتا و پیچ‌ها متفاوت هستند، می‌توان نتیجه گرفت که این تغییر سبب تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین می‌شود.

در موقعیت ۱۷۱، اسیدآمینهٔ پرولین جایگزین سرین شده است، پرولین مانند والین غیر قطبی و دارای گروه آلیفاتیک در زنجیرهٔ جانبی خود است اما این گروه آلیفاتیک حلقه‌وار است. از سویی مانند گلایسین تمایل به ایجاد پیچ دارد. افزون بر این اسیدآمینه تمایل به ازبین‌بردن هر دو ساختمان مارپیچ α و صفحه β دارد. اسیدآمینهٔ سرین در حلقهٔ زنجیرهٔ جانبی خود دارای گروه هیدروکسیل (OH) است، در واقع جزء اسیدآمینه‌های قطبی است. گروه هیدروکسیل در این اسیدآمینه با گروه‌های NH و CO زنجیرهٔ اصلی رقابت می‌کنند و تمایل به ازبین‌بردن مارپیچ α دارند (۳). به نظر می‌رسد که جایگزینی اسیدآمینهٔ غیر قطبی (پرولین) به جای اسیدآمینهٔ قطبی (سرین) سبب تغییر در ساختار و عملکرد پروتئین می‌شود. همان‌گونه که در جهش Fec^X (که یک ایزولوسین غیرقطبی جایگزین یک سرین قطبی شده است)، این رخداد به وجود آمده است (۱۰).

نتیجه‌گیری

اگزون دوم ژن پروتئین مؤثر بر تمایز استخوانی ۱۵ در جمعیت بز نجدی چندشکلی ژنتیکی نشان داد. در توالی‌یابی این بخش از ژنوم سه جهش یافت شد. در ژنوتیپی که جهش‌های آن به تغییر اسیدآمینه‌های گلایسین با والین و پرولین با سرین انجامید، بالاترین نرخ چندقلوزایی مشاهده شد. ازاین‌رو با استفاده از این نشانگر می‌توان مادران مستعد برای چندقلوزایی را شناسایی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، از همکاری کارشناسان محترم مرکز تحقیقات صفی‌آباد و همچنین از از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه خانم صدر قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. سلیمانی، ب، رحیمی میانجی، ق. و برومند چ آ (۱۳۹۰) بررسی اثر پلی‌مورفیسم در اگزون ۲ ژن BMP15 روی دوقلوزایی و صفات وزنی در گوسفند سنجابی. زیست‌شناسی ایران. ۲۴(۴): ۴۹۳-۴۸۷.

۲. علی نقی‌زاده، ر، محمدآبادی، م. ر. و زکی‌زاده س (۱۳۸۹) چندشکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز سرخ جبال بارز. مجموعه بیوتکنولوژی کشاورزی. ۲(۱): ۸۰-۶۹.

۳. محمدی ر (۱۳۸۸) بیوشیمی. ویرایش اول. انتشارات آییژ. تهران، صص. ۵۳-۵۴، ۵۷-۵۹ و ۶۶-۶۷.

4. Arefnezhad B (2007) Molecular analysis of BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein-15) gene in Markhoz goats. M.Sc. Thesis, Department of Animal Science, Shiraz University, Shiraz, Iran p. 133.

5. Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL and Sawyer HR (1999) Molecular cloning of the ovineGrowth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. Biology of Reproduction. 60: 381-386.

6. Chang HC, Brown W and Matzuk MM (2002) Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-b superfamily. Endocrine Reviews. 23: 787-823.

7. Dai R (2004) Analyzed relationship between CLPG, BMP15 gene polymorphic and production performance of seven sheep populations in north of Xinjiang. Nanjing Agricul University Master's Thesis.

8. Davis GH, Balakrishnan L, Ross IK, Wilson T, Galloway SM, Lumsden BM, Hanrahan JP, Mullen M, Mao XZ, Wang GL, Zhao ZS, Zeng YQ, Robinson JJ, Mavrogenis AP, Papachristoforou C, Peter C, Baumung R, Cardyn P, Boujenane I, Cockett NE, Eythorsdottir E, Arranz JJ and Notter DR (2006) Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecX(I)) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Animal Reproduction Science. 92: 87-96.

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

10. Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R and 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 of Reproduction. 70: 900-909.

11. He YQ, Chu MX, Wang JY, Fang L and Ye SC (2006) Polymorphism on BMP15 as a candidate gene for prolificacy in six goat breeds. Journal of Anhui Agricultural University. 33: 61-64.

12. Hua GH, Chen SL, Ai JT and Yang LG (2008) None of polymorphism of ovine fecundity major genes FecB and FecX was tested in goat. Animal Reproduction Science. doi:10.1016/j.anireprosci.3-4: 279-286.

13. Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, Smith P, Reader K, Lawrence SB, connell O, Laitinen ARM, Cranfield M, Groome NP, Ritvos O and McNatty KP (2002) Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biology of Reproduction. 67: 1777-1789.

14. Knight PG and Glister C (2003) Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. Animal Reproduction Science. 78: 165-183.

15. Nejati-Javaremi A, Rahimi G and Amiri A (2007) Detection of polymorphism in FecXL gene associated with Twinning in Lori-Bakhtiari sheep breed using PCR-SSCP. The 5th NationalBiotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 520.

16. Wang Y, Yuanxiao L, Nana Z, Zhanbin W and Junyan B (2011) Polymorphism of Exon 2 of BMP15 Gene and Its Relationship with Litter Size of Two Chinese Goats. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 24(7): 905-911.

17. Zare Y, Nejati-Javaremi A and Rahimi G (2007) Detection of polymorphisms in two point of gene associated with Twinning (BMP15) in Shal sheep. The 5th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran, Iran. p. 483.