بررسی چند شکلی ژن IGF-I در جمعیت گاو دورگ استان خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP

کمال حسن‌پور[1]، مرتضی اصغری‌مقدم[1]، محمدتقی بیگی‌نصیری[2]، هدایت الله روشنفکر[2]، جمال فیاضی[2]، سید صالح طباطبائی وکیلی[2]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران.

۲. گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، اهواز، ایران.

*نویسنده مسئول: *Hasanpoor.kamal@gmail.com*

چکیده

ژن فاکتور رشد شبه انسولینی I، نقش عمده‌ای در رشد، تنظیم سوخت و ساز بدن پس از تولد، شیردهی، توسعه غدد پستانی و باوری در گاو را بر عهده دارد. این ژن روی کروموزوم شماره ۵ گاو قرار دارد. هورمون IGF-I توسط اغلب بافت ها ترشح می‌شود، ولی عمده ترشح آن از کبد بوده و پس از ترشح به دیگر بافت ها می‌رسد. این هورمون نقش کلیدی در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و متابولیکی دارد. عواملی چون هورمون رشد، تغذیه، انسولین و دما روی غلظت سرمی IGF-I تاثیر گذارند. به منظور بررسی چند شکلی ژن IGF-I از ۹۳ راس گاو دورگ در استان خوزستان به طور تصادفی خونگیری به عمل آمد. استخراج DNA از نمونه‌های خون و واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۲٤۹ جفت بازی از اگزون ۱ این ژن انجام شد. آنزیم برشی SnaBI برای هضم آنزیمی استفاده گردید. نتایج نشان داد، فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب ۰/۰٦، ۰/۵۳ و ۰/٤۱ می باشد. ژنوتیپ AB بیشترین و ژنوتیپ AA کمترین فراوانی را در گله داشت. فراوانی آلل A در این جمعیت برابر ۰/۳۳ و فراوانی آلل B برابر ۰/٦۷ برآورد گردید. به دلیل انتخاب، تعادل هاردی واینبریگ در گله وجود نداشت.

کلمات کلیدی: فاکتور رشد شبه انسولینی I، چندشکلی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، SnaBI

مقدمه

تحقیقات نشان داد که انتخاب به کمک نشانگر، سرعت پیشرفت ژنتیکی سالانه را افزایش می‌دهد. یکی از این نشانگرها، ژن IGF-I است که نقش فیزیولوژیکی مهمی در رشد، تولید شیر و فعالیت‌های تولیدمثلی ایفا می‌کند (Grochowska et al., 2001). ارتباط بین سطوح خونی IGF-I با سرعت تقسیم سلولی و وزن بدن باعث شده است که این فاکتور به عنوان نشانگری مناسب جهت انتخاب حیوانات اهلی مورد استفاده قرار می گیرد. تحقیقات نشان داده است که سطوح IGF-I در موش‌ها دارای وراثت پذیری ۰/٤ بوده و انتخاب موش‌ها بر اساس سطوح IGF-I باعث افزایش ۰/۲ وزن شش هفتگی آن‌ها پس از هفت نسل گریده است (Blair et al., 1987). بنابراین اگر چه سطوح IGF-I پلاسمای خون با سرعت رشد حیوانات مختلف در ارتباط است، با این وجود استفاده از این ویژگی حیوانات (سطوح IGF-I) جهت انتخاب ژنتیکی و بهبود صفات تولیدی و رشدی حیوانات اهلی نیازمند مطالعه و بررسی بیشتر است (Zenobi et al., 1993) .

