

هفتمین کنگره علوم دام ایران



چند شکلی ژنتیکی در ناحیه پروموتور ژن فاکتور رشد شبه انسولین ۱ در بلدرچین ژاپنی

هما اعرابی^{۱*}، محمد مرادی شهربابک^۲، عباس پاکدل^۳، حسین مرادی شهربابک^۴، علی اسماعیلی زاده کشکوییه^۵

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد، گروه علوم دامی دانشگاه تهران

۲ و ۴. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تهران

۳. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان

۵. هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان

ایمیل نویسنده مسئول: homa.aarabi1982@gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه تعیین چند شکلی در ناحیه پروموتور ژن IGF1 و ارتباط آن با وزن بدن در زمان تفریخ و هفته های مختلف پرورش تا زمان کشتار در نسل دوم بود. در این مطالعه هشت جفت بلدرچین سفید و وحشی به عنوان نسل پایه با یکدیگر تلاقی داده شدند. در مجموع ۳۴ بلدرچین در نسل اول تولید شده و از تلاقی افراد نسل اول ۴۲۲ بلدرچین در نسل دوم ایجاد شد. نمونه های خون از ۴۷۲ پرنده از سه نسل جمع آوری شده و DNA ژنومیک به وسیله روش تغییر یافته نمکی استخراج شد. با استفاده از روش PCR-SSCP یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی A → G در ناحیه مورد نظر ژن IGF1 در ۴۷۲ قطعه بلدرچین در سه نسل تشخیص داده شد. میانگین افزایش وزن روزانه ماده ها در ژنوتیپ AG بیشتر از نرها بود ($P<0.001$). نتایج ارایه شده در این مقاله در مقایسه با گزارشات دیگر در مرغ، نشان دهنده یک چند شکلی جدید در ناحیه پروموتور ژن IGF1 در بلدرچین بود که می تواند به عنوان یک نشانگر ژنتیکی برای مطالعه ارتباط با صفات اقتصادی و مزرعه ای در بلدرچین ژاپنی مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه های کلیدی: بلدرچین ژاپنی - تکنیک PCR-SSCP - پروموتور - فاکتور رشد شبه انسولین - صفات رشد

مقدمه

فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGFs) شامل خانواده هورمون های پپتیدی هستند که از نظر ساختمانی مشابه انسولین هستند که عملکردهای چندگانه ای بر روی فعالیت های متابولیک و آنالولیک دارند (۱۱). اغلب فعالیت هورمون رشد در بدن جوجه ها از طریق فاکتورهای رشد شبه انسولینی (IGF) انجام می شود (۸). بر خلاف مرغ که اکثریت مطالعات ژنومی بر روی آن متمرکز شده است، تحقیقات اندکی بر روی بلدرچین صورت گرفته است (۶). در پژوهشی تکثیر قطعه ۴۰۷ جفت بازی ناحیه اگزون ۱ ژن



هفتمین نکره علم داریان

IGF1 در ماده‌های ۴ سویه از بذرچین، هیچ گونه جهشی در بین سویه‌های مورد بررسی ملاحظه نشد، اما SNP تبدیل تیمین به سیتوزین (**T** → **C**) در مقایسه با مرغ در دو موقعیت نوکلوتیدی ۱۹۷ و ۳۴۱ مشاهده شد (۱۰). در پژوهشی عملکرد ناحیه پرومотор ژن IGF1 با سنتز کایمرهای حاوی توالی‌های^۵ IGF1 در جوجه و ژن گیرنده لوسیفراز بررسی شد و نشان داده شد که پرومotor جوجه‌ها می‌توانند بیان لوسیفراز در سلول‌های انسانی و سنتز IGF1 را افزایش دهد و بیانگر این است که بخش مهمی از پرومотор ژن IGF1 در جوجه‌ها و انسان تا حدود زیادی حفاظت شده است (۹). از آنجایی که SNP مورد مطالعه در این آزمایش در ناحیه پرومotor بود، می‌توان فرض نمود که این چند شکلی ممکن است از طریق تنظیم بیان ژن بر روی رشد تاثیر بگذارد (۱۳). هدف از این تحقیق، تعیین چند شکلی و فراوانی آللی و ژنتیکی بخشی از جایگاه پرومотор ژن IGF1 در بذرچین راپنی به روش PCR-SSCP بود.

