بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه صنعتی اصفهان

همایش ملی
نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی

اولین همایش ملی

نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی

۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

** کتابچه مقالات **

دبیر همایش: دکتر سعید انصاری مهیاری

اعضا کمیته علمی (براساس حروف الفبا):

دکتر محمد علی ادریس (دانشگاه صنعتی اصفهان)

دکتر سعید انصاری مهیاری (دانشگاه صنعتی اصفهان)

دکتر علیرضا ترنگ (پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور)

دکتر سید مرتضی حسینی (پژوهشکده زیست فناوری - اصفهان)

دکتر حمیدرضا رحمانی (دانشگاه صنعتی اصفهان)

دکتر احمد ریاسی (دانشگاه صنعتی اصفهان)

دکتر عبدالرضا نبی نژاد (پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور)

دکتر محمد حسین نصر اصفهانی (پژوهشکده زیست فناوری - اصفهان)

اعضا کمیته اجرایی:

دکتر احمد ریاسی

مهندس حمید خشوعی

مهندس احمد شاهمرادی

مهندس مهرنوش فروتن

مهندس ندا نوری نائینی

مهندس سیمین خورسندی

مهندس رضا مرادی حاجی دولو

مهندس سهیلا زارعی

مهندس زهرا وفایی

پیام دبیر همایش

توسعه و کاربرد علم بیوتکنولوژی در کشور بسرعت در حال گسترش میباشد بصورتیکه در حال حاضر ایران در رتبه تحت منطقه قرار گرفته و در آسیا رتبه پنجم تولید علم بیوتکنولوژی را برعهده دارد و در آینده ای نزدیک قادر خواهد بود با کشورهای برتر آسیا رقابت داشته باشد. با عنایت به پیشرفتهای علم ژنتیک و روش های مولکولی، بیوتکنولوژی نوین شکل گرفته و در سالهای آینده نیز نفوذ بیشتری در زندگی بشر خواهد داشت. بیوتکنولوژی دام که جوان تر از همتایان خود در سایر بخش ها از جمله علوم گیاهی و علوم پزشکی است، هم اکنون پرشتاب در حال توسعه وگسترش میباشد. بدیهی است ظرفیتهای موجود کشور در صنعت دامپروری در کنار قابلیتهای بیوتکنولوژی علوم دامی موجب توجه زیاد محققین به بیوتکنولوژی دامی شده است.

نشانگرهای مولکولی DNA، مهندسی ژنتیک، کشت بافت و جنین، تکنولوژی نوترکیب و سلولهای بنیادی از جمله جنبه های مختلف بیوتکنولوژی نوین هستند که به نحوی بر سلامتی، تغذیه و محیط زیست تأثیر می گذارند. امروزه بیوتکنولوژی حیوانی به عنوان یک ابزار قدرتمند در اختیار دانشمندان ژنتیک حیوانی قرار گرفته تا بتوانند با بهروری از تکنیک های نوین بیوتکنولوژی و تلفیق آنها با روشهای کلاسیک به نژادی، هر چه بیشتر سرعت، دقت و هزینه مسیرهای اصلاح دام را بهبود بخشند. استفاده موثر و دقیق از فنون بیوتکنولوژی از قبیل همسانه سازی (Cloning)، تولید حیوانات تراریخته، بهگزینی و انتخاب براساس کل اطلاعات و توالی ژنوم (Genomic Selection) در کنار تعیین تنوع گونه ها و نژادها و غیره به منزله ابزارهای کارآمد در سطح جهان مورد استفاده دانشمندان قرار گرفته و درآمدهای سرشاری را از این بابت نصیب آنها کرده است.

براین اساس گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان همایش ملی با عنوان نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی را برای نخستین بار در کشور با همکاری مجموعه های مرتبط با بیوتکنولوژی جانوری از جمله پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان و همچنین پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور در شهریورماه سال جاری برگزار نمود. فراخوان همایش از تیرماه به دانشگاهها و مراکز تحقیقاتی ارسال و نزدیک به یکصد مقاله در راستای محورهای همایش به دبیرخانه واصل گردید و پس از داوری، مقالات دارای معیارهای علمی مناسب جهت ارایه انتخاب شد. همچنین در این همایش هفت سخنران مدعو در حوزه های مرتبط با بیوتکنولوژی دامی آخرین دستاوردها را ارائه مینمایند.

سعید انصاری مهیاری

این همایش با همکاری

پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان و

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کشور برگزار شده است

حامیان همایش:

دانشکده کشاورزی - گروه علوم دامی

شرکت یاساطب

SinaClon BioScience شرکت سیناکلون

فهرست مقالات:

عنوان مقالات **شماره صفحه**

خصوصیات بیولوژیکی وچندشکلی ژن لاکتوفرین در گاوهای شیری(حجت اسدالله پورنعنایی).....۱-۴
بررسی چند شکلی ژن FecG در گوسفند قره گل با استفاده از روش PCR-RFLP(نجات بادبرین).....۵-۸
کاربرد پروتئومیکس در تشخیص بیماری و بهبود عملکرد تولیدمثلی در گاو(مینا باقری ورزنه).....۹-۱۲
بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و محیط بر تولید شیر گاوهای شیری ایران **(مهدی بهلولی)**.....۱۳-۱۸
الگوی بیان پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید در هیپوتالاموس در...(فرید پژوهی).....۱۹-۲۳
مطالعه ی ارتباط بین صفات کمی و کیفی اسپرم با میل جنسی قوچ های دورگ (محمد مصطفی پورسیف).....۲۵-۲۸
ارزیابی فراوانی چند شکلی جایگاه K232A از ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز(DGAT1) ...(ملیحه پیرزاد).....۲۹-۳۲
ارتباط چند شکلی ژن DGAT1 با عملکرد صفات تولید شیر و امتیاز سلول‌های سوماتیکی ...(ملیحه پیرزاد).....۳۳-۳۶
بررسی پلی مورفیسم ژن TLR2 و ارتباط آن با نمره سلولهای سوماتیکی در گاوهای شیری...(محمد جعفریان).....۳۷-۴۰
بررسی چند شکلی ژنIGF-I با استفاده از PCR-SSCP در گوسفند ماکویی(عباس حاجی حسینلو).....۴۱-۴۴
بررسی مقدماتی چند شکلی مقاومت ژنتیکی به نماتود هموئکوس کنتورتوس در... (مونا حبشی زاده اصل).....۴۵-۴۸
تحلیل پیوستگی نشانگرهای مولکولی کروموزوم ۱ برای شناسایی نواحی ژنومی مؤثر بر رشد ...(رویا حریت).....۴۹-۵۲
دست‌ورزی ژنتیکی و تولید حیوانات تراریخت(**آرش** داودی).....۵۳-۵۸
تغییرات بیان ژن CRH و سازگاری جوجه‌های گوشتی به تنش گرمایی(رقیه رحمانی فیروزی).....۵۹-۶۲
اثرات عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش بر بیان ژن TRH در ...(رقیه رحمانی فیروزی).....۶۳-۶۶
نشانگرهای مولکولی و آبزی‌پروری (سالار درافشان).....۶۷-۷۰
بررسی تنوع ژنتیکی پنج مارکر میکروستلایت مرتبط با ژن FecB در گوسفند سنجابی(ربیع رهبر).....۷۱-۷۳
شناسایی چند شکلی ژن FABP4 درگوسفندان آمیخته افشاری× برولا مرینو با استفاده از PCR-SSCP(**لیلا زاهدی**).....۷۵-۷۸
بررسی ارتباط بین ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پائین اکسید شده(OLR1) با صفات تولیدی ...(مسعود سلطانی).....۷۹-۸۲
بررسی چند شکلی ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پائین اکسید شده(OLR1) و تنوع آن ... (مسعود سلطانی).....۸۳-۸۶
تنوع اللی ژن FTO (اینترون ۳ و اگزون ۴) درگوسفندان آمیخته افشاری × برولا مرینو با استفاده از...(وحید سلمانی).....۸۷-۹۰
Sperm Status and DNA Dose Play Ke... **(شادانلو)**.....۹۱-۹۷
بیان ژن کیس ـ ۱ در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش صحرایی(محمد سعید صالحی).....۹۹-۱۰۲
بررسی چندشکلی در دو جایگاه ژن STAT1 در گاوهلشتاین استان اصفهان(غلامحسین عسکری).....۱۰۳-۱۰۷
بررسی تاثیر پلی مورفیسم ژن های اوستئوپونتین (OPN) و کاپاکازئین (KCN)...(هادی غلامی) ۱۰۹-۱۱۳
شناسایی بیماری نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات با استفاده از تکنیک PCR –R F ...(سمیه قرائی فتح آباد).....۱۱۵-۱۱۸
بررسی چندشکلی ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان نژاد زل مازندران با روش PCR-RF(شهاب الدین قره ویسی).....۱۱۹-۱۲۳
شبیه سازی دام و امنیت غذایی(مجتبی قنبری).....۱۲۵-۱۲۸
بررسی چندشکلی ژن هورمون رشد مرغ‌های بومی فارس به روش PCR- RFLP با آنزیم Msp I (سمانه گرجی) ۱۲۹-۱۳۲
کلونینگ وکتور کد کننده قطعهC3dگاو به عنوان ادجوانت مولکولی جهت کاربرد ...(طناز لایق).....۱۳۳-۱۳۶

تعیین چند شکلی ژن بورولا در گوسفندان نژاد زل با استفاده از روش ...PCR-RFL(هادی محمودی).....**۱۳۹-۱۳۷**
کلون قطعه Fc توکسین باکتری *کلستریدیوم تتانی* با هدف کاربرد در واکسن‌های DNA...(حسین معتمدی).....**۱۴۴-۱۴۱**
ارتباط بیان ژن HSP70 و عادت‌پذیری جوجه‌های گوشتی به...(محمد طار هرکی نژاد).....**۱۴۸-۱۴۵**
آنالیزساختار ژن در آلل های*I*Ovar-DRB مختلف گوسفندی(حافظعلی دلجو عیسی لو).....**۱۵۲-۱۴۹**
استفاده از نانوبیوتکنولوژی در پرورش و سلامت دام (علی خطیبی بردسیری) **۱۵۶-۱۵۳**
کاربرد نانوبیوتکنولوژی در آبزی پروری و شیلات (علی خطیبی بردسیری) **۱۶۰-۱۵۷**
بررسی بیان ژن موسین ۲ در ژژونوم جوجه گوشتی (حشمت سپهری مقدم) **۱۶۴-۱۶۱**
پروتئومیکس و کاربرد آن برای شناسایی بیماری‌های دام‌های اهلی(فرهاد احمدی) **۱۶۸-۱۶۵**
مطالعه ی اثر ترکیب ژنتیکی و فتوپریود بر روی صفات کمی و کیفی ....(محمد مصطفی پورسیف) **۱۷۲-۱۶۹**
مسائل اخلاقی وبیوتکنولوژی در تولید مثل دام(میرزا پاپی پور) **۱۷۶-۱۷۳**
بررسی ارتباط چند شکلی ژن میوستاتین با صفات وزن تولد و افزایش وزن در گوسفند....(محمد فرهادیان).....**۱۸۰-۱۷۷**
بررسی بیان کمی برخی از ژن‌های مرتبط با تنش در اووسیت‌های بالغ شده گوسفندی ...(زهرا غریب زاده) **۱۸۶-۱۸۱**
بررسی سطوح تستوسترون پلاسما و ارتباط آن ویژگی های اسپرم قوچ های دورگ(محمد مصطفی پورسیف) **۱۹۰-۱۸۷**
بررسی تاثیر همزمان فاکتورهای رشد EGF، bFGF و هورمون FSH...(مهندس فروزان اسمعیل زاده) **۱۹۴-۱۹۱**
روسکوویتین و اثر آن روی اکسپند سلول‌های کومولوس اووسیت میش(سلمان نصرالهی) **۲۰۰-۱۹۵**
میش در همزمانی فحلی با استفاده از نورجستومت، اسفنج و سیدر eCG...(صادق چراغی‌سرای) **۲۰۴-۲۰۱**
بررسی نمو بالقوه تخمک های گوسفندی در محیط کشت ....(زاهدی مقدم) **۲۰۸-۲۰۵**
تاثیر پروستاگلاندین F2α بر خصوصیات کمی و کیفی منی ۴ نژاد قوچ دورگ (علی الفتی چغاگلانی) **۲۱۲-۲۰۹**
بررسی اثر هم کشتی سلولهای اسپرماتوگونی نابالغ گاوی با فیدر های سرتولی و STO(زهرا نصیری) **۲۱۶-۲۱۳**
بررسی وضعیت هسته و میکروتوبول در طی فرآیند بلوغ درتخمک‌های گاو، گوسفند و بز(مریم کیانی) **۲۲۱-۲۱۷**
ایجاد یک روش بهینه فاقد زونا جهت انتقال هسته سلول سوماتیک...(سید مرتضی حسینی) **۲۲۹-۲۲۳**
بررسی اثر تغییرات اپی ژنتیکی سلولهای سوماتیک دهنده هسته (هیپومتیلاسیون) **...(** فرنوش جعفرپور) **۲۳۷-۲۳۱**
موقعیت یابی ایمنوهیستوشیمی آروماتاز در دستگاه تناسلی بز نر(صباح محمدی) **۲۴۲-۲۳۹**
تاثیر چندشکلی ژن کاپاکازئین روی صفات شیرواری گاوهای شیری هلشتاین ....(خداویردی جوان سیاه بیگدیلو).....**۲۴۵-۲۴۳**
تشخیص موتاسیون ژن $DNA\text{-}PK_{CS}$ در اسب های نژاد عرب (اصیل) در ایران(رویا شهیدزاده عربانی).....**۲۵۱-۲۴۷**

خصوصیات بیولوژیکی وچندشکلی ژن لاکتوفرین در گاوهای شیری

حجت اسدالله پورنعنایی*[1]، عزیزالله باختری[2]، سعید انصاری مهیاری[3]، محمدعلی ادریس[3]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲-دانشجوی دکتری علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان ،۳-عضو هیات علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

* نویسنده مسئول: حجت اسدالله پورنعنایی H.Asadallahpor@gmail.com

چکیده

در این مقاله مروری خصوصیات بیولوژیکی پروتئین لاکتوفرین، نقش آن در سیستم دفاعی بدن و همچنین چندشکلی‌های ژنتیکی موجود در این پروتئین و ارتباط آن با صفات تولیدی و ورم پستان مورد بررسی قرار گرفته است. لاکتوفرین با وزن ملکولی ۸۰ کیلودالتون از ۶۹۰ اسیدآمینه تشکیل شده است. این گلیکوپروتئین نقش‌های عملکردی و بیولوژیکی فراوانی را در بدن بر عهده دارد که می‌توان به نقش آن در مکانیسم‌های دفاعی بدن علیه ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و پارازیت‌ها، و همچنین جلوگیری از رشد پاتوژن‌های بوجود آورنده ورم پستان اشاره نمود. مطالعات انجام شده توسط محققین مختلف، ارتباط بین چند شکلی این ژن را با صفات تولیدی و مقاومت به ورم پستان در گاوهای هلشتاین مورد تائید قرار داده‌اند. در نتیجه با استفاده از چند شکلی‌های ژنتیکی موجود در این ژن و ارتباط آن با صفات تولیدی و ورم پستان می‌توان از این ژن به عنوان یکی از ژن‌های کاندید در برنامه‌های اصلاح نژادی گاوهای شیری، جهت بهبود صفات تولیدی وافزایش مقاومت آن‌ها به بیماری ورم پستان استفاده نمود.

واژگان کلیدی: لاکتوفرین، چندشکلی، ورم پستان و گاوشیری

مقدمه

توجه به ژنتیک مولکولی جهت کمک به انتخاب و اصلاح نژاد دام ها، از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا امکان انتخاب دقیق‌تر و دستیابی به پیشرفت ژنتیکی سریع‌تر را ممکن می‌سازد. لاکتوفرین یکی ازپروتئین‌های مهم و چندکاره‌ای است که در شیر و دیگر ترشحات بدن مانند بزاق، صفرا، ترشحات موکوسی، اشک و همچنین در گرانول‌های ثانویه نوتروفیل‌ها و سلول‌های اپیتلیال وجود دارد (Kaminski *et al*., 2006). چندشکلی‌های ژنتیکی زیادی در ژن لاکتوفرین در نواحی پروموتر، آکسون و همچنین در اینترون‌ها گزارش شده است. با استفاده از این چندشکلی‌ها و در صورت وجود ارتباط بین آن‌ها و صفات تولیدی و ورم پستان، می‌توان از آن‌ها به عنوان ابزاری جهت کمک به انتخاب سریع‌تر و دقیق‌تر دام‌ها بهره جست (Pawlik *et al*., 2009).

ویژگی‌های ژنتیکی و بیولوژیکی گلیکوپروتئین لاکتوفرین

لاکتوفرین که به آن پروتئین قرمز نیز گفته می‌شود برای اولین بار در سال ۱۹۳۹ از پروتئین‌های موجود در آب پنیر تفکیک و مورد شناسایی قرار گرفت (Kutila, 2004). این گلیکوپروتئین با وزن ملکولی ۸۰ کیلودالتون از ۶۹۰ اسیدآمینه تشکیل شده است. لاکتوفرین یکی از پروتئین‌های مهم و چندکاره ای است که در شیر و دیگر ترشحات بدن مانند بزاق، صفرا، ترشحات موکوسی، اشک و همچنین در گرانول‌های ثانویه نوتروفیل‌ها و سلول‌های اپیتلیال وجود دارد. ژن لاکتوفرین در گاو روی کروموزوم شماره ۲۲ قرار دارد و شامل ۱۷ آکسون می‌باشد (Kaminski *et al*., 2006). لاکتوفرین در مکانیسم‌های دفاعی بدن علیه ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و پارازیت‌ها نقش

دارد. در ساختار این پروتئین دو لپ وجود دارد (C و N) که هریک از این دولپ از دو ناحیه کروی شکل تشکیل شده و دارای یک جایگاه اتصال با آهن است. آکسون‌های۲ تا ۴ و همچنین ۹ تا ۱۲ این ژن، قسمت اول ناحیه کروی هر لپ و آکسون‌های ۱۲ تا ۱۵ این ژن قسمت بعدی هرلپ این پروتئین را کد می‌کند (Seyfert *et al*., 1994). مطالعات اولیه در خصوص مکانیسم ضد باکتریایی این گلیکوپروتئین به این موضوع اشاره دارد که این پروتئین با بلوکه کردن یون آهن و غیر قابل دسترس نمودن آن باعث جلوگیری از رشد باکتری‌هایی می‌شود که در ساختار سلولی خود احتیاج به یون آهن دارند. با بیشتر شدن دامنه مطالعات در مورد این گلیکوپروتئین، مشخص گردید که مکانیسم ضد باکتریایی لاکتوفرین بسیار پیچیده است به طوری‌که بعضی از آزمایشات نشان می‌دهد که این گلیکوپروتئین می‌تواند روی دیواره سلولی باکتری‌ها اثر گذاشته و با جدا کردن لیپوپلی‌ساکارید از دیواره سلولی، حساسیت این باکتری‌ها را نسبت به آنتی‌بادی و لیزوزوم‌ها افزایش دهد (Pawlik *et al*., 2009). غلظت لاکتوفرین موجود در شیر گاو از تمامی پستاندارن دیگر کم‌تر است. با این وجود در مدت زمانی که غده پستان، آغوز تولید می‌کند و یا در شرایطی که پستان تحت عفونت باکتریایی قرار گرفته است، غلظت لاکتوفرین موجود در شیر به صورت معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند(Li *at al*., 2004). در بافت‌های مختلف بدن میزان بیان ژن لاکتوفرین متفاوت می‌باشد، به طوری‌که بیشترین سطح بیان این ژن در غده پستان و کبد و پس از آن به میزان متوسطی در بافت روده و به مقدار بسیار کمی در بافت‌های شش، کلیه و طحال صورت می‌گیرد. در غده پستان ژن لاکتوفرین توسط سلول‌های اپیتلیال و نوتروفیل‌ها بیان می‌شود و میزان بیان این ژن وابسته به مرحله رشد آلوئل‌ها می‌باشد. میزان بیان این ژن تحت تأثیر فاکتورهایی نظیر اسید رتینوئیک و TNF_alpha[1] نیز قرار می‌گیرد (Pawlik *et al*., 2009).

چندشکلی‌های مورد مطالعه در ژن لاکتوفرین و ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی و تشخیص نژادی

چندشکلی‌های زیادی در ژن لاکتوفرین در نواحی پروموتر، آکسون و همچنین در اینترون‌ها گزارش شده است. وجود چندشکلی در ناحیه ۳۲+ پروموتر این ژن (G/C) ارتباط معنی‌داری با تولید پروتئین و همچنین درصد پروتئین شیر دارد (Kaminski *et al*., 2006). کامینسکی و همکاران گزارش کردند که چند شکلی موجاحیه ۲۱۶+ پروموتر این ژن، با افزایش تولید پروتئین شیر در ارتباط می‌باشد. همچنین این محققین با بررسی همزمان این چند شکلی با دیگر چندشکلی‌ها (نظیر ژن گیرنده هورمون رشد) عنوان نمودند، این چند شکلی‌ها به کمک هم می‌تواند باعث افزایش تولید شیر و چربی شیر گردند (Kaminski *et al*., 2008). در نژادهای مختلف گاو شیری نیز چند شکلی ژن لاکتوفرین مورد مطالعه قرار گرفته و مشخص شده است که برخی از چندشکلی‌های موجود در این ژن فقط در بعضی از نژادهای گاو شیری وجود دارد. به عنوان مثال وجود چند شکلی در نواحی ۹۱۵- و ۹۲۶- این ژن فقط در نژادهای گاو شیری هلشتاین، نیوزلند و منتبلیارد[2] مورد شناسایی قرار گرفته است. همچنین وجود یک چند شکلی وابسته به نژاد در ناحیه پروموتر این ژن مورد شناسایی قرار گرفته است (جایگاه ۱۵۶۰-)، بر این اساس ژنوتیپ تمامی گاوهای هلشتاین در این جایگاه به صورت هموزیگوت (CC) خواهد بود (Pawlik *et al*., 2009). لی و همکاران (۲۰۰۴) وجود چند شکلی در آکسون‌های شماره ۴، ۸، ۹، ۱۱، و ۱۵و اینترون شماره ۴ این ژن را گزارش کردند. وجود چند شکلی در ناحیه آکسون شمار ۴ این ژن باعث جایگزین شدن اسیدآمینه ایزولوسین با اسیدآمینه والین می‌شود. همچنین این محققین گزارش کردند که چند شکلی موجود در ناحیه آکسون شماره ۱۵ این ژن همیشه همراه با دیگر چند شکلی‌های موجود در ناحیه تنظیمی این ژن خواهد بود، در نتیجه وجود چندشکلی در این ناحیه از ژنوم ممکن است نقش مهمی در فرآیند ترجمه و مکانیسم‌های تنظیمی این ژن بر عهده داشته باشد (Li *at al*., 2004).

۱.Tumor Necrosis Factor alpha

۲. Montbeliarde

ارتباط چندشکلی‌های مورد مطالعه در ژن لاکتوفرین با صفت ورم پستان

در بسیاری از مطالعات، همبستگی ژنتیکی بین شمار سلول‌های بدنی و ورم پستان کلینیکی بین ۰/۵ تا ۰/۸ و با متوسط ۰/۷گزارش گردیده است. از آنجا که توارث‌پذیری برآورد شده برای عفونت پستان توسط آنالیزهای باکتریولوژی در سطح بسیار پائینی گزارش شده است. و همچنین به دلیل کارایی پایین اصلاح نژاد در جهت انتخاب برای این صفت، می‌توان با استفاده از همبستگی موجود بین چند شکلی این ژن، با شمار سلول‌های بدنی موجود در شیر، از این ژن به عنوان یکی از ژن‌های کاندید جهت شناسایی گاوهای مقاوم به ورم پستان استفاده نمود (Pösö *et al*., 1996). در مطالعه‌ای که توسط وجداک و همکاران (۲۰۰۶) صورت پذیرفت، رابطه بین وجود چند شکلی در ناحیه اینترون شماره ۶ این ژن و حساسیت به بیماری ورم پستان مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه افراد هموزیگوت AA شمار سلول‌های بدنی کمتری نسبت به افراد هتروزیگوت AB داشتند (Wojdak-Maksymiec *et al*., 2006). وجود چندشکلی در این ناحیه از ژن لاکتوفرین توسط سندر و همکاران (۲۰۰۶) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این مطالعه بر خلاف نتایج گزارش شده توسط وجداک و همکاران بود و حاکی از این بود که حیوانات دارای ژنوتیپ BB دارای شمار سلول‌های بدنی کمتری نسبت به افراد AB می‌باشد. البته باید خاطر نشان کرد که تعداد افراد BB در این مطالعه ناکافی بود. بنابراین به مطالعات بیشتری در این ضمینه احتیاج است تا بتوان با اطمینان بیشتری در مورد نتایج حاصل از آن بحث نمود (Sender *et al*., 2006). در مطالعه‌ای دیگر وجود چند شکلی در ۳ ناحیه از پروموتر (۳۴۲۹+، ۳۴۴۰+ و ۳۸۷۹+) و همچنین یک جایگاه در ناحیه آکسون شماره ۱ این ژن (۴۴۳۲+) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین هر یک از این چند شکلی‌ها به صورت جداگانه، با شمار سلول‌های بدنی موجود در شیر وجود ندارد. اما زمانی که چندشکلی در این جایگاه‌ها به صورت ترکیبی مورد مطالعه قرار گرفت، مشخص شد که ارتباط معنی‌داری بین برخی از این ترکیب‌ها (GG EF DD و EF CD BB) با میزان شمار سلول‌های بدنی موجود در شیر وجود دارد (Huang *et al*., 2009). در نتیجه می‌توان با استفاده از همبستگی ژنتیکی موجود بین شمار سلول‌های بدنی و ورم پستان کلینیکی، از ترکیب این چندشکلی‌ها جهت انتخاب گاوهای شیری مقاوم به ورم پستان در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده کرد.

منابع

Huang, J., H. Wang., C. Wang., J. Li., Q. Li., M. Hou., J. Zhong. (2009). *J. Mol Biol Rep*.**37**:477-483
Kaminski, S., K. Oleński., P. Brym., T. Malewski., A.A Sazanov. (2006). *Russian Journal of Genetics* . **42**: 924-927
Kaminski. S., T. Malewski., A. Ahman., E .Wojcik., A. Rusc., A. OLEŃSKI K.,. Jakubczak., A.A . Sazanov. (2008). *Russian Journal of Genetics*. **44**:459-465.
Kutila,T.,(2004). Published Doctoral Dissertation, University of Helsinki, Finland. **PP**: 57
Li, G.H., Y. Zhang., D.X. Sun., N. Li.(2004). *J.Animal biotechnology*.**15**:67-76
Pawlik, A., G. Sender., A. Korwin-Kossakowska. (2009). *J. Anim. Sci*. **27**: 4, 263-271
Pösö, J., A.E. Mäntysaari.(1996). *J. Dairy Sci*. **79** :1284–1291.
Sender, G., A. Korwin-Kossakows., K. Galal. (2006). *Medycyna Weterynaryjna*. **62:** 563 -565.
Seyfert H.M., A .Tuckoricz., H. Intertahl., G. Hobom.(1994). *Gene* **143**: 265-269.
Wojdak-Maksymiec, K., M. Kmiec, J. Ziemak. (2006). *Veterinarni Medicina*. **51**: 14–20.

Biological properties and polymorphisms of lactoferrin gene in dairy cows

H. Asadallahpor Nanayie[1]* ,A. Bakhtari[2], S. Ansari Mahyari[3], M.A Edriss[3]
[1]MSc Student of Animal Science of Technology University of Isfahan. Iran
[2]PhD student of Animal Science of Technology University of Isfahan. Iran
[3]Academic member, Dept Animal Science, Isfahan University of Technology. Iran
*** Corresponding E-mail address:** H. Asadallahpor@gmail.com

Abstract
In this article, biological properties of lactoferrin, Its role in the immune system, and genetic polymorphisms and their relationship with production traits and mastitis has been studied. Lactoferrin with 80 kDa molecular weight is composed of 690 amino acid. This glycoprotein plays many important functional and biological roles in the body, such as,
protection of body against viruses, bacteria, fungi and parasites, and also, inhibition role for growth of mastitis-causing pathogens. There are many Studies, which confirmed association between these gene polymorphisms with production traits and resistance to mastitis in Holstein cows. As a result, polymorphisms of this gene can be candidate for breeding programs of dairy cows to improve their resistance to mastitis and increase yield.

Keywords: Lactoferrin**,** Polymorphism, Mastitis and dairy cattle

بررسی چند شکلی ژن FecG در گوسفند قره گل با استفاده از روش PCR-RFLP

نجات بادبرین*[۱]، سید ضیاء الدین میرحسینی[۲]، امجد بهمنی[۳]، سید بنیامین دلیر صفت[۴]، زربخت انصاری[۵]

۱، ۲ و ۳- دانشجوی دکترا، دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان ۴- کارشناس ارشد گروه پژوهشی کرم ابریشم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان ۵- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* نویسنده مسئول: نجات بادبرین. گیلان دانشگاه گیلان گروه علوم دامی. nejatbadbarin2002@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق رابطه چند شکلی ژن GDF9 در گوسفند نـژاد قره‌گل با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰۰ راس گوسفند قره‌گل در ایستگاه اصلاح نژاد قره‌گل سرخس به صورت تصادفی نمونه خون تهیه و از یک جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر ژن ۱۵۰۳ جفت بازی مورد نظر استفاده شد. برای هضم آنزیمی قطعات حاصل از PCR از آنزیم *Rsa* I با پنج جایگاه برشی استفاده شد. رابطـه معنـی‌داری بیـن چنـــدشکلی‌های ژنوتیپی مشاهده شده و صفت دوقلوزایی مشاهده شد. به طوری که حیوانات هتروزیگوت نسبت به هموزیگوت‌ها نرخ تخمک‌ریزی و باروری بالاتری داشتند.

واژگان کلیدی: گوسفند قره‌گل، دوقلوزایی، GDF9، PCR-RFLP

مقدمه

در گوسفند دامنه بزرگی از چندقلوزایی در بین و داخل نژادهای مختلف مشاهده شده است، مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که در بعضی از نمونه‌ها چندقلوزایی و میزان تخمک‌ریزی می‌توانند تحت تاثیر یک ژن باشند که به آن ژن بزرگ اثر گفته می‌شود (دیویس و همکاران، ۱۹۹۱). یکی از این ژن‌های باروری که اخیراً در گوسفند شناسایی شده، عبارت است از GDF9[۱] که روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد و نام دیگر آن FecG می‌باشد (گالووی و همکاران، ۲۰۰۲). ژن GDF9 از جمله ژن‌های عمده موثر بر دوقلوزایی در گوسفند است. این ژن از ژن‌های اتوزومی با اثر غلبه ماورایی است که روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند قرار دارد (هانراهان و همکاران، ۲۰۰۴). درگوسفندانی که دارای یک کپی از ژن GDF9 می‌باشند میزان باروری افزایش پیدا می‌کند، اما گوسفندان با ژنوتیپ هموزیگوت غیر بارور و توسعه تخمدانی در این گوسفندان غیر نرمال می‌باشد. گوسفندان با ژنوتیپ هتروزیگوت برای ژن GDF9 دارای باروری بالایی هستند که تاثیر این جهش‌هروی باروری با افزایش شکم زایش به صورت افزایشی است (هانراهان و همکاران، ۲۰۰۴). در این پژوهش با استفاده از روش PCR-RFLPچند شکلی آللی در ژن GDF9 مورد بررسی قرار گرفته و همچنین به بررسی فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه‌های فوق و رابطه این ژن با چند قلوزایی در گوسفند قره‌گل پرداخته شده است.

---

[۱] Growth Differentiation Factor 9

مواد و روشها

از یک صد راس گوسفند نژاد قره‌گل سرخس (۳۱ نر و ۶۹ ماده) به صورت تصادفی و انفرادی از سیاهرگ وداج و با استفاده از لوله‌های خلا نمونه خون تهیه شد. برای استخراج DNA ژنومی از روش بهینه یافته Clotted Blood استفاده شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به روش الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. با استفاده از آغازگرهای پیشنهاد شده توسط هانراهان و همکاران ژن مورد نظر بوسیله واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر شد که توالی این پرایمر ها به صورت زیر بود.