هورمون IGF-I (سوماتومدین C) یکی از اعضای خانواده IGF می‌باشد. این خانواده شامل سه پپتید IGF-I، IGF-II

و انسولین، گیرنده‌های هم‌جنس با آنها و حداقل ٦ پروتئین باند شونده به آنها می‌باشد (Roite et al., 2001). این هورمون یک پپتید تک زنجیره، با وزن مولکولی تقریبی ۷۰۰۰ دالتون می‌باشد و دارای ۷۰ اسیدآمینه است (Weber et al, 1999) و توسط بسیاری از بافت‌ها ترشح می‌شود، ولی عمده آن از کبد بوده که پس از ترشح به دیگر بافت‌ها می‌رسد (Elgin et al, 1987). ژن IGF-I در گاو روی کروموزوم شماره ۵ واقع شده است. این ژن در گاو حاوی ۳ انترون و ٤ اگزون می‌باشد و در مجموع ۷۲٤۹۵ جفت نوکلئوتید دارد. شماره دسترسی به این ژن در بانک ژن، AF017143 می‌باشد (Ge et al., 2001).

بررسی‌های بسیاری بر روی چند شکلی این ژن صورت گرفته که در اکثر تحقیقات چند شکلی مشاهده گردیده است (Ge et al., 2001; Curi et al., 2005; Kim et al., 2004, Siadkowska et al., 2006). از آن جایی که تاکنون این ژن، بر روی گاوهای دورگ خوزستان مورد ارزیابی قرار نگرفته است، هدف از این تحقیق، بررسی چند شکلی این ژن در گاوهای دورگ خوزستانمی‌باشد.

مواد و روش کار

برای بررسی چندشکلی ژن IGF-I خون‌گیری از ورید وداج ۹۳ راس گاو دورگ به میزان ۵ سی‌سی انجام گرفت، و در لوله‌های خلادار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. پس از پایان خون‌گیری، نمونه‌ها در دمای ٤- به آزمایشگاه دانشگاه رامین خوزستان منتقل گردید و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت دیاتوم به روش Boom et al., 1989 صورت گرفت. طراحی توالی آغازگرها برای PCR براساس توالی آغازگرهای تعدادی از محققین صورت گرفت (Ge et al., 2001; Siadkowska et al., 2006; Li et al., 2004 ; et al., 2009; Laureano et al., 2006) انجام گرفت. توالی آغازگرها مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

اندازه باند (bp)	ژن هدف	توالی پرایمر ('3---'5)
۲٤۹	IGF-1	5'-ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3'
		5'-ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT-3'

پس از آزمایش غلظت‌های مختلف اجزای PCR، شرایط بهینه PCR با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر به صورت بافر PCR 1X، ۲ میکرومولار $MgCl_2$، ۰/۲۵ میکرومولار آغازگرها، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، یک واحد آنزیم تک پلی‌مراز و DNA الگو به میزان ۱۵۰ نانوگرم در هر واکنش PCR استفاده شد (مدل دستگاه Icycler ساخت شرکت Biorad).برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرها بصورت زیر بود (جدول ۲).

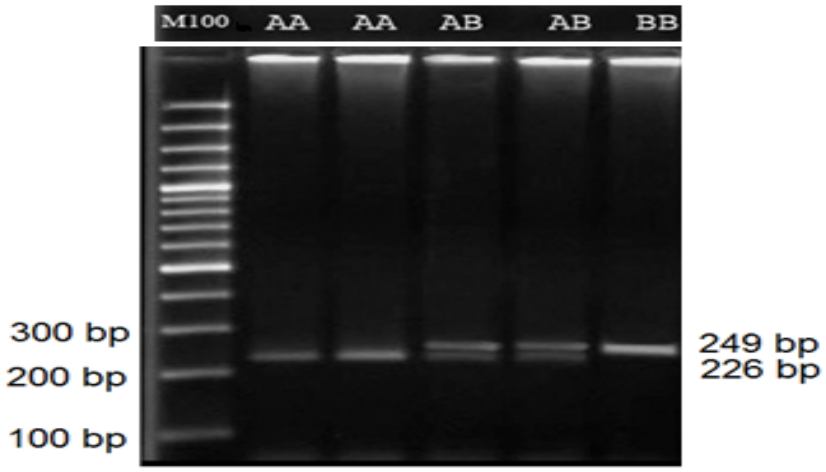
جدول ۲- پارامترهای حرارتی زنجیره‌های پلی‌مراز