مواد و روش‌ها

جمعیت‌های آزمایشی، استخراج DNA، طراحی پرایمر، تکثیر PCR و انجام^۱ SSCP در این تحقیق تعداد ۸ جفت پرنده از سویه سفید یا S (تخمگذار) و ۸ جفت پرنده از سویه وحشی یا W (گوشتی) به عنوان نسل والد (P) انتخاب و تلاقي دو طرفه‌ای بین آنها (نر سفید × ماده وحشی و نر وحشی × ماده سفید) انجام شد. پرنده‌گان نسل F1 به وسیله تلاقي دو طرفه W ماده × نر و S ماده × نر تولید شدند. از تلاقي پرنده‌گان نسل F1 تعداد ۴۲۲ پرنده نسل F2 ۲۴۶ پرنده نر و ۱۷۶ پرنده ماده در طی ۵ هج متوالی تولید شدند (۱۲). استخراج DNA به روش تغییر یافته نمکی انجام شد. با استفاده از نرم افزارهای طراحی پرایمر شامل Primer3 plus و Primer designing tool F: (R: GGGCATGGTGACAAATAACATC GTTAGTCAGCATGTAGGCGTG) برای تکثیر بخشی از جایگاه پرومотор ژن IGF1 بذرچین از سایت NCBI بر اساس توالی مرغ با شماره دسترسی KM596748.1 طراحی شد. پس از انجام PCR، تعیین الگوهای ژنتیکی با استفاده از روش SSCP انجام شد. پس از انجام SAS نرم افزار BioEdit، پنج الگوی متفاوت مشاهده شد و از هر الگو تعدادی نمونه توالی‌یابی و پس از هم‌دیف کردن توالی‌ها با استفاده از نرم افزار، چند شکلی‌های مشاهده شده تعیین و جهت تجزیه و تحلیل، بذرچین‌ها تعیین ژنتیک شدند و سه الگوی متفاوت از لحاظ ژنتیکی مشخص شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از انجام مراحل آزمایشگاهی و بررسی توالی هر یک از الگوهای ژنتیکی، بررسی ارتباط بین ژنتیک‌ها و صفات موردنظر در ۴۲۲ قطعه بذرچین جمعیت F2 با استفاده از روش Mixed SAS نرم افزار انجام شد. مدل آماری مورد نظر برای تجزیه داده به شرح زیر بود (۳):

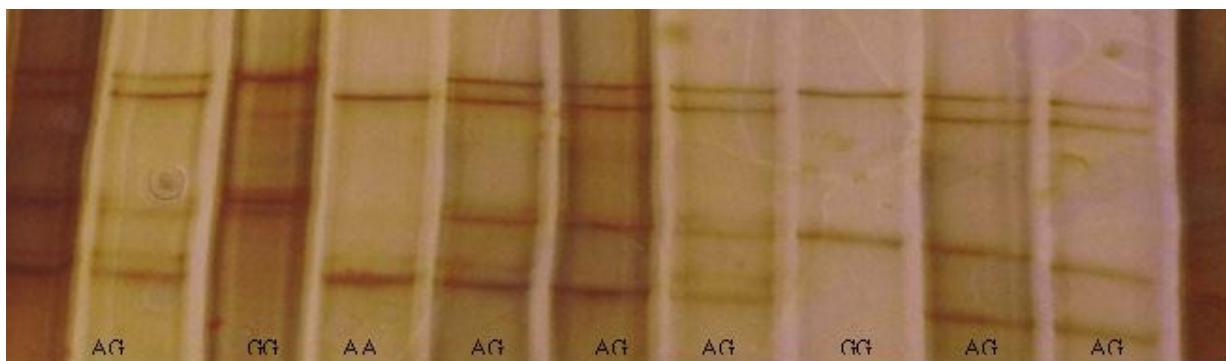
$$y_{ijkl} = \mu + S_i + H_j + G_k + (SG)_{ik} + a_{ijk} + e_{ijkl}$$

که μ امین مشاهده مربوط به i امین جنس، j امین تفریخ و k امین ژنتیک است. S_i میانگین کل، H_j اثر ثابت i امین جنس، G_k اثر ثابت j امین تفریخ و G_k اثر ثابت k امین ژنتیک، $(SG)_{ik}$ اثر متقابل i امین جنس و k امین ژنتیک، a_{ijk} اثر تصادفی حیوان و e_{ijkl} اشتباہ تصادفی با میانگین صفر و σ^2_e است.