G4:5′–CCAATCTGCTCCTACACACCT-3′ و G1:5′–GAAGACTGGTATGGGGAAATG-3′

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرومول بافر PCR 10X، ۲/۵ میلی مول MgCL2، ۰/۲ مول dNTP، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلی مراز و ۱۰ پیکومول از هرکدام از آغازگرها بود. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۳°C به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد. واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر، حاوی ۱ واحد آنزیم *Rsa* I، ۲ میکرولیتر بافر و ۱۷ میکرولیتر محصول PCR و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. در نهایت برای مشاهده باندها از ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم برماید (با توان ثابت ۸۵ وات به مدت ۲ ساعت) و برای عکس برداری و انجام تجزیه تحلیل‌ها از دستگاه ژل داک استفاده شد. برای برآورد تعداد آلل کار آمد (ne)، هتروزیگوسیتی کل و درصد چند شکلی از نرم افزار Pop Gene Version 1.31 و برای بررسی رابطه الگوهای آللی دیده شده در ژن GDF9 با صفت دوقلوزایی از نرم افزار SAS version 9.1 استفاده شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، از جایگاه ژن GDF9 نشان داد که قطعه ۱۵۰۳ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است. قطعه ۱۵۰۳ جفت بازی تکثیر شده ژن GDF9 توسط آنزیم *Rsa* I که دارای جایگاه‌های برش اختصاصی بر روی قطعه ژنی تکثیر شده است، هضم گردید. در هنگام فعالیت آنزیم در صورتی که در توالی تشخیص آنزیم تغییری ایجاد شود، برش DNA به وسیله آنزیم در آن منطقه صورت نمی‌گیرد. بنابراین می‌توان وجود و یا عدم وجود جهش در منطقه برش را از طریق ایجاد ژنوتیپ‌های مختلف تشخیص داد. توالی تشخیص برای آنزیم *Rsa* I ، GT/AC می‌باشد. در اثر هضم محصولات تکثیر شده با این آنزیم سه جایگاه که بیشترین فراوانی را در بین نمونه‌ها داشتند برای نمره دهی در روش PCR-RFLP انتخاب شدند. بر این اساس سه نوع ژنوتیپ شناسایی شد. افرادی که دارای دو باند در محدوده ۶۰۷ و ۳۵۰ جفت بازی بودند در گروه یک، یعنی ژنوتیپ هموزیگوت +/+ قرار گرفتند. گروه دوم شامل افراد هتروزیگوتی (-/+) می‌شد که پس از انجام عمل الکتروفورز روی ژل آگاروز سه قطعه به طول ۸۵۲، ۶۰۷ و ۳۵۰ جفت بازی ایجاد کرده بودند. از بین تمامی نمونه‌های مورد آزمایش تنها دو فرد ژنوتیپ هموزیگوت -/- را با ایجاد دو قطعه در محدوده ۸۵۲ و ۳۵۰ جفت بازی نشان دادند. افراد دارای ژنوتیپ هموزیگوت -/- کمترین فراوانی و افراد هتروزیگوت با ژنوتیپ -/+ بیشترین فراوانی را داشتند.

رابطه معنی‌داری اثر ژنوتیپ‌های مشاهده شده در ژن GDF9 با صفت دوقلوزایی در گوسفندان نژاد قره‌گل مورد آزمون قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد ژن GDF9 اثر معنی‌داری روی تخمک گذاری و افزایش نرخ دوقلوزایی در گوسفندان قره‌گل دارد. نتیجه

آنالیز آماری مربوط به اثر معنی‌داری ژن GDF9 روی دوقلوزایی در جدول۱ نشان داده شده است. مرادبند و همکاران (۱۳۸۵) با استفاده از روش PCR-RFLP نشان دادند که ژنوتیپ هتروزیگوت ژن GDF9 اثر معنی‌داری بر باروری دارد. در این تحقیق جایگاه مورد مطالعه چندشکل بوده که با نتایج به دست آمده در گوسفند قره‌گل مطابقت دارد. همچنین در تحقیقی که توسط کثیریان و همکاران (۱۳۸۵) با استفاده از روش PCR-RFLP روی گوسفندان سنگسری انجام شد نتایج نشان دهنده وجود چندشکلی در ژن GDF9 در گوسفندان مذکور بود که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

منابع

۱- مرادبند، ف. ۱۳۸۵. تعیین چند شکلی‌های موجود در ژنهایFecB، BMP15 و GDF9 در گوسفندان نژاد بلوچی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دامی و شیلات. مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه مازندران.

2- Davis, G. H., J. C. McEwan, P. F. Fennessy, K. G. Dodds and P. A. Farquhar. 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. Biol Reprod. 44: 620-624.

3- Galloway, S. M., S. M. Gregan, T. Wilson, K. P. McNatty, J. L. Jungel, O. Ritvos, and G. H. Daivis. 2002. Bmp15 mutations and ovarian function. Mol. Cell Endocrinol. 191: 15-18.

4- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H. Davis, R. Powell and S. M .Galloway. 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). Biol Reprod. 70: 900-909.

5- Hanrahan, J. P. and M. Mullen. 2007. Lleyn breed is likely source of BMP15 and GDF9 mutations, that have large effects on ovulation rate, discovered in Cambridge and Belclare breeds. Biol. Reprod. 70: 809-821.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر جایگاه GDF9 روی صفت دو قلوزایی در روش RFLP

صفات	درجه آزادی	آماره Wald
جنسیت	۱	۰/۸۵۷۰^{ns}
الگوی آللی	۲	۹/۶۴۹۷**

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

Study of GDF9 gene polymorphisms using PCR-RFLP in Gharegol sheep breed

Badbarin Nejat[1*], Sayed Ziyaedin Mirhoseini[2], Amjad Bahmani [3], Seyed Benyamin Dalirsefat[4], Zarbakht Ansari[5]
1, 2 and 3- PhD Student, Associate Professor and Postgraduate Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Guilan University, Rasht, 4 Dept. of Sericulture, Faculty of Agricultural Sciences, Guilan University, Rasht, 5 Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Sari
* Corresponding E-mail address: nejatbadbarin2002@yahoo.com

Abstract:
In this study polymorphism of GDF9 gene and its association with twinning in Gharegol sheep breed was assessed using PCR-RFLP technique. Blood samples were randomly and individually collected from 100 Gharegol sheep at the Gharegol breeding station of Sarakhs-Iran. One pair of specific primer was selected to amplify a 1503 bp fragment of the gene and *Rsa I* enzyme was used to digest the amplified fragment. Three genotypes including AA, AB and BB were identified in the studied population. In the PCR-RFLP method, as a result of significant relationship between genotype polymorphism and twining trait, the heterozygote animals demonstrated higher ovulation and fecundity rate.

Key words: Gharegol sheep, GDF9 Polymorphism, PCR-RFLP

کاربرد پروتئومیکس در تشخیص بیماری و بهبود عملکرد تولیدمثلی در گاو

مینا باقری ورزنه
دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان
آدرس پست الکترونیک: Mina_b641028@yahoo.com
شماره تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۲۹۳۱۰۷

چکیده

پروتئومیکس روشی برای شناسایی پروتئین‌ها و بررسی بیان آن‌ها در سلول، بافت و مایعات بدن است که می‌تواند به شناسایی نشانگرهای زیستی برای تشخیص اولیه بیماری کمک کند در مطالعه‌ای که بر روی مایع فولیکولی کیست تخمدان انجام شد هشت پروتئین به عنوان نشانگرهای زیستی در تشخیص کیست فولیکولی در گاو شناسایی شدند. همچنین **مقایسه الگوی پروتئوم سرم بین گاو مبتلا به اندومتریتیس و گاو سالم نشان می‌دهد که غلظت اروزوموکوئید در گاو مبتلا به اندومتریتیس بعد از زایش کاهش می‌یابد.** مقایسه پروتئوم سویه باکتری *Brucella abortus* کشت شده در آزمایشگاه با سویه جدا شده از گاو مبتلا به بروسلوز می‌تواند برای درک بهتر بیماری و کشف داروها و واکسنهای جدید مفید باشد. در آزمایشات پروتئومیکس پروتئین‌ها و مسیرهای جدیدی شناسایی می‌شوند که در شکل گیری فرضیه‌های آینده در مهار ایمنی توسط گلوکوکورتیکوئیدها نقش دارند. مطالعه پروتئین‌ها و شناخت مکانیسم مولکولی عوامل مؤثر بر باروری نر می تواند با کاهش هزینه و زمان مصرفی در افزایش راندمان تولیدمثل ضروری باشد. بنابراین مقایسه **پروتئوم** اسپرماتوزوآ با باروری کم با اسپرماتوزوآ با باروری زیاد نشان می‌دهد که بیان برخی پروتئین‌ها مانند پلی پپتید کازئین کیناز۲ و میزان تیروزین کیناز در اسپرماتوزوآ با باروری زیاد افزایش می یابد. همچنین گزارش شده است که تغییرات در نوع پروتئین و مقدار آن در مایع منی می‌تواند بر شاخص باروری گاو نر مؤثر باشد. در نهایت می توان نتیجه گیری کرد که پروتئومیکس می‌تواند در کشف داروها، واکسن‌ها و روش-های درمانی جدید و بهبود راندمان تولیدمثل مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئومیکس، **تولیدمثل، نشانگر زیستی، ایمنی**

مقدمه

رفتار سلول و اغلب فعالیت‌هایی که در سلول انجام می‌شود به عهده پروتئین‌ها است. سلول در برابر شرایط مختلف محیطی و پیام‌هایی که از سلول‌های اطراف دریافت می‌کند، پروتئین‌های مختلفی را می سازد. بنابراین پروتئین‌ها و مسیرهایی که در آن نقش دارند با گذر زمان و برحسب استرس‌هایی که یک سلول دستخوش آنها می‌شود دائماً تغییر می‌یابند. به کلیه پروتئین‌هایی که در یک سلول در یک زمان مشخص بیان می‌شوند، پروتئوم آن سلول گفته می‌شود. برای شناسایی مکانیسم‌های ملکولی رفتار سلولی و واکنش‌های زیستی، لازم است پروتئین‌هایی که در یک سلول بیان می‌شوند، تغییرات آنها در شرایط مختلف، عملکرد آنها و همچنین برهمکنش‌های بین پروتئین‌های مختلف در یک سلول بررسی شود. به مجموعه این بررسی‌ها پروتئومیکس گفته می‌شود. در واقع پروتئومیکس به شناسایی پروتئین‌ها و

بررسی بیان آن‌ها در سلول، بافت و مایعات بدن می‌پردازد. با مقایسه الگوی پروتئین‌های بافت‌های سالم و بیمار می‌توان به **نشانگرهای زیستی** مرتبط با بیماری پی برد **و از آن‌ها در** شناسایی اولیه بیماری و **مدیریت آن در حیوان** استفاده کرد (2006, Mollisa ;2007, Radosevich). **از طرفی** شناسایی بر همکنش پروتئین‌های میزبان و عامل پاتوژن **می‌تواند** به شکل گیری فرضیه هایی برای تحقیقات آینده و کشف داروها، واکسن‌ها و روش‌های درمانی جدید کمک کند (2008,Lippolis). همچنین آزمایشات پروتئومیکس با شناخت مکانیسم مولکولی عوامل مؤثر بر باروری نر می تواند با کاهش هزینه و زمان مصرفی در افزایش راندمان تولیدمثل مفید باشند(2008, Divyaswetha). با توجه به اینکه استرس زایمان و دوران انتقال سیستم ایمنی ذاتی را مهار می‌کند. پروتئومیکس پروتئین ها و مسیرهای جدیدی را شناسایی می‌کند که در شکل‌گیری فرضیه های آینده در مهار ایمنی توسط گلوکوکورتیکوئیدها مؤثر هستند (2008 ,Lippolis).

نتایج و بحث

مطالعات انجام شده با استفاده از الکتروفورز ژل پلی اکریلامید دو بعدی (2-D PAGE) بر روی مایع فولیکولی کیست تخمدان نشان می‌دهد که هشت پروتئین به نام‌های آدنوزین تری فسفاتاز- اف-۱ میتوکندری گاوی (BMFA)، فاکتور همراه با اریتروئید (EAF)، متیونین سینتاز، گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) ، گلیسرآلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز، پروتئین شوک حرارتی ۷۰- (HSP70)، بتا لاکتاگلوبولین و سوکسینات دهیدروژناز درون مایع فولیکولی کیست تخمدان تولید می شوند. بنابراین شناسایی این پروتئین‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی می توانند در تشخیص کیست فولیکولی در گاو مؤثر باشند (2005, Maniwa). بررسی پروتئوم آندومتریوم گاو نشان می-دهد که پروتئین‌های دسمین، آلفا اکتین-۲، پروتئین شوک حرارتی **-۲۷، پراکسی ردوکسین-۶، ایزوفرم-۱ گیرنده هورمون** LH ، **پیش ساز کالکتین-۴۳، دئوکسی ریبونوکلئاز-۱ و زنجیره سنگین کلاس -۱** MHC ، **با** ابتلا به اندومتریتیس **افزایش می‌یابند. در حالیکه این عفونت منجر به کاهش** پروتئین‌هایی مانند **ترانسفرین، پیش ساز اینترلوکین-۲، زیرواحد بتا هموگلوبین، کانال پتاسیم ترامر دومین دو می‌شود** (2010, Changyong). **همچنین مقایسه الگوی پروتئوم سرم بین گاو مبتلا به اندومتریتیس و گاو سالم نشان می‌دهد که غلظت هاپتوگلوبین و اروزوموکوئید گلیکوپروتئین اسید آلفا-۱** (orosomucoid/α_1-acid glycoprotein) **در زمان زایمان نوسان داشته است. ولی در گاوی که بعد از زایش مبتلا به اندومتریتیس می‌شود غلظت اروزوموکوئید کمتر ازگاو سالم است بنابراین می‌توان از میزان اروزوموکوئید سرم بعد از زایمان به سلامت دام پی برد** (2007, Radosevich).

پژوهشگران با آزمایشات پروتئومیکسی که بر روی باکتری مایکوباکتریوم اویوم زیرگونه پارا توبرکلوسیز انجام داده اند به دنبال شناسایی روش‌های تشخیصی جدید و مقایسه پروتئوم سویه کشت شده در آزمایشگاه با سویه جدا شده از گاو مبتلا هستند تا از این طریق با درک بهتر بیماری به کشف واکسن‌های جدید بپردازند (2007, Radosevic; 2006, Donghee). مشابه این تحقیقات بر روی *Brucella abortus, Pasteurella multocida, Mycobacterium bovis bacillus* نیز انجام شـــده است (2004,Mollenkopf; 2008, Lippolis ;2006 , Boyce) .پروتئین‌هایی مانند زیر واحد فلاوپروتئین فومارات ردوکتاز، زیر واحد آلفا آدنوزین تری فسفات سینتاز، سیستئین سینتاز A به عنوان پروتئین‌های ایمونوژنیک برای گسترش واکسن در برابر بروسلا در انسان و دام شناسایی شده‌اند (2006, Connolly). بررسی پروتئوم

نوتروفیل‌ها به عنوان اولین خط دفاعی در مقابله با پاتوژن‌ها در گاو مبتلا به ورم پستان نشان می‌دهد که بیان پروتئینی به نام هیستون H2A (در غشای نوتروفیل) در اثر مهار سیستم ایمنی قبل از زایش کاهش می‌یابد (Lippolis , 2005 ;2008).

مقایسه پروتئوم اسپرماتوزوآ با باروری کم با اسپرماتوزوآ با باروری زیاد نشان می‌دهد که باروری کم به دلیل آسیب DNA در مرحله G2/M است. از طرفی بیان پلی پپتید کازئین کیناز۲ (دخیل در مرحله آخر اسپرماتوژنزیز و بعد از لقاح اسپرم و تخمک) در مسیر انتقال پیام فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و میزان تیروزین کیناز (فسفریلاسیون پروتئین اسپرم برای ظرفیت پذیری) در اسپرماتوزوآ با باروری زیاد افزایش می یابد. که این عوامل منجر به افزایش متابولیسم انرژی (گلیکولیز و تنفس اکسیداتیو) می‌شود. همچنین بیان کمپلکس F1 میتوکندریایی ATP5B (تولید آدنوزین تری فسفات در غشای میتوکندری که برای حرکت اسپرم و ظرفیت پذیری آن استفاده می‌شود) و زیرواحد ۳ سیتوکروم c اکسیداز (عضوی از کمپلکس پروتئین انتقال غشایی که در میتوکندری یافت می‌شود و آخرین پروتئین در زنجیره انتقال الکترون است) و مسیرهای انتقال پیام به نامهای فاکتور رشد مشتق شده از پلاکت (PDGF) وفاکتور رشد اپیدرمی کهمحرک فسفریلاسیون تیروزین هستند نیز افزایش می‌یابد. از طرفی مسیر انتقال پیام فاکتور رشد اپیدرمی منجر به فعالیت فسفولیپاز C (تولید اینوزیتول ۱، ۴، ۵- تری فسفات از فسفاتیدیل اینوزیتول ۵،۴- بی فسفات) و پلی مریزاسیون آکتین (ضروری برای لقاح اسپرم و تخمک طی ظرفیت پذیری اسپرم) می‌شود. فسفولیپاز C برای واکنش آکروزومی، باروری و توسعه جنین حائز اهمیت است. نقص در مسیر انتقال پیام فاکتور رشد اپیدرمی در اسپرماتوزوآ با باروری کم منجر به اختلال در ظرفیت پذیری اسپرم می‌شود (Divyaswetha, 2008). همچنین در مطالعات دیگر گزارش شده است که تغییرات در نوع پروتئین و مقدار آن در مایع منی بر شاخص باروری گاو نر اثر دارد (Van,2006). بنابراین می‌توان نتیجه گیری کرد که پروتئومیکس با مطالعه تغییرات پروتئین‌ها می‌تواند در کشف داروها، واکسن‌ها و روش‌های درمانی جدید و بهبود راندمان تولیدمثل مفید باشد.

Proteomics application in disease diagnosis and reproduction improvement in cow

Abstract:

Proteomics is defined as the study of the protein component of a cell, tissue and biological fluid. This technique has the potential to identify protein biomarkers of disease states. In study which was performed on bovine ovarian follicular cysts (BOFC) eight proteins are over expressed in BOFC that these proteins could be useful biomarkers for BOFC. The difference between serum proteome pattern cows affected by postpartum endometritis with healthy cows revealed that concentrations orosomucoid was decreased in endometritis. The comparison proteome of *Brucella abortus* between laboratory-adapted strains and clinical isolates could be useful to better understand this disease and vaccine development. Proteomics experiments identified new proteins and pathways that may be important in future hypothesis-driven studies of glucocorticoid-induced immunosuppression. Understanding the molecular mechanisms of effective parameters on male fertility is essential for obtaining high reproductive efficiency by decreasing cost and time. The investigations on proteome of high fertility spermatozoa indicated that expression of some proteins such as casein kinase 2 (CKII) prime poly peptide and tyrosine kinase in high fertility spermatozoa was higher compared to low fertility spermatozoa. Also some evidence has indicated that variation in protein types and amounts in seminal

fluid regulates fertility indexes in dairy bulls. In conclusion, proteomics is a useful technique for discovering drugs, vaccine development, diagnosis diseases by biomarkers and improvement of reproduction efficiency.
Key words: Proteomics, reproduction, biomarker, immunity

منابع

1. Boyce, J., P. A. Cullen, V. Nguyen, I. Wilkie, B. Adler. 2006. Analysis of the Pasteurella multocida outer membrane sub-proteome and its response to the in vivo environment of the natural host. Proteomics, 6: 870–880.
2. Changyong, C., J. W. Park, E. S. Kim, S. G. Lee, S. Y. Park, J. S. Lee, M. J. Cho, K. R. Kang, J. Han, D. Kang. 2010. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in bovine endometrium with endometritis. Korean Journal of Physiology Pharmacology. 4: 205–212.
3. Connolly, J. P., D. Comerci, T. G. Alefantis, M. Quan, R. Chafin, P. Grewal, C. V. Mujer, R. A. Ugalde, V. G. DelVecchio. 2006. Proteomic analysis of Brucella abortus cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development .Proteomics. 6: 3767–3780.
4. Divyaswetha, P,. B. Nanduri, A. Kaya, J. M. Feugang, S. C. Burgess, E. Memili. 2008. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. BMC Systems Biology, 2: 19-31.
5. Donghee, C., N. Sung, M. T. Collins. 2006. Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. Proteomics. 6: 5785–5794.
6. Lippolis, J. D., T. A. Reinhardt. 2005. Proteomic survey of bovine neutrophils. Veterinary mmunology and Immunopathology. 103: 53–65.
7. Lippolis, J. D., T. A. Reinhardt. 2008. Proteomics in animal science. Journal of Animal Science. 86: 2430–2441.
8. Maniwa, J,. S. Izumi, N. Isobe, T. Terada. 2005. Studies on substantially increased proteins in follicular fluid of bovine ovarian follicular cysts using 2-D PAGE and MALDI-TOF MS. Reproductive Biology and Endocrinology. 3: 23-31.
9. Mollenkopf, H. J., L. Grode, J. Mattow, M. Stein, P. Mann, B. Knapp, J. Ulmer, S. H. E. Kaufmann. 2004. application of mycobacterial Proteomics to vaccine design: improved protection by mycobacterium bovis BCG Prime-Rv3407 DNA Boost vaccination against Tuberculosis infection and immunity. 11: 6471–6479.
10. Mollisa, M. E., J. L. Walgren, M. D. Mitchell, D. C. Thompson. 2006. Proteomics: recent applications and new technologies. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 98: 432–441.
11. Radosevich, T., R. Timothy, A. Reinhardt, J. D. Lippolis, J. P. Bannantine, J. R. Stabel. 2007. Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis strains K-10 and 187. Journal of Bacteriology. 3: 1109–1117.
12. Rowan, E. M., J. Kirwan, M. K. Doherty, Ph. D. Whitfield. 2007. Biomarker discovery in animal health and disease: The application of Post-Genomic technologies. Biomark Insights. 2: 185–196.
13. Van, C. K., S. Kuy, D. J. Palmer, S. R. Davis, G. J. Cooper. 2006. Characterization of bovine seminal plasma by Proteomics. Proteomics. 6: 5826–5833.

بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و محیط بر تولید شیر گاوهای هلشتاین ایران جهت شناسایی تغییر بیان ژن در سطوح مختلف تولیدی با استفاده از مدل رگرسیون تصادفی

مهدی بهلولی[1*]، جلیل شجاع غیاث[2]، صادق علیجانی[2]، علیرضا اقبال[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه تبریز، ۲-اعضای هیئت علمی گروه علوم دامی گرایش ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه تبریز، ۳-مسئول فن‌آوری اطلاعات مرکز اصلاح نژاد کشور

*نویسنده مسئول: مهدی بهلولی ، دانشگاه تبریز آدرس ایمیل: m.bohluly@gmail.com

چکیده

این تحقیق جهت بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و محیط بر مقدار شیر گاوهای هلشتاین ایران انجام گردید. در این تحقیق، فایل داده که شامل ۸۲۷۲۹۵ رکورد روز-آزمون از دوره شیردهی اول ۹۸۱۳۶ گاو ماده با ۳۷۳ نر بود. داده‌ها توسط مرکز اصلاح دام کشور از سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۹ جمع‌آوری گردیده بود. مدل رگرسیون تصادفی با چندجمله‌ای‌های لژاندر مرتبه ۳ جهت تخمین پارامترهای ژنتیکی در سه گروه، که از نظر سطح تولید تقسیم‌بندی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. فایل داده از نظر میانگین تولید شیر گله-سال‌ها به سه گروه کم‌تولید، متوسط‌تولید و پرتولید تقسیم شد. وراثت‌پذیری برای تولید ۳۰۵-روز برای گروه‌های کم، متوسط و پرتولید به ترتیب برابر ۰/۳۱، ۰/۳۳ و ۰/۲۵ به دست آمد. همبستگی ارزش‌های اصلاحی برآورد شده بین دو گروه کم‌تولید و متوسط تولید برابر با ۰/۷۷ و بین کم‌تولیدها با پرتولیدها برابر با ۰/۷۸ بود. اما بین دو گروه متوسط‌تولید با پرتولید بالاتر به دست آمد (۰/۹۹). همبستگی‌های اسپیرمن به دست آمده (۰/۷۷ و ۰/۷۸)، بر وجود اثر متقابل ژنوتیپ و محیط معنی‌دار بین دو گروه کم‌تولید با متوسط‌تولید و نیز بین کم‌تولید با پرتولید دلالت دارد. تفاوتی بین واریانس ژنتیکی گروه‌های مذکور وجود داشت که منعکس کننده سطوح تولیدی مختلف بود. نتایج این تحقیق نشان داد که تولید شیر نتاج گاوهای نر به محیط پرورشی وابسته است. پارامترهای ژنتیکی صفت مورد بررسی با استفاده از رویه REML در مدل نری و با توجه به اینکه یک صفت در محیط‌های مختلف به عنوان صفات مختلف در نظر گرفته شد، تخمین زده شد.

کلمات کلیدی: **اثر متقابل ژنوتیپ و محیط، گاو شیری، مدل رگرسیون تصادفی، همبستگی.**

مقدمه

امروزه استفاده از ژنوتیپ‌های خاص در گله‌های گاو شیری ایران به فراوانی صورت می‌گیرد و جریان ژن با پیشرفت تکنولوژی تولیدمثلی شتاب بیشتری گرفته است. اسپرم نژادهای خاصی در تمامی مناطق ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد که اغلب برای بهبود تولید شیر جایگزین نژادهای بومی می شوند. با توجه به تنوع بالا در سیستم‌های پرورشی و مدیریتی گله ها در مناطق مختلف ایران، اثرات محیطی این پتانسیل را دارند که با ژنوتیپ‌ها تعامل قوی برقرار کرده و پارامترهای تولیدی را تغییر دهند. زیرا محیط باعث می شود که یک سری از ژن ها خاموش و در مقابل یک سری دیگر از ژنها بیان شوند و در این صورت یک صفت در دو محیط به عنوان دو صفت در نظر گرفته می شود (فالکونر، ۱۹۸۹). اثر متقابل ژنوتیپ با محیط به تفاوت حساسیت محیطی ژنوتیپ ها اشاره دارد. اگر ژنوتیپ‌ها رتبه‌بندی‌شان در محیط‌های مختلف تغییر کند، دلیلی بر تفاوت بیان ژن در محیط‌های مختلف خواهد بود (همامی و همکاران، ۲۰۰۹). سازمان اینتربول(۲۰۰۷) گزارش کرد که افزایش تجارت بین المللی اسپرم و ابزارهای دقیق و پیشرفته برای مقایسه بین کشوری و بین منطقه‌ای

حیوانات، ضرورت محاسبه اثر متقابل ژنوتیپ با محیط را نشان می دهد. هیز و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که در بیشتر مطالعات اثر متقابل ژنوتیپ با محیط برای تولید شیر به وسیله مشخص کردن تولید شیر در محیط‌های مختلف به عنوان صفات مختلف تحقیق می شود. فیکز و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند زمانی که میانگین گله برای تولید شیر در زمان اوج تولید به عنوان توصیف‌گر محیطی مدنظر قرار می‌گیرد، اثر متقابل ژنوتیپ و محیط به وضوح دیده می شود. با گسترش تلقیح مصنوعی(A.I.)، ژنوم گاوهای نر در مناطق مختلف توزیع یافته‌اند. مدل مناسب برای آنالیز داده‌های تکرار شده در سنین مختلف، مدلی است که ساختار میانگین و کوواریانس را که در طول زندگی حیوان متغیر می باشد، در برآورد پارامترهای ژنتیکی منظور کند. شفر و دکر (۱۹۹۴) مدل رگرسیون تصادفی (RRM) را برای آنالیز رکوردهای روزآزمون در گاو شیری پیشنهاد کردند.

مواد و روش‌ها

کل رکوردهای روز-آزمون تولید شیر گاوهای شیری که از مرکز اصلاح نژاد کشور تهیه گردید، برای شکم اول در دامنه‌ی سنی ۲۱ تا ۴۶ ماهگی از سال ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۹ برابر با ۳۱۹۲۰۲۲ مورد بود، که با انتخاب رکوردهای موجود در بازه ۵ تا ۳۰۵ روز از دوره شیردهی (DIM)، تولید شیر در دامنه ۱/۵ تا ۷۵ کیلوگرم، گاوهای شیری دارای بیش از ۵ رکورد روز- آزمون، گله- سال‌های دارای بیش از ۱۰ گاو شیرده و نیز با انتخاب گاوهای ماده‌ای که پدرشان بیش از ۱۰ نتاج داشت، تعداد رکوردها به ۲۰۰۸۱۸۸ مورد رسید. در مرحله بعدی با استفاده از رویه Fastclus در نرم‌افزار SAS، از روی میانگین تولید سالانه گله‌های باقیمانده، گله- سال‌ها(HY) به سه گروه کم تولید، متوسط تولید و پرتولید تقسیم شدند. گاوهای نری که در هر سه گروه دارای نتاج بودند برابر با ۳۷۳ رأس شد. در نهایت ۸۲۷۲۹۵ رکورد از ۹۸۱۳۶ رأس گاو ماده در فایل داده باقی ماند. فایل شجره لازم برای مدل نری از نرهای موجود از سال ۱۳۶۳ تهیه گردید. از آنجا که یک صفت در چند محیط به عنوان چند صفت در نظر گرفته می شود، لذا مدل روز-آزمون رگرسیون تصادفی چندصفته به صورت ذیل مورد استفاده قرار گرفت:

$$y_{tijklmu} = HTD_i + YC_j + Age_k + MT_l + \sum_{n=0}^{3} \phi_{tun}\, s_{un} + \sum_{n=0}^{3} \phi_{tmn}\, pe_{mn} + e_{tijklmu}$$

در این مدل، $y_{tijklmu}$ ، رکورد روزآزمون نتاج mاُم گاو نر uاُم در روز tاُم در زیر گروه‌های گله- سال- ماه رکورد روزآزمون iاُم (HTD)، سال گوساله زایی (YC) jاُم، سن در زمان زایش(Age) kاُم و دفعات دوشش (MT) lاُم؛ s_{un} و pe_{mn} ، به ترتیب nاُمین ضریب رگرسیون تصادفی گاو نر uاُم و اثر محیطی دائمی برای گاو ماده mاُم؛ ϕ_{tun} و ϕ_{tmn} به ترتیب چندجمله ای های لژاندر nاُم برای روز tاُم مرتبط با گاو نر uاُم و گاو ماده mاُم؛ n، درجه چندجمله‌ای‌ها برای اثر ژنتیک افزایشی گاو نر و محیطی دائمی و $e_{tijklmn}$، اثرات تصادفی باقیمانده است. ساختار (کو)واریانس اثرات تصادفی مدل به این صورت مشخص می شود:

$$\mathrm{var}\begin{bmatrix} \boldsymbol{s} \\ \mathbf{pe} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{G}\otimes\mathbf{A} & 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{P}\otimes\mathbf{I} & 0 \\ 0 & 0 & \mathbf{I}\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

که $\mathbf{A}$، ماتریس روابط خویشاوندی گاوهای نر؛ $\otimes$، ضرب کرونکر؛ $\mathbf{G}$ و $\mathbf{P}$ ماتریس (کو)واریانس ضرایب رگرسیون تصادفی به ترتیب برای اثرات ژنتیک افزایشی نرها و محیط دائمی گاو ماده، $\mathbf{I}$ یک ماتریس واحد و σ_e^2 واریانس باقیمانده است. برای آماده‌سازی داده‌ها از نرم‌افزار FoxPro 9.0 استفاده گردید و همچنین ماتریس (کو)واریانس‌های ضرایب رگرسیون تصادفی با استفاده از روش حداکثر

درستنمایی محدودشده (REML) بدست آمد. برای تولید شیر، همگرایی در دور ۷۲۷ به $۷/۸۴\times۱۰^{-۱۱}$ رسید. برای محاسبه وراثت‌پذیری از فرمول

$(h^2 = \frac{4\sigma_s^2}{\sigma_s^2+\sigma_{pe}^2+\sigma_e^2})$ که $\sigma_s^2 = \mathbf{qGq}'$، $\sigma_{pe}^2 = \mathbf{qPq}'$ و σ_e^2 که، σ_s^2، σ_{pe}^2 و σ_e^2 به ترتیب واریانس ژنتیک افزایشی نرها، واریانس محیط دائمی مربوط به گاو ماده و واریانس باقیمانده می‌باشند، استفاده شد. $\mathbf{G}$ و $\mathbf{P}$ به ترتیب ماتریس (کو)واریانس به دست آمده برای ضرایب رگرسیون تصادفی اثرات ژنتیک افزایشی نرها و محیط دائمی ماده‌ها بوده و $\mathbf{q}$ نیز بردار چندجمله‌ای‌های مربوطه می باشد. با استفاده از مدل نری سه صفته، برای هر یک از گاوهای نر در رابطه با تولید شیر در سه سطح تولیدی مذکور سه ارزش اصلاحی به دست آمد. برای محاسبه وراثت‌پذیری و ارزش اصلاحی از نرم‌افزار MATLAB استفاده شد.

نتایج و بحث

اطلاعات خلاصه شده آماری در رابطه با فایل داده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. دلیل اینکه در گروه گله‌های کم تولید گاوهای شیرده کمتر و متعاقباً رکوردهای کمتری وجود دارد این است که در این گله‌ها به دلیل سطح مدیریتی پایین و داشتن تعداد گاو کمتر در سال-گله مد نظر، نسبت به دو گروه دیگر نتاج کمتری به ازای هر گاو نر وجود دارد و نیز به دلیل استفاده از رویه Fastclus است که گروه‌بندی را از روی واریانس پارامتر (میانگین گله- سال‌ها) طوری انجام می‌دهد که واریانس داخل گروهی به حداقل برسد و اختلاف بین گروه‌ها حداکثر باشد.