مرحله	واسرشت	اتصال	تکثیر	تعداد سیکل
اول	۹٤ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه	-	-	۱
دوم	۹٤ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	٦۱ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه	٦۱ درجه سانتیگراد ٤۰ ثانیه	۳۵
سوم		-	۷۲ درجه سانتیگراد، ٤ دقیقه	۱

پس از تکثیر جایگاه مورد نظر قطعه ۲٤۹ جفت بازی حاصل شد. هضم قطعه ۲٤۹جفت بازی با آنزیم (SnaBI) Eco1051 از شرکت vivantis malaysia وجود سه ژنوتیپ AA، BB و AB را مشخص می‌کند، آنزیم Eco105I یک توالی ٦ نوکلئوتیدی شامل بازهای TACGTAرا شناسایی کرده و در محل اتصال بازهای Gو C برش می‌دهد، این آنزیم ژنوتیپ BB را برش نمی‌دهد و قطعه ۲٤۹ بازی بدون تغییر باقی می‌ماند، در صورتی که در ژنوتیپ AA هر دو رشته برش خورده و هر رشته به دو قطعه ۲۲٦ و ۲۳ بازی تبدیل می‌شود. در ژنوتیپ AB یک رشته برش خورده و به دو قطعه ۲۲٦ و ۲۳ بازی تبدیل می‌شود، و رشته دیگر بدون تغییر باقی می‌ماند. ژنوتیپ‌های مشاهده شده به وسیله نرم افزار 32 Popgene آنالیز گردید. در این بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی و میزان هتروزیگوسیتی جمعیت مورد بررسی، تعیین شد.

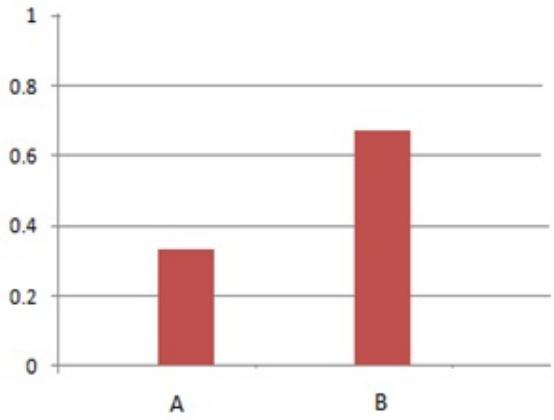
نتایج

نتایج حاصل از بررسی DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز نشان داده که DNA استخراج شده فاقد هر گونه آلودگی پروتئینی و آلودگی به RNA است. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتری در حدود ۳۰ تا ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. استخراج DNA به این شیوه غلظت مناسبی از DNA را جهت واکنش زنجیره ای پلی‌مراز فراهم نمود. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تکثیر قطعه ۲٤۹ جفت بازی از بخش اگزون ۱ تکثیر شده از ژن IGF-I توسط آنزیم برشی SnaBI هضم گردید و سه ژنوتیپ AA، AB و BB شناسایی شدند. جهت بررسی اندازه قطعات از سایز مارکر bp ۱۰۰ استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، تکثیر قطعه مورد نظر را تایید کرد.

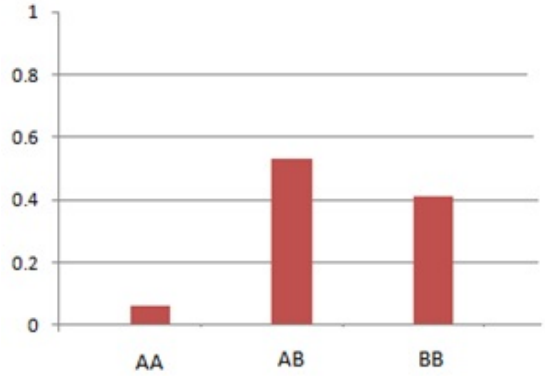


شکل ۱- الگوی PCR-RFLP قطعات هضم شده ژن IGF-I با استفاده از آنزیم برشی SnaBI

فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب ۰/۰۶، ۰/۵۳ و ۰/۴۱ می‌باشد (نمودار ۱). فراوانی آلل‌های A و B در این جمعیت به ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۶۷ برآورد گردید (نمودار ۲).