^۱Single Strained Conformation Polymorphism

تکثیر و تعیین الگوهای ژنوتیپی

پس از انجام SSCP در ابتدا ۵ الگوی ژنوتیپی متفاوت مشاهده شد که بعد از توالی یابی تنها سه الگو از لحاظ ژنوتیپی با یکدیگر متفاوت بودند. با توجه به توالی یابی الگوهای ژنوتیپی مختلف بخشی از جایگاه پرومотор ژن IGF1 جهش $A \rightarrow G$ اوّلین بار در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۷۲ با سه ژنوتیپ AA، AG و GG شناسایی شد (شکل ۱) که با شماره دسترسی KT587341.1 و KT587342 در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید (شکل ۱).



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل پلی اکریلامید ژنوتیپ‌های G172A ژن فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF1) در بذرچین ژاپنی: یک جهش G172A وجود داشت. سه پروفایل (AA, AG و GG) از تصویر ژل مشاهده شد.

چند شکلی ژن IGF1 در جوجه‌ها در مطالعات زیادی گزارش شده است (۴، ۹، ۵ و ۷). در مرغ در موقعیت ۵۷۰ ناحیه پرومотор، جهش $A \rightarrow C$ گزارش شد (۴ و ۵). جهش مشاهده شده در پژوهش حاضر، تاکنون در مرغ مشاهده نشده است ولی نوکلئوتید همردیف با موقعیت ۱۷۲ در پژوهش حاضر (موقعیت ۱۲ در مرغ)، شامل نوکلئوتید G بود. پس از تکثیر قطعه ۴۰۷ جفت بازی ناحیه اگرون ۱ در ماده‌های ۴ سویه بذرچین، هیچ گونه جهشی در بین سویه‌ها مشاهده نشد ولی متفاوت با SNP ۳۴۱ و ۱۹۷ نسبت به مرغ ($T \rightarrow C$) (۱۰). اثر جنس در وزن‌های سنین ۴ و ۵ هفتگی و قبل از کشتار در ژنوتیپ‌های AG و GG و تاثیر این عوامل در سن ۳ هفتگی در ژنوتیپ AA از لحاظ آماری معنی دار بود (در سطح ۰/۰۰۱). ماده‌های ژنوتیپ GG و AA به ترتیب دارای بیشتری و کمترین میانگین وزن بدن بودند ولی اختلاف بین آنها از لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول ۱). در این پژوهش تفاوت معنی داری بین وزن بدن نرها و ماده‌ها در ژنوتیپ AA مشاهده نشد (جز در سه هفتگی). که به نظر می‌رسد به علت تعداد کم افراد نسل پایه و ساختار شجره باشد. تا قبل از سه هفتگی تفاوت معنی داری بین وزن بدن نر و ماده‌ها در هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها وجود نداشت (جدول ۱). که در توافق با تحقیقات فنوتیپی گزارش شده در بذرچین است (۱، ۲).

به طور خلاصه نتایج ارایه شده در این مطالعه در مقایسه با گزارشات دیگر در مرغ، نشان دهنده وجود یک چند شکلی جدید در ناحیه پرومotor ژن IGF1 در بذرچین بود اما ارتباط آن با صفات مرتبط با وزن بدن و نرخ رشد از لحاظ آماری معنی دار نبود ($P < 0.05$).