ارزش اصلاحی گاوهای نر در سه گروه مذکور محاسبه گردید و با استفاده از همبستگی اسپیرمن، همبستگی ارزش اصلاحی گاوهای نر بین دو محیط کم تولید و پرتولید برابر با ۰/۷۷ و بین گله‌های کم‌تولید با پرتولید ۰/۷۸ به دست آمد که با توجه به نتایج گزارش شده (رفرناتو و همکاران، ۲۰۰۳؛ بوهمانوا و همکاران، ۲۰۰۸؛ هایل- مریم و همکاران، ۲۰۰۸ و همامی و همکاران، ۲۰۰۸) اثر متقابل محسوسی مابین گروه اول و دوم و نیز گروه اول با سوم وجود دارد که منجر به رتبه‌بندی متفاوت گاوهای نر در دو محیط مختلف می شود (نمودار شماره ۱). اما به دلیل اینکه همبستگی بالایی (۰/۹۹) مابین دو گروه متوسط تولید و پرتولید وجود داشت می توان گفت که اثر متقابل ژنوتیپ و محیطی که منجر به رتبه‌بندی متفاوت مابین این دو گروه شود، وجود ندارد و تولید شیر توسط مجموعه یکسانی از ژن‌ها کنترل می شود. همانطور که نمودار شماره ۱ نشان می دهد تفاوت ارزش اصلاحی گاوهای نر در گروه دوم و سوم بیشتر از گروه اول می باشد (واریانس EBV بیشتری دارند) و مهم تر اینکه رتبه برخی از گاوها در این سه گروه تغییر می کند (بیشترین تغییرات در گروه دوم و سوم در مقایسه با گروه اول رخ داده است). وراثت‌پذیری به دست آمده برای گروه‌های کم تولید، متوسط تولید و پر تولید برای ۳۰۵ روز شیردهی (d- ۳۰۵) به ترتیب برابر با ۰/۳۱، ۰/۳۳ و ۰/۲۵ به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی این است که پارامترهای ژنتیکی در این سه گروه

فرق می کند که با نتایج به دست آمده توسط مولدِر و همکاران(۲۰۰۴)؛ همامی و همکاران (۲۰۰۸)؛ هایل–مریم و همکاران (۲۰۰۸) و کرون– مونوز و همکاران(۲۰۰۴) مطابقت دارد که دلیلی بر وجود تأثیرات محیط‌های مختلف بر تولید شیر با تغییر بیان ژن‌های کنترل‌کننده‌ی تولید شیر می باشد.برای بررسی تغییرات وراثت پذیری در روزهای مختلف، چند روز از دوره شیردهی، انتخاب و وراثت پذیری و نیز همبستگی ارزش اصلاحی گاوهای نر در دو گروه کم‌تولید و پرتولید در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. وراثت‌پذیری در روزهای اول بیشتر تخمین زده شده است و تا حیوان به اوج تولید خود نزدیک شود وراثت‌پذیری کمتر می شود. یکی از دلایلی که در این بازه زمانی وراثت‌پذیری کاهش می یابد این است که حیوان در تعادل منفی انرژی قرار دارد (بیردا و همکاران، ۲۰۰۷). در زمان اوج تولید وراثت‌پذیری برای گله‌های موجود در گروه کم‌تولید بیشتر تخمین زده شده، زیرا حیوان با اینکه در محیط با سیستم مدیریتی ضعیف قرار دارد ولی حیوان به محیط پرورشی سازگار شده و بیشترین تغییرات مربوط به صفت تولید شیر از اثرات ژنتیکی حیوان متأثر می شود. جدول شماره ۲ نشان می دهد که بیشترین تغییرات در رتبه بندی گاوهای نر بعد از شروع شیرواری تا رسیدن به اوج تولید رخ می‌دهد زیرا همبستگی به دست آمده در این بازه زمانی پایین‌تر می باشد که نشان‌دهنده این حقیقت است که در این بازه زمانی ژنوتیپ بیشترین اثر متقابل را با محیط دارد و دلیلی بر تفاوت بیان ژن بین سطوح تولیدی مذکور می باشد. استفاده از اسپرم هایی خاص در محیط هایی با شرایط آب و هوایی و سیستم های تولیدی مختلف، ضرورت محاسبه و بررسی اثر متقابل ژنوتیپ و محیط را نشان می دهد که عدم بررسی آن می‌تواند کارایی برنامه‌های اصلاح نژادی را کمتر کند.

منابع

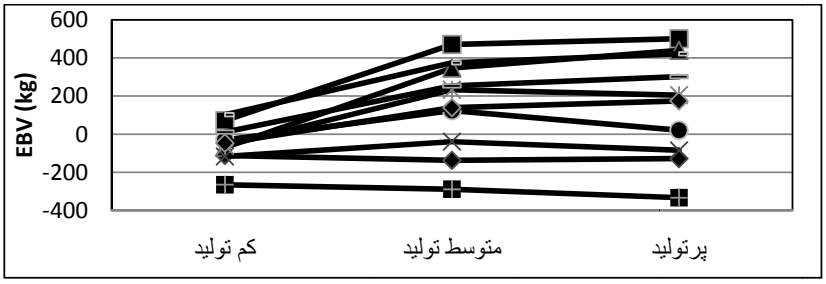
1) Beerda, B., W. Ouweltjes, L. B. J. Sebek, J. J. Windig, and R. F. Veerkamp**,** 2007. Effects of Genotype by Environment Interactions on Milk Yield, Energy Balance, and Protein Balance. J. Dairy Sci. 90:219–228.
2) Bohmanova, J., I. Misztal, S. Tsuruta, H. D. Norman, and T. J. Lawlor **,** 2008. *Short Communication:* Genotype by Environment Interaction Due to Heat Stress. J. Dairy Sci. 91:840–846
3) Ceron-Munoz, M., F. H. Tonhati, C. N. Costa, D. Rojas-Sarmiento, and D. M. Echeverri**,** 2004. Factors that Cause Genotype by Environment Interaction and Use of a Multiple-Trait Herd-Cluster Model for Milk Yield of Holstein Cattle from Brazil and Colombia. J. Dairy Sci. 87:2687–2692.
4) Haile-Mariam, M., M. J. Carrick and M. E. Goddard, 2008. Genotype by Environment Interaction for Fertility, Survival, and Milk Production Traits in Australian Dairy Cattle. **J.** Dairy Sci. 91:4840–4853.
5) Hammami, H., B. Rekik, H. Soyeurt, C. Bastin, and N. Gengler, 2008. Genotype × Environment Interaction for Milk Yield in Holsteins Using Luxembourg and Tunisian Populations. J. Dairy Sci. 91:3661–3671.
6) Hayes, B. J., M. Carrick, P. Bowman, and M. E. Goddard, 2003.Genotype × Environment Interaction for Milk Production of Daughters of Australian Dairy Sires from Test-Day Records. J. Dairy Sci. 86:3736–3744**.**

	کم تولید	متوسط تولید	پر تولید	کل
تعداد حیوانات رکورددار(رأس)	۱۰۶۶۶	۳۰۸۵۴	۵۶۶۱۶	۹۸۱۳۶
تعداد رکورد	۸۷۴۳۷	۲۶۱۲۶۹	۴۷۸۵۹۸	۸۲۷۲۹۵
تعداد نتاج به ازای هر گاو نر	۲۸/۶	۸۲/۷۲	۱۵۱/۷۸	۲۶۳/۱
متوسط سن‌در زمان زایش (ماه)	۳۰/۲۴	۲۶/۹۴	۲۶/۵۷	۲۷/۰۱
میانگین دفعات دوشش	۲/۴۴	۲/۹۴۱	۲/۹۸	۲/۹۱
میانگین تولید شیر(کیلوگرم)	۱۹/۹۰±۲/۴۲	۲۶/۷۲±۱/۵۴	۳۱/۲۰±۱/۵۶	۲۷/۴۹±۴/۰۸
تعداد گله- سال‌ها	۴۲۰	۹۵۱	۷۷۵	۲۱۴۶

جدول شماره ۱: آمار توصیفی حیوانات موجود در سه گروه (کم، متوسط و پرتولید) تقسیم‌بندی شده از روی میانگین شیر تولیدی در گله- سال‌ها

	تولید ۳۰۵ روز	=۵DIM	=۵۰DIM	=۱۰۰DIM	=۱۵۰DIM	=۲۵۰DIM	=۳۰۵DIM
وراثت‌پذیری‌گروه کم تولید	۰/۳۱	۰/۳۳	۰/۱۳	۰/۵۸	۰/۳۰	۰/۳۵	۰/۳۳
وراثت‌پذیری گروه پر تولید	۰/۲۵	۰/۳۵	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۳۶	۰/۲۲	۰/۴۳
همبستگی رتبه‌ای	۰/۷۸	۰/۳۲	۰/۷۷	۰/۹۷	۰/۸۸	۰/۸۵	۰/۸۸

جدول شماره ۲: وراثت‌پذیری و همبستگی EBV گاوهای نر در دو گروه کم و پرتولید برای ۳۰۵ روز شیردهی و ۶ روز انتخابی از روزهای شیرده



نمودار شماره ۱: ارزش اصلاحی ۱۰ گاو نر انتخاب شده به طور تصادفی، در سه گروه تولیدی

Genotype by environment interaction of milk yield for distinct of gene expression changes in Iranian Holstein by random regression model

Mehdi Bohluli[1*]., Jalil Shodja[2]., Sadegh Alijani[2]., Alireza Eghbal[3].
[1] MSc student of Animal Breeding and Genetics, Tabriz University
[2] Members of scientific boards, department of Animal Breeding and Genetics, Tabriz University
[3] Information Technology officer of National Breeding Center
***Corresponding E-mail address: m.bohluly@gmail.com**

Abstract: This research was carried for investigation Genotype by Environment Interaction for milk yield of Iranian Holstein dairy cattle. In this research, data set of was included 827295 TD records of 98136 cows and 373 common sires in first lactation. These data were collected by Iranian breeding center from 1380-1389. Radom Regression TD Sire model with third-order Legendre polynomials were used to estimated genetic parameters in three groups of herd- year means. Herd-years grouped in low, medium and high production levels of milk. Heritability estimates for 305-day milk yield were 0.31, 0.33 and 0.25 in low, medium and high production levels, respectively. Estimated breeding values correlation between the two groups (low and medium production levels) were 0.77 and between low and high production levels were 0.78 for milk yield. But high breeding values correlation between medium and high production levels (0.99). based on estimated correlations (0.77 and 0.78) are evidence for G×E for milk yield production while low spearman correlations suggest different rankings of sires in low and medium production levels and also between low and high production levels. Differences between genetics variances found in the three groups reflect different milk production levels. Results from this study indicate that milk production of daughters of the same sires depends greatly on the production environment. Genetic parameters for traits were estimated using REML in multivariate sire model.

Key words: genotype by environment interaction, dairy cattle, random regression model, correlation.

همایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

الگوی بیان پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید در هیپوتالاموس در گامه‌های فحلی موش صحرایی

فرید پژوهی[۱]؛ محمد رضا جعفرزاده شیرازی[۲]؛ محمد جواد ضمیری[۲]؛ محمد سعید صالحی[*۱]؛ محمد رضا نام‌آور[۳]؛ علی نیازی[۴]؛ امین رمضانی[۴]؛ نادر تنیده[۵]؛ امین تمدن[۶]

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ۲ـ بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۳ـ مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز ۵ـ مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۶ـ گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
* نویسنده مسئول: محمد سعید صالحی، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، صندوق پستی: ۶۵۱۸۶-۷۱۴۴۱ sisas33@gmail.com

چکیده

پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید ـ۳ (RFRP-3) در مغز جوندگان در جلوگیری از آزادسازی گونادوتروپین نقش دارد و در حقیقت هومولوگ هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) است. از این رو با توجه به اثر پپتید RFRP-3 بر تراوش گونادوتروپین‌ها، هدف این پژوهش بررسی بیان ژن RFRP در سطح رونویسی و ترجمه در گامه‌های چرخه فحلی، در مغز موش صحرایی بود. برای بررسی RFRP-3 mRNA روش Real time PCR و برای بررسی پپتید RFRP-3 روش ایمینوهیستوشیمی به کار برده شد. بیان RFRP-3 mRNA در سراسر چرخه فحلی در داین‌سفالن موش‌های صحرایی تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵) در صورتی که تعداد نورون‌های بیان کننده RFRP-3 در گامه‌های پرواستروس و ابتدای استروس به صورت معنی‌داری از گامه‌های استروس، مت استروس و دای‌استروس کمتر بود (P<۰/۰۵). در نتیجه می‌توان این احتمال را مطرح کرد که ممکن است بیان ژن RFRP-3 در سراسر چرخه فحلی، در سطح رونویسی کنترل نمی‌شود.

واژگان کلیدی: پپتید وابسته به آرژنین ـ فنیل آلانین ـ آمید، گامه چرخه فحلی، هیپوتالاموس، موش صحرایی

مقدمه

نورون‌های هیپوتالاموس با آزادسازی فاکتورهای پپتیدی تحریک کننده و مهار کننده، تراوش هورمون‌های هیپوفیز پیشین را تنظیم می‌کنند. تراوش گونادوتروپین ها در درجه اول به وسیله اثر تحریکی هورمون آزاد کننده گونادوتروپین (GnRH) کنترل می‌شود. در سال ۲۰۰۰ پپتیدی با ۱۲ اسید آمینه در هیپوتالاموس مغز بلدرچین شناسایی شد و به علت توانایی آن در جلوگیری از آزادسازی گونادوتروپین، هورمون مهار کننده گونادوتروپین (GnIH) نام گرفت (Tsutsui et al., 2000). پژوهش‌های بعدی وجود هومولوگ‌های GnIHرا با عنوان "پپتید وابسته به آرژنین – فنیل آلانین – آمید[۱] (RFRP)" در مغز جوندگان (Murakami et al., 2008) و گوسفند (Clarke et al., 2008) شناسایی

[۱]- Arg-Phe-NH2 related peptide

کردند. در موش صحرایی گزارش شده تنها RFRP-3، بر فعالیت گونادوتروپ ها اثر مهاری دارد (Clarke et al., 2009). از این رو با توجه به اثر پپتید RFRP-3 بر تراوش LH از هیپوفیز، هدف این پژوهش بررسی بیان ژن RFRP در سطح رونویسی و ترجمه در گامه‌های چرخه فحلی، در مغز موش صحرایی بود.

مواد و روش ها

در این پژوهش برای بررسی بیان RFRP-3 mRNA روش RT-PCR به کار برده شد. بدین منظور از ۱۵ موش صحرایی (*Rattus norvegicus*) بزرگسال استفاده شد. موش‌های صحرایی پس از تعیین گامه های چرخه فحلی (بررسی میکروسکپی اسمیر واژن) با روش جابجایی مهره‌های گردن کشتار شدند (سه موش صحرایی در هر گامه فحلی). سه موش صحرایی نیز ۱۵ روز پس از تخمدان برداری کشتار شدند (به عنوان گروه شاهد). سپس مغز هر جانور بی درنگ خارج و بخش دایین‌سفالن به نیتروژن مایع انتقال و سپس تا زمان انجام RT-PCR در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. استخراج RNA، تیمار با آنزیم DNase I برای حذف آلودگی‌های ژنومی و سنتز رشته اول cDNA (همگی توسط کیت‌های شرکت فرمنتاز و مطابق دستورالعمل) انجام شد. برای طراحی پرایمر ژن RFRP-3 (NM_023952) و ژن کنترل داخلی GAPDH (M32599) نرم‌افزار ALLELEID 6 به کار برده شد. واکنش Real Time PCR به صورت مقایسه‌ای (Relative) با ۴۰ سیکل و دمای اتصال ۵۶ درجه سانتی گراد انجام و با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان محاسبه شد:

$$-\Delta\Delta Ct = (CT\ RFRP\text{-}3 - CT\ GAPDH)\ phase - (CT\ RFRP\text{-}3 - CT\ GAPDH)\ OVX$$

برای بررسی الگوی بیان پپتید RFRP-3 روش ایمیونوهیستوشیمی استفاده شد. بدین منظور، بیست موش صحرایی ماده پس از تعیین گامه های چرخه فحلی از راه قلب پرفیوژ شدند. پس از بیرون آوردن مغز، ناحیه دایین سفالون جدا و در محلول سوکروز ۳۰٪ قرار داده شد. نمونه ها با ضخامت ۳۰ میکرومتر برش داده شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد، در محلول دارای ماده محافظ یخزدگی (Cryoprotectant) نگهداری شدند. برش های مناسب دارای هسته DMH سه بار و هر بار برای ده دقیقه با محلول فسفات بافر سالین (PSB) شستشو شدند. از سدیم سیترات بافر ۱۰ میلی مولار (PH=6) برای بازیابی آنتی ژن استفاده و پس از سه بار شستشوی مجدد با PBS، از سرم پنج درصد الاغ به عنوان محلول بلوک کننده استفاده شد. آنتی بادی اولیه علیه RFRP-3 با رقت یک به سیصد تهیه و نمونه ها برای ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد با این محلول انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان و شستشوی نمونه ها با فسفات بافر سالین، نمونه ها با آنتی بادی ثانویه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از قرار دادن نمونه ها بر لام، تعداد نورون های بیان کننده RFRP-3 در هر برش با میکروسکوپ فلورسنت شمارش شد.

میانگین و انحراف معیار بیان mRNA و پپتید RFRP-3 در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی با نرم افزار SPSS مقایسه شدند.

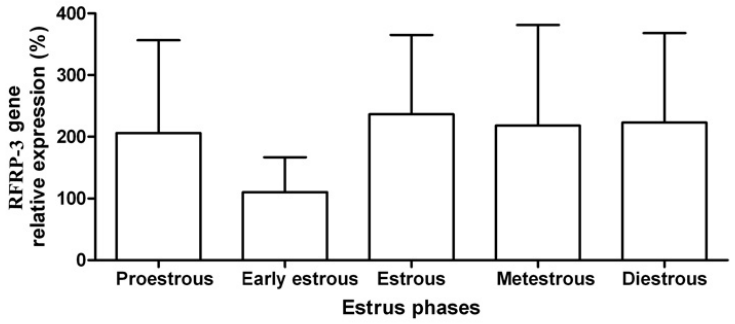
نتایج و بحث

بیان RFRP-3 mRNA در گامه های گوناگون چرخه فحلی در دایین‌سفالن موش‌های صحرایی تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$؛ نگاره ۱). در صورتی که تعداد نورون‌های بیان کننده RFRP-3 در گامه‌های پرواستروس و ابتدای استروس به صورت معنی‌داری از گامه‌های

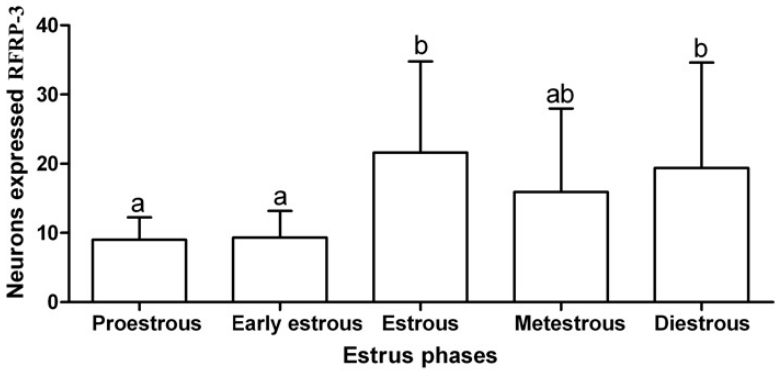
استروس، مت استروس و دای‌استروس کمتربود ($P<0.05$؛ نگاره ۲). پیش‌تر، پپتید RFRP-3 تنها در هسته DMH مغز جوندگان و RFRP-3 mRNA نیز تنها در DMH هامستر شناسایی شده بود (Kriegsfeld et al., 2006). شمار سلول‌های بیان کننده RFRP و فعالیت این سلول‌ها در گامه پرواستروس هامستر کاهش یافت و فعالیت این نورون‌ها در حوالی زمان سرژ GnRH/LH در دوره پیش از تخمک ریزی به صورت چشمگیر مهار می‌شد. بیان شده است که سنتز، تراوش و یا انتقال پپتید RFRP در خلال چرخه تخمدانی تغییر می‌کند (Kriegsfeld et al., 2006). اگرچه در این پژوهش مشاهده شد که مقدار ثابتی RFRP-3 mRNA در نورون‌های RFRP موش صحرایی، در گامه‌های مختلف چرخه فحلی بیان می شود اما بیان پپتید RFRP-3 در خلال چرخه فحلی متفاوت بود و می‌توان این احتمال را مطرح کرد که ممکن است بیان ژن RFRP-3 در سراسر چرخه فحلی، در سطح رونویسی کنترل نمی‌شود.

منابع

1) Clarke, I.J., Y. Qi, I. Puspita Sari, J.T. Smith. 2009. Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. Frontiers in Neuroendocrinology, 30:371-378.
2) Clarke, I.J., I.P. Sari, Y. Qi, J.T. Smith, H.C. Parkington, T. Ubuka, J. Iqbal, Q. Li, A. Tilbrook, K. Morgan, A.J. Pawson, K. Tsutsui, R.P. Millar, G.E. Bentley. 2008. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. Endocrinology, 149:5811-5821.
3) Kriegsfeld, L.J., D.F. Mei, G.E.Bentley, T. Ubuka, A.O. Mason, K. Inoue, K. Ukena, K. Tsutsui, R. Silver. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103:2410-2415.
4) Murakami, M., T. Matsuzaki, T. Iwasa, T. Yasui, M. Irahara, T. Osugi, K. Tsutsui. 2008. Hypophysiotropic role of RFamide-related peptide-3 in the inhibition of LH secretion in female rats. Journal of Endocrinology, 199:105-112.
5) Tsutsui, K., E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii, P.J. Sharp. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. Biochemical and Biophysical Research Communications, 275:661-667.



نگاره ۱ـ میانگین (± انحراف معیار) بیان نسبی ژن RFRP-3 در گامه های چرخه فحلی، در داین سفالن موش صحرایی (n=۳).



نگاره ۲ـ میانگین (± انحراف معیار) بیان پپتید RFRP-3 در گامه های چرخه فحلی، در داین سفالن موش صحرایی (n=۵). میانگین های دارای بند واژه ی همانند، تفاوت آماری معنی داری ندارند (P>0.05).

Expression of RFamide-related peptide-3 during estrous cycle in hypothalamus of rat

Farid Pazhoohi [1], Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi [2], Mohammad Javad Zamiri [2], Mohammad saied Salehi *[1], Mohammad Reza Namavar [3], Ali Niazi [4], Amin Ramazani [4], Nader Tanideh [5], Amin Tamadon [6]

1- Graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 2- Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 3- Histomorphometry and Stereology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 4- Biotechnology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, 5- Stem Cell and Transgenic Technology Research Center & Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 6- Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University & Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*** Corresponding author: sisas33@gmail.com**

Abstract

RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) has an inhibitory role in gonadotropin secretion in rodents' brain, and is a homolog of gonadotropin inhibitory hormone (GnIH). The aim of the present study was to evaluate the expression levels of RFRP-3 mRNA and peptide during estrous cycle in the brain of rats. Real time PCR was performed on tissue samples to determine expression of RFRP-3 mRNA and immunohistochemistry analysis was used to determine RFRP-3 peptide expression. The expression of RFRP-3 mRNA was not significantly different in diencephalon of rats during the estrous cycle ($P>0.05$), while number of RFRP-3 expressing neurons was significantly lower at proestrous and early estrous in comparison to estrous, metestrous and diestrous phases ($P<0.05$). It is likely that expression of RFRP-3 gene during the estrous cycle may not be controlled at the transcriptional level.

Keywords: RFamide-related peptide-3, Estrous cycle, Hypothalamus, Rat

مطالعه ی ارتباط بین صفات کمی و کیفی اسپرم با میل جنسی قوچ های دورگ

محمد مصطفی پورسیف[۱]، غلامعلی مقدم[۲]، عباس رافت[۳]، علی الفتی چغاگلانی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی،دانشگاه تبریز، ۲- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی،دانشکده ی کشاورزی،دانشگاه تبریز

۳- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی،دانشگاه تبریز

مقدمه

در تمام گله های اصلاح نژادی شناسایی و حذف قوچ های فقیر از نظر ویژگی های اسپرم و میل جنسی و نیز توانایی جفتگیری از اهمیت بالایی برخوردار است. کاهش میل جنسی و ظرفیت پایین جفتگیری شانس آبستن کردن میش در فحلی اول و به دنبال آن نرخ بره زایی و همزمانی بره زایی در گله را مختل می کند. حال آنکه با هدف اجرای تکنیک تلقیح مصنوعی و نیز سرعت بخشیدن به پیشرفت ژنتیکی گله ضرورت دارد تا از اسپرم های با کیفیت بالا برای تلقیح مصنوعی استفاده شود. لذا زمانیکه همبستگی بین فاکتورهای باروری اسپرم و میل جنسی ثابت شود می توان با دقت و سرعت بیشتری طی انجام آزمون های استاندارد میل جنسی، قوچ های ضعیف از نظر این صفت را شناسایی کرده و غیر مستقیم گامت های ممتاز را به نسل بعدی منتقل کرد. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین ویژگی های اسپرم با میل جنسی در قوچ های دورگ است.

بررسی منابع

بین قوچ های با میل جنسی متوسط در مقایسه با قوچ های با میل جنسی بالا از نظر تولید اسپرم تفاوت وجود دارد اطلاعات اندکی وجود دارد.[۳] نژاد های مختلف دارای میل جنسی متفاوتی هستند[۱]. گاوهای با میل جنسی بیشتر به انزال هایی با تعداد اسپرم بیشتری گرایش دارند[۲]. با این حال در دیگر مطالعات عنوان شده بین فعالیت جنسی با حجم منی و غلظت اسپرم ارتباط معنی داری وجود ندارد[۴]. آزمون های لیبیدو می توانند توانایی حیوان در جفتگیری را پیش بینی کنند اما نمی توان با قاطعیت راجع به باروری و صفات اسپرم آنها قضاوت کرد. لذا ضرورت دارد در صورت وجود همبستگی با ارائه ی مدلی استاندارد نه تنها توانایی جفگیری بلکه صفات اسپرم و به دنبال آن باروری دام را پیش بینی کرد[۵].

مواد و روش ها

در طول پاییز از ۱۱ قوچ بارور دورگ ۳ تا ۵ ساله با سه ترکیب ژنتیکی(بلوچی–مغانی، قزل–بلوچی، آرخامرینو–قزل) و وزن زنده ی ۶۵ تا ۷۵ کیلوگرم اسپرم گیری انجام شد. نمونه ها بلافاصله بعد از اسپرم گیری به آزمایشگاه منتقل شده و از نظر صفات کمی و کیفی ارزیابی شدند. حجم منی بوسیله ی لوله اسپرم گیری مدرج با دقت ۰/۱ ml ثبت شد. غلظت اسپرم توسط لام توما تعیین شد و برای رقیق

کردن نمونه ی تازه از سیترات سدیم دی هیدراته ۲/۹٪ (۱ به ۲۰۰) استفاده شد. تحرک موجی اسپرم تحت بزرگنمایی ×۱۰ از ۱ تا ۵ نمره دهی شد. درصد تحرک پیشرونده اسپرم بعد از رقیق کردن نمونه ی تازه (۱ به ۲۰۰) با سیترات سدیم دی هیدراته ۲/۹٪ و بوسیله ی لام قطره ی معلق (۳۷°C) و با عدسی × ۴۰ چند زمینه از لام بررسی شد(این روش برای اولین بار اجرا شده و سبب وضوح بیشتر اسپرماتوزوا ها زیر میکروسکوپ می شود). برای ارزیابی درصد اسپرم زنده و مرده و درصد اسپرم ناهنجار از رنگ آمیزی ائوزین استفاده شد و با عدسی × ۴۰ تعداد ۳۰۰ اسپرماتوزوا برای درصد زنده و ۲۰۰ اسپرم برای درصد ناهنجاری شکل شمارش شد. میزان فعالیت متابولیکی اسپرم(MBR-T) بوسیله رنگ متیلن بلو بر حسب مدت زمان(ثانیه) تغییر رنگ نمونه ی تازه بعد از ترکیب ۱ به ۱ منی تازه و رنگ محاسبه گردید. برای اندازه گیری میل جنسی[1] از سه معیار زمان عکس العمل[2] ، دوره ی بی تفاوتی جنسی (Refractory Period) و تعداد پرش منجر به انزال استفاده شد. ماهانه سه بار این آزمون ها انجام شدند. داده ها بوسیله ی نرم افزار SAS version 9.1 آنالیز شدند.

نتایج و بحث

با در نظر گرفتن هر سه فاکتور مورد استفاده در تست لیبیدو، نژاد قزل-بلوچی نسبت به دو نژاد دیگر میل جنسی بالاتری داشت($P<$ ۰/۰۱). نژاد آرخامرینو – قزل به طور معنی داری($P <$ ۰/۰۱) زمان عکس العمل(RT) بیشتری نسبت به دو نژاد دیگر داشت اما بین دو نژاد بلوچی-مغانی و قزل-بلوچی تفاوت معنی داری از نظر این صفت مشاهده نشد. بین زمان عکس العمل(RT) با دوره ی بی تفاوتی جنسی یا RP($r =$ ۰,۱۵۳ ، $P <$ ۰/۰۵) همبستگی معنی داری مشاهده شد. بین RP با حجم انزال($r =$ -۰/۲۱۲ ، $P <$ ۰/۰۱) و تعداد پرش منجر به انزال($r =$ ۰/۴۵۷ ، $P <$ ۰/۰۱) و نیز بین تعداد پرش منجر به انزال با حجم انزال هم همبستگی منفی معنی داری($r =$ -۰/۱۵۳ ، $P<$۰/۰۵) دیده شد. Quirino و همکاران (۲۰۰۴) همبستگی بین لیبیدو و حجم انزال را مثبت گزارش کردند. نژاد قزل-بلوچی از نظر پارامتر های میل جنسی از دو نژاد دیگر بهتر است اما این برتری در میان صفات اسپرم فقط در صفت حجم انزال مشهود بود. این مطالب با نتایج قبلی که همبستگی ژنتیکی مناسبی بین ویژگی های مورفولوژیک اسپرماتوزوا و میل جنسی گزارش کردند همخوانی ندارد[۷]. از طرفی در مطالعات مختلف بر روی گاوهای Nellore همبستگی فنوتیپی بین لیبیدو با صفات منی گزارش نشده است[۶]. اثر ژنوتیپ بر روی تمام صفات تست لیبیدو و صفات اسپرم معنی دار شد($P <$۰/۰۱) و فقط بر روی غلظت اسپرم این اثر در سطح ۰/۰۵ معنی دار شد.

منابع

1.Boland, M.P., Alkamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B., Howles, C.M., 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. Anim. Reprod. Sci. 9, 241-252.

1- Libido
2- Reaction time(RT)

2.Brockett C. C., Presicce G. A., Foote R. H., 1994. Semen quality and behavior of Holstein bulls exposed to estradioltreated bulls for mounts. J. Dairy Sci. 77, 124–31.

3.El-Alamy M.A., Foote R.H., Hare E., 2001. Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long and short day lighting. Theriogenology. 56, 839-854.

4.Henney, S.R., Killian, G.J., Deaver, D.R., 1990. Libido, hormone concentrations in blood plasma and semen characteristics in Holstein bulls. J. Anim. Sci. 68, 2784–9.

5.Hoflack G., Van Soom A., Maes D., De Kruif A., Opsomer G., Duchateau L., 2006. Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holestein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. Theriogenology. 66, 207-216.

6.Pineda N., Lemos P. F., Fonseca V. O., 1997. Comparacao entre dois testes de avaliacao do comportamento sexual (libido) de touros Nelore (Bos Taurus indicus). Rev. Bras. Report. Anim. 21, 29-34.

7.Quirino C. R., Bergmann J. A. G., Vale Filho V. R., Andrade V. J., Reis S. R., Mendonca R. M., Fonseca C. G., 2004. Genetic parameters of libido in Brazilian Nellore bulls. Theriogenology. 62, 1-7.

جدول-۱. مقایسه ی پارامتر های میل جنسی و اسپرم سه نژاد قوچ دورگ(میانگین ± انحراف معیار)

صفات	بلوچی – مغانی	قزل – بلوچی	آرخامرینو – قزل
حجم انزال(ml)	۰,۹۲ ± ۰,۰۳^{c}	۱,۲۸ ± ۰,۰۳^{a}	۱,۱۶ ± ۰,۰۳^{b}
تحرک موجی(۱-۵)	۳,۶۷ ± ۰,۰۵^{b}	۳,۸۷ ± ۰,۰۵^{ab}	۳,۹۴ ± ۰,۰۵^{a}
درصد تحرک پیشرونده	۶۲,۹۳ ± ۱,۱۳^{b}	۶۷,۵۱ ± ۰,۹۷^{a}	۶۷,۵۴ ± ۰,۹۷^{a}
غلظت اسپرم($\times 10^{9}$)	۳,۸۸ ± ۰,۰۸^{a}	۳,۵۶ ± ۰,۰۷^{b}	۳,۶۵ ± ۰,۰۷^{b}
اسپرم ناهنجار(%)	۱۳,۶۷ ± ۰,۵۷^{a}	۱۱,۰۲ ± ۰,۵۰^{b}	۱۱,۳۲ ± ۰,۵۰^{b}
نرخ فعالیت متابولیکی	۱۲۱,۷۶ ± ۴,۱۴^{a}	۱۱۶,۷۸ ± ۳,۵۹^{ab}	۱۱۰,۹۵ ± ۳,۵۹^{b}
تعداد کل اسپرم/انزال	۳,۵۸ ± ۰,۱۷^{a}	۴,۵۸ ± ۰,۱۵^{b}	۴,۲۳ ± ۰,۱۵^{b}
اسپرم زنده(٪)	۶۷,۲۲ ± ۱,۱۲^{b}	۷۱,۸۳ ± ۰,۹۷^{a}	۷۲,۱۹ ± ۰,۹۷^{a}
تعداد پرش منجر به انزال	۶,۹۸ ± ۰,۶۳^{a}	۳,۱۴ ± ۰,۵۳^{b}	۶,۰۰ ± ۰,۵۳^{a}
(sec)Reaction time	۱۷,۲۷ ± ۱,۸۵^{a}	۱۲,۳۰ ± ۱,۵۹^{b}	۲۴,۵۸ ± ۱,۵۹^{c}
(sec)Refractory period	۲۴۸,۳۰ ± ۱۹,۱۸^{a}	۸۳,۸۲ ± ۱۶,۶۷^{b}	۲۳۲,۰۶ ± ۱۶,۶۷^{a}

Abstract

This study was conducted on eleven crossbred fertile rams included 3 Balochi-Moghani, 4 Ghezel-Balochi, 4 Ghezel×Merino. All Semen samples were collected using artificial vagina. libido test of rams were recorded three times a month at the time of semen collection. It was based on Reaction time, refractory period and number of mounting. Semen traits were studied immediately. The results showed that libido of Ghezel×Balochi were better than others. However the significantly difference wasn't observed about semen characteristics among the three breeds except ejaculate volume($P < 0.01$). Refractory period ($P < 0.01$) and number of mount ($P < 0.05$) were correlated with semen volume. Thus we could not prove that the semen quality is related to ram libido.

ارزیابی فراوانی چند شکلی جایگاه K232A از ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز(DGAT1) در گاو هلشتاین ایران

ملیحه پیرزاد[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، محمد علی ادریس[۳]، محمد خوروش[۴]، سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی[۵].