نمودار ۱- فراوانی‌های آللی ژن IGF-I



نمودار ۲- فراوانی‌های ژنوتیپی ژن IGF-I

میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در ژن IGF-I در گاوهای دورگ ۰/۵۲٦ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/٤٤١ است. به این ترتیب میزان تنوع ژن IGF-I در این جمعیت نسبتا بالا بود (جدول ۳).

جدول ۳- هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار جایگاه ژنی IGF-I در گاوهای دورگ

جایگاه ژنی	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	متوسط هتروزیگوسیتی
IGF-I	۰/۵۲٦	۰/٤٤١	۰/٤٨٣

بحث

ژنوتیپ AB بیشترین فراوانی و ژنوتیپ AA کمترین فراوانی را در گله داشت. فراوانی آلل B بیشتر از آلل A بود، که با نتایج تعدادی از محققین موافق (Reyna et al., Laurano et al., 2009; Kim 2010; Curi et al., 2005 et al., 2004;) و با نتایج برخی دیگر مخالف بود(Li et al., 2004 Ge et al., 2001; Siadkowska et al., 2006;).

Yazdanpanah et al. (1389)، با مطالعه‌ای که بر روی ۸٤ راس گاو نجدی انجام دادند. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB را به ترتیب ۰/۰۲، ۰/۱٤، ۰/۸٤ و فراوانی آلل‌های A و B را بترتیب ۰/۰۹ و ۰/۹۱ و همچنین فراوانی هتروزیگوسیتی برابر ۰/۱٤۲ گزارش نمودند. (Zych et al. 2007) با مطالعه بر ۱٤۸ گاو نژاد هلشتاین_فریزین فراوانی آللی A و B را به ترتیب ۰/۸٤ و ۰/۱٦ و فراوانی ژنوتیپی AA، AB و BB را به ترتیب ۰/۷۲۳، ۰/۲۳٦و ۰/۰٤۱ بدست آوردند. Curi et al, 2005 طی آزمایشی که روی ۳٤۸ راس گاو نر متعلق به چهار گروه ژنتیکی، شامل ۷۰ راس نلور، ۳۰ راس کانشیم (از تلاقی چارولایز و زبو) و ۲۷۵ راس دورگ سمینتال با نلور، انجام دادند، ژنوتیپ BB بیشترین فراوانی را داشت.

Fatima et al., 2009 در مطالعه ای بر روی ۱۵۰ گاومیش رودخانه ای از ۳ نژاد مهسانی، سورتی و جعفرآبادی چند شکلی ژن IGF-1 را با استفاده از روش SSCP بررسی کردند. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب برای نژاد سورتی ۰/٤٦، ۰/۱۱ و ۰/٤۳، برای نژاد مهسانی ۰/۰٤٥، ۰/۳٥٥ و ۰/٦۰ و برای نژاد جعفرآبادی ۰/٥۱، ۰/۳٦۱ و ۰/۱۲۹ محاسبه گردید.