هفتمین نکره علوم دام ایران



جدول ۱- اثر متقابل^{*} بین وزن و جنس در چند شکلی‌های زن IGF1 در بلدرچین ژاپنی

ژنوتیپ IGF1-SNP1

GG			AG			AA			سن (روز)	صفت
ماده	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده	نر	ماده		
۶/۱۷±۰/۶۲ n=۶۲	۶/۱۲±۰/۶۲ n=۷۷	۶/۱۷±۰/۶۱ n=۱۰۶	۶/۱۱±۰/۶۱ n=۱۵۴	۶/۱۴±۰/۶۶ n=۸	۶/۱۳±۰/۶۲ n=۱۴	وزن زنده روزگی (گرم)	۱	میانگین حداقل مربعات اشتباه استاندارد	میانگین حداقل مربعات اشتباه استاندارد	میانگین حداقل مربعات اشتباه استاندارد
۲۱/۶۴±۰/۸۸ n=۶۳	۲۱/۸۱±۰/۷۳ n=۷۵	۲۱/۳۷±۰/۶۲ n=۱۰۶	۲۱/۵۰±۰/۵۴ n=۱۵۲	۲۴/۹۷±۲/۶۴ n=۸	۲۰/۱۴±۱/۶۹ n=۱۴	روزگی	۷			
۴۵/۳۲±۱/۹۱ n=۶۳	۴۴/۱۵±۱/۰۹ n=۷۶	۴۷/۲۴±۱/۲۹ n=۱۰۵	۴۴/۸۳±۱/۲۰ n=۱۵۳	۴۹/۴۴±۵/۴۹ n=۸	۴۱/۲۱±۳/۵۱ n=۱۴	روزگی	۱۴			
۸۲/۳۳ ^a ±۲/۹۰ n=۶۳	۷۷/۹۲ ^{ab} ±۲/۳۲ n=۷۷	۸۳/۰۳ ^a ±۱/۸۹ n=۱۰۴	۷۸/۲۸ ^a ±۱/۷۲ n=۱۵۳	۸۴/۷۴ ^a ±۷/۹۷ n=۸	۷۰/۸۴ ^{b**} ±۵/۲۲ n=۱۴	روزگی	۲۱			
۱۲۱/۴۰ ^a ±۳/۷۲ n=۶۳	۱۱۳/۰۰ ^b ±۲/۹۷ n=۷۵	۱۲۰/۵۸ ^a ±۲/۴۸ n=۱۰۶	۱۱۲/۸ ^b ±۲/۲۱ n=۱۵۰	۱۲۰/۰۹ ^{ab} ±۱۰/۵۸ n=۸	۱۰۴/۷۳ ^b ±۷/۷۳ n=۱۴	روزگی	۲۸			
۱۶۲/۵۵ ^a ±۳/۹۱ n=۴۹	۱۵۱/۱۷ ^b ±۳/۲۵ n=۶۶	۱۶۰/۲۰ ^a ±۲/۵۴ n=۹۰	۱۵۰/۸۱ ^b ±۲/۳۱ n=۱۳۰	۱۵۲/۰۴ ^{ab} ±۱۲/۴۷ n=۶	۱۴۷/۰۴ ^b ±۸/۸۸ n=۹	روزگی	۳۵			
۱۰۲/۸۷ ^a ±۳/۵۱ n=۶۳	۱۴۲/۶۱ ^b ±۲/۸۰ n=۷۶	۱۵۴/۴۵ ^a ±۲/۳۲ n=۱۰۶	۱۴۴/۳۳ ^b ±۲/۰۶ n=۱۴۹	۱۴۹/۵۲ ^{ab} ±۱۰/۱۳ n=۸	۱۳۵/۲۹ ^b ±۷/۴۴ n=۱۴	قبل از کشتار	از			
۲/۰۷±۰/۱۳ n=۶۲	۲/۱۴±۰/۰۹ n=۷۵	۲/۰۸±۰/۰۸ n=۱۰۶	۲/۱۱±۰/۰۷ n=۱۵۲	۲/۵۸±۰/۳۶ n=۸	۱/۹۰±۰/۲۳ n=۱۴	میانگین افزایش	۷			
۳/۴۷ ^{ab} ±۰/۱۵ n=۶۳	۳/۲۴ ^b ±۰/۱۱ n=۷۵	۳/۶۲ ^a ±۰/۱۴ n=۱۰۵	۳/۳۷ ^b ±۰/۱۱ n=۱۵۲	۳/۵۷ ^{ab} ±۰/۴۹ n=۸	۳/۰۷ ^b ±۰/۳۰ n=۱۴	روزگی	۱۴	وزن روزانه		
۵/۲۸ ^a ±۰/۱۹ n=۶۳	۴/۷۱ ^b ±۰/۱۵ n=۷۶	۵/۱۶ ^a ±۰/۱۴ n=۱۰۴	۴/۷۴ ^b ±۰/۱۴ n=۱۵۳	۴/۹۸ ^{ab} ±۰/۵۵ n=۸	۴/۱۹ ^b ±۰/۳۴ n=۱۴	روزگی	۲۱			
۵/۵۶ ^a ±۰/۲۱ n=۶۳	۵/۰۸ ^{ab} ±۰/۱۷ n=۷۵	۵/۳۷ ^a ±۰/۱۵ n=۱۰۴	۴/۹۸ ^b ±۰/۱۳ n=۱۵۰	۵/۰۵ ^{ab} ±۰/۵۸ n=۸	۴/۸۶ ^b ±۰/۳۶ n=۱۴	روزگی	۲۸			
۴/۶۲ ^{ab} ±۰/۲۵ n=۴۹	۴/۱۷ ^b ±۰/۲۱ n=۶۶	۴/۶۷ ^a ±۰/۱۷ n=۹۰	۴/۳۱ ^b ±۰/۱۷ n=۱۳۰	۴/۴۳ ^{ab} ±۰/۸۱ n=۶	۴/۶۰ ^{ab} ±۰/۵۸ n=۹	روزگی	۲۸			

*اثر متقابل جنس و ژنوتیپ به صورت دو عاملی ارایه شده است. **حرروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد.