۱-دانشجوی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. ۲،۴-استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان ۳،۵- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

چکیده

از آنجا که تا ثیر چند شکلی DGAT1 K232A در تنوع میزان چربی شیر به اثبات رسیده است، این تحقیق به منظور ارزیابی فراوانی چند شکلی DGAT1 K232A در گاوهای شیری هلشتاین ایران صورت گرفت. ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز۱(DGAT1)، آنزیم آسیل کوآ: آسیل ترانسفراز۱ را کد می‌کنند. این آنزیم در ساخت تری گلیسرید در غده پستانی گاو نقش کلیدی ایفا می‌کند. چند شکلی مورد نظر، نتیجه جایگزینی نوکلئوتید AA→GC در اگزون ۸ این ژن می‌باشد که نتیجتاً باعث تغییر اسیدآمینه آلانین(A) به لایزین(K) در آنزیم تولید شده می-شود. ۴۰۸ فرد با استفاده از تکنیک RFLP-PCR ژنوتایپ شدند. به این صورت که یک قطعه ۴۱۱ جفت بازی، در برگیرنده جهش، تکثیر و با آنزیم *CfrI* هضم می‌گردید و از این طریق ۴۰۸ گاو هلشتاین ژنوتایپ شدند و درکل سه نوع ژنوتایپ KK ، KA و AA تعیین گردید. افراد KK فاقد آلل جهش یافته بودند و افراد KA داری یک آلل جهش یافته و افراد AA دارای دو آلل جهش یافته بودند. فراوانی ژنوتیپی AA ، KAو KK به ترتیب ۰/۳۵۷۸، ۰/۵۵۱۵ و ۰/۰۹۰۷ و فراوانی آلل های K و A به ترتیب ۰/۳۷ و۰/۶۳تخمین زده شد.

واژه کلیدی:ژنDGAT1، چند شکلی K232A، RFLP-PCR، گاوهای هلشتاین ایران

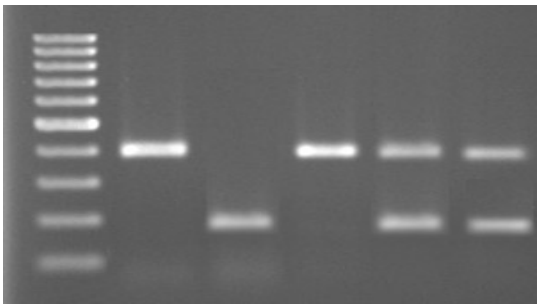
مقدمه

کاربرد نشانگرهای ژنتیکی در اصلاح دام از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و استفاده درست از آن‌ها موجب افزایش سرعت و دقت در پیشرفت ژنتیکی دام می‌شود. در پژوهش‌های مختلف وجود یک QTL موثر بر صفات تولید شیر و درصد چربی شیر در انتهای سانترومر کروموزم ۱۴ گاو گزارش شده است که محدوده ۳ سانتی مورگان را در بر می‌گیرد. ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز۱[1](DGAT1) به عنوان ژن کاندید موثر بر میزان چربی شیر معرفی شده است (گریزارت و همکاران،۲۰۰۲). وجود تنوع آللی در نواحی کد کننده و یا ساختمانی این ژن می‌تواند روی بیان ژن، توالی محصول تولید شده یا کمیت وکیفیت آن تاثیر گذارد. این ژن کد کننده آنزیم دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱ است که در آخرین مرحله ساخت تری گلیسرید در غدد پستانی گاو نقش کلیدی دارد. بیش از ۹۸ درصد چربی شیر از تری گلیسرید تشکیل شده است که بیان کننده نقش مهم این آنزیم در تولید چربی شیر می‌باشد. در ژن DGAT1، ایجاد یک جهش موثر از نوع تک نوکلئوتیدی باعث تبدیل گوانین به آدنین و نتیجتاً منجر به جایگزینی لیزین با آلانین در موقعیت ۲۳۲ امینه اسید در این آنزیم می‌گردد. وجود این جهش باعث اثر بزرگی روی تولید و ترکیب شیر می‌باشد. زیرا آلل جهش یافته به نسبت، می‌تواند منجر به تولید تری گلیسرید بیشتری شود (نسلودوهمکاران، ۲۰۰۸). هدف این تحقیق، بررسی چند شکلی K232A از ژن DGAT1 گاو نژاد هلشتاین در ایران بود.

مواد و روش‌ها

[1] Diacylglycerol acyle transferase 1

در این پژوهش به منظور استخراج DNA و بررسی چندشکلی ژن DGAT1 در گله گاوهای نژاد هلشتاین ایرانی و همچنین بررسی فراوانی ژنی وژنوتیپی، جمعیتی از پنج گله در استان اصفهان مورد مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که در مجموع ۴۰۸ نمونه خون از این گله‌ها به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. نمونه خون‌ها تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. همچنین اطلاعات مربوط به رکوردهای شیردهی و تولید مثل گاوها نیز از واحدهای گاوداری تهیه شد. استخراج DNA ژنومی از گلبول‌های سفید به روش استخراج نمکی میلر انجام گرفت. این روش مبتنی بر استفاده از لیز کننده سلول گلبول قرمز و سفید می‌باشد. جهت تعیین غلظت و کیفیت ماده ژنتیکی استخراج شده (DNA) از روش الکتروفورز استفاده گردید که غلظت نمونه‌ها حدود۱۰۰ -۵۰ نانوگرم تخمین زده شد. تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۱۱ جفت باز، در بر گیرنده چند شکلی K232A ژن DGAT1 با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[1] (PCR)انجام گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده (وینتر و همکاران، ۲۰۰۲) عبارتند از: آغاز گر رفت '-GCACCATCCTCTTCCTCAAG 3-'۵ و آغاز گر برگشت: ' GGAAGCGCTTTCGGATG-3 -'۵



شکل۱- ژل آگارز الکتروفورز شده ۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید. انواع ژنوتیپ های حاصل از هضم آنزیمی. ستون ۱ از سمت چپ نشانگر DNA ، ستون ۲و۴ ژنوتیپ KK، ستون ۳ ژنوتیپAA و ستون ۵ و۶ ژنوتیپ KA .

غلظت نهایی مواد در ۲۰ میکرولیتر شامل ۲میکرولیتر DNA (۵۰-۱۰۰نانوگرم)، ۱/۲ میلی مول کلرید منیزیوم، ۰/۱۶ میلی مول مخلوط نوکلئوتیدی، ۶/۶ پیکومول از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم تک پلی مراز(سیناژن) و ۱X بافرPCR بود. واسرشته سازی اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با الگوی ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد. بعد از این چرخه‌ها، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.از روش چند شکلی طول قطعات محدود شده[2](RFLP) برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲/۵ واحد آنزیم برشی *Cfr1* (فرمنتاز، آلمان) و ۱X بافر آنزیم*Cfr1* *به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هضم گردید. قطعات حاصل شده در ژل آگاروز ۲/۵ درصد مشاهده گردید. آنزیم برشی، قطعه‌ی ۴۱۱ جفت بازی را به دوقطعه‌ی ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت بازی برش می‌دهد. قطعه PCR برش نیافته، نشان دهنده آلل لایزین(آلل K) و دو قطعه‌ی حاصل از هضم نشان دهنده آلل آلانین (الل A) بود (شکل۱).*

نتایج و بحث

فراوانی آللی وژنوتی

فراوانی ژنوتیپی و اللی مشاهده شده، شاخص نئی، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده **با** استفاده از نرم افزار Pop_Gene برآورد گردیدند(جدول۱). به منظور بررسی تعادل هاردی- وینبرگ در جایگاه‌های مورد مطالعه در این جمعیت، از ازمون کای اسکوار استفاده گردید. فراوانی آلل K در این پژوهش (۰/۳۷) کاملاً با گزارش گویتر و همکاران (۲۰۰۷) در رابطه با بررسی گاوهای

[1] Polymerase Chain Reaction
[2] Restriction Fragment Length Polymorphism

هلشتاین فرانسه مطابقت دارد. وینیکیوس[1] و همکاران(۲۰۱۰) با ژنوتایپ ۳۰۷۰ گاو هلشتاین آمریکایی، فراوانی این آلل را ۰/۴ اعلام نمودند. صادقی (۱۳۸۷)نیز طی ارزیابی اثر جایگاه K232A در گاوهای نر هلشتاین ایرانی، فراوانی الل K را ۰/۳۹۹ گزارش نمود. به طور کلی، با توجه به گزارشات صادقی وهمچنین پژوهش حاضر، فراوانی پایین‌تر آلل K نسبت به آلل A، ممکن است به دلیل انتخاب دام‌ها در جهت افزایش تولید شیر طی سال‌های گذشته باشد. از جهت دیگر، جمعیت گاوهای هلشتاین مورد بررسی، حامل درصد بالایی از ژن‌های گاوهای نر آمریکایی هستند که این عامل می‌تواند دلیل دیگری برای مشاهده فراوانی پایین تر آلل K نسبت به آلل A باشد. مقدار کای اسکور ۱۴/۱۹۴ با احتمال ۰/۰۰۰۱۶۵ برآورد شد که نشان دهنده نبود تعادل هاردی- وینبرگ در جمعیت مورد نظر است و از آنجا که افراد جمعیت مورد مطالعه ما از گله‌های صنعتی انتخاب شده بودند، بخاطر اعمال انتخاب و یا انجام تلقیح مصنوعی و نبود آمیزش تصادفی در گله های صنعتی، این نتیجه دور از انتظار نبود. بیشترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به ژنوتیپ KA می‌باشد که با نتایج تالر و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. شاخص نئی و شانون برآورد شده با مقدار نسبتاً بالا، میزان تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت نشان می‌دهد. در نهایت می‌توان اینطور نتیجه گیری کرد که میزان تنوع ژنتیکی درجمعیت مورد مطالعه بالاست و با توجه به این نکته که تنوع، اساس کارهای اصلاح نژادی است، می‌توان از گاوهای هلشتاین ایران به عنوان یک منبع ژنتیکی مناسب استفاده کرد.

جدول۱ :فراو

ژنوتیب	فراوانی ژنوتیپی	فراوانی اللی	شاخص نئی	شاخص شانون	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مشاهده شده
AA	۰/۳۵۷۸	الK : ۰/۳۷	۰/۴۶۴۳	۰/۶۵۷	۰/۴۶۴۹	۰/۶۰۷۶
KA	۰/۵۵۱۵					
KK	۰/۰۹۰۷	الA : ۰/۶۳				

*آلل A و K به ترتیب آلل‌های آلانین و لیزین در جایگاه K232A

منابع

۱–صادقی م. ۱۳۸۶. اثر پلی مورفیسم ژن‌های کاندیدا بر ارزش اصلاحی صفات تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران. رساله دکتری. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،دانشگاه تهران.

2- Gautier, M., Capitan, A., Fritz, S., Eggen, A., Biochard, D. and Druet, T.2007.Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairycattle. J. Dairy Sci. 90: 2980-2988.

3- Thaller, G., W. Kramer, A, Winter, B. Kaupe, G. Erhardt, R. Fries. 2003. Effects of DGAT1 variants in German cattle breed. *Anim. Sci*. 81: 1911-1918.

[1] Vinicius

4- Naslud, j., W. F. Fikse, G. R. Pielberg, A. Lund. 2008. Frequency and Effect of the Bovineacyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Swedish Dairy cattle. *Dairy Sci*,. 91: p. 2127-2134.

5- Vinicius, M., T. Sonstegard, R. Thallman, E. Connor, R. Schnabel, C. Van Tassell. 2010. Characterization of DGAT1 allelic effects in a sample of North American Holstein cattle. *Anim. Biotechnology*. 21: 88–99.

6- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Sirnon, P., Spelman, R., Georges, M. and Snell, R.2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. Genome Res. 12: 222-231.

Frequency of the Bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Iranian Holstein Dairy Cattle

malihe pirzad[1]. Saeid Ansari Mahyari[2]. Mohammad-Ali Edriss[3], Mohammad Khorvash[4], Badraldin Ebrahim Sayed-Tabatabaei[5]

1-M. Sc of genetic and animal breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy.

2-4- Assistant Professor. College of Agricultural, Isfahan University of technology. 3,5- Professor, College of Agricultural, Isfahan University of technology.

Abstract:

Because of the DGAT1 K232A polymorphism in the diversification of milk fat has been proven, This study were to assess the frequency of DGAT1 K232A polymorphism in Iranian Holstein dairy cows. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) , which is encoded by the DGAT1 gene, is a key enzyme in triacylglycerol synthesis in the mammary gland. The considered polymorphism results from AA→GC nucleotide substitution in DGAT1 gene exon 8 and so, alanine to lysine amino acid change at product protein. This polymorphism proved to significantly affect the percent fat content in milk. Genotyping population, was performed using RFLP-PCR technique. A 411 bp fragment including this polymorphism was amplified and digested with the enzyme *CfrI* to determine the genotypes of 408 Holstein cows.Three types genotype KK, KA and AA were detected. KK individuals have not mutatnt alles, KA individuals have one mutant allele and AA individual have twomutant alleles. Frequency of genetic AA, KA and KK genotypes were respectively 0/3578, 0.5515, and 0.0907 and frequency of K and A allels were estimated 0.37 and 0.63, respectively.

Keywords: DGAT1 gene, K232A polymorphism, RFLP-PCR, Iranian Holstein Cattle

ارتباط چند شکلی ژن DGAT1 با عملکرد صفات تولید شیر و امتیاز سلول‌های سوماتیکی در گاو هلشتاین

ملیحه پیرزاد[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، محمد علی ادریس[۳]، محمد خوروش[۴]، سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی[۵]

۱-دانشجوی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. ۲،۴-استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان ۳،۵-استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی ارتباط بین چند شکلی K232A DGAT1 با امتیاز سلول‌های بدنی و عملکرد تولید شیر در گاوهای هلشتاین انجام گرفت. ژن DGAT1 درانتهای سانترومریک کروموزم ۱۴ گاوی وجود دارد که آنزیم آسیل کوآ: آسیل ترانسفراز۱ را کد می‌کند. این آنزیم درآخرین مرحله ساخت تری گلیسرید در غده پستانی نقش دارد. چند شکلی K232A باعث ایجاد تنوع در میزان چربی شیر می‌گردد. جمعیت مورد مطالعه ، شامل ۴۰۸ گاو هلشتاین، با تکنیک RFLP-PCR ژنوتایپ شدند که هر سه ژنوتیپ در جمعیت مشاهده شد. فراوانی آلل K و آلل A به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۶۳ بود. آنالیزهای آماری انجام شده، اثر ژنوتایپ ژن DGAT1 را برای تولید شیر و درصد چربی شیر در دوره اول شیردهی معنی دار نشان داد اما اثر معنی داری در ارتباط با صفت SCS مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: ژن DGAT1، چند شکلی K232A، RFLP-PCR، امتیاز سلول‌های بدنی، گاوهای هلشتاین

مقدمه

هدف اصلی در پژوهش روی ژنوم دام، شناسایی ژن‌ها یا نشانگرهایی است که بر صفات اقتصادی تاثیرگذار بوده و در نهایت بتوان از آن‌ها در برنامه های اصلاح نژادی استفاده کرد. ژن DGAT1[۱]، کد کننده آنزیم دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱است که درآخرین مرحله ساخت تری گلیسرید در غدد پستان نقش کلیدی دارد. بیش از ۹۸ درصد چربی شیر از تری گلیسرید تشکیل شده است که بیان کننده نقش مهم این آنزیم در تولید چربی شیر می‌باشد. ایجاد یک جهش موثر از نوع تک نوکلئوتیدی در این ژن، منجر به جایگزینی لیزین با آلانین در موقعیت ۲۳۲ آمینه اسید آنزیم تولید شده می‌گردد که اثر بزرگی روی تولید و ترکیب شیر دارد (نسلود و همکاران،۲۰۰۸). در کل، مطالعات کمی در رابطه با ارتباط این چند شکلی با صفاتی غیر از صفات تولیدی شیر مثل صفت امتیاز سلول‌های بدنی شیر(SCS[۲]) انجام شده است. با توجه به تاثیر منفی SCS بر تولید و کیفیت شیر(کوپک و همکاران،۲۰۰۹) ازاهداف این تحقیق علاوه بر مطالعه ارتباط این چند شکلی با عملکرد صفات تولیدی، همچنین مطا لعه ارتباط این چند شکلی با میزان SCS شیر نیز در نظر گرفته شده است.

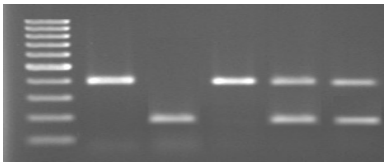
مواد و روش‌ها

در این پژوهش به منظور استخراج DNA و بررسی چندشکلی ژن DGAT1، ۴۰۸ نمونه خون از پنج گله دراستان اصفهان به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. استخراج DNA ژنومی از گلبول‌های سفید به روش استخراج نمکی میلر انجام گرفت. تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۱۱ جفت باز در بر گیرنده چند شکلی K232A ژن DGAT1 با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[۳](PCR) انجام گرفت.

---

[۱] Diacylglycerol acyle transferase 1
[۲] Somatic cell score
[۳] Polymerase Chain Reaction

توالی آغازگرهای مورداستفاده به صورت آغازگررفت: '۵-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3' وآغاز گربرگشت: '۵-GGAAGCGCTTTCGGATG-3' می‌باشد. از روش چند شکلی طول قطعات محدود شده[۱](RFLP)، باآنزیم برشی *Cfr1*، ژنوتیپ نمونه‌ها تعیین شد. *آنزیم برشی، قطعه‌ی ۴۱۱ جفت بازی را به دو قطعه‌ی ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت باز ی برش می‌دهد. قطعه PCR برش نیافته، نشان دهنده آلل لایزین(آلل K) و دو قطعه‌ی حاصل از هضم نشان دهنده آلل آلانین(الل A) بود(شکل۱).*



شکل۱-انواع ژنوتیپ های حاصل از هضم آنزیمی: ستون ۱ از سمت چپ نشانگر DNA، ستون ۲ و۴ژنوتیپ KK، ستون ۳ ژنوتیپAA و ستون۵ و۶ ژنوتیپ KA .

میانگین،اشتباه معیار،انحراف معیار،دامنه صفات و ضریب تغییرات برای صفات مورد بررسی در دوره اول شیردهی درجدول۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: میانگین، اشتباه معیار، انحراف معیار، دامنه صفات، ضریب تغییرات برای صفات تولیدی و scs در دوره

صفت	تعداد دام مورداستفاده	میانگین ± اشتباه معیار	انحراف معیار	کمترین مقدار	بیشترین مقدار	ضریب تغییرات
تولیدشیر تصحیح شده	۴۰۷	۹۸۴۲/۸±۹۸/۴۶	۱۴۲۰/۵	۵۶۵۳/۶	۱۳۲۶۹/۲	۱۴/۴۳
درصد چربی	۴۰۱	۳/۱۲±۰/۰۳۰	۰/۴۶	۱/۷۳	۴/۴۵	۱۴/۷۶
درصدپروتئین	۴۰۴	۲/۹۴± ۰ /۰۱۲	۰/۱۸۷	۲/۴۱	۳/۴۷	۶/۳۸
SCS	۳۵۲	۱/۶±۰/۰۶۱	۰/۸۲	−۱/۶۴	۴/۳۲	۵۱/۸

به منظور بررسی ارتباط میان ژنوتیپ‌ها و صفات تولیدی در دوره اول شیردهی، تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه GLM با استفاده از مدل زیر انجام شد. دراین مدل پارامترها عبارتنداز:

$$Y_{iil} = \mu + G_i + Hys_{i+} b_1 (X_{iil} - \bar{X}) + e_{iil}$$

Y_{ijl}: رکورد تولید شیر تصحیح شده بر اساس ۳ بار دوشش در روز، درصد چربی یا پروتئین، μ: اثر میانگین کل، G_i: اثر ژنوتیپ، Hys_j:اثر گله، اثر سال وفصل زایش به صورت ترکیب شده، b_1 : ضریب رگرسیون طول دوره شیردهی،

X_{ijl}: طول دوره شیردهی، $\bar{X}$: میانگین روزهای طول دوره شیردهی e_{ijl} :اثر تصادفی باقی مانده. برای بررسی اثر ژنوتیپ روی scs، اثرژنوتیپ و Hys به عنوان اثر ثابت و تولید شیر تصحیح شده به عنوان اثر کوواریت در نظر گرفته شد(جدول۲).

برای بررسی اثر ژنتیکی بر صفت شمارش سلول‌های بدنی، از معیار امتیاز سلول‌های بدنی در طول دوره شیردهی استفاده گردید. برای نرمال نمودن توزیع داده‌های مربوط به تعداد سلول‌های بدنی از لگاریتم تعداد سلول‌های بدنی در مبنای ۲استفاده شد (SCS=log2(SCC/100000)+3) (کوپک و همکاران،۲۰۰۹).

[۱] Restriction Fragment Length Polymorphism

منابع تغییرات	درجه آزادی	شیر تصحیح شده	درصد چربی	درصد پروتئین	SCSصفت
		میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات	میانگین مربعات
ژنوتیپ	۲	*	* ۰/۶۶۷۸	ns۰/۰۸۴۲	ns۰/۳۷۷۰
Hys	۴۲(۴۰)[1]	**	**۰/۴۵۴۰	ns۰/۰۳۸۵	**۵۴/۹۲
روزهای شیردهی	۱	**	ns۰/۱۴۳۲	ns۰/۰۸۹۴	ns۰/۰۰۶۶
	R-squer	۰/۳۶۸	۰/۲۸۳	۰/۱۵۸	۰/۲۳۷

* و *

۱: درجه آ

نتایج

هرسه نوع ژنوتیپ AA , KA و KK برای چند شکلی مورد نظر در جمعیت مشاهده شد که فراوانی آنها به ترتیب ۰/۳۵۷۸ ، ۰/۵۵۱۵ و ۰/۰۹۰۷ فراوانی آلل K ۰/۳۷ و آلل A ۰/۶۳ می‌باشد.

بررسی ارتباطات ژنوتیپی ژن DGAT1 با صفات تولید شیر:

نتایج وبحث:

نتیجه آزمون آماری اثر ژنوتیپ‌های مختلف ژن DGAT1 K232A در ارتباط با صفت درصد چربی شیر و تولید شیر معنی دار(P<۰/۰۵) بود (جدول۲) که با نتایج پژوهش کاپ و همکاران(۲۰۰۷) روی نژاد هلشتاین آلمانی، ونیکیوس و همکاران(۲۰۱۰) روی نژاد هلشتاین آمریکای شمالی و صادقی (۱۳۸۶) روی نژاد هلشتاین ایرانی مطابقت داشت. همچنین نتایج آزمون آماری برای صفت درصد پروتئین در پژوهش حاضر معنی دار نشد که فقط با نتیجه صادقی(۱۳۸۶)در این مورد موافق بود. با توجه به مقدار پایین ضریب تغییرات داده‌های مربوط به درصد پروتئین (جدول۱) که عاملی برای کاهش واریانس بین گروهی و نهایتاً کاهش برآورد میزان F می‌شود، می‌تواند دلیلی برای معنی دار نشدن اثر ژنوتیپی بر این صفت باشد.

بررسی ارتباطات ژنوتیپی ژن DGAT1 با صفت SCS :

نتیجه وبحث:

در این بررسی اثر ژنوتیپی معنی‌داری روی SCS مشاهده نگردید که با نتایج بسیاری از پژوهش‌ها از جمله کاپ و همکاران (۲۰۰۷) و بری و همکاران (۲۰۱۰) و نسلود وهمکاران(۲۰۰۸) موافق اما با نتیجه ونیکیوس و همکاران (۲۰۱۰) مخالف بود.

منابع

۱–صادقی م. ۱۳۸۶. اثر پلی مورفیسم ژن‌های کاندیدا بر ارزش اصلاحی صفات تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران. رساله دکتری. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،دانشگاه تهران.

2- Kaupe, B., Brandt, H., Prinzenberg, E.M. and Erhardt, G. 2007. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science* 85: 11–21.

3- Berry, D.P., D. Howard, P. O'Boyle, S. Waters, J.F. Kearney and M. McCabe .2010. Associations between the K232A polymorphism in the diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) gene and performance in Irish Holstein-Friesian dairy cattle. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 49: 1–9.

4- Vinicius, M., T. Sonstegard, R. Thallman, E. Connor, R. Schnabel, C. Van Tassell. 2010. Characterization of DGAT1 allelic effects in a sample of North American Holstein cattle. *Anim. Biotechnology*. 21: 88–99

5- Naslud, j., W. F. Fikse, G. R. Pielberg, A. Lund. 2008. Frequency and Effect of the Bovineacyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Swedish Dairy cattle. *Dairy Sci*,. 91: p. 2127-2134.

6- Morek-Kopeć, M., A. Żarnecki , W. Jagusiak. 2009. Associations between somatic cell score of milkv and fertility traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Animal Science Papers and Reports.* 27: 15-22.

Influence of the bovine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1(DGAT1)K232A genetic variation on somatic cell score and milk performance

malihe pirzad[1]. Saeid Ansari Mahyari[2]. Mohammad-Ali Edriss[3], Mohammad Khorvash[4], Badraldin Ebrahim Sayed-Tabatabaei[5].

1- M. Sc of genetic and animal breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy.

2,4- Assistant Professor College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy . 3,5-Professor, College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy.

Abstract:

The study aimed at estimating the association between of the DGAT1 K232A whit somatic cell score (SCS) and milk performance Holstein cattle. The gene diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) is mapped to the centromeric end of The bovin BTA14 and encodes the acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1enzyme which catalyses the final step in triglyceride synthesis . K232A polymorphism proved to significantly affect the percent fat content in milk. Genotyping population, was performed using RFLP-PCR technique. A 411 bp fragment including was amplified and digested with the enzyme *CfrI* to determine the genotypes of 408 Holstein cows. Three types genotype KK, KA and AA were detected. Frequency of K and A allels were estimated 0.37 and 0.63, respectively. The statistical analyses showed positive and significant effects of the genotype for milk production and fat percent traits in first lactations but haven't significant effect for scs.

Keywords: DGAT1 gene, K232A polymorphism, RFLP-PCR, somatic cell score, Holstein Cattle.

بررسی پلی مورفیسم ژن TLR2 و ارتباط آن با نمره سلولهای سوماتیکی در گاوهای شیری استان خراسان رضوی

محمد جعفریان[۱]، محمد باقر منتظر تربتی[۲]،دکتر سریر[۲]، عاطفه عابدینی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه بیرجند ، ۲- - استادیار دانشگاه بیرجند۳-کارشناس ارشد دانشگاه بیرجند

***محمد جعفریان** jaefariyan88@yahoo.com

چکیده :

TLR2 ترکیب کلیدی از سیستم مقاومت طبیعی است که نقش مهمی را در پاسخ های التهابی به پاتوژنهای خارجی (باکتری ها ، قارچ ها و ویروسها) ایفا می کند . TLR2 عضوی از خانواده TLR هاست که توانایی منحصر به فردی در شناسایی پپتیدوگلیکان و لیپوتئیکوئیک اسید وسایر باکتری های گرم مثبت را دارد. اطلاعات بدست آمده نشان می دهد کهTLR2 ممکن است در پاسخ میزبان به عفونت های داخل پستانی نقش ایفا کند. در مجموع به نظر میرسد که TLR 2ژن کاندیدای جالبی برای حساسیت به ورم پستان باشد. در این تحقیق از ۱۱۰ راس گاو واقع در دو گاوداری در استان خراسان رضوی برای شناسایی چند شکلی در جایگاه ژنیTLR2 خونگیری شد. استخراج DNA از نمونه های خون با روش نمکی بهینه صورت گرفت،برای جدا سازی و تکثیر قطعات مورد نظر از روش PCR و جهت تعیین ژنوتیپ نمونه ها از روش SSCPاستفاده شد. مقایسه نتایج حاصل از این روش نشان دادند که کلیه نمونه ها در این تحقیق دارای ژنوتیپ یک شکل در جایگاه مورد مطالعه از ژن TLR2بودند.

واژگان کلیدی: سلول های سماتیکی،ورم پستان، SSCP ،پلی مورفیسم

مقدمه :

ورم پستان که با التهاب غده پستان همراه است، به علت عفونت باکتریایی در پستانداران ماده بوده که به عنوان یک مشکل زیان آور در دامداری ها محسوب وی شود، و از شایع ترین و گران ترین بیماری های موثر در گاو شیری در سراسر دنیا به حساب می آید. تغییرات در شمار سلول های سوماتیکی در شیر در درجه اول به شدت و مدت عفونت بستگی دارد. در نتیجه، گاو با ورم پستان بالینی به احتمال زیاد شمار سلول های سوماتیکی شیرشان بیشتر از تحت بالینی خواهد بود (الیور و همکاران،۱۹۸۹).

پیشگیری و درمان آنتی بیوتیکی گاوها به عنوان متداول ترین روش در بین گاوداران شناخته می شود. تحقیقات اخیر راگو و تابون (۲۰۰۰) از دانشگاه ویسکانسین نشان داد مقادیر باقیمانده آنتی بیوتیک در شیر در زمان درمان ورم پستان گاو شیری، می تواند باعث ایجاد نوعی پاسخ آلرژیک به شیر و فرآورده های لبنی حاوی آنتی بیوتیک ها در افراد مصرف کننده از این فرآورده ها و ترکیبات، ظهور انواع باکتری ها مقاوم در برابر آنتی بیوتیک در جوامع انسانی و دامی(که به نوبه خود ممکن است اثر آنتی بیوتیک های مشابه مورد استفاده در طب انسانی را کاهش داده و مقاومت آنتی بیوتیکی افزایش دهد) گردد. لذا براین اساس می توان گفت ابداع روش های نوین پیشگیری و درمان بیماری ورم پستان در این برهه از زمان (بلحاظ رشد روبه فزآینده جمعیت انسانی) تا چه اندازه درخور توجه و اهمیت می باشد.

بیماری ورم پستان بیشتر تحت تاثیر عوامل محیطی قرار دارد، اما تنوع ژنتیکی دام ها نیز در این بیماری موثر است. افزایش تعداد سلول های سوماتیک از نظر فنوتیپی از علایم سالم نبودن پستان است، اما از نظر ژنتیکی کم بودن تعداد سلول های سوماتیک دلیلی بر آن نیست که ضرورتاً فراوانی عفونت های پستانی نیز کاهش یابد (بوچر و همکاران، ۱۹۹۲). بیشتر مطالعات ارتباط ژنتیکی مثبت بین تعداد سلول

های سوماتیک و بیماری ورم پستان را به ما نشان می دهد.(امانوئلسون و همکاران، ۱۹۸۸). به همین دلیل برای کاهش دادن بیمادی ورم پستان باید انتخاب در جهت کاهش تعداد سلول های سوماتیک انجام شود (کوفی و همکاران، ۱۹۸۶). به همین دلیل بجای انتخاب مستقیم ورم پستان برای کاهش این بیماری، به طور غیر مستقیم و به وسیله انتخاب برای کاهش تعداد سلول های سوماتیک عمل می شود TLR2ترکیب کلیدی از سیستم مقاومت طبیعی است که نقش مهمی را در پاسخ های التهابی به پاتوژنهای خارجی (باکتری ها ، قارچ ها و ویروسها) ایفا می کند (استیون و همکاران 2008) TLR2عضوی از خانواده TLR هاست که که توانایی منحصر به فردی در شناسایی پپتیدوگلیکان و لیپوتئیکوئیک اسید وسایر باکتری های گرم مثبت را دارد(بانرمن وهمکاران 2004) TLR2گاوی می تواند بطور مناسبی سیگنالهای S.aureus,E.coliرا دریافت کند. ژن TLR2 طی عفونت ورم پستان ایجاد شده توسط s.aureus وstrep.uberis بیان می شود (goldamerوهمکاران۲۰۰۴). گزارش های پیشین پیشنهاد دادند کهTLR2 ممکن است در پاسخ میزبان به عفونت های داخل پستانی نقش ایفا کند. در مجموع به نظر میرسد که TLR 2ژن کاندیدای جالبی برای حساسیت به ورم پستان باشد.

مواد و روش‌ها:

در این تحقیق برای بررسی چند شکلی ژن TLR2 از راس گاو واقع در دو گاوداری در استان خراسان رضوی برای شناسایی چند شکلی در جایگاه ژنیTLR2 خونگیری شد. استخراج DNA از نمونه های خون با روش نمکی بهینه صورت گرفت و سپس جایگاه های مورد نظر در ژن TLR2 توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از آغازگر های اختصاصی (جدول ۱) انجام گرفت. حجم نهایی محصول به میزان ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. مراحل واکنش زنجیره ای پلیمراز به صورت واسرشته سازی اولیه، ۹۵ ℃ به مدت ۵ دقیقه ،۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی، ۹۴ ℃ به مدت۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط ۷۲ ℃ برای مدت ۵۰ ثانیه و دمای بسط نهاییس۷۲°C به مدت زمان ۱۰ دقیقه می باشد. در مرحله بعد محصولات پی سی ار مستقیما با روش اس اس سی پی تعیین ژنوتیپ شدند. جهت تک رشته ای کردن ۲ میکرولیتر از محصول پی سی ار از هر نمونه را با ۸ میکرولیتر بافر واسرشته سازی (بروموفنل ۰٫۱ به میزان ۱۰ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر از محلول *EDTA* ۰/۵ مولار، ۱۹۰ میکرولیتر گلیسرول و ۸۰۰ میکرولیتر فرمامید) مخلوط، در دمای ۹۴°C به مدت ۱۰ دقیقه تک رشته و بلافاصله بعد از آن به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ سرد شدند. محصولات پی سی ار تک رشته به مدت ۱۰ ساعت با ولتاژ ۱۲۰*V/cm* روی ژل اکریل آمید ۱۲٪ الکتروفروز و به وسیله نیترات نقره ۰/۲٪ رنگ آمیزی شدند.