Li et al., 2004 تحقیقی را بر روی ۱۲۰ قطعه مرغ خالص نژاد ونچانگ به منظور تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی به روشPCR-RFLP توسط آنزیم SnaB1 انجام دادند. فراوانی ژنوتیپی AA، AB و BB به ترتیب ۰/۳۲، ۰/٤۱ و ۰/۲۷ و فراوانی آلل A و B به ترتیب ۰/٥۳ و ۰/٤۷ برآورد گردید. نتایج نشان داد که تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد. ژن IGF-I با بسیاری از صفات تولیدی در ارتباط است. Reyna et al., 2010 وجود چند شکلی تک نوکلوتیدی SNP ژن IGF-I، که با صفات تولیدی در گاو ارتباط دارد، را گزارش دادند. در جمعیت شارولایز فراوانی آلل A برابر ۰/٤٦ و فراوانی آلل B برابر ۰/٥٤ بودند. در جمعیت بیف مستر آلل B بیشترین فراوانی را داشته که ۰/۹۷ بود. Yazdanpanah et al., 2011 با افزایش هتروزیگوسیتی ژنهای افراد، تنوع ژنتیکی بین گامت های تولید شده از آنها و در نتیجه بین فرزندان آنها بیشتر خواهد بود. در صورتی که میزان تنوع پایین باشد، نمی توان روش مناسبی برای انتخاب و ترجیح بعضی از حیوانات نسبت به دیگران پیدا کرد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در گاوهای نجدی را ۰/۱٤۲ گزارش دادند، که این میزان تنوع، در سطح پایینی بوده و نشان می‌دهد، هیچ گونه انتخابی در جمعیت در جهت افزایش یا کاهش فراوانی ژنوتیپ‌های IGF-1 صورت نگرفته است. افزایش میزان هتروزیگوسیتی سبب افزایش غلظت IGF-I خون می‌شود و می‌تواند به عنوان یک عامل در بهبود تولیدمثلی عمل کند. IGF-I سبب افزایش قطر فولیکولی‌ها و به دنبال آن تخمک گذاری می‌شود. (Zulu et al., 2002; Reyna et al., 2010). افزایش میزان هتروزیگوسیتی تظاهر آلل‌های مغلوب زیان‌آور را کاهش می‌دهد. با افزایش هتروزیگوسیتی در اثر آمیخته‌گری، هتروزیگوس شدن آلل‌های مغلوب در نتیجه عدم تظاهر آنها به صورت یک فنوتیپ می‌شود. (Yazdanpanah, 2011). برای اینکه جمعیتی در تعادل باشد بایستی انتخاب صورت نگیرد، موتاسیون (جهش) و مهاجرت رخ ندهد، آمیزش تصادفی باشد، اندازه جمعیت بزرگ باشد و در نهایت اثر رانش تصادفی نیز وجود نداشته باشد(Yazdanpanah, 2011)، اما با توجه به اینکه در جمعیت مورد نظر انتخاب صورت گرفته تعادل برقرار نیست. با مقایسه بین هتروزایگوسیتی مشاهده شده (Ho) و قابل انتظار (He) می‌توان دریافت، که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین این دو مقدار وجود دارد. با توجه به وجود هتروزایگوسیتی بالا می‌توان نتیجه گرفت، که جمعیت گاو دورگ از نظر این ژن، یک ذخیره ژنتیکی مناسب برای اهداف مختلف پرورشی و اصلاح نژادی در کشور می‌باشد. با توجه به اطلاعات به دست آمده از این پژوهش می‌توان بیان کرد که نشانگر IGF-1 در گاو دورگ دارای میزان هتروزیگوسیتی و پلی مورفیسم بالایی می‌باشند که نشان دهنده تنوع بالا می‌باشد. این ژن با صفات تولیدی ارتباط بسیار نزدیکی دارد. از آنجایی که در این نشانگر میزان پلی‌مورفیسم و هتروزیگوسیتی بالا بود، بنابراین در صورتی که در گاو رکوردهای تولیدی در دسترس باشند، می‌توان با

ژنوتیپ‌های مشاهده شده از نشانگر ارتباط داده و بهترین ژنوتیپ ها را انتخاب کرد. البته لازم به یاد آوری است که تنها این نشانگر نیست که بر صفات تولیدی تاثیر دارد، بلکه ژنهای دیگری نیز روی این صفات تاثیر گذارند.