هفتمین کنگره علوم دام ایران



در مجموع فراوانی ژنوتیپ AA در هر سه جمعیت پایین بود که می‌تواند به دلیل ساختار شجره و نوع تلاقي گری‌های بین والدین دارای ژنوتیپ‌های مختلف باشد. احتمال دوم می‌تواند به علت وجود اثر نمونه‌گیری مندلی ناشی از پایین بودن اندازه جمعیت پایه باشد. میانگین افزایش وزن روزانه ماده‌ها در مقایسه با نرها در ژنوتیپ AG بیشتر بود ($P<0.001$). با توجه به آنکه در اکثر منابع و گزارشات، چند شکلی جایگاه پروموتور ژن IGF1 در مرغ ارتباط معنی‌داری با صفات رشد داشت، بنابراین این جایگاه می‌تواند در بلدرچین نیز به عنوان یک جایگاه مؤثر بر صفات مرتبط با رشد محسوب شود، بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به آنکه ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی پروموتور ژن IGF1 با صفات مرتبط با رشد و وزن بدن در مرغ مشاهده شده، از یک جمعیت تصادفی و یا با نسل پایه بزرگ‌تر برای بررسی ارتباط بین این چند شکلی و صفات مرتبط با رشد در بلدرچین نیز استفاده شود.

منابع

- اعرابی، ه. مرادی شهربابک، م. و نجاتی جوارمی، الف. ۲۰۱۰. انتخاب واگرای وزن بدن در سن چهار و پنج هفتگی در بلدرچین ژاپنی. مجله علوم دامی ایران. شماره ۴، ص ۳۷۳-۳۸۰.
- آیت‌الله‌ی، الف. ۱۳۸۶. انتخاب برای صفات رشد و تولید مثل در بلدرچین ژاپنی. رساله دکتری دانشگاه تهران.
- خالداری، م. (۲۰۱۲). روش‌های آماری. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی، تهران.
- Amills, M., N. Jimenez, D. Villalba, M. Tor, E. Molina, D. Cubilo, C. Marcos, A. Francesch, A. Sanchez and M. Estany. 2003. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the Chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. *Poultry Science*. 82: 1485–1493.
- Kadlec, J., B. Hosnedlova, V. Rehout, J. Citek and L. Vecerek. 2011. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. *Journal of Agrobiology*. 28(2): 157–163.
- Kayang, B.B., A. Vignal, M. Inoue-Murayama, M. Miwa, J.L. Monvoisin, S. Ito and F. Minvielle. 2004. A first generation microsatellite linkage map of the Japanese quail. *Animal Genetics*. 35: 195-200.
- Khadem, A., H. Hafezian and GH. Rahimi-Mianji. 2010. Association of single nucleotide polymorphisms in IGF-I, IGF-II and IGFBP-II with production traits in breeder hens of Mazandaran native fowls breeding station. *African Journal of Biotechnology*. 9 (6): 805-810.

Genetic Polymorphism in promoter of Insulin- like Growth Factor 1 gene in Japanese quail

Abstract

The purpose of this study was to detect the polymorphism in IGF1 promoter region and their association with Body weights at the time of hatching and different weeks until slaughter were recorded in the second generation. In this research eight pairs of white and wild quails were crossed reciprocally as a base population. A total of 34 quails were produced in first generation (F1) and 422 quails were generated by intercrossing the F1 population. Blood samples were collected from 472 birds from three Generations and genomic DNA was extracted using modified salting out method. A pair of specific primer pairs were used for amplification of IGF1 promoter region in 472 birds from three Generations and polymorphisms were detected using PCR SSCP method. Analysis of phenotypic data showed that the average of daily gain was higher in females compared to males for AG genotype ($P<0.001$). No significant associations were observed between IGF1 promoter genotypes and body weights in one up to five weeks of ages and slaughter time and the average of daily gain from first to four weeks. Comparison between detected allele in the present study with reported allele by other research groups in chickens revealed a novel SNP in promoter of IGF1 gene in Japanese quail, the SNPs discovered in this study provided suitable markers for association studies of candidate genes with important economic traits in Japanese quail.

Keywords: Insulin-Like Growth Factor-I, Growth traits, Japanese quail, PCR-SSCP assay, promoter