نقطه ذوب(سانتیگراد)	توالی	آغازگر
57.0	5`-TTCAGGTCCCTTTATGTCTTG-3`	رفت
59.0	5`-GTGTGCAAATTAGTATCTCTCAG-3`	برگشت

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن TLR2

نتایج و بحث:

قطعه مربوط به اگزون مورد نظر توسط آغازگر طراحی شده تکثیر شد.در تمامی نمونه ها (۱۱۰ نمونه) تکثیر به خوبی انجام گرفت. صحت قطعه تکثیری با الکتروفروز محصولات PCR روی ژل آگارز 0.8 ٪ انجام گرفت (شکل ۱) .

جهت آنالیز چند شکلی در این جایگاه از تکنیک SSCPاستفاده شد. نتیجه آزمایش حاصل از این روش الگوی باندی یکسانی را در همه نمونه ها نشان دادند. حاصل این بررسی با استفاده از تکنیک SSCP در این جایگاه نیز وجود الگوهای باندی و ژنوتیپ یکسان در تمامی نمونه ها بود. ژن TLR2گاوی در انتهای پروکسیمالbta17 قرار گرفته است که ۲ اگزون دارد و۷۸۴اسید آمینه را کد می کند.

برای بررسی رابطه بین چند شکلی ژن TLR2و مقاومت به ورم پستان در تحقیق حاضر در جمعیت مرغ بومی ایستگاه اصلاح رنژاد مرغ بومی مازندران نشان داد که کل نمونه های آنالیز شده دارای آلل وحشی و ژنوتیپ مونومورف می باشند (شکل ۲). علت نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر شاید به دلیل شدت انتخاب به نفع این ژنوتیپ و یا کوچک بودن جامعه باشد. پیشنهاد می شود برای بدست آوردن نتایج دقیق تر از تعداد نمونه ها بیشتر و در حد امکان دارای رکورد در تحقیقات آینده استفاده شود.

منابع :

1-Bannerman, D.B., M.J. Paape, J.W. Lee, X. Zhao, J.C. Hope and P. Rainard, 2004. Escherichia coli and Staphylococcus aureus elicit different innate immune response following intra-mammary infection. Clin. Diag. Lab. Immun., 11: 463-472.

2-Boettcher. P. J., Van Doormaal. B. J. 1999. Tools for selection for functional traits in Canada Interbull, Bulletin 23:29-39.

3-Coffey. E. M., W. E. Vinson and R. E. Pearson. 1968. Potential of somatic cell concentration in milk as a sir selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. J. Dairy Sci. 69:2163.

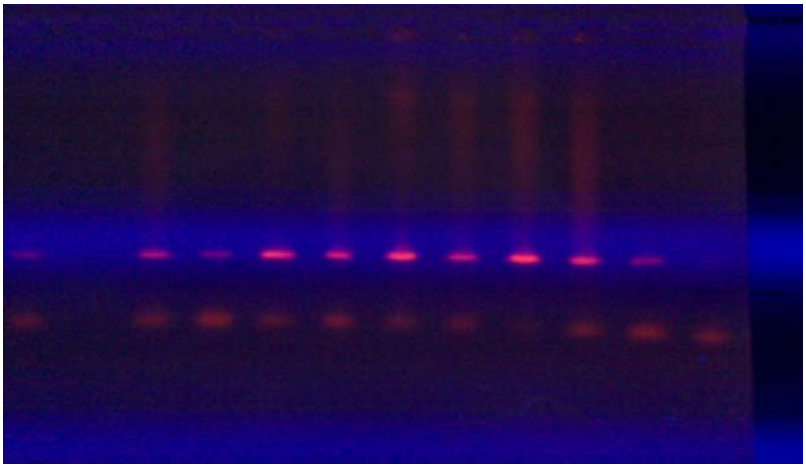
4-Emanualson. U., B. Danell and J. Phillipsson. 1988. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell count and milk production estimated by multiple trait restricted maximum likelihood. J. Dairy Sci. 71:467.

5-Goldammer, T., H. Zerbe, A. Molenaar, H.J. Schuberth, R.M. Brunner, S.R. Kata and H.M. Seyfert, 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of β-Defensin 5, Toll-Like-Receptor 2 (TLR2) and TLR4 but not TLR9 in cattle. Clin. Diag. Lab. Immunol., 11: 174-185

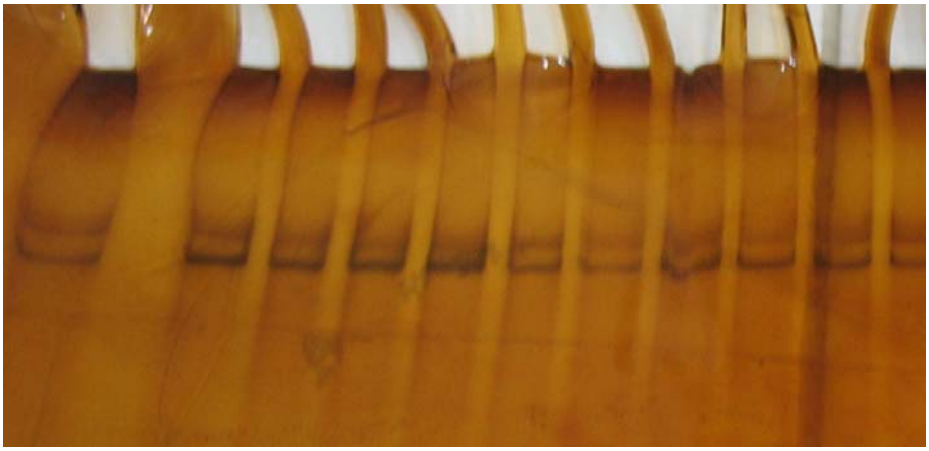
6-Oliver. S.P and Bushe. T. 1987. Growth inhibition of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae during involution of the bovine mammary gland: relation to secretion composition. Am. J. Vet. Res. 48: 1669-1973.

7-Stevens, V.L., A.W. Hsing, J.T. Talbot, S.L. Zheng and J. Sun et al., 2008. Genetic variation in the toll-like receptor gene cluster (TLR10-TLR1-TLR6) and prostate cancer risk. Int. J. Cancer, 123: 2644-2650.

شکل۱



شکل۲



TLR2 gene polymorphism and its relationship with scores Somatic cells in dairy cows in Khorasan Razavi

Mohammad Jafarian 1, Mohammad Bagher wait Torbati 2, emotion Abedini 3
Professor, University of Birjand -2 , a graduate student at the University of Birjand -1
MA, University of Birjand -3
Mohammad Jafarian jaefariyan88@yahoo.com *

Abstract:
Key combination of natural resistance that TLR2 plays an important role in the inflammatory response to foreign pathogens (bacteria, fungi and viruses) can play. Member of the TLR family, TLR2 is unique in that the ability to identify gram-positive bacteria is peptidoglycan and other Lypoprotein. The data indicate that TLR2 may play a role in host response to intramammary infections. Overall, it appears that the TLR 2 gene an interesting candidate for susceptibility to mastitis. In this study of 110 cows in the cattle located in Khorasan Razavi province to identify the polymorphism in TLR2 loci was blood.Comparing the results of this study showed that all samples in this study, genotype A in place of the TLR2 gene were studied.

Keywords : : mastitis; gene TLR2; polymorphism; number of somatic cell

بررسی چند شکلی ژن**IGF-I** با استفاده از **PCR-SSCP** در گوسفند ماکویی

عباس حاجی حسینلو[۱*]،نصرالله پیرانی[۲]،علی هاشمی[۳]،فرزانه فیلکوش مقدم[۴]،شجاع جعفری[۵]،رامین رضازاده[۴]

۱* دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام ارومیه ، ۲ دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه تبریز ، ۳ استادیار گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه ، دانشجویان کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام تبریز ، ۵ دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام ارومیه

email:abbas_hajihosseinlo@yahoo.com

چکیده

ژن IGF-I یافاکتور رشد شبه انسولین که بر روی کروموزوم شماره ۳ گوسفند قرار دارد،یکی از ژن های کاندیدا برای نرخ رشد و تولید گوشت بوده و در تزاید و تمایز سلول های غدد پستانی و پس روی این اندام حایز نقش مهمی میباشد. به منظور بررسی چند شکلی ژن IGF-Iاز تعداد۱۰۰ رأس گوسفند نر و ماده ماکویی ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند ماکویی در ماکو به طور تصادفی خونگیری شد. استخراج DNA و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۲۶۵ جفت بازی از اگزون۱ این ژن انجام گرفت. چند شکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) محصولات PCR تعیین شد. برای این جایگاه از ژن IGF-I دو آلل B,A به ترتیب با فراوانی های۰/۷۳ و ۰/۲۷بدست آمد. برای ژن IGF-I سه الگوی باندی(ژنوتیپ)I3، I2 و I1 با فراوانیهای ۰/۰۶، ۰/۴۲ و ۰/۵۲، به ترتیب ، بدست آمد. برای مشاهده قطعات حاصل، از ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید. آزمون کای-اسکوار برای توده مورد مطالعه نشان داد که جمعیت در تعادل هاردی-واینبرگ قراردارد (P>0/05).بر اساس این نتایج متوان گفت که تنوع ژنتیکی اگزون ۱ این ژن در گوسفند ماکیی نسبتا بالا بودهکه میتوان در برنامه های انتخاب و اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: IGF-I ، چند شکلی، PCR-SSCP ، گوسفند ماکویی.

PCR-SSCP Polymorphism of IGF-I Gene Makui Sheep

Abstract:

IGF-1 gene that has located on chromosome 3 in sheep is a marker for growth rate and meets production and has a important role in mammary glands cell differentiation and proliferation. For analysis of IGF-1 Gene Polymorphism in Makui Sheep، the blood were collected of one hundred male and female Makui Sheep that rearing in breeding center of shahre MakuTotal DNA extractions were made with a modified salting out method (Miller et al. 1998). and the polymorphism was detected by PCR-SSCP method at a 265 bp fragment for genotyping. Acrylamide gel and silver nitrate were used for the fragment observations. Two alleles of A and B with frequencies of 0.53 and 0.27 were detected. Genotype frequencies were 0.52, 0.42 and .06 for AA(I1) ،AB(I2) and BB(I3) ،respectively. The Hardy-Weinberg equilibrium not existed between the genotypes (P>0/05)....These results confirmed the potential userfulness of IGF-1 gene in marker-assisted selection prugrams for sheep breeding.

Key words:IGF-1،Polymorphism،PCR-SSCP،Makui Sheep

\

مقدمه

تشخیص چندشکلی های نوکلوتیدی در پروموتور مهم میباشد، زیرا جانشین شدن نوکلوتید در ناحیه ای همچون جایگاه باند شدن عامل رونویسی در ژنوم ممکن است مقدار بیان ژن را تغییر دهد. یکی از این نشانگرها ژن فاکتور رشد شبه انسولین(IGF-1) است که نقش فیزیولوژیکی مهمی را در رشد و تکامل پستانداران یاری میکند و غلظت این عامل در خون این موجودات ، در ارتباط با صفات رشد بوده و شاخص فیزیولوژی مفیدی برای انتخاب در تولید شیر دارد. فاکتورهای رشد انسولین مانند برای فعالیت‌های رشد ،توسعه،فعالیت های متابولیکی و میتوزنیکی پستانداران ضروری میباشد.با توجه به این که IGF-1 میانجی بسیاری از اثرات هورمون رشد میباشد فعالیت های بیولوژیکی اش توسط پروتین های پیوندی در بدن تعدیل میشود.پروتین پیوندی فاکتور رشد انسولین مانند(IGFBP) دارای میل ترکیبی بالا با فاکتورهای رشد انسولین مانند بوده و با اتصال به گیرنده های IGF-1 باعث کاهش فعالیت زیستی آن ها میشود(۶).IGF-1 (سوماتومدینC) یکی ازاعضا این خانواده میباشد،این خانواده شامل سه پپتید IGF-1، IGF-11،انسولین، گیرنده های هم جنس با آن ها و حداقل ۶ پروتین باند شونده به آن ها میباشد(۴). IGF-1 یک پپتید تک زنجیره با وزن مولکولی ۷۰۰۰ دالتون بوده و دارای ۷۰ اسید امینه است(۵). تولی اسید آمینای آن در گاو،انسان و خوک شبیه میباشد و با گوسفند در موقعیت اسید امینه ۶۶(به جای پرولین،آلانین دارد)تفاوت دارد. IGF-1با IGF-11در ۶۰ درصد توالی اسید آمینهای مشترک میباشند. IGF-1 بر روی رشد جنین،رشد پس از تولد،متابولیسم کربوهیدرات ها و پروتئین ها دخالت دارد(۱۰).این عامل افزایش دهنده جذب گلوکز در بافت های محیطی بوده که باعث تحریک ساخت گلیکوژن شده و واجد اثری شبیه انسولین میباشد که با افزایش جذب اسیدامینه،باعث ساخت پروتئین میشود.ژن IGF-1 دارای ۶ اگزون و ۵ انترون بوده و در ۷۳/۵ سانتی مورگانی کروموزوم ۵ گاو نقشه یابی شده است(اولین بار جی و همکاران(۱۹۹۷) با استفاده از تکنیک SSCPیک موتاسیون تک نوکلوتیدی در ژن IGF-1را گزارش نمودند. سپس جی و همکاران(۲۰۰۱) مشخص کردند که در ناحیه ′۵ این ژن و ۵۱۲ جفت قبل از اولین کدون اگزون اول(ATG) ،یک جایگزینی نوکلوتید TباC اتفاق افتاده است که ژنوتیپBBدر این جایگاه به طور مثبتی با اضافه وزن بدن در ۲۰ روز پس از شیرگیری ارتباط داشت . موقعیت کروموزومی ژن IGF-1 در حیوانات مختلف مانند گوسفند روی کروموزوم ۳ توسط(Imam.Cgaili1991)، در گاو روی کروموزوم شماره ۵ توسطWomack(1993 et al)، در خوک روی کروموزوم ۵ توسط(Piggenoue Database) ، در جوجه (Burtet al 1995)روی کروموزوم ۱، در انسان روی کروموزوم ۱۲ توسط(human Genoue Database1995)مشخص شده است. ژن فاکتور رشد شبه انسولین در گاو۷۳/۵ سانتی مورگان و در جوجه ۱۶۵/۹۵ سانتی مورگان است. و توالی نوکلوتیدی در انسان و خوک و بز و جوجه۷۰-۹۰ KB(Rotwine1991,Rose2002).تعداد اگزون در بین گونه ها متفاوت است برای مثال بز وگوسفند۶-۱ اگزون دارد و انسان و موش ۵-۱ اگزون دارند(Rotwine1987- Shimutsu,Rotwin 1986). یک قطعه bp۲۶۵ژن IGF-1گوسفند(bp۷۳۲-۴۶۷)در بالا دست انتهای′۵ اگزون ۱ الگوهای ۳تایی توسطYilmaz(et al,2005)پیدا شد که ۳ ژنوتیپ AA،AB،BBبود(۱). گزارشاتی در مورد ارتباط SNPدر انتهای ′۵ IGF-1 با صفات رشد در گوسفند بلوچی بود(۲) و انالیز از منطقه′۵ اگزون ۱ از ژن فاکتور رشد شبه انسولین ۱ گوسفند ۳ الگوی ژنوتیپی را نشان دادکه ارزیابی رابطه آن با وزن تولد –وزن از شیرگیری و متوسط افزلیش وزن از تولد تا شیرگیری (ADG)و از شیر گیری تا ۶ ماهگی و از ۶ ماهگی تا ۱ سالگی نشان داد که یک اثر مثبت از ژنوتیپ (ab)با وزن از شیر گیری و متوسط افزایش وزن تا شیرگیری دارد و ژنوتیپ (bb)وزن تولد بالا داشت وژنوتیپ(aa)نتیجه قابل قبولی برای وزن زنده در یک سالگی داشت و متوسط افزایش وزن بدن از تولد تا شیر گیری تحت تاثیر پلی مورفیسم مشخص شده در اگزون ۱ داشت(طهمورث پور و همکاران ۲۰۰۹).(۲)

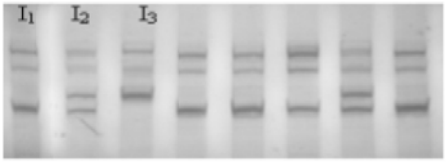
مواد و روشها

از ۱۰۰ راس گوسفندان نر و ماده ماکویی ایستگاه اصلاح نژاد ماکو به طور تصادفی خونگیری به عمل آمد.استخراج DNAبه روش نمکی (میلر۱۹۹۸)انجام گرفت. آغازگرهای زن فاکتور رشد شبه انسولین بر اساس توالی DNAدر اگزون شماره۱ ژن IGF-1به شماره

شناسایی(AY803775)طراحی شد.واکنش PCRجهت تکثیر قطعات مورد نظر در حجم ۲۰ میکرو لیتر با استفاده از آغازگر رفت :-'5 ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-3' (forward primer) اغازگر برگشت :-'5 (CACATCTGCTAATACACCTTACCCG-3' (reverseprimer انجام شد.غلظت نهایی مواد PCRعبارت بودند از :بافر 1X PCR،200میکرومولار dNTP، 1/5میکرو مولار MgCl2، 0/5پیکو مول از هر پرایمر،unit 1آنزیم تک پلیمراز و ۱۰۰ نانوگرم DNAجهت واکنش زنجیرهای پلیمراز برنامه حرارتی به صورت :مرحله اول،واسرشت ائلیه در ۹۵درجه سلسیوس به مدت ۳دقیقه،مرحله دوم شامل واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه،اتصال ۵۸ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و تکثیر در۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۴ دقیقه و تکرار در ۳۱ سیکل انجام گرفت.صحت قطعه به دست آمده از محصول PCR، 5میکرولیتر ازمحصولات را با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری(6X)مخلوط شد و به همراه نشانگر وزنی M100بر روی ژل آگارز۱/۵ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد تایید و ارزیابی قرلر گرفتند.جهت انجام SSCP،مقدار ۱۰-۷ میکرولیتر از محصولات با ۷ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد برای مشاهده ژنوتیپ ها از روش رنگ آمیزی نیترت نقره استفاده شد.الگوهای باندی ایجاد شده مورد شمارش قرار گرفتند و بر اساس قرار گرفتن الگوهای باندی ژنوتیپ حیوانات تعیین شد و سپس با استفاده از نرم ازار POP GENE32معیارهای مربوط به چند شکلی ژن IGF-1در این جمعیت مورد محاسبه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

به منظور تایید تکثیر قطعه مورد نظر محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل اگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند،مشاهده تنها یک باند ۲۶۵ جفت بازی نشان دهنده تکثیر درست قطعه انتخاب شده از اگزون شماره ۱ ژن فاکتور رشد شبه انسولین و صحت انجام PCR بود که با نتایج بدست امده از تحقیق طهمورث پور و همکاران مطابقت داشت.برای مشاهده قطعات حاصل از ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد که چند شکلی فضایی تک رشتهای (SSCP) محصولات PCRتعیین شد.برای ژن IGF-1سه الگوی باندی(ژنوتیپ)I3،I2،I1 با فراوانی های ۴۲/۰۶،۰/۰، ۰/۵۲ به ترتیب بدست آمد،شاخص هتروزیگوتی و تعداد الل موثر برای این جایگاه به ترتیب ۳۹درصد ، ۱/۶۵ بدست آمد.آزمون کای اسکوار نشان داد که جمعیت گوسفندان ماکویی در حالت تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارد (P>0/05).



سه الگوی باندی (ژنوتیپ) به دست آمده ژن **IGF-1** بر اساس روش **SSCP**

ژنوتیپ	AA	AB	BB
فراوانی ژنوتیپی(درصد)	٪ ۵۲	٪ ۴۲	٪۶
آلل	A	B	
فراوانی آللی	0/73	0/27	
$\chi^2=0/15^{ns}$	شاخص شانون = ۰/۵۸		تعداد الل موثر= 1/65

ژن IGF-1	هموزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مشاهده شده	هموزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی Nei	متوسط هتروزیگوتی
اگزون ۱	۰/۵۸	۰/۴۲	۰/۶۰۱۸	۰/۳۹۸۲	۰/۳۹۴۲	۰/۳۹۴۲

منابع:

1) A.yilmaz,M.E.Davis,andH.C.Hines.A PCR-SSCP Polymorphism Detected in the 5 Flanking Region of the ovine IGF1 Gene.Research and Reviews :Beef and Sheep, Special Circular 170-99
2) Mojtaba Tahmoorespur, Mehdi VafayeValeh, Mohammad Reza Nasiry, mousavi and Ansary. Association of the polymorphism in the 5 flanking region of the ovine IGF-1 gene With growth trait in the baluchisheep .South African Journal of Animal Science 2009.
3) -Yilmaz,A and M.E. Davis, 2005. Detection of two nucleotide substitutions and putative promoters in the 5' flanking region of the ovine IGF-I gene. J Appl Genet 46(3): 307-309.
4) Weber, M. S. 1998. The Role of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and IGF Binding Proteins in Mammary Gland Development, Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, State University.
5) Roite, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.L. and Butler, A. 2001. The Somatomed Hypothesis Endocr. Rev. 22: 53-74.
6) Duan C, & Xu Q. 2005. Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF action. General and Comparative Endocrinology, 142: 44-52.

بررسی مقدماتی چند شکلی مقاومت ژنتیکی به نماتود همونکوس کنتورتوس در گوسفند نژادهای مغانی، قزل و ماکویی

مونا حبشی زاده اصل، سید عباس رأفت، احمد نعمت الهی، غلامعلی مقدم، جلیل شجاع، نصراله پیرانی دانشگاه تبریز
مونا حبشی زاده اصل، دانشگاه تبریز mona_hza@yahoo.com

چکیده

انگل های داخلی گوسفندان (نماتودها) در سیستم های تولیدی بر پایه ی مرتع از نظر سلامت دام ها و اقتصاد دامداران بسیار مهم هستند، بنابراین انجام برنامه های اصلاح نژاد در مورد یافتن ژن (ژنهای) مقاوم به این نماتودها از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. هدف از این مطالعه یافتن ژن (ژنهای) مقاوم به نماتودها در سه نژاد گوسفند مغانی، قزل و ماکویی می باشد. ابتدا ۲۰رأس بره سنین ۴ الی ۶ ماه از هر کدام از نژادهای فوق انتخاب و سپس با خوراندن ۵۰۰۰ عدد لارو سن **L3** به آنان تحت چالش مصنوعی قرار می گیرند. سپس در روزهای ۲۸، ۳۵ و ۴۲ بعد از چالش دامها توزین شده و نمونه گیریهای مربوط به حجم سلول های خونی(**PCV**)، تعداد تخم انگل(**FEC**) و تست فماچا(**FAMACHA**) انجام می شود. در حین آزمایش، نمونه خون دام ها اخذ و دی ان ای استخراج شده برای تعیین ژنوتیپ به آزمایشگاه سایبرسدورف اتریش به خارج از کشور ارسال شد. با در اختیار داشتن ژنوتیپ و داده های فنوتیپی امکان یافتن ژن (ژنهای) مقاوم وجود خواهد داشت. نتایج اولیه حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین نژادها و افراد داخل نژاد از نظر مقاومت به همونکوس کنتوتوس است.

کلمات کلیدی: **گوسفند، نژاد، نماتود، ژنوتیپ، ژن مقاوم**

مقدمه

سالیانه هزینه های زیادی برای از بین بردن عفونت های انگلی معده و روده و درمان و مدیریت آنها در نشخوار کنندگان مصرف می شود. بنابراین پرورش حیوانات مقاوم به نماتودها کمک زیادی به مقابله با عفونت های نماتودی در سیستم های بر پایه ی مرتع می کند. از صفاتی که در این مورد حائز اهمیت است می توان به (FEC (fecal egg counts، PCV (packed cell volumes) و وزن بدن اشاره کرد. در این مطالعه هدف یافتن ژن مقاومت به *Haemonchus contortus* است. همانکوس کنترتوس نماتودی است که بیشتر در مناطق گرمسیر و معتدل و تحت شرایط مرطوب رایج است، خطرنا است و خون را می مکد و سبب آنمی و حتی مرگ نیز می شود. بنابراین با یافتن ژن مقاوم نسبت به این نماتود توسط برنامه های اصلاح نژادی می توان این ژن را در سایر گوسفندان نیز ترویج کرد.

بررسی منابع:

انگل ها چالش سلامتی بزرگی را در سیستم های تولیدی بر پایه ی مرتع بر جای می گذارند و سالیانه قیمت مقابله با عفونت های انگلی معده و روده در صنعت گوسفندداری انگلیس در حدود ۸۴ میلیون یورو گزارش شده است (Nieuwhof and Bishop, 2005). در آمریکا کشاورزان همواره کنترل انگل های داخلی را به عنوان اولین موضوع در برنامه های سلامت گوسفندان در نظر می گیرند (Umberger and Notter,1987). مطالعات زیادی در مورد تنوع ژنتیکی در مقاومت به عفونت های انگلی در داخل نژادهای گوسفندان ثبت شده است (Wooleston and Eady,1995). نژادهای مقاوم به نماتودها به عنوان یک هدف برای کنترل عفونت های نماتودی در گوسفندان مرتع می باشد (Bishop and Stear, 2001). مطالعات قبلی با استفاده از گوسفندان Blackface یک ناحیه ی ویژه در کروموزوم گوسفند سانان به نام های OAR3، 14و ۲۰ مشخص کرده اند (Davies et al., 2006) و دو ناحیه ی OAR3 و OAR20 دو عدد از کمترین QTL های معمول برای مقاومت به نماتودها در بسیاری از مطالات شناسایی شده اند (Buitkamp et al., 1999; Coltman et al., 2001; Charon et al., 2002; Crawford et al., 2006; Beraldi et al., 2007). ناحیه ای که در OAR14 است فقط در گوسفندان Blackface دیده شده است (Davies et al., 2006) همچنین QTL صفت FEC در OAR14 در گوسفندان شیری اسپانیا گزارش شده است (Gutierrez-Gil et al., 2009). ناحیه یOAR14 شامل فاکتور اینترفرون تنظیمی (IRF3) و گیرنده ی toll-like (TLR) مرتبط با ژن است (Davies et al., 2006). IRF3 در ناحیه ی QTLای قرار گرفته که صفات مربوط به سلامتی را در ۵ گونه تحت تأثیر قرار می دهد(انسان، موش، خوک، گاو و گوسفند) وبه عنوان یک ژن کاندید برای QTL در OAR14 هستند (Jann et al., 2009). بره های تولید شده در اندونزی از قوچ های BB(Barbados Backbelly) که از باربادوس وارد کشور اندونزی شده اند به طور معنی داری، دارای FEC کمتری نسبت به نرهای تولیدی توسط قوچ های VIW(Virgin Islands White) هستند (Romjali et al., 1997). قوچ های اخته حاصل از BB×VIW دارای FEC کمتری نسبت به Katuhin هستند (Vanimisetti et al., 2002).

مواد وروشها

ابتدا بایستی لاروها را آماده کنیم برای این منظور آنها را در محیط آزمایشگاه کشت می دهیم، بدین ترتیب لاروهای L3 را آماده می کنیم. در مرحله ی اول برای آزمایش مؤثر بودن اثر دارو FEC را در ۵ بره از هر نژاد تعیین می کنیم. برای ژنوتیپاژ بایستی DNA را با کیفیت عالی استخراج کنیم. سپس از هر نژاد مغانی، قزل و ماکویی ۲۰ رأس دام سه ماهه خریداری می کنیم. به بره ها شماره زده و داروی ضد انگل می خورانیم. FEC را در ۵ بره از هر نژاد جهت تعیین مؤثر بون داروها اندازه گیری می کنیم، ۲ رأس نیز دام دهنده (Donor) آماده می کنیم. (گوسفند دهنده: دامی که در آزمایشگاه بصورت مصنوعی آلوده به انگل همونکوس کنتورتوس شده است و دایما می توان از آن تخم انگل را گرفته و لارو ال-۳ پرورش داد.)

زمان شروع چالش مصنوعی بایستی هر بره حدودا ۴ الی ۶ ماهه باشد. ۵۰۰۰ لارو به هر بره می دهیم، دام ها را توزین می کنیم، از هر بره نمونه ی خون گرفته، DNA را با کیفیت عالی استخراج کرده و برای ژنوتیپاژ ارسال می کنیم. سپس نمونه گیری FEC،

PCV و FAMACHA را انجام می دهیم. ۲۸، ۳۵ و ۴۲ روز بعد از چالش نیز این کارها را تکرار می کنیم، با این تفاوت که در ۴۲ روز بعد از چالش ۶ رأس دام را برای اندازه گیری های بیشتر ذبح می کنیم.

نتایج

در حال حاضر این تحقیق در حال اجرا می باشد و گوسفند دهنده تهیه می شود. در صورت یافتن ژن مقاوم می توان توسط برنامه های اصلاح نژادی آن را در سایر گوسفندان نیز رواج داد. نتایج اولیه حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین نژادها و افراد داخل نژاد از نظر مقاومت به هموانکوس کنتوتوس است.

منابع

1. Matika, O., R. Pong-Wong, J.A. Woolliams, S.C. Bishop. 2010. Confirmation of two quantitative trait loci regions for nematode resistance in commercial British terminal sire breeds. Journal of Animal, pp: 1-8.
2. Vanimisetti, H.B., S.P. Greiner, A.M. Zajac, D.R. Notter. 2004. Performance of hair sheep composite breeds: Resistance of lambs to Haemonchus contortus. Journal of Animal Science, pp: 595-604.
3. Notter, D.R., S.A. Andrew, A.M. Zajac. 2002. Responses of hair and wool sheep to a single fixed dose of infective larvae of Haemonchus contortus. Journal of Small Ruminant Research, pp: 221-225.
4. Gasbarre, L.C., J.E. Miller. 2000. Breeding for disease resistance in farm animals, 6:129-152.
5. Makkar, H.P.S., G.J. Viljoen. 2005. Applications of gene-based technologies for improving animal production and health in developing countries. Animal Production and Health Section, Joint FAC/LAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agricultre, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
6. Guimaraes, E.P., J. Ruane, B.D. Scherf, A. Sonnino, J.D. Dargie. 2007. Marker-Assisted selection. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Study of genetic resistance polymorphism to Haemonchus contortus nematod in Moghani, Ghezel and Makuii sheep breeds

Abstract

Sheep internal parasites (nematodes) in pasture-based production systems are very important from animal health and economical aspects, so conducting breeding programs in order to find the nematode resistance gene(s) are of significant importance. The aim of this study is to find nematode resistance gene(s) in three sheep breeds including: Ghezel, Moghani, and Makui. Initially 20 lambs of ages between 4 and 6 months were selected from each breeds and then fed with 5000 third-stage larvae causing them to be artificially challenged. Then 28, 35 and 42 days after they were being challenged, animals were weighted and PCV, FEC and FAMACHA sample were measured. During the experiment, blood samples were taken and extracted DNAs were sent to the Austria *Seibersdorf* laboratory to determine their genotypes. With genotype and phenotype data in hand determining resistance gene(s) to nematodes is possible in the studied sheep breeds. Preliminary results indicate genetic variation between and within breeds from the view point of resistance to *Haemonchus contortus*.

Keywords: Sheep, Breeds, Nematodes, Genotype, Resistance gen

همایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

تحلیل پیوستگی نشانگرهای مولکولی کروموزوم ۱ برای شناسایی نواحی ژنومی مؤثر بر رشد در گوسفند نژاد لری- بختیاری

رویا حریت [۱]، علی اسمعیلی‌زاده کشکوئیه [۲]، ابراهیم اسدی خشویی [۳]

[۱]- کارشناس ارشد دانشگاه شهر کرد ۲-استاد یار و عضو هیات علمی دانشگاه شهید باهنر کرمان استاد یار ۳-عضو هیات علمی دانشگاه شهرکر

نویسنده مسئول: رویا حریت، اصفهان خیابان میر مجتمع گاه تلفکس : ۰۳۱۱۶۶۴۲۶۳۳ پست الکترونیکی: horriat_61@yahoo.com

چکیده:

هدف اصلی این تحقیق، بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی کروموزوم ۱ با وزن تولد و سایر صفات رشد بعد از تولد در گوسفند نژاد لری- بختیاری بود. آنالیز نواحی ژنومی موثر بر صفات کمی (QTL) برای داده‌های یک جمعیت گوسفند نژاد لری- بختیاری با استفاده از تحلیل پیوستگی به روش مکان یابی درون فاصله ای مبتنی بر رگرسیون ساده انجام گردید. جمعیت مورد بررسی شامل ۱۶۲ حیوان مربوط به ۵ خانواده ناتنی پدری بود. داده‌های فنوتیپی شامل اندازه‌گیری‌های وزن تولد (BWT)، وزن یک‌ماهگی (W1)، وزن شیرگیری (WWT)، وزن شش‌ماهگی (W6)، دور سینه در شش‌ماهگی (GI6)، طول بدن در شش‌ماهگی (LG6)، ارتفاع جدوگاه در شش‌ماهگی (HT6)، وزن نه‌ماهگی (W9) و وزن دوازده‌ماهگی (W12) بودند. ۵ والد نر و نتاج آنها در یک ناحیه کاندیدا روی کروموزوم ۱ برای نشانگرهای ریزماهواره تعیین ژنوتیپ شدند. داده‌ها در دو مرحله، آنالیز هر خانواده به‌صورت انفرادی و آنالیز توام تمام خانواده ها به‌کمک یک مدل تک QTL مورد آنالیز قرار گرفتند. بر اساس آنالیزهای انفرادی خانواده ها، QTLهای مرتبط با صفت وزن یک ماهگی (در موقعیت ۲۱۰/۶cM)، که این QTL در نزدیکی پرایمر INRA011 در خانواده دوم شناسایی گردید. در خانواده‌ی سوم نیز QTLهای مرتبط با صفات وزن یک ماهگی و وزن شیرگیری به ترتیب (درموقعیت های ۲۵۲/۶cM و ۲۲۳/۶) در نزدیکی نشانگرهای LSCV105 و MCM137 شناسایی شدند. هم چنین در خانواده چهارم نیز یک QTL مؤثر روی صفت وزن یک ماهگی در موقعیت ۲۵۴/۶ در نزدیکی نشانگر LSCV105 شناسایی شد. با انجام آنالیز به صورت هم زمان بر روی تمام خانواده ها یک QTL مرتبط با صفات وزن یک‌ماهگی در موقعیت۲۵۴/۶ در نزدیکی نشانگرLSCV105 شناسایی شد. با توجه به آنکه ژن ترانسفرین وPIT1 بر روی کروموزوم ۱ قرار دارند. این کروموزوم یک کاندیدای قوی برای اثرات مشاهده شده‌ی QTL بر صفات رشد در این نژاد است.

واژگان کلیدی: گوسفند لری- بختیاری، خانواده‌ی ناتنی، نشانگرهای ریزماهواره، QTL، کروموزوم ۱.

مقدمه:

هدف اصلی در پرورش گوسفند و بز در ایران تولید گوشت قرمز می باشد همچنین به دلیل پائین بودن بازده تولید در کشور ما نسبت به کشورهای پیشرفته،اهمیت افزایش بازده تولید دو چندان است. عوامل بسیاری در تغییر تولید دام‌ها یا قضاوت روی بازده تولید آن ها مؤثر است آنچکه علاوه بر نسل جاری بر تولید در نسل های بعد هم تأثیر بگذارد مسأله ژنتیک و اصلاح نژاد می باشد. از میان نژادهای گوسفند بومی ایران گوسفند لری- بختیاری، سنگین وزن‌ترین آن ها می‌باشد.

در این نژاد، رشد به عنوان مهمترین صفت اقتصادی مطرح است و تاکنون وزن شیرگیری و وزن ۶ ماهگی به عنوان مهمترین معیارهای انتخاب در این نژاد به کار گرفته شده است (اسدی، ۱۳۷۸). اما فرآیند انتخاب اغلب در این نژاد فقط بر مبنای اطلاعات فنوتیپی و بدون داشتن تفاوت‌های ژنتیکی افراد در سطح DNA آن‌ها صورت گرفته است. هزینه زیاد یا مشکل بودن رکوردبرداری برای برخی از صفات اقتصادی، عامل محدودکننده در بهبود ژنتیکی آنها با استفاده از روشهای سنتی می‌باشد. تاکنون چندین مطالعه در زمینه‌ی شناسایی QTL در جمعیت گوسفندان نژادهای مختلف جهان صورت گرفته است. نشان داد که ژن ترانسفرین روی کروموزوم ۱ روی صفت رشد تأثیر گذار است(کمیک، ۱۹۹۹). با این وجود، در زمینه شناسایی QTL موثر بر رشد گوسفندان بومی ایران هیچ گزارشی در دسترس نیست. در صورت شناسایی جایگاه‌های ژنی مرتبط با صفات کمی (QTL)، می‌توان از روش‌های نوین انتخاب ژنتیکی بر مبنای تفاوت‌های افراد در سطح DNA آن‌ها استفاده نمود. لذا هدف اصلی این تحقیق، بررسی ارتباط نشانگرهای مولکولی (ریزماهواره) کروموزوم ۱ با وزن تولد و سایر صفات رشد بعد از تولد در گوسفند نژاد لری- بختیاری بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی مورد استفاده، یک طرح ناتنی پدری بود، لذا بدین منظور، تعداد پنج خانواده ناتنی پدری مجموعاً شامل ۱۶۲ حیوان از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد گوسفند لری- بختیاری واقع در ۱۵ کیلومتری شهرکرد انتخاب گردیدند.از تمامی پنج والد نر و نتاجشان از طریق رگ گردن و به‌وسیله‌ی لوله‌های خلاء حاوی EDTA خون‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌های خون بلافاصله روی یخ برده شده و به آزمایشگاه انتقال یافتند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از یک روش استخراج نمکی تغییریافته انجام گردید. بر اساس نقشه ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره‌ای گوسفند تعداد ۶ نشانگر ریزماهواره انتخاب گردیدند ریزماهواره‌های انتخاب شده با استفاده از یک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر یافتند. مراحل واسرشته‌سازی اولیه، واسرشته‌سازی، اتصال آغازگر به رشته‌ی الگو و بسط توسط پلیمراز و همچنین تعداد چرخه‌های به‌کاررفته در آزمایش که در یک دستگاه ترموسایکلر اپندورف و با برنامه‌ی Touch Down به‌انجام رسیدند.محصولات PCR روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶٪ واسرشته‌ساز،الکتروفورز شدند و باندها به‌وسیله‌ی رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، قابل مشاهده گشتند. سپس پنج والد نر برای تمام ۶ نشانگر تعیین ژنوتیپ شدند و در نهایت آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار آنلاین QTL express و با استفاده از روش نقشه‌یابی درون‌فاصله‌ای مبتنی بر رگرسیون ساده برای آنالیز QTL بر روی صفات استاندارد شده استفاده گردید (نات و همکاران، ۱۹۹۶).

نتایج و بحث

در حالتی‌که هر خانواده به‌صورت مجزا مورد آنالیز قرار گرفت، صفت وزن یک ماهگی (W1) در خانواده‌ی دوم درفاصله ۲۱۰/۶ سانتی‌مورگان در سطح (P<۰/۰۵) ، صفات وزن یک ماهگی (W1)، و وزن شیرگیری (WWT) در خانواده سوم به ترتیب در فواصل ۲۵۲/۶ و ۲۲۳/۶ سانتی‌مورگان در سطح (P<۰/۰۵) و در خانواده‌ی چهارم صفت وزن یک ماهگی (W1) در فاصله ۲۵۴/۶سانتی‌مورگان در سطح(P<۰/۰۱) معنی‌دار شدند .در مرحله‌ی آخر، یک آنالیز نهایی بر روی کلیه‌ی خانواده‌ها به‌منظور تخمین دقیق‌تر موقعیت QTL بر روی کروموزوم ۱ انجام گردید. نتایج حاکی از مکان یابی QTL برای صفت وزن یک ماهگی در فاصله ۲۵۴/۶ سانتی مورگان در سطح (P<۰/۰۵) بود.

منابع

۱.اسدی خشویی ا. ۱۳۷۸. برآورد پارامترهای ژنتیکی و محیطی صفات تولیدی و تعیین معیار انتخاب مناسب در گوسفند لری- بختیاری. رساله‌ی دکترای اصلاح نژاد دام، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۲.-اسماعیلی زاده کشکوییه ع. فولادی م.ح. محمدآبادی م.ر. ۱۳۸۶. تحلیل مولکولی صفت تردی گوشت گاو با استفاده از فن‌آوری DNA. پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، سالن اجلاس سران، تهران.

۳.Cockett, N. E., S. P. Jackson, G. D. Snowder, T. L. Shay, S. Berghmans, J. E. Beever, C. Carpenter. and M. Georges. 1996. Polar overdominance at the callipyge locus in sheep. Science, 273:236-238.

۴.Doerge, R. W., and G. A. Churchill. 1996. Permutation test for multiple loci affecting a quantitative character. Genetics, 142:285–294.

۵.Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright. and J. S. Mattick. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification، Nucleic Acids Res., 19(14):4008.

۶.Falconer, D. S., and T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative genetics. Ed. Longman، 4 Ed. Cap. 21.

جدول ۱- خلاصه‌ی نتایج آنالیز QTL در خانواده‌های دوم، سوم و چهارم **(به‌تفکیک) روی کروموزوم ۱**

صفت	موقعیت (cM)	فاصله‌ی اطمینان[a]	خانواده	اثرات (S.E.) QTL پدری	اثرات QTL[b]	Fآماره	نشانگر[c]	میانگین (S.E.)[d]
W1	۲۱۰/۶	-	۲	Kg(۱/۸۷) ۵/۴۸	۱۱/۲	*۸/۵۶	INRA011	۴/۸۷ (۵/۱۵)
W1	۲۵۲/۶	۲۱۱/۶-۲۸۵/۶	۳	Kg(۰/۷۷) ۲/۴۳	۱۴/۰	*۹/۷۹	LSCV105	۱۶/۸۱ (۲/۳۴)
WWT	۲۲۳/۶	-	۳	Kg(۲/۲۸) ۶/۷۱	۲۴/۰	*۸/۶۲	MCM137	۲۷/۱۵ (۵/۹۲)
W1	۲۵۴/۶	۲۱۴/۶-۲۷۴/۶	۴	Kg(۱/۱۲) ۴/۹۴	۲۵/۰	**۱۹/۲۷	LSCV105	۱۹/۲۷ (۳/۳۲)

جدول ۲- خلاصه‌ی نتایج آنالیز QTL روی کلیه‌ی خانواده‌ها

صفت	موقعیت (cM)	فاصله‌ی اطمینان[a]	خانواده	اثرات (S.E.) QTL پدری	اثرات QTL[b]	Fآماره	نشانگر[c]	میانگین (S.E.)[d]
W1	۲۵۴/۶	۲۰۰/۶-۲۶۳/۶	۱	۰/۹۷ (۱/۱۸) Kg	۵/۷۸	*۲/۹۹	LSCV105	۱۶/۷۷ (۲/۰۹)
W1	۲۵۴/۶	۲۰۰/۶-۲۶۳/۶	۲	۱/۱۷ (۱/۰۳) Kg	۶/۹۷	*۲/۹۹	LSCV105	۱۶/۷۷ (۲/۰۹)
W1	۲۵۴/۶	۲۰۰/۶-۲۶۳/۶	۳	۱/۱۷ (۱/۸۱) Kg	۶/۹۷	*۲/۹۹	LSCV105	۱۶/۷۷ (۲/۰۹)
W1	۲۵۴/۶	۲۰۰/۶-۲۶۳/۶	۴	۱/۲۳ (۴/۲۳) Kg	۷/۳۳	*۲/۹۹	LSCV105	۱۶/۷۷ (۲/۰۹)
W1	۲۵۴/۶	۲۰۰/۶-۲۶۳/۶	۵	۲/۵۸ (۱/۹۱) Kg	۱۵/۳	*۲/۹۹	LSCV105	۱۶/۷۷ (۲/۰۹)

[a] فاصله‌ی اطمینان ۹۵٪ برای موقعیت QTL بر اساس آزمون بوت استراپ بر حسب سانتی‌مورگان، [b] اثر QTL به‌صورت درصدی از میانگین صفت، [c] نزدیک‌ترین نشانگر به QTL، [d] میانگین تصحیح شده برای اثرات ثابت، * و ** به ترتیب اثر معنی دار QTL در سطح ۵ و ۱ درصد در سطح کروموزوم

Linkage analysis of molecular markers on ovine chromosome 1 to identify quantitative trait loci affecting growth in Lori-Bakhtiari sheep

Horriat R, Esmailizadeh K. Ali[2] and Asadi Khashoei Ebrahim[1, 3]

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahre Kord University, Shahre Kord, Iran[1]
[2]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
[3]Corresponding author: horriat_61@yahoo.com

Abstract
The main purpose of this study molecular marker chromosome 1 associated with birth weight and other characteristics of growth after birth in Lori - Bakhtiari sheep. Analysis of genomic regions affecting quantitative traits (QTL) for a sheep population data race Lori - Bakhtiari, using linkage analysis to site selection within the distance method based on simple regression analysis was performed. Population of 162 animals including about 5 families were paternal half. Phenotypic data, including measurements of birth weight (BWT), weight at one month of age (W1), weaning weight (WWT), weight at six months of age (W6), chest circumference (GI6), body length (LG6), withers height at six months of age (HT6), weight at nine months of age (W9) and yearling weight (W12). Five sires and their progeny in a candidate region on chromosome 1 microsatellite markers for genotyping were. Data in two phases, analysis of each individual family basis and combined analysis of all families using a single-QTL models were analyzed. Analysis based on individual families, QTL related to weight a month attribute (position 210/6 cM), the QTL near INRA011 primer in the second family was identified. The family of the third QTL related to weight and weaning weight a month, respectively (in all 252/6 cM and 223/6 cM) and nearby markers MCM137 LSCV105 were identified. The fourth family, a QTL affecting the weight of an attribute months in position 254/6 was detected near marker LSCV105. With analysis simultaneously on all families, a QTL associated with weight 1 month position 254/6 was detected near marker LSCV105. Due to the transferrin gene on chromosome 1 and PIT1 are strong candidate for the observed effects of QTL on growth related traits in Lori- Bakhtiari sheep.

Keywords: Sheep Lori - Bakhtiari family half, microsatellite markers, QTL, chromosome 1.

دست‌ورزی ژنتیکی و تولید حیانات تراریخت

آرش داودی[1*]، رامین صیقلانی[2]، علیرضا ترنگ[3]، نفیسه حیسن‌زاده[4]، مصطفی لطفی فرخد[5]، فریده طهمورسی[6]

۱، ۲ و ۵- کارشناس ارشد رشته ژنتیک واصلاح دام پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور (رشت)، ۳- مدیریت پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور(رشت)، ۴- دانش آموخته کارشناس ارشد رشته ژنتیک واصلاح دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین-خوزستان، ۶- کارشناس رشته زیست‌شناسی پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور (رشت)

*نویسنده مسئول: آرش داودی، پست الکترونیکی: arash1983@gmail.com

خلاصه:

تولید حیوانات ترانسژنیک یکی از اهدافی است که در سال‌های اخیر پیشرفت‌های قابل‌توجهی پیدا نموده است. بوسیله این سیستم می‌توان تنظیم و عملکرد ژنها را بررسی نمود، همچنین امید آن می رود که در بدن حیوانات مختلف اندام هایی را تولید نماییم که امکان انتقال آنها به انسان وجود داشته و همچنین تولید موجوداتی که بتوانند به شرایط سخت محیطی مقاوم (organ replacement) باشد. تراریخت؛ موجودی است که در آن هر سلول اطلاعات ژنتیکی جدیدی را حمل می نماید یا دارای یکسری اطلاعات ژنتیکی جدید باشد. البته این واژه محدود به ژن خارجی می باشد. امروزه دانشمندان، بسیاری از حیوانات تغییر یافته را که دارای جهش هایی همچون جهش های نقطه ای بوده و توسط Gene targeting حاصل شده اند را به عنوان تراریخت قلمداد می نمایند. حیوانات تراریخت دارای زاده های تراریخت میباشند. از موجودات تراریخت جهت مطالعه تنظیم عمل ژن و تولید پروتئین های نوترکیب استفاده می‌شود. بیشتر این موجودات پستاندارند زیرا آنها بر عکس باکتری ها، گیاهان و مخمرها دارای تغییرات پس از ترجمه می باشند. در روش انتقال فیزیکیDNA برهنه توسط یک نیروی فیزیکی، به داخل فرستاده میشود و از این نوع روشها میتوان ریزتزریقی ،بمباران ذرات ،اولتراسوند و الکتروپوراسیون را نام برد. چندین روش انتقال شیمیایی نیز برای دست‌ورزی حیوانات وجود دارد، که اصول همگی آنها یکسان است. و انتقال DNA با استفاده از این روش توسط رسوب DNA/ فسفات کلسیم انجام می‌شود.

کلمات کلیدی: دست‌ورزی ژنتیکی؛ حیوانات تراریخت؛ تولیدات حیوانی؛ ژن خارجی

حیوانات تراریخته را از لحاظ کاربردی می‌توان به ۵ گروه تقسیم کرد:

۱-**مدل‌های بیماری**: حیوانات تراریخته می‌توانند به عنوان مدلی برای شناسایی و تحقیق درباره بیمارهای مختلف به کار گرفته شوند همانند موش‌های تراریخت که قبلاً به ADIS، آلزایمر، انواع سرطان‌ها و پارکینسون‌اند.

۲-**انتقال دهنده دارویی**: همچنین حیوان تراریخته می تواند مدلی باشد که پروتئین‌های حاصل از ژن یا ژن‌های منتقل شده به آن‌ها در محصولات از قبیل شیر، گوشت و تخم مرغ وارد شده و به عنوان انتقال دهنده دارو عمل نماید بعنوان مثال گاو ترانسژنیک حاصل ژن لاکتوفرین انسان که یک پروتئین آهن و ضروری برای رشد نوزادان است می‌تواند با تولید شیر نزدیک به شیر انسان نیازهای نوزادان

انسان را تا حد زیادی برآورده کند یا بزهای ترانسژنیک می‌توانند در هر لیتر شیر بیش از چهار گرم آنتی بادی مونو کلونال تولید کنند (کاروافور و وندبروک، ۲۰۱۱). انتقال ژن به سلول‌های بدن بایستی به کمک برخی وکتورها مانند ۱-وکتورهای ویروسی، رتروویروس (DNA خودش را به طور مستقیم با کروموزم میزبان ترکیب می‌کند)، ادنوویروس و هرپس ویروس ۲- DNA برهنه (DNA خطی یا پلاسمید) انجام شود. ژن درمانی جایگزینی ژن در ژنوم انسان است. از بیماری‌های ژن درمانی شده می‌توان هموفیلی نوع A شناسایی ADA (آنزیمی در مسیر تجزیه نوکلئوتید) و درمان نقص ژنتیکی نهفته به نام SCIDS را عنوان نمود.

۳- **پیونددهنده خارجی**: xeno به معنی بیگانه می‌باشد و xenotrnasplants شامل پیوند ارگان (غیر انسانی) به انسان می‌باشد. علت این کار به خاطر وجود یک نقص مهم در ارگان‌های انسان می‌باشد. خوک به دلیل ویژگی‌هایی همچون ۱- اندازه مناسب ارگان‌هایش ۲- ارزان بودن برای افزایش کار ۳- داشتن نوزادان بزرگ ۴- سن بلوغ پایین و ۵- تعداد کم بیماری مشترک با انسان (در مقایسه با نخستینها) می‌تواند ارگان‌های مختلفی را بسازد. مشکل این کاربه این جهت است که پیوندها به طور تهاجمی از طریق سیستم ایمنی پس زده می‌شوند. راه حل این مسئله ایجاد ارگان‌های خوکی (که کمترخوک مانند باشد)، به وسیله حذف نشانگرهای سطحی سلولی است که از طریق سیستم ایمنی انسانی به عنوان بیگانه شناخته می‌شوند. به طور مثال یک شرکت به نام PPL (آنها گوسفند Dolly را ایجاد کرد) یک خوک ممتاز را ایجاد کردند که فاقد آنزیم ۱و۲ گالاکتوسیس ترانسفراز بود. این آنزیم گروه‌های قندی را به پروتین های سطح سلول‌های خوک اضافه می‌کند. این گروه قندی (α۱و۳ گلاکتوز) ، آنتی ژنیک بسیار بالایی دارد و باعث پس زدن بافت خوک از یک گیرنده انسانی می‌شود.

۲- **منابع غذایی ترانس ژنیک**: این حیوانات با اضافه کردن یک ژن به ژن هورمون رشد در ژنوم ایجاد می‌شوند. این حیوانات سریعتر رشد می‌کنند و مقاومت بالاتری در برابر بیماری‌ها دارند (درلاین همکاران، ۱۹۹۷). دستکاری در ژن هورمون رشد تا کنون در پستانداران و ماهی صورت گرفته است.

۵-**مدل‌های بیولوژیکی تراریخته**: یک مدل بیولوژیکی حیوانی است که می‌توان از آن برای بروز و نحوه عملکرد ژن انتقال داده شده استفاده کرد. به عنوان مثال میتوان از میمون‌های ANDi، یا موش‌های دادرای ژن PDLTO یا $PIWIL^2$ (از عوامل بروز سرطان سینه) نام برد.

دست‌ورزی ژنتیکی حیوانات:

بین حیوانات و گیاهان دو تفاوت عمده وجود دارد؛ اولاً: حیوانات همچنان که رشد می نمایند در طی تکامل در مورد پتانسیل خود محدود می‌شوند به‌عبارت بهتر سلول‌های حیوانی تمایز یافته قادر به تمایز مجدد نیستند و خصوصیات اجدادی خود را بیابند. ثانیاً در مورد حیوانات باید گفت که سلول‌های سوماتیک و زایشی در مرحله اول تکامل از همدیگر جدا می شوند. حال با وجود این دو تفاوت به بررسی روش-های تولید حیوانات تراریخت می‌پردازیم:

روش‌های انتقال ژن و تولید موجودات تراریخت

ریز تزریقی Pronuclear

یکی از تکنیک‌ها جهت تولید حیوان تراریخت روش ریز تزریقی می باشد، بدین صورت که ابتدا DNA به پیش هسته جنس نر تزریق شده، و بلافاصله پس از تزریق هسته اسپرم پوشش خود را از دست می دهد. در این مرحله یک مقدار کمی DNA از طریق یک سوزن باریک تزریق می گردد در طول این مرحله تخم در جای خود توسط یک پیپت مکنده ثابت نگه داشته می شود. پس از تزریق جنین در شرایط درون لوله آزمایش تا مرحله ۸ و ۱۶ سلولی باقی می ماند و سپس به گیرنده مورد نظر تزریق می گردد. این تکنیک در ظاهر روشی ساده می‌باشد اما در عمل نیاز به ابزار و مهارت بالا دارد روش کار بدین صورت است که، در ابتدای کار یک سوزن باریک را از حدود یک نانولیتر از محلول DNA که شامل حدود دویست تا سیصد DNA می باشد پر می‌نماییم سپس در زیر میکروسکوپ سوزن را وارد زیگوت می‌نماییم. لازم است که ژن را در یک جایگاه مشخص وارد شود ولی این کار با این روش ریزتزریقی مقدور نمی‌باشد حتی با بهترین طراحی جهت ترانسژن هدفمند جایگیری باز دارای بی‌نظمی می باشد، تنها راه برای بالا بردن بهره‌وری این روش استفاده از نوترکیبی همولوگوس می‌باشد، که توسط تزریق همزمان آنزیم‌های ریکامبیناز همراه با ترانسژن می‌باشد ولی این تکنیک نیز مانند بسیاری از روش‌ها همچنان در مراحل ابتدایی خود قرار دارد. جایگیری نامنظم همچنین موجب این نگرانی می‌شود که ممکن است یک ژن توسط این ترانسژن آسیب ببیند و درجه خطر برای هر جایگیری بستگی به توالی های کنترلی یا کد کننده در درون ژنوم انسان دارد. این راه روشی قابل انجام با کارایی بین ۵ تا ۵۰ درصد می‌باشد بعضی اوقات این اتفاق صورت می‌گیرد که حذف و نوترتیبی ژنومی در مقیاس بالا در مکان دخول ژن صورت می‌گیرد و در بعضی موارد لوکوس بطور کامل هیپرمتیله و خاموش می‌گردد (کاروافور و وندبروک، ۲۰۱۱).

انتقال توسط رتروویروسهای نوترکیب

ترانسداکشن رتروویروسی سبب تولید یک کپی از ترانسژن بدون گسستگی مهمی در DNA ژنومی اطراف آن می‌گردد. این تکنیک دارای چندین محدودیت اساسی می باشد که از مزیت آن می‌کاهد یکی از این محدودیت‌ها ظرفیت پایین این نوع وکتور می‌باشد و ترانسژن های بزرگ این توانایی را ندارند که وارد آن گردند تمایل عناصر تنظیمی ویروس برای تداخل با بیان ژن‌های اندوژنوس احاطه کننده آن و همچنین تمایل پرووِیروس‌ها برای داخل شدن در درون ژنوم سبب متیله شدن و خاموشی ژن‌های احاطه کننده می‌گردد. جنین حاصل در اکثر موارد موزائیک می‌باشد تا این که بخواهد تراریخت باشد و ما نیاز با ان داریم که حتما نسل دوم را نیز بررسی نماییم امروزه به خاطر مزیت دیگر روش‌ها ما کمتر از این روش استفاده می‌نماییم (پارک و همکاران، ۲۰۰۷، لی وهمکاران، ۲۰۰۸).

انتقال به سلولهای بنیادی جنینی

این سلول‌ها از بخش داخلی جنین موش در حال رشد در دیواره رحمی حاصل می‌گردد این سلول‌ها دارای ۴ مزیت می‌باشند که آنها را برای این منظور مناسب گردانیده است: اول: آنها سلول‌های pluripotent می‌باشند که تمام سلول‌های یک جنین در حال تکامل را

تولید می‌نمایند. دوم: این سلول‌ها توانایی کشت در شرایط درون شیشه یعنی شرایطی که در آن تعدادی از سلول‌ها می میرند را دارا می‌باشند و با تمام روش‌های استاندارد می‌توان انها را انتقال داد. سوم: انها به طور غیر معمول دارای توانایی نوترکیبی همولوگوس را دارا می باشند

بدین معنا که می‌توان از آنها برای هدفمند کردن ژن استفاده نمود. چهارم: آنها این توانایی را دارند که به میزان نامحدود در یک حالت غیر تمایز یافته باقی بمانند و سلول‌های بنیادی جنینی را که از قبل حاصل شده‌اند را می توان به جنین موش دیگر تزریق نمود این سلول‌ها این توانایی را دارند که به تمام دیگر بافت‌ها تبدیل گردند (کاروافور و وندبروک، ۲۰۱۱).

روشهای دیگر برای پستانداران و پرندگان تراریخت

تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (Intra cytoplasmic sperm injection)

این روش شامل تزریق سرهای اسپرم به درون سیتوپلاسم تخم (ICSI) می باشد. این تکنیک برای انتقال ژن تنظیم گردیده است بدین صورت که DNA پلاسمیدی لخت در شرایط آزمایشگاهی به طور خودبخودی به اسپرم باند گردید. بدنبال تزریق اسپرم در تخم لقاح نیافته حدود ۹۵ درصد از جنین بالغ یا پروتئین فلورسانت سبز را نمایش می دهند. Brackett و همکاران برای نخستین بار نشان دادند که اسپرم دارای یک خصوصیت ذاتی است که می تواند به DNA خارجی تماس پیدا نمایند. این تکنیک پیشرفت سریعی در مدت زمان کوتاه نمود زیرا که انتقال با واسطه اسپرم سریع و ارزان است. در سالهای اخیر مقالات زیادی در زمینه استفاده از اسپرم ماهی ،طیور و حیوانات اهلی به عنوان وکتور جهت انتقال ژن به حیوانات ارائه گردیده است. این روش برای تولید قورباغه های تراریخت بسیار کارا بوده است بیش از ۸۰ در صد از زاده ها ترانسژنیک بوده اند، در حالیکه برای تولید گاو و گوسفند تراریخت این تکنیک دارای محدودیت می باشد پس باید گفت که انتقال توسط اسپرم به طور گسترده برای تولید حیوانات تراریخت موفق نمی باشد. مکانیسم وارد شدن DNA خارجی در طول انتقال ژن به واسطه اسپرم به خوبی شناخته نشده است ، پیشنهاد شده است که مکانهایی از کروماتین که غنی از عناصر LINE باشند مکانهای مستعد برای وارد شدن DNA خارجی می‌باشند (جان ، ۱۹۹۲).

روش Mithocondrial transgenics

تعدادی از بیماری‌های ژنتیکی توسط موتاسیون‌های میتوکندریایی صورت می‌پذیرد و به منظور مدل سازی برای چنین بیماریهایی ما نیاز داریم تا DNA را در ژنوم میتوکندریایی حیوانات مناسب وارد نماییم این کار را نمی توان با استفاده از تکنیک‌های انتقال DNA استاندارد انجام داد و یک روش جدید باید به کار گرفته شود که در این روش هسته لاین سلولی دارای موتاسیون میتوکندریایی را خارج نموده وسپس با یک زیگوت موش گیرنده جایگزین می نمایند. موشهای ترانس میتوکندریایی حاصل دارای موتاسیون در هر سلول خود می‌باشند و موتاسیون را از طریق سلول‌های زاینده ماده انتقال می‌دهند از این رو میتوکندری در اسپرم تنها به مقدار کم در جنین توزیع می‌گردد .روش کار برای موش‌های ترانس میتوکندریال دارای ۵ مرحله می باشد ابتدا سل لاین می بایست تولید میتوکندری نماید که دارای ترانسژن یا موتاسیون میتوکندریال مناسب می‌باشد. جهت نیل به این مقصود راههای زیادی وجود دارد، اما یکی از راههای مهم اتصال بین سلولهایی که DNA میتوکندریایی آنها کاهش یافته است و سیناپتوزوم ها از موش بالغ می باشد که دارای چندین حذف DNA میتوکندریایی و دیگر موتاسیون ها هستند می باشد به این دسته از سلول‌ها سیبرید گفته می شود (هیبریدی که در آن سیتوپلاسم ترکیب می شود ولی هسته‌ها ترکیب نمی شوند) و سیتوپلاسم آنها هیبریدی از دو سل لاین می‌باشد مرحله بعدی حذف هسته از سلول‌های سیبرید می‌باشد، بنابراین آنها به عنوان دهنده میتوکندری عمل می‌نمایند بدون آنکه هیچ هسته اضافی را وارد تخم نمایند اصولاً این عمل را با سانتریفوژ در حضور

سیتوکالازین بتا انجام می‌دهند پس از شستشوی سیبریدهای فاقد هسته، زیگوت‌ها را ازماده‌های دهنده جمع آوری می‌نماییم و از یک دستگاه Micromanipulator (دستگاه دستورزی در حد میکرون) برای ایجاد شکاف استفاده می‌نماییم و پس از این شکاف سیبریدها را در فضای پری ویتلین قرار می‌دهیم. پس از یک دوره کوچک در محیط کشت، عبور را در بین سلول‌های موجود در محیط کشت تسریع کرده و این کار را با قرار دادن سلول‌ها در میان الکترودهای Fusion chamber انجام می‌گیرد و از یک پالس AC طولانی (۲۲۵ ولت به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه) جهت منظم نمودن و به صف در آوردن سیتوپلاست و اووسیت استفاده می‌گردد و پس از آن یک پالس DC مختصر استفاده می‌شود (۲۵۰۰ ولت به مدت ۲۰ میلی ثانیه) که این عمل در حدود یک ساعت بعد انجام می پذیرد، بعد از یک دوره کوتاه در محیط جنین به مادر منتقل می‌گردد، تا این دوره پایان یابد (وارنر، ۱۹۹۵).

قوانین ترانس ژنتیکی: هر دسته از حیوانات تراریخته ملاحظات اخلاقی خودش را دارد که سودمندیشان در اجتماع را در مقابل زیان‌ها برای حیوان یا محیط زیست می‌سنجیم. در مواردی مثل مدل‌های بیماری، انتقال دهنده‌های دارویی، پیوند دهنده‌های خارجی، سودهای پزشکی بسیاری دارند. تنظیمات قوی باید برای حداقل کردن آزاردگی حیوانات پی‌گیری شود. مثل استفاده از درد نشان‌ها و مرگ حیوان در تومورهای پیشرفته. اگرچه آسایش بعضی حیوانات که در مواردی مثل پیونددهنده خارجی برای بدست آوردن ارگان‌های مورد نظر قربانی می‌شوند، گرفته می‌شود ولی تعدادشان محدود تر از میلیون‌ها حیوانیست که روزانه برای مصرف معمولی انسان قربانی می‌شوند. پستانداران برتر مثل خوک‌های برتر به طور جدی اثرات جانبی از احتیاجات مرگ آوری را با توجه به رشد سریعتر و کمبود غذایی نشان می‌دهند. ماهی‌های برتر مثل SALMON و Trout اثرات زیان آور قابل مشاهده‌ای نداشته‌اند و بزودی برای مصرف انسانی دیده می‌شوند. به دلیل نبود آگاهی بین دانشمندان و عموم مردم و به دلیل پیوند خوردن سودها و خطرات پژوهش‌های بیولوژیکی، توصیه می‌شود که تلاش برای کاهش این شکاف از طریق ایجاد یادگیری زیستی جذاب‌تر در سطوح متوسطه و لیسانس برای همه صورت گیرد. راه‌های مختلفی باید برای افزایش اطلاعات عمومی مردم از مفاهیم و خطرات و سودهای تئوریکی روشهای اصلاح ارگانیسم‌های زنده پیدا کرد. پژوهشگران باید نقش بسیار مهمی را در این بحث بین علم و جامعه در عین احترام برای اعتقادات مختلف و مخالف داشته باشند. یکی دیگر از مباحث مهم در قوانین تراریختی، شماره ثبت این حیوانات می‌باشد که می‌توانمفید باشد اما یک جنبه منفی هم می‌تواند داشته باشد که اگر هزینه خیلی بالایی داشته باشد باعث می‌شود اجرای پژوهش‌ها در آزمایشگاه‌های کوچکتر صورت گیرند (کاروافور و وندبروک، ۲۰۱۱).

نتیجه گیری:

تکنولوژی انتقال ژن توانایی موجود را بالا می‌برد یا خصوصیت کاملاً جدیدی را معرفی می‌کند. دو راه اصلی برای ساخت یک حیوان تراریخته وجود دارد یکی از طریق دستکاری هسته آماده لقاح در تخم‌های در مرحله لقاح یا از طریق دستکاری سلولهای بدنی رویان. این تکنیک‌ها اهمیت بسیار زیادی از جنبه‌های مختلف در علوم کشاورزی، زیست پزشکی، تنظیم ژن، بیولوژی پیشرفته و دیگر علوم مرتبط دارد. تکنیک تولید حیوانات تراریخت کمک بسیار بزرگی برای افزایش تولید حیوانات برای تولید مواد خوراکی با توجه به رشد روز

افزون مصرف کننده‌ها خواهد بود. ایجاد حیوانات تراریخته یک موضوع بحث انگیز است که نیاز به سیاست های قانونی برای کمک به حداقل کردن آزردگی حیوانات و حداکثر کردن سودمندی برای جامعه دارد.

منابع

1. Johnston, S.A., Tang, D.C. 1994. Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization. Methods Cell Biol. 43: 353–365.
2. Lee, L.Y., Gelvin, S.B., 2008. T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiol. 146 (2): 325–32.
3. Park, F. 2007. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis?. Physiol. Genomics 31 (2): 159–73.
4. Wagner, J., Thiele, F., Ganten, D. 1995. Transgenic animals as models for human disease. Clin. Exp. 17 (4): 593–605.
5. Jun, D., Gong, S. Z., Fletcher, G.L., Shears, M. A., King, M. J., Idler, D. R., Hew, C. L. 1992. Growth Enhancement in Transgenic Atlantic Salmon by the use of an "All Fish" Chimeric Growth Hormone Gene Construct. Bio/Technology 10: 176 - 181.
6. Devlin, R., Carlo, A., Timothy, Y., Yesaki, D. E., John C. B. 2001. Growth of domesticated transgenic fish. Nature 409: 781-782.
7. Gillespie, D. (2005) Pharming for Farmeceuticals. http://learn.genetics.utah.edu/archive/pharming/index.html
8. Crawford, N,.A, Vandebroek. Transgenic animals and society. 2011. An Interactive Qualifying Project Report of Worcestet polytechnic institute.48

Genetic Manipulation and Transgenic Animals Produced

Nafiseh Hosseinzadeh[4], Mostafa Lotfi Farokhad[5], Arash Davoudi[1*], Ramin Seighalani[2], Alireza Tarang[3], Farideh Tahmoressi[6]

*** Corresponding E-mail address: arash1983@gmail.com**

Abstract

In recent years, the transgenic animal's production is one of goals that have found substantial improvements. By this system can be studied regulated and genes function, also expected the produce in body various animal the various organs that can be possible to transfer human body, furthermore producing organisms (organ replacement) that are resistant to difficult environmental conditions. "Transgenic"; the organisms that each cell will carry the new genetic information or organisms with have new genetic information. Although, this word limited to the foreign gene. Nowadays, many researchers have been modified animals with mutations such as point mutations that have been achieved by "gene targeting" considered as transgenic. The transgenic animals born with transgenic parents. Transgenic organisms use of to study regulation of gene function and production of recombinant proteins. The most of these organisms are mammals. Because, mammals unlike the bacteria, yeasts and plants does have changes after translated. In physical transfer methods, naked DNA is transferred with physical force into cell. This type of methods such as microinjection, particle bombardment, ultrasound and electroporation. There are several chemicals methods for genetic manipulation of animals that same of all principles. The DNA transferring with this method performed by deposition of DNA/calcium phosphate.

Keywords: Genetic Manipulation; Transgenic Animals; animal's production; foreign

تغییرات بیان ژن CRH و سازگاری جوجه‌های گوشتی به تنش گرمایی

رقیه رحمانی فیروزی ، محمد حسین شهیر، محمد طاهر هرکی نژاد
دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی
مسئول مکاتبه : ro_rahmani@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر ROSS 308 به منظور بررسی اثرات عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش بر بیان ژن CRH[1] در ۳ گروه آزمایشی توزیع شدند: ۱) عادت‌دهی حرارتی[2](TC) برای ۲۴ ساعت در روز سوم تحت دمای 38 ± 1 °C و پرورش در **شرایط نرمال سالن.۲) ترکیبی از عادت‌دهی حرارتی در روز سوم و استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی (TCHS)[3] ۳) گروه کنترل پرورش در شرایط نرمال سالن. نمونه_های مغز جهت بررسی سطوح بیان ژن-های مورد نظر با استفاده از تکنیک Real-time PCR در ۴۲ روزگی جمع‌آوری شد. پرایمر های اختصاصی برای ژن CRH به عنوان ژن اصلی مورد مطالعه و نیز ژن های GAPDH و YWH به عنوان ژن های شاهد یا کنترل طراحی گردید. نتایج بررسی اختلاف معنی‌دار در میزان بیان ژن CRH در بین ۳ گروه تیمار را نشان داد. نتایج بررسی اختلاف معنی‌دار در سطوح بیان ژن CRH در بین ۳ گروه تیمار را نشان داد. . این نتایج نشان می دهد عادت_دهی حرارتی منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن CRH در جوجه-های گوشتی تحت شرایط استرس گرمایی(TCHS) نسبت به گروه کنترل شده است. درحالیکه گروه TCHS و TC تفاوت معنی‌داری نداشتند. عادت‌دهی حرارتی در روز سوم موجب شد تا جوجه‌های TCHS در بیان ژن CRH همانند گروه TC که در شرایط نرمال پرورش یافتند عمل کنند. نتایج این بررسی نشان داد که عادت‌دهی حرارتی می‌تواند جهت کاهش اثرات مخرب استرس گرمایی در جوجه‌های گوشتی بکار رود.**

کلمات کلیدی: **جوجه گوشتی ،عادت‌دهی حرارتی، تنش گرمایی، هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین، Real- Time PCR**

مقدمه

استرس گرمایی یکی از عواملی است که اثر منفی بر عملکرد طیور دارد و می‌تواند به عنوان یک مشکل جدی برای پرورش‌دهندگان طیور مورد توجه قرار گیرد. هورمون آزادکننده کورتیکوتروپین (CRH) نه تنها آزاد شدن هورمون از هیپوفیز، آدرنال را تنظیم می‌کند، نقش مهمی در بسیاری از تنظیمات فیزیولوژیکی دارد. بنابراین تغیرات سنتز و ترشح CRH برای تنظیم واکنش استرس با اهمیت هستند(wang and xu., 2008). سیگنال‌های محیطی در اوایل دوره پرورش می‌توانند مسیرهای داخل سلولی را فعال کنند و به طریق مکانیسم های اپی‌ژنتیک منجر به تغییراتی در بیان ژن در ژنوم شوند، بدین وسیله فنوتیپ بیان شده به وسیله ژنوتیپ وابسته به اثرات محیطی است و وقایع محیطی بر عمل ژنوم و فنوتیپ تاثیر می‌گذارند. (Klose and bird, 2007).. بنابراین ممکن است بتوان از اپی‌ژنتیک به

---

[1] corticotropin-releasing hormone
[2] Thermal conditioning
[3] Thermal conditioning with heat stress

عنوان ابزاری برای جلوگیری از اثرات مخرب محیط بر رفتارو فیزیولوژی طیور استفاده کرد. تا کنون تحقیقی جهت بررسی اثرات عادت-دهی حرارتی بر ژن CRH انجام نشده است. هدف از این مطالعه این بود تا اثرات عادت‌دهی حرارتی را بر بیان ژن‌های CRH در جوجه-های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر ROSS 308 در ۳ گروه آزمایشی (۳ تیمار و ۵ تکرار) با ۱۶ پرنده به ازای هر تکرار توزیع شدند: ۱) عادت دهی حرارتی برای ۲۴ ساعت در روز سوم تحت دمای $38 \pm 1\ ^{o}C$ ۲) ترکیبی از عادت‌دهی حرارتی در روز سوم و استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی(TCHS) ۳) گروه کنترل پرورش در شرایط نرمال سالن. نمونه برداری از تعداد۳۰ پرنده جهت جهت تهیه نمونه هیپوتالاموس انجام شد. نمونه ها تا زمان استخراج RNA در منهای۸۰ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. پرایمر های اختصاصی برای ژن TRH[1] به عنوان ژن اصلی مورد مطالعه و نیز ژن های GAPDH[2] و YWH[3] به عنوان ژن های شاهد یا کنترل طراحی گردید استخراج RNA کل توسط کیت CinnaPure RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تهیه cDNA از RNA کل توسط واکنش رونویسی معکوس[4] (RT- PCR) با استفاده از کیت 2-steps RT-PCR(Vivantis ، سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی بیان ژن از واکنش Real-time PCRاستفاده شد. ترکیبات واکنش به همراه غلظت آن شامل: SYBR Grean PCR Master Mix ۱۲/۵ میکرولیتر، ۰/۳ µM از هر کدام از پرایمرها بود، DNA الگو≤ 300 ng ، عاری از نوکلئاز رسانده شود برنامه زمانی و دمایی مورد استفاده در واکنش PCR شامل: تیمار اولیه ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و فعال سازی اولیه ۹۵درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود، و چرخه‌های حرارتی شامل ۹۵درجه سانتیگراد واسرشت سازی به مدت ۱۵ ثانیه،۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت گسترش قطعه مورد نظرانجام شد. جهت بررسی بیان ژن اندازه های Ct و نیز اندازه مطلق تعداد کپی هایِ DNA که با مقایسه با منحنی استاندارد رسم شده بدست آمد مقایسه نمونه های تیمار با گروه شاهد انجام شد. جهت نرمال کردن داده و نیز حذف اثر خطا احتمالی از ژن های شاهد[5] استفاده شد.

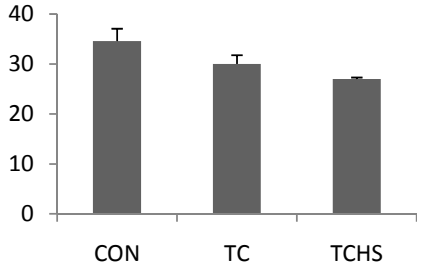
---

[1] Thyrotropin-releasing hormone
[2] Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
[3] Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
[4] Reverse transcription

[5] House keeping gene

نتایج و بحث

با توجه به نتایج حاصل از Real time PCR تفاوت معنی‌داری در بیان ژن CRH بین گروه TCHS و کنترل وجود داشت($P<0/05$). در مقایسه این دو تیمار گروه TCHS بیان بیشری نسبت به کنترل نشان داد. اما دو گروه TC و TCHS تفاوت معنی‌داری نداشتند، بررسی‌ها نشان داده است که CRH هورمون اصلی محور HPA است که در تنظیم دما نقش دارد و آزاد شدن ACTH کورتکس آدرنال را تحریک می‌کند، که منجر به افزایش کورتیکواسترون می شود، غلظت پلاسمایی کورتیکوسترون نیزدر عکس العمل به تنش حرارتی افزایش پیدا می‌کند (Debone et al., 2008). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که دمای محیطی ۱ ± ۳۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در ۳ روزگی موجب تحمل گرمایی در جوجه های گوشتی می‌شود. عادت‌دهی حرارتی در روز سوم موجب شده است تا استرس گرمایی اعمال شده از روز ۲۴ تا ۴۲ تاثیری بر بیان ژن CRH در مقایسه با گروه TC که در شرایط نرمال پرورش یافتند نداشته باشد به عبارت دیگر بیان ژن در دو گروهی که تحت استر س گرمایی اول دوره قرار گرفتند و در شرایط متفاوتی پرورش یافتند یکسان بود و این نشاندهنده سازگاری اپی‌ژنتیک ایجاد شده در گروه TCHS می‌باشد و بیان بیشتر ژن CRH در جوجه‌های TC نسبت به کنترل را می‌توان به گرمای اول دوره نسبت داد. بنابراین روش عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش می‌تواند جهت مقابله با تنش گرمایی راهکار مناسبی باشد.



شکل۱- مقایسه نمونه‌های تیمار و شاهد (± **انحراف استاندارد**) با مقدار C_t ($P<0/05$)

منابع

1. Debonne, M. Baarendse, P.J.J. Vandenbarnd, H. Kemp, B. Bruggeman, V. and Decuypere, E. 2008. Involvement of the hypothalamicpituitary-thyroid axis and its interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the ontogeny of avian thermoregulation: a review.World's Poultry Science Journal. Vol. 64

2. Klose, RJ., Bird, AP. 2007. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem. Sci. 31:89–97

3. Wang, J. W. and Xu, S. W. Effects of cold stress on the messenger ribonucleic acid levels of corticotrophin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in hypothalami of broilers .2008. Poultry Science 87: 973–978

Variations of CRH expression and thermal adaptation of broiler on heat stress

Mohammad Hosein Shahir, Taher Harkinezhad Roghayeh Rahmanifirozi,
University of Zanjan, Faculty of Agriculture, Department of animal science
Corresponding E-mail address: ro_rahmani@yahoo.com

Abstract
This study was aimed to assess effects of thermal manipulation in early growing period on CRH gene expression in broiler chicks under thermal challenge. Two hundred forty broiler chicks of ROSS 308 in three experimental groups namely: 1) Thermal conditioning(TC) for 24 h at the 3 days of age 2) combination of TC at the 3 days of age and subsequent heat stress (32 ºC ± 2) from 24 to 42 days of age (TCHS) and 3) the control. Samples of brain were taken to evaluate the level of gene expression by real-time PCR. Specific primers were designed for CHR as gene of interest and GAPDH and YWH as housekeeping reference gene. The rate of CRH gene expression was significantly different between three groups. Results showed that thermal adaptation lead to increase in CRH gene expression in chicks of TCHS group when compared to control group under thermal stress condition while no significant difference between TC and TCHS groups. Therefore, thermal adaptation in early growing period and consequently increase in CRH gene expression can be considered as one of the mechanisms involved in improvement of thermotolerance in broiler chickens under thermal challenges.
Key words: Broiler chickens ,thermal conditioning, corticotropin-releasing hormone, Real- Time PCR

اثرات عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش بر بیان ژن TRH در جوجه‌های گوشتی تحت تنش حرارتی

رقیه رحمانی فیروزی ،محمد طاهر هرکی نژاد، محمد حسین شهیر و مرادپاشا اسکندری نسب
دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی
مسئول مکاتبه : ro_rahmani@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر ROSS 308 به منظور بررسی اثرات عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش بـر بیان ژن TRH[1] در ۳ گروه آزمایشی توزیع شدند: ۱) عادت‌دهی حرارتی[2](TC) برای ۲۴ ساعت در روز سوم تحت دمای ۱ ± ۳۸ ºC ۲) ترکیبی از عادت‌دهی حرارتی در روز سوم و استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی[3](TCHS) ۳) گروه کنترل پرورش در شرایط نرمال سالن. نمونه_های مغز جهت بررسی میزان بیان ژن مورد نظر با استفاده از تکنیک Real- Time PCR در ۴۲ روزگی جمع‌آوری ش‌د. . پرایمر های اختصاصی برای ژن TRH به عنوان ژن اصلی مورد مطالعه و نیز ژن های GAPDH و YWH به عنوان ژن های شاهد یا کنترل طراحی گردید. نتایج بررسی اختلاف معنی‌دار در میزان بیان ژن TRH در بین ۳ گروه تیمار را نشان داد. این نتایج نشان می دهد عادت_دهی حرارتی منجر به کاهش معنی‌دار بیان TRH در جوجه‌های گوشتی تحت شرایط استرس گرمایی(TCHS) نسبت به گروه کنترل شده است. بنابراین عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش و به تبع آن کاهش بیان TRH می تواند یکی از مکانیسم های بهبود تحمل گرمایی در جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی در طی دوره پرورش باشد.

کلمات کلیدی: جوجه های گوشتی، عادت‌دهی حرارتی، هورمون آزادکننده تیروتروپین، Real- Time PCR

مقدمه

بخش اعظم تولیدات طیور در دنیا به مناطق خشک و گرمسیری اختصاص دارد. یکی از مهمترین مشکلات صنعت طیور استرس گرمایی بوده که از یک طرف کاهش تولید و از طرف دیگر افزایش مرگ و میر گله را در پی خواهد داشت. از آنجایی که طیور، حیوانات خونگرمی هستند و فقط در یک ناحیه از دمای طبیعی نسبتا محدود می‌توانند به راحتی زندگی کنند، بنابراین دماهای بالا و پایین، استرس‌زا هستند و اثر منفی بر تولید و رفاه حیوان دارند از طرف دیگر هورمون‌ها نیز به تغیرات در دمای محیطی حساس هستند و به عنوان شاخص مهم پاسخ های فیزیولوژیکی پرنده به عوامل استرس زا می‌باشد. هورمون آزادکننده (TRH) نه تنها آزاد شدن هورمون از هیپوفیز، آدرنال و تیروئید را تنظیم می‌کنند، نقش مهمی در بسیاری از تنظیمات فیزیولوژیکی دارند. بنابراین تغیرات سنتز و ترشح TRH برای تنظیم واکنش استرس با اهمیت هستند(wang and xu., 2008). تا کنون تحقیقی جهت بررسی اثرات عادت‌دهی حرارتی بر بیان ژنTRH انجام نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عادت‌دهی حرارتی بر بیان ژن TRH در جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی بود.

مواد و روش‌ها

---

[1] thyrotropin-releasing hormone
[2] Thermal conditioning
[3] Thermal conditioning with heat stress

تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر ROSS 308 در ۳ گروه آزمایشی (۳ تیمار و ۵ تکرار) با ۱۶ پرنده به ازای هر تکرار توزیع شدند: ۱) عادت دهی حرارتی برای ۲۴ ساعت در روز سوم تحت دمای $38 \pm 1\ ^{o}C$ ۲) ترکیبی از عادت‌دهی حرارتی در روز سوم و استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی(TCHS) ۳) گروه کنترل پرورش در شرایط نرمال سالن. نمونه برداری از تعداد۳۰ پرنده جهت جهت تهیه نمونه هیپوتالاموس انجام شد. نمونه ها تا زمان استخراج RNA در منهای۸۰ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. پرایمر های اختصاصی برای ژن TRH[1] به عنوان ژن اصلی مورد مطالعه و نیز ژن های GAPDH[2] و YWH[3] به عنوان ژن های شاهد یا کنترل طراحی گردید. استخراج RNA کل توسط کیت CinnaPure RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و نیز سنجش های لازم توسط نانودراپ انجام شد. تهیه cDNA از RNA کل توسط واکنش رونویسی معکوس (RT- PCR)[4] با استفاده از کیت Vivantis)2-steps RT-PCR ، سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی بیان ژن از واکنش Real Time PCR استفاده شد. ترکیبات واکنش به همراه غلظت آن شامل: Mix SYBR Grean PCR Master ۱۲/۵ میکرولیتر، ۰/۳ µM از هر کدام از پرایمرها و DNA الگو $\leq$ 300 ng بود که با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمانی و دمایی مورد استفاده در واکنش PCR شامل: تیمار اولیه ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و فعال سازی اولیه ۹۵درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود، و چرخه های حرارتی شامل ۹۵درجه سانتیگراد واسرشت سازی به مدت ۱۵ ثانیه،۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت گسترش قطعه مورد نظرانجام شد. جهت بررسی بیان ژن اندازه های Ct و نیز اندازه مطلق تعداد کپی هایِ cDNA که با مقایسه با منحنی استاندارد رسم شده بدست آمد مقایسه نمونه های تیمار با گروه شاهد انجام شد. جهت نرمال کردن داده و نیز حذف اثر خطا احتمالی از ژن های شاهد[5] استفاده شد.

نتایج و بحث

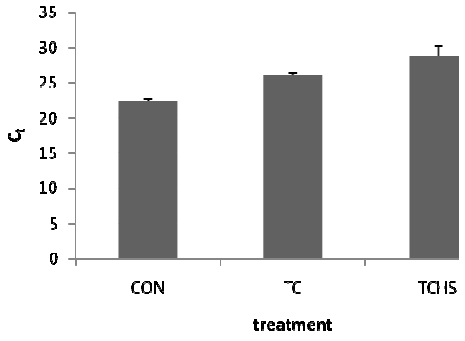
در این پژوهش بین گروه شاهد و دو گروه تیمار تفاوت معنی داری از نظر عملکرد و صفات لاشه مشاهده نشد. کاهش میزان رشد و کاهش خوراک مصرفی پرنده های در حال رشد در دمای محیطی بالاتر در بسیاری از مطالعات گزارش شده است .با توجه نتایج مطالعه جاضر می تواند چنین تلقی گردد که عادت دهی گرمایی اعمال شده موجب تحمل گرمایی در گروه عادت دهی شده حرارتی (پرورش در شرایط استرس گرمایی) شده است . علیرغم اینکه این جوجه ها در شرایط دمای بالا پرورش یافتند در مقایسه با تیمارهای دیگر کاهش معنی داری در میزان رشد وخوراک مصرفی نشان ندادند. نتایج حاصل از Real time PCR نمونه های اول دوره پرورش نشان داد بین

---

[1] Thyrotropin-releasing hormone
[2] Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
[3] Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
[4] Reverse transcription

[5] House keeping gene

تیمارهای که در سه روزگی متحمل استرس حرارتی شده بودند و گروه شاهد از لحاظ بیان ژن TRH تفاوت وجود دارد اگر چه این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار نبود. عدم وجود تفاوت زیاد بین بیان ژن TRH در جوجه‌های شاهد و تیمار در اول دوره ممکن است به این بعلت باشد که هنوز سیستم تنظیم حرارت در جوجه‌های در این سن کامل نشده است. اما در آخر دوره وضعیت بیان ژن کاملا متفاوت بود، بطوریکه تیمار TCHS به طور معنی‌داری($P<0/01$) بیان ژن TRH کمتری نسبت به گروه شاهد داشتند(شکل ۱). وجود تفاوت در بیان این ژن بین تیمارهای که متحمل استرس حرارتی شده بودند و گروه شاهد نشان دهنده این است که مواجهه با استرس حرارتی در اول دوره بر بیان این ژن در دوره های بعدی استرس گرمای موثر می باشد و این ژن نقش موثری را در تحمل استرس حرارتی در جوجه های گوشتی ایفا می کند. Takahashi و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که تزریق داخل مغزی TRH در جوجه‌های تازه متولد شده باعث القاء هیپرترمی و افزایش دمای بدن شده و مقدار تغییرات وابسته به دز تزریقی بوده است. البته با توجه به عدم تغییر غلظت هورمونها ی تیروئیدی بعد از تزریق TRH در این مرحله از رشد، تعدادی از محققین معتقدند که اثر تعدیل کنندگی TRH ممکن است از طریق CRH اعمال گردد(Tachian et al., 2006;Debonne et al., 2008).



شکل۱- مقایسه نمونه‌های تیمار و شاهد (**± انحراف استاندارد**) در مقدا رسیکل آستانه C_t ($P<0/01$)

نتایج این تحقیق نشان می دهد که دمای محیطی۱ ± ۳۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در ۳ روزگی موجب تحمل گرمایی در جوجه های گوشتی می شود و جوجه های که در این دوره دچار چالش حرارت بالا شده بودند در مواجهه با چالش حرارتی اواخر دوره پرورش بیان ژن TRH بالاتری نسبت به گروه شاهد نشان دادند. بنابراین بیان ژن TRH می تواند در شرایط تنش گرمایی دارای نقشی موثر بوده و کاهش بیان آن می‌تواند باعث کاهش میزان این هورمون شده و در نتیجه یکی از مکانیسم‌های مقابله با تنش گرمای‌باشد.

منابع

1. Debonne, M. Baarendse, P.J.J. Vandenbarnd, H. Kemp, B. Bruggeman, V. and Decuypere, E. 2008. Involvement of the hypothalamicpituitary-thyroid axis and its interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the ontogeny of avian thermoregulation: a review.World's Poultry Science Journal. Vol. 64

2.Takahashi, H., Iigo, M., Ando, K., Tachibana, T., Denbow, D.M. and Furuse, M. 2005. Regulation of body temperature by thyrotropin-releasing hormone in neonatal chicks. Developmental Brain Research 157: 58-64.

3. Tazawa, H., Moriya, K., Tamura, A., Komoro, T. and Akiyama, R. 2001. Ontogenic study of thermoregulation in birds. Journal of Thermal Biology. 26, 281-286.

4. Wang, J. W. and Xu, S. W. Effects of cold stress on the messenger ribonucleic acid levels of corticotrophin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in hypothalami of broilers .2008. Poultry Science 87: 973–978.

Effects of thermal adaptation in early growing period on TRH gene expression in broiler chicks under thermal challenge condition

Roghayeh Rahmanifirozi, Taher Harkinezhad , Mohammad Hosein Shahir , Moradpasha eskandarinasab
University of Zanjan, Faculty of Agriculture, Department of animal science
Corresponding E-mail address: ro_rahmani@yahoo.com

Abstract

This study was aimed to assess effects of thermal manipulation in early growing period on TRH gene expression in broiler chicks under thermal challenge. Two hundred forty broiler chicks of ROSS 308 in three experimental groups namely: 1) Thermal conditioning(TC) for 24 h at the 3 days of age 2) combination of TC at the 3 days of age and subsequent heat stress (32 ºC ± 2) from 24 to 42 days of age (TCHS) and 3) the control. Samples of brain were taken to evaluate the level of gene expression by real-time PCR. Specific primers were designed for THR as gene of interest and GAPDH and YWH as housekeeping reference gene. The rate of TRH gene expression was significantly different between three groups. Results showed that thermal adaptation lead to decrease in TRH gene expression in chicks of TCHS group when compared to control group under thermal stress condition. Therefore, thermal adaptation in early growing period and consequently decrease in TRH gene expression can be considered as one of the mechanisms for improvement of thermotolerance in broiler chickens under thermal challenges.

Key words: Broiler chickens ,thermall conditioning, thyrotropin-releasing hormone, Real- Time PCR

نشانگرهای مولکولی و آبزی‌پروری

سالار درافشان

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان،sdorafshan@cc.iut.ac.ir

چکیده

استفاده از نشانگرهای مولکولی در آبزی‌پروری رو به توسعه است و امروزه به فراخور نوع نیاز از نشانگرهای مختلفی استفاده می شود. در برخی موارد نظیر شناسایی گونه‌ها، استفاده از نشانگرهای مولکولی ارزان قیمت و ساده نظیر RAPD کافی است در حالی که برای برخی دیگر از کاربری‌ها نظیر انجام بهگزینی یاری شده با نشانگر یا آزمون انساب استفاده از نشانگرهای پیچیده و نسبتا گران‌قیمت نظیر ریزماهواره و AFLP توصیه می شود. در این نوشتار سعی می‌شود تا قابیلت نشانگرهای مختلف بر مبنای نیازهای کاربردی در صنعت آبزی‌پروری مورد اشاره قرار گیرد.

واژگان کلیدی: نشانگر مولکولی، ارزیابی ذخایر، آزمون انساب، آبزی‌پروری.

مقدمه

آبزی‌پروری، صنعتی جهانی با بیشترین نرخ رشد در بین تمامی فعالیت‌های مرتبط با کشاورزی است. تنوع آبزیان پرورشی به طرز چشمگیری از سایر موجودات پرورشی بیشتر است. تنها حدود ۱۰۰ گونه ماهی (به جزء سایر آبزیان نظیر ماهیان زینتی، سخت‌پوستان، نرمتنان و گیاهان آبزی) در مقیاس تجاری و به منظور تامین نیاز پروتئینی انسان در سراسر جهان پرورش داده می شوند. نشانگرهای آلوزایمی، ابتدایی‌ترین نوع نشانگر جهت ارزیابی ژنتیکی و شناسایی ذخایر آبزیان است. اما امروزه با دستیابی به نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، نوع و میزان کاربری آنها به طرز چشمگیری گسترش یافته به‌طوری که هم اکنون از این نشانگرها در زمینه‌های مختلف صنعت آبزی‌پروری از شناسایی گونه تا اجرای برنامه‌های بهگزینی مبتنی بر نشانگر استفاده می شود (جدول ۱). در این مقاله مهمترین کاربردهای نشانگرهای مولکولی در آبزی‌پروری مورد اشاره قرار می گیرد.

الف- شناسایی گونه، سویه و انواع آمیخته

به لحاظ وجود تفاوت بارز بین گونه‌های مختلف آبزیان، امکان شناسایی آنها با استفاده از انواع نشانگرهای مولکولی نظیر RFLP، RAPD، AFLP و ریزماهواره وجود دارد. در این بین نشانگر RAPD به نظر ارزانترین و ساده‌ترین روش شناسایی محسوب می شود. برای شناسایی افراد آمیخته یا دورگه نسل اول امکان استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP وجود دارد. در این حالت نیمرخ ژنتیکی باید حاوی باندهای بارز خاص هر یک از والدین باشد. در ایران شناسایی آمیخته‌های حاصل از تلاقی مصنوعی جنس ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* و جنس نر ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius*با استفاده از نشانگر

RAPD و ریزماهواره انجام شده است (درافشان، ۱۳۸۵). در خصوص شناسایی نژادها، ارزیابی تا حدودی مشکل است. به لحاظ اینکه معمولا نشانگر مولکولی خاص هر نژاد (سویه) معمولا طراحی نشده است و همچنین سویه‌های مختلف درون یک گونه از نظر ژنتیکی بسیار شبیه به هم هستند. با این وجود امکان شناسایی برخی نژادهای آبزیان
پرورشی نظیر کپور معمولی *Cyprinus carpio* و گربه‌ماهی کانالی *Ictalurus punctatus* با استفاده از نشانگرهای بسیار چندشکل ریزماهواره و AFLP فراهم شده است.

ب- ارزیابی ذخایر و تنوع ژنتیکی آبزیان

علی‌رغم سابقه طولانی صنعت آبزی‌پروری، ویژگی‌های ژنتیکی مولدین مورد استفاده در این صنعت تاکنون به خوبی مشخص نشده-اند. در بسیاری از مناطق جهان از جمله ایران، از ذخایر و نژادهای متعددی از یک گونه نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور توسعه آبزی‌پروری بهره برداری شده است. با این وجود ارتباط ژنتیکی بین انواع سویه‌ها همچنان نامشخص است. سوالات اساسی در این زمینه میزان تنوع ژنتیکی مولدین و تمایز ژنتیکی گله‌های پرورشی با انواع وحشی است. در این خصوص استفاده از نشانگرهای پرقدرتی نظیر ریزماهواره و به خصوص AFLP توصیه می شود.

ج- آزمون انساب و ارزیابی مشارکت تولیدمثلی

شاید پیچیده‌ترین سیستم‌های تولیدمثلی و جفت‌گیری در سلسله جانوری متعلق به ماهیان باشد. از این رو استفاده از روش‌های بسیار کارآمد به منظور تعیین نسب و میزان مشارکت تولیدمثلی در سیستم های مختلف تولیدی-پرورشی الزامی است. با توجه به ماهیت هم‌بارز و تنوع بالای نشانگر ریزماهواره، که تنوع بسیار مناسبی را حتی بین افراد درون یک گله پرورشی نشان می دهد، این نشانگر بهترین ابزار برای ارزیابی میزان مشارکت تولیدمثلی مولدین در ایجاد نسل آتی و تعیین نسب در آبزیان است. واضح است که با افزایش اندازه گله و تعداد آبزیان مورد بررسی، تعداد جایگاههای چند شکل ریزماهواره که باید مورد ارزیابی قرار گیرد نیز افزایش می یابد. در ایران مطالعاتی در زمینه آزمون انساب و میزان مشارکت تولیدمثلی در الگوهای مختلف آمیزش مصنوعی در گله مولدین ماهی آزاد دریای خزر و قزل‌آلای رنگین‌کمان اجرا شده است.

د- نشانگرهای مولکولی، جایگاههای صفت کمی (QTL) و بهگزینی یاری‌شده با نشانگر (MAS)

استفاده از فناوری‌های نوین نظیر نشانگرهای مولکولی به منظور بهبود روشهای بهگزینی صفات مهم اقتصادی نظیر رشد و مقاومت به بیماری در بسیاری از آبزیان در حال گسترش است. به این منظور استفاده از نشانگرهای مولکولی پلی‌مورف نظیر ریزماهواره، SNP و AFLP و نیز خانواده‌های مختلفی از یک گونه آبزی که نشانگر مورد استفاده در بین آنها تفرق یابد، الزامی

است. در این صورت امکان ایجاد نقشه پیوستگی (Linkage map) وجود داشته و با انجام مطالعات اصلاح‌نژادی امکان جایابی جایگاه‌های صفت کمی (QTL) بر روی نقشه پیوستگی وجود خواهد داشت. علی رغم مزایای این روش در شناسایی افراد (خانواده-های) با پتانسیل برایاجرای برنامه های اصلاح‌نژادی، ارزیابی پیوستگی ژنتیکی و نقشه‌یابی جایگاه‌های صفت کمی در آبزیان در مقایسه با بسیاری دیگر از دام‌ها نظیر گاو یا خوک یا گیاهان زارعی نظیر سویا در ابتدای راه قرار دارد. تاکنون برخی جایگاه‌های صفت کمی برای انواع خاصی از آبزیان شناسایی شده است که از آن جمله می توان به جایگاههای صفت کمی مقاومت به درجه حرارت بالا، زمان تخم‌ریزی و توسعه جنینی در قزل‌آلای رنگین‌کمان، مقاومت به استرس و پاسخ ایمنی در تیلاپیا و ضریب تبدیل غذایی در گربه‌ماهی کانالی اشاره کرد.

دورنمای نقش نشانگرهای مولکولی در آبزی‌پروری

استفاده از نشانگرهای مولکولی در صنعت آبزی‌پروری در سطح جهان رو به گسترش است. به نظر می رسد علاوه بر کاربردهای مورد اشاره، استفاده از نشانگرها در سایر زمینه‌های مرتبط یا آبزی‌پروری نظیر سیستماتیک مولکولی، ژنتیک جمعیت، بیولوژی تکاملی، اکولوژی مولکولی و همچنین پایش ایمنی غذاهای دریایی بر توسعه پایدار این صنعت تاثیرگذار باشد. در ایران استفاده از نشانگرهای مولکولی برای اجرای برنامه‌های بهگزینی یاری‌شده با نشانگر و نیز شناسایی سویه‌های مختلف گونه‌های مهم پرورشی از جمله مهمترین جنبه‌های کاربردی استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های آتی خواهد بود.

منابع

۱. درافشان، س. ۱۳۸۵. دستکاری های کروموزومی ماهی آزاد دریای خزر *Salmo trutta caspius* و قزل‌آلای رنگین‌کمان، *Oncorhynchus mykiss* برای پرورش نسل اول. رساله دکتری شیلات، گرایش تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۱۵۰ صفحه.

2. Liu, Z.J. Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238: 1 –37.

جدول ۱. نشانگرهای مولکولی توصیه شده بر مبنای هدف مطالعه.

هدف مطالعه	نشانگر توصیه شده	سایر نشانگرهای کارآمد
تشخیص گونه	RAPD	AFLP و ریزماهواره
تشخیص سویه (نژاد)	AFLP و ریزماهواره	RAPD
تشخیص آمیخته (دورگه)	RAPD	AFLP و ریزماهواره
آزمون نسب	ریزماهواره	-
تنوع ژنتیکی	AFLP و ریزماهواره	RAPD
نقشه‌یابی ژنتیکی	ریزماهواره و SNP	AFLP و RFLP

Molecular markers and aquaculture

Salar Dorafshan

Department of Natural Resources (Fisheries Division), Isfahan University of Technology, Isfahan, sdorafshan@cc.iut.ac.ir

Abstract:

Application of molecular markers in aquaculture are under development. Nowadays, different markers are used based on necesssities. Using RAPD marker as a cost effective and simple method is enough for sepices identification. While, for some other applications, like marker assitant secelction and paternity tests more expensive and complicated markers such as microsatellite and AFLP should be considered. In this article, the application of different markers based on aquaculture needs will be disscussed.

Keywords: Molecular markers, Stock assessment. Paternity test, Aquaculture.

همایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

بررسی تنوع ژنتیکی پنج مارکر میکروستلایت مرتبط با ژن FecB در گوسفند سنجابی

ربیع رهبر*[۱]، برومند چهارآیین[۲]، بیژن سلیمانی[۲]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، ۲-ایستگاه تحقیقات دامپروری مهرگان کرمانشاه
* نویسنده مسئول: ربیع رهبر، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
Email: rahbarrabie@gmail.com

چکیده

ریزماهواره‌ها به طور گسترده برای تعیین نقشه ژنی، برآورد فاصله ژنتیکی و ارزیابی دام‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی پنج مارکر میکروستلایت مرتبط با ژن FecB در گوسفند سنجابی بود. نمونه های خون بطور تصادفی از ۱۰۰ گوسفند سنجابی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل و جهت آنالیزهای بعدی در دمای $-4^{\circ}C$ ذخیره شد. DNA با استفاده از روش نمکی بهینه یافته استخراج شد و ۵ جایگاه میکروستلایت توسط جفت پرایمرهای اختصاصی و به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شدند. سپس محصولات PCR از طریق الکتروفورز روی ژل پلی آکریلامید ۸٪ تفکیک شدند. آنالیز آماری نشان داد که میکروستلایت OarHH55 بیشترین و نشانگر ریز ماهواره OarHH55 کمترین میزان PIC را دارد. تعداد آلل‌های موثر در دامنه‌ای بین ۳,۰۴۵۵ برای نشانگر OarHH55 و ۵,۶۳۳۸ برای نشانگر OarHH35 برآورد گردید. همچنین مشخص شد که این نشانگرهای ریزماهواره‌ای دارای میزان پلی‌مورفیسم و هتروزیگوسیتی بالایی می‌باشند که آنها را برای مطالعات برآورد ارزیابی‌های ژنتیکی مناسب می سازد.

واژگان کلیدی: میکروستلایت، واکنش زنجیره ای پلیمراز، الکتروفورز، گوسفند سنجابی

مقدمه

میکروستلایت‌ها را واحدهای تکراری ساده(SSR)[1] می‌نامند. ریزماهواره‌ها به طور گسترده برای تعیین نقشه ژنی، برآورد فاصله ژنتیکی و ارزیابی دام‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند (فرید و همکاران ۲۰۰۰). در سال‌های اخیر دانشمندان مختلف از میکروستلایت‌ها برای آنالیز ژنتیکی گاو، تعیین تنوع ژنتیکی و ارزیابی صفات اقتصادی در گوسفند و بز استفاده‌های زیادی کرده‌اند (گوان و همکاران ۲۰۰۷). آرورا و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که ژنوتیپ‌های مختلف میکروستلایت‌های OarHH64 وOarFCB128 اثرات متفاوتی را روی صفات تولیدی گوسفندان گنجام هندی نشان می‌دهند (آرورا و همکاران ۲۰۱۰). هدف از مطالعه حاضر، بررسی تنوع ژنتیکی پنج مارکر میکروستلایت مرتبط با ژن FecB در گوسفند سنجابی بود.

[1]Simple Sequence Repeat (SSR)

مواد و روش‌ها

نمونه های خون بطور تصادفی از ۱۰۰ گوسفند سنجابی جمع آوری شد. . نمونه های خون در ظرف حاوی یخ قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل یافت و تا زمان استخراج DNA در 4 درجه سانتی گراد نگهداری شد. استخراج DNA با روش نمکی بهینه یافته که توسط میلر و همکاران (1988) ارائه شده، انجام گرفت. برای انجام این پژوهش از ۵ مارکر میکروستلایت OarHH64، OarHH35، OarHH55، OarFCB128 و OarE101 استفاده گردید.

تکثیر قطعات مورد نظر

حجم مخلوط مورد استفاده در PCR ، 25 µL می‌باشد که شامل: 18.5 µL آب مقطر، 2 µL Buffer 10X PCR (25 mmol L^{-1})، 1.5 mm $MgCl_2$ (1 L^{-1})، 0.5 µL DNA، 1 µL dNTPs (2.5 mmol L^{-1})، Taq DNA polymerase 0.5 µL (5 u μL^{-1})، 0.8 µL (10 mmol L^{-1}) از هر یک از پرایمرهااستفاده شد. شرایط دمایی PCR برای تکثیر قطعه ژنی عبارت است از۹۴°C به مدت ۳ دقیقه جهت واسرشته شدن DNA الگو، ۳۲ سیکل شامل ۹۴°C برای واسرشته سازی اولیه به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمرها به DNA، ۶۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه برای سنتز DNA و همچنین جهت بسط نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

نتایج و بحث

در گوسفندان سنجابی مورد مطالعه در این تحقیق تمام قطعه ها با چند شکلی بالایی تکثیر شدند. در جمعیت مورد مطالعه ما توانستیم به طور کلی ۲۷ آلل را در ۵ میکروستلایت مشاهده کنیم. تعداد آلل‌های محاسبه شده در هر لوکوس در دامنه‌ای بین ۴(OarHH64) تا ۸(OarHH35) قرار داشتند. در این تحقیق میانگین ۵/۴ آلل به دست آمد. برای میکروستلایت‌های مطالعه شده شاخص‌های میزان اطلاعات پلی‌مورفیک (PIC)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده(Ho) برآورد گردیدند. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مربوط به نشانگر OarHH35 و کمترین میزان هتروزیگوسیتی نیز مربوط به نشانگر OarHH55بود. با توجه به نتایج مشاهده می گردد که میکروستلایت OarHH55 دارای بیشترین و نشانگر ریز ماهواره OarHH55 نیز کمترین میزان PIC را نشان می‌دهند. تعداد آلل‌های موثر در دامنه‌ای بین ۳,۰۴۵۵برای نشانگر OarHH55و ۵,۶۳۳۸ در نشانگر OarHH35 برآورد گردید. در مطالعه سان و همکاران (۲۰۱۰) روی گوسفندان هو برای نشانگر ریزماهواره ایOarHH35 تعداد آلل های مشاهده شده، تعداد آللهای موثر، میزان هتروزیگوسیتی و PIC به ترتیب ۵، ۲/۹۷و ۰/۶۶ به دست آمد، آللهای مشاهده شده در آن پژوهش در دامنه ۱۴۱-۱۲۱ جفت بازی قرار داشتند که با مشاهدات مطالعه اخیر روی گوسفند سنجابی متفاوت بود. در پایان با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که این نشانگرهای ریزماهواره‌ای دارای میزان پلی‌مورفیسم و هتروزیگوسیتی بالایی بوده که آنها را برای مطالعات برآورد ارزیابی‌های ژنتیکی مناسب می سازد.

منابع

1- Sun, W., Chang, H., Musa, H., Chu, M., 2010. Study on relationship between microsatellite polymorphism and producing ability on litter size trait of Hu sheep in China. African. J. Biotech. 9(50), 8704-8711.

2-Miller, S., Dykes, D., Paletsky, H., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic. Acid. Res. 16, 1215.

3-Farid, A., E. O Reilly, C. Dollard and Jr. C.R. Kelsey, 2000. Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. Can. J. Anim. Sci., 80: 9-17.

4- Guan, F., G. Q. Shi, J. T. Ai, S.R. Liu and L.G. Yang, 2007.Relationship between genetic diversity of chromosome 6 determined by microsatellite markers and litter size in Hu sheep.Hereditas, 29: 1230-1236.

5-Arora, R.,Bhatia, S. and Jain, A. 2010.Morphological and genetic characterizationof Ganjam sheep.Animal Genetic Resources. 46: 1-9.

Studying of Genetic Diversity of Five Microsatellite Markers Related to FecB gene in Sanjabi Sheep

Rabie Rahbar[1*], Boromand Chaharaein[2], Bijan Solimani[2]

1- Young Researchers club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Animal Science, Agriculture and Natural Resources Research Centre, Kermanshah, Iran

*Corresponding E-mail address: rahbarrabie@gmail.com

Abstract

Microsatellite is extensively used for designing the genetic chain map, orienting quantity character loci, and evaluating the genetic diversity. The aim of the present study was the studying of genetic diversity of five microsatellite markers related to FecB gene in Sanjabi sheep. Blood samples were randomly collected from 100 Sanjabi sheep, transported to the laboratory and stored at -4°Cfor further analysis. DNA was extracted using modified salting-out method and 5 microsatellite loci were amplified by specific primers pairs using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were then separated by electrophoresis on 8% poly acryl-amid gel. Statistical analysis showed that OarHH35 and OarHH55 microsatellites had the highest and lowest PIC, respectively. Effective allele's number was in ranging between 3.0455 for OarHH55 marker and 5.6338 for OarHH35 marker. Also, it detected these microsatellite markers had high polymorphism and heterozygosity size that caused to fit them for studying of genetic valuation assessment.

Keywords: microsatellite, polymerase chain reaction, electrophoresis, Sanjabi sheep

شناسایی چند شکلی ژن FABP4 درگوسفندان آمیخته افشاری× برولا مرینو با استفاده از PCR-SSCP

لیلا زاهدی*[۱]، طاهر هرکی نژاد[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه زنجان، ۲-عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه زنجان
leilyzhd@yahoo.com

چکیده

چربی اعماء و احشا و دنبه درصد قابل توجهی از وزن لاشه در گوسفند را به خود اختصاص می دهد. از جمله ژنهای مهم مرتبط با صفات چربی می توان به ژن کدکننده پروتئین متصل شونده به اسید چرب بافت آدیپوسیت(FABP4) اشاره نمود که عضو خانواده بزرگ پروتئینهای متصل به چربی می‌باشد. در تحقیق حاضر چند شکلی ژن FABP4 در گوسفندان آمیخته افشاری× برولامرینو مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از تعداد ۱۰۰ رأس بره نر ۱۱ ماهه نمونه خون گرفته و از آن DNA استخراج گردید. آغازگرهای لازم با استفاده از توالی این ژن در سایر حیوانات طراحی شدند. محصولات حاصل از PCR با روش SSCP مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی باندها بر روی ژل اکریل آمید، تمامی نمونه‌ها در ۳ گروه ژنوتیپی AA، BB و AC به ترتیب با فراوانی ۶۵ ، ۲۱ و ۱۳ در صد قرار گرفتند. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که در جایگاه ژنی FABP4 چندشکلی ژنتیکی وجود دارد مطالعه بیشتری نیاز است تا ارتباط این چند شکلی با صفات لاشه مورد بررسی قرار گیرد و در صورت وجود ارتباط می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گوسفند افشاری، FABP4، چند شکلی، SSCP

مقدمه

پروتئینهای متصل شونده به اسیدچرب(FABPs) اعضای یک خانواده بزرگ محافظت شده از پروتئینهای اتصالی به چربی داخل سلولی هستند و تا کنون ۱۲ نوع مختلف FABP سیتوپلاسمی با توزیع ویژه بافتی شناسایی شده اند(Cho et al, 2008). ژن FABP4 به طور منحصر به فرد در سلولهای چربی بیان می‌شود که به اسیدهای چرب زنجیر بلند و دیگر لیگاندهای آب گریز متصل می‌شود(Michal et al,2006). این پروتئینها نقش مهمی را در تنظیم هموستازی گلوکز و لیپید در واکنش با گیرنده های مسئول فعال کردن تکثیر پروکسی‌زوم (PPAR) ایفا می‌کنند. تا کنون پژوهشی در مورد ژن FABP4 بر روی گوسفند انجام نشده بود. بنابراین پژوهش حاضر جهت شناسایی و همچنین یافتن چندشکلی ژن FABP4 در گوسفندان نژاد افشاری× برولامرینو انجام شد.

مواد و روش‌ها

جهت اجرای تحقیق تعداد ۱۰۰ رأس بره نر ۱۱ ماهه افشاری موجود در گله اصلاح نژادی گوسفند افشاری مزرعه آموزشی- پژوهشی دانشگاه زنجان مورد استفاده قرار گرفتند. از آنها نمونه خون گرفته شد و DNA ژنومی با روش فنل- کلروفورم استخراج شد. از آنجایی که توالی ژن FABP4 گوسفند در دسترس نبود آغازگرها از روی توالی این ژن در سایر پستانداران طراحی گردید که توالی آنها به صورت زیر است وبرای تکثیر یک قطعه bp ۳۵۰ از اگزون ۱ در نظر گرفته شده اند:

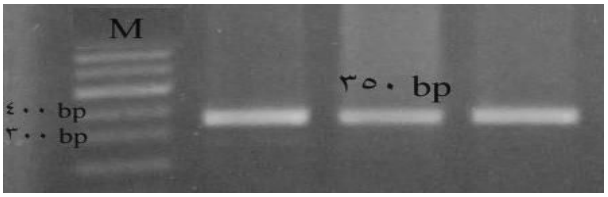
F: 5' CAAGGAGAGCCAAAGTTGAG 3'
R: 5' CTAGAGAAAAAGTTATAAGCCCAG 3'

هر مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) (۵۰ µl) شامل ۱۶ پیکو مول از هر پرایمر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۰/۸ IU تک‌پلیمراز،µl ۰/۱ تک بافر PCR، ۲۰۰ µM از هر dNTP (سیناژن)، ۲mM MgCl2 و ۵۰mM KCl بود. برنامه حرارتی مناسب برای آغازگر مورد مطالعه به صورت: واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل شامل: واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه انتخاب و بسط نهایی در دمای۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. برای تأیید تکثیر قطعه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر بافربارگذاری با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصدالکتروفورز شدند.

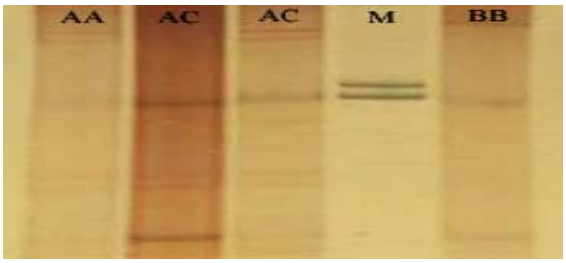
برای انجام SSCP ۸ میکرولیتر از محصولات PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردید. برای واسرشته کردن رشته ها ، نمونه ها به مدت ۱۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در دستگاه PCR قرار داده شدند. سپس بلافاصله نمونه ها در داخل یخ قرارگرفتند تا از اتصال مجدد رشته های مکمل جلوگیری شود. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی و از ژل اکریل آمید ۱۰٪ استفاده شد. برای این منظور ۱۳ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاری در هر چاهک ریخته شدو با ولتاژ ۱۵۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و با بافر TBE 1X ، الکتروفورز شد. برای مشاهده ژنوتیپ ها از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

نتایج و بحث

تکثیرناحیه‌ای شامل اگزون ۱ ژن FABP4 گوسفند با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از روی این ژن در سایر پستانداران با موفقیت انجام گرفت و بر روی ژل آگارز باندی به طول ۳۵۰ جفت باز مشاهده گردید(شکل ۱). نمونه های تکثیر شده با PCR ، با استفاده از SSCP تعین ژنوتیپ شده، مورد آنالیز قرار گرفتند و الکتروفورز محصولات PCR واسرشته شده بر روی ژل اکریل آمید، سه الگوی باندی و ژنوتیپ مختلف را نشان داد(شکل ۲).



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪
(M: مارکر ۱۰۰ bp)



شکل۲- نتایج حاصل از انجام SSCP محصولات PCR روی ژل اکریلامید ۱۰٪.

مشخص شد که ژنوتیپ AA بیشترین (۶۵ درصد) و ژنوتیپ AC کمترین (۱۳ درصد) فراوانی را در جمعیت مورد مطالعه داشتند. این ژن روی کروموزوم ۱۴ گاوی قرار دارد و تا کنون ژنوتیپهای CC، GC و GG شناسایی شده‌اند(Pannier et al, 2010).توالی یابی مستقیم محصولات PCR از دو منبع ژنی DNA از گاوهایی با marbling کم و زیاد از نژاد لیموزین×واگو، دو SNP آشکار نموده و پس از انجام آزمایشات و تعیین ژنوتیپ، سرانجام آنالیزهای آماری نشان دادند که ژنوتیپهای FABP4 بطور معنی داری میزان چربی مرمری ($p<0.05$) و عمق چربی زیر پوستی ($P<0.05$) را تحت تأثیر قرار می‌دهد(Michal et al,2006). طبق مطالعات Pannier و همکاران(۲۰۱۰) تعداد دامها از هر ژنوتیپ و فراوانی آللی در هر نژاد گاو متفاوت بدست آمده و هیچگونه تفاوت معنی داری از تعادل هاردی واینبرگ در بین نژادها مشاهده نشده است. نتایج این پژوهش نشان می دهد که ژن FABP4 در جمعیت مورد مطالعه دارای چند شکلی است و بنا به نقش این ژن درارتباط با خصوصیات لاشه بر اساس گزارشهای موجود، بررسی ارتباط این ژن با خصوصیات لاشه در گوسفند و بخصوص در گوسفندانی که تیپ گوشتی دارند ضروری به نظر می رسد.

منابع

1. Cho, S., T.S. Park. D. Yoon. H.S. Cheong. S. Namgoong. B.l. Park. H.W. Lee. C. S. Han. E.M. Kim. I-C. Cheong . H. Kim & H.D. Shin. 2008. Identification of genetic polymorphisms in FABP3 and FABP4 and putative association with back fat thickness in Korean native cattle. BMB reports, 41(1):29-34

2. Michal, J. J., Z. W. Zhang. C. T. Gaskins and Z. Jiang. 2006. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu × Limousin F_2 crosses. Animal genetics, 37:400-402

3. Pannier, L., A.M. Mullen. R.M. Hamill. P.C. Stapleton. T. Sweeney. 2010. Association analysis of single nucleotide polymorphism in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred Bos taurus cattle. Meat Science, 85:515-518

Polymorphism of FABP4 gene in Afshari x Broola Merino cross lambs studied using PCR-SSCP

Leyla Zahedi [1*], Taher Harkinezhad[2]
[1]MSc Student of animal Genetics and Breeding of Zanjan University [2] Academic member of Faculty of Agriculture, the University of Zanjan, Iran
leilyzhd@yahoo.com

Abstract
Tail and other adipose fat comprise a considerable fraction of carcass composition. Fatty acid binding protein 4 gene (FABP4) is one of important genes playing a role relating to this traits. This study aimed to investigate polymorphism in FABP4 in Afshari x Broola Merino cross lambs. To do this, a study was conducted using 100 male lambs. Lambs were at age of 11 month before slaughtering. Since DNA sequence of this gene was not available for sheep primers were designed based on those of other mammals. To identify different genotypes SSCP procedure were implicated on PCR products. Six different genotypes namely AA, BB, and AC were found according to the bands on non-denaturing p*olyacrylamide* gel and their frequency were 65, 21and 13 percent respectively. These results indicate that there is polymorphism in first exon of FABP4 gene. Further study is necessary to determine the association of this polymorphism with carcass traits in sheep.

بررسی ارتباط بین ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پائین اکسید شده(OLR1) با صفات تولیدی در گاوهای شیری هلشتاین ایران

مسعود سلطانی*[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، غلامرضا قربانی[۳]، محمدعلی ادریس[۴]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[۵]
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲،۳،۴و۵- عضو هیأت علمی دانشگاه صنعتی اصفهان
* نویسنده مسئول: مسعود سلطانی،دانشگاه صنعتی اصفهان-دانشکده کشاورزی masoud_sol32@yahoo.com

چکیده

به منظور بررسی ارتباط بین ژن OLR1 با صفات تولید شیر،از ۴۰۸ رأس گاو هلشتاین در ۵ گاوداری صنعتی اصفهان که دارای رکوردهای تایید شده بودند، نمونه گیری خون انجام شد.پس از انجام مراحل استخراج، تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده و تکثیر و هضم توسط آنزیم برشی، محصول هضم بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد مشاهده گردید. دو آلل A(بدون برش bp 270) و C(برش خورده به قطعات bp 250 و bp 20)در هر پنج مشاهده شد و هر پنج گله در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند.ژنوتیپ CC در مقایسه با AA و AC بطور معنی داری درصد چربی شیر بیشتری از خود نشان داد و ژنوتیپ های CC و AC در برابر AA درصد پروتئین بیشتری داشتند ($P<0.01$) .

واژگان کلیدی:ژنOLR1،گاو هلشتاین،ژنوتیپ،الکتروفورز.

مقدمه

اثر بعضی از ژنها بر روی صفات به طور قطع اثبات گردیده و مسیر عمل آنها مشخص شده است،اما در بعضی از ژنها تأثیر و نحوه ی عمل آنها بر روی صفات به طور قطعی مشخص نشده و لذا تحت عنوان ژنهای کاندید شناخته می شوند.یکی از ژنهای کاندید مؤثر برصفات تولید شیر در گاو که در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است ، ژن OLR1[۱] می باشد.

OLR1 یک پروتئین غشائی نوع دوم متعلق به خانواده لکتین نوع C است که بعنوان یک گیرنده ی سطح سلولی برای فرم اکسید شده ی لیپوپروتئین با چگالی پائین (ox-LDL) عمل می کند(خطیب،2006).QTL های متعدد مؤثر بر صفات تولید شیر بر روی کروموزوم شماره ۵ گاو نزدیک ژن OLR1 گزارش شده است(خطیب،2006). با توجه به نقش OLR1 در متابولیسم چربی و در رابطه با تخریب ox-LDL و همچنین مطالعات QTL صفات تولید شیر، OLR1 بعنوان یک ژن کاندید مرتبط با صفات تولید شیر در گاوهای شیری در نظر گرفته شده است(خطیب،2006).خطیب و همکاران با مطالعه بر روی یک جمعیت گاو هلشتاین آمریکای شمالی ، وجود یک SNP[۲] در ناحیه ی غیر ترجمه ای[۳] 3' (3'-UTR) این ژن را گزارش کردند(خطیب،2006).این چند شکلی حاصل جایگزینی

---

[۱] Oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor
[۲] Single nucleotide polymorphism
[۳] Untranslated region

نوکلئوتید آدنین با سیتوزین در جایگاه8232 (OLR1g.8232 C >A) است که در حالت وجود نوکلئوتید C یک جایگاه برش برای آنزیم برشی ایجاد شده و در نتیجه آلل A به صورت یک باند 270 bpو آلل C به صورت یک باند 250 bp بر روی ژل آگارز قابل تشخیص خواهد بود(خطیب،2006).این مطالعه نشان دهنده ی بیشتر بودن درصد و مقدارچربی شیر در ژنوتیپهای CC در مقابل ژنوتیپهای AC و AA بود. چند شکلی در 3'-UTR ممکن است ترجمه و یا ثبات mRNA حاصل از ژن OLR1 را کنترل کند(خطیب،2006).علی رغم مطالعات انجام شده،هنوز نیاز به بررسی این ژن در جمعیتهای مختلف گاو با زمینه ژنتیکی مختلف احساس می شود.هدف این تحقیق بررسی تنوع و فراوانی آللی چند شکلی ژن OLR1 در گاوهای هلشتاین ایران و ارتباط آن با صفات تولید شیر و استفاده از آن در جهت اهداف اصلاحی می باشد.

مواد و روش ها

توسط ونوجکت از سیاهرگ دمی ۴۰۸ رأس از گاوهای 5 گاوداری صنعتی اصفهان که دارای اطلاعات شجره و رکوردهای تأیید شده بودند نمونه خون گرفته شد.استخراج DNA به روش استخراج نمکی میلر و همکاران(1998)انجام پذیرفت و به دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد TAE، کیفیت و کمیت آن تعیین گردید.با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و بکارگیری آغازگرهای اختصاصی قطعه مورد نظر از ژن OLR1 که حاوی SNP مورد مطالعه بود، تکثیر گردید.این قطعه 270 bp طول داشت که بر روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده گردید. قطعات تکثیر شده توسط آنزیم برشی PstI مورد هضم قرار گرفتند. در صورت برش، آلل C و در غیر اینصورت آلل A خواهد بود. به منظور تعیین ژنوتیپ محصول هضم بر روی ژل آگارز 2/5 درصد TBE الکتروفورز شد. به منظور بررسی ارتباط بین ژنوتیپ های این چند شکلی با صفات تولید شیر از نرم افزار SAS رویه GLM استفاده گردید. به منظور آنالیز مدل زیر مورد استفاده قرار گرفت:

Y_{ijk} نشان دهنده ی صفات تولید شیر تصحیح شده، درصد چربی و درصد پروتئین شیر ، G_iاثر ثابت ژنوتیپ ژن OLR1 و H_j اثر ثابت گله می باشد.X_{ijk} طول دوره شیردهی(به عنوان واریانس مشترک) بر اساس روز و $\overline{X}$ ، میانگین روزهای طول دوره شیردهی، W_{ijk} روزهای باز(به عنوان واریانس مشترک) و $\overline{W}$ ، میانگین روزهای باز است. b_1 و b_2 نیز به ترتیب ضریب رگرسیون طول دوره شیردهی و روزهای باز می باشد. و e_{ijk} نیز اثر خطا خواهد بود.

نتایج و بحث

پس از هضم توسط آنزیم برشی، محصول هضم بر روی ژل آگارز 2/5 درصد مشاهده گردید.هر دو آلل A(بدون برش 270 bp) و C(برش به 250 bpو 20 bp)در هر پنج گله مشاهده شد و فراوانی آنها در مجموع به ترتیب برابر با 0/5172 و 0/4828 بود که با مقادیر گزارش شده توسط خطیب و همکاران مطابقت داشت(خطیب،2006). فراوانی ژنوتیپ های AA،ACوCC به ترتیب برابر با 0/289 ، 0/456 و 0/255 بودو هر پنج گله برای این چند شکلی در تعادل هاردی–وینبرگ قرار داشتند.آنالیز آماری نشان دهنده وجود ارتباط بین ژنوتیپ و درصد چربی و پروتئین بود اما بین ژنوتیپ و شیر تصحیح شده 305 روز ارتباطی یافت نشد(جدول 1).

افراد دارای ژنوتیپ CC در مقایسه با ژنوتیپ های AA و AC بطور معنی دار(0.0001)درصد چربی شیر بیشتری داشتند که نتایج بدست آمده در تحقیقات مشابه را تایید می کند(کومی سارک،2009، اسچنیک،2009 و خطیب،2006). همچنین افراد با ژنوتیپ AC و CC در مقایسه با افراد دارای ژنوتیپ AA درصد پروتئین بیشتری داشتند($P<0.01$) که تحقیقات مشابه تا کنون چنین ارتباطی را نشان نداده اند(کومی سارک،2009، اسچنیک،2009 و خطیب،2006).با توجه به نتایج این تحقیق میتوان از این چند شکلی در انتخاب به کمک نشانگرها استفاده نمود.

منابع

1. Komisarek, J., and Z. Dorynek. 2009. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. J Appl Genet, 50(2):125–132.
2. Schennink, A., H. Bovenhuis, K. M. Le´on-Kloosterziel, J. A. M. van Arendonk and M. H. P. W. Visker. 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition, Anim Genet, 40(6):909-916
3. Khatib, H., S. D. Leonard, V. Schutzkus, W. Luo, and Y. M. Chang. 2006. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein dairy cattle. J. Dairy Sci, 89:1753–1760.

جدول۱- مقایسه اثر سطوح مختلف ژنوتیپ روی صفات تولید شیر

ژنوتیپ	شیر تصحیح شده۳۰۵روز(kg)	درصد چربی(٪)	درصد پروتئین(٪)
AA	$9706.41^{a} \pm 121.21$	$3.07^{a} \pm 0.042$	$2.61^{a} \pm 0.032$
AC	$9941.60^{a} \pm 98.31$	$3.15^{a} \pm 0.034$	$2.70^{b} \pm 0.026$
CC	$9783.57^{a} \pm 128.35$	$3.36^{b} \pm 0.044$	$2.75^{b} \pm 0.034$

Evaluation of relationship between the OLR1 gene with production traits in Holstein dairy cattle

Masoud Soltani[1*], Saeid Ansari Mahyari[2], Golamreza Ghorbani[3], Mohammad-Ali Edriss[4], Badraldin Ebrahim Sayed-Tabatabaei[5]

[1]MSc Student of Animal Science of Technology University of Isfahan

[2,3,4و5]Academic member of Technology University of Isfahan

*** Corresponding E-mail address:** masoud_sol32@yahoo.com

Abstract

To investigate the relationship between OLR1 gene and milk production traits,blood samples werw obtained from 408 cows in 5 industrial dairy farms in Isfahan province that had registered recordes. After extracting DNA, determining the quality and quantity of extracted DNA, amplification and digestion by restriction enzyme, digestion product was observed on a 2.5% agarose gel. Both alleles A(uncut 270bp) and (cut into fragments 250bp and 20bp) were observed in all 5 herds and all werw in Hardy–Weinberg equilibrium. Genotype CC compared to AA and AC showed significantly ($P<0.0001$) more milk fat percent and genotypes CC and AC had more milk protein percent compared to genotype AA($P<0.01$).

Keywords: OLR1 Gene, Holstein Cows, Genotype, Electrophoresis.

بررسی چند شکلی ژن گیرنده لیپوپروتئین با چگالی پائین اکسید شده(OLR1) و تنوع آن در گاوهای شیری هلشتاین ایران

مسعود سلطانی*[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، غلامرضا قربانی[۳]، محمدعلی ادریس[۴]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[۵]
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان،۲،۲،۴و۵-عضو هیأت علمی دانشگاه صنعتی اصفهان
* نویسنده مسئول: مسعود سلطانی،دانشگاه صنعتی اصفهان-دانشکده کشاورزی masoud_sol32@yahoo.com

چکیده

در اصلاح نژاد دام، حفظ تنوع ژنتیکی(به عنوان ماده خام در انتخاب)در بین حیوانات امری اجتناب ناپذیر می باشد. به منظور بررسی چند شکلی ژن OLR1 و تنوع آن در گاوهای شیری هلشتاین ایران ،از 408 رأس گاو هلشتاین در 5 گاوداری صنعتی اصفهان ، نمونه گیری خون انجام شد.پس از انجام مراحل استخراج، تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده و تکثیر و هضم توسط آنزیم برشی، محصول هضم بر روی ژل آگارز 2/5 درصد مشاهده گردید. دو آلل A(بدون برش 270 bp) و C(برش خورده به قطعات 250 bp و 20 bp)در هر پنج گله مشاهده شد. آنالیز ژنتیکی جمعیت توسط برنامه ی نرم افزاری PopGen32 انجام شد. شاخص های محاسبه شده نشان دهنده ی وجود تنوع بالای این چند شکلی در جمعیت مورد مطالعه می باشد که می توان در انتخاب به کمک نشانگرها از آن استفاده نمود.

واژگان کلیدی:ژن OLR1،گاو هلشتاین،چند شکلی،تنوع ژنتیکی.

مقدمه

نژادهای حیوانات اهلی طی قرن ها انتخاب طبیعی و انتخاب توسط انسان با توجه به شرایط مختلف محیطی و نیازهای انسانی شکل گرفته اند. تنوع ژنتیکی درون و بین نژادی متخصصان ژنتیک و اصلاح دام را قادر می سازد تا در پاسخ به تغییرات محیطی و نیاز های بازار، حیوانات برتر را انتخاب نمایند. تنوع ژنتیکی به عنوان یک ماده خام در انتخاب مطرح می باشد و نبود آن به معنای یکسانی حیوانات و در نتیجه عدم انتخاب خواهد بود. بنابراین حفظ این تنوع در برنامه های اصلاح نژادی اجتناب ناپذیر خواهد بود. با بکار گیری روش های مناسب می توان مقدار تنوع در جمعیت ها را تخمین زده و از کاهش آن و از دست رفتن ژن های مطلوب جلوگیری بعمل آورد.ژن OLR1[۱] به عنوان یک ژن مرتبط با صفات تولید شیر مطرح گردیده است. این ژن سنتز پروتئین گیرنده ی LDL اکسید شده را بر عهده دارد(خطیب،2006). مطالعات انجام شده، نشان دهنده ی ارتباط بین چند شکلی[۲] موجود در ناحیه ی غیر ترجمه ای '3 این ژن با صفت درصد چربی شیر در گاو می باشد(کومی سارک،2009، اسچنیک،2009 و خطیب،2006). این چند شکلی (از نوع SNP[۳]) حاصل

---

[۱] oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1
[۲] Polymorphism
[۳] Single nucleotide polymorphism

جایگزینی نوکلئوتید آدنین با سیتوزین در جایگاه 8232 (OLR1g.8232 C >A) می باشد. وجود این چند شکلی و حفظ تنوع آن می تواند در انتخاب به کمک نشانگرها[۱] بکار گرفته شود. هدف تحقیق حاضر ، بررسی این چند شکلی و تنوع آن در گاوهای هلشتاین ایران بود.

مواد و روش ها

توسط ونوجکت از سیاهرگ دمی 408 رأس از گاوهای 5 گاوداری صنعتی اصفهان که دارای اطلاعات شجره و رکوردهای تأیید شده بودند نمونه خون گرفته شد.استخراج DNA به روش استخراج نمکی میلر و همکاران(1998)انجام پذیرفت