References

1. Blair, H.T., Mccutcheon, S.N., Mackenezie, D.D.S., Gluckman, P.D., and Ormsby, J.E. 1987. Variation in plasma concentration of insulin like growth factor I and its coordination with live weight in mice. Aust. J. Biol. Sci. 40: 287-293.

2. Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M., Jansen, C.L., and Wherteim Van Dillen, P.M.E. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503.

3. Curi, R.A., Oliveirb, H.N., Silveir, A.C., and Lopes, C.R. 2005. Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. J. Livest. Prod. Sci. 94: 159-167.

4. Elgin, R.G., Busby, W.H., and Clemmons, D.R. 1987. An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. J. Cell Biol. 84: 3254-3258.

5. Fatima, S., Bhatt, S.M., Bhong, C.D., Rank, D.N., and Joshi, C.G. 2009. Genetic polymorphism study of IGF-I gene in buffaloes of Gujarat. Buff. Bull. 28: 159-164.

6. Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C., Irvin, K.M., and Simmen, R.C.M. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. J. Anim. sci. 79: 1757-1762.

7. Grochowska, R., Sqrensen, P., Zwierzchowski, L., Snochowski, M., and Lqvendahl, P. 2001. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-I of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. J. Anim. Scin. 79: 450-476.

8. Kim, M.H., Seo, D.S., and Ko, Y. 2004. Relationship between Egg productivity and Insulin-Like growth factor-1 genotypes in Korean native Ogol chickens. Poultry Sci. 83: 1203-1208.

9. Laureano, M.M., Otaviano, A.R., Lima, A.L.F., Costa, R.B., Salman, A.K.D., Sena, J.A.D., Tonhati, H., and Albuqurque, L.G.D. 2009. Characterization and polymorphism screening of IGF-I and prolactin genes in Nelore heifers. Ital. J. Anim. Sci. 8: 277-283.

10. Li, C., Basarad, J., Snelling, W.M., Bwnkel, B., Murdoch, B., Hansen, C., and Moore, S.S. 2004. Assessment of positional candidate genes myf5 and igf1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of Bos taurus. J. Anim. Sci. 82: 1-7.

11. Reyna, X.F., Montoya, H.M., Castrellin, V.V., Rincon, A.M.S., Bracamonte, M.P., and Vera, W.A. 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. Genet. Mol. Res. 9: 875-883.

12. Roite, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L., and Butle, A. 2001. The somatomedin hypothesis. Endocr. Rev. 22: 53-74.

13. Siadkowska, E., Zwierzchowski, L., Oprzadek, J., Strzalkowska, N., Bagnicka, E., and Krzyxewski, J. 2006. Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Anim. Sci. Pap. Rep. 24: 225-237.

14. Weber, M.S., Purup, S., Vestergaard, M., Ellis, S.E., Andersen, J.S., Akers, R.M., and Sejrsen, K. 1999. Contribution of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 to mitogenic activity in bovine mammary extracts and serum. J. Endocrinol. 161: 365-373.

15. Zulu, V.C., Nakao, T., and Sawamuka, Y. 2002. Insulin-like growth factor-I as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle. J. Med. Sci. 64: 657-665.

16. Zych, S., Szewczuk, M., Piatkowska, W.C., and Szatkowska, I. 2007. A new ACRS-SNP in the 5' flanking region of the bovine insulin-like growth factor 1 (IGF1) gene (Brief report). Arch. Tierz. Dummerstorf. 50: 531-532.

17. Zenobi, P.D., Holzmann, P., Glatz, Y., Riesen, W.F., and Froesch, E.R. 1993. Improvement of lipid profile in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by insulin-like growth factor I. Diabetologia. 36: 465-469.

18. Yazdanpanah, A. 2011. Investigation of IGF-1 gene polymorphism by PCR-RFLP in najdi cow population in Khuzestan province. Master's thesis. Department of Animal Sciences, University of Khuzestan Ramin. 25-57 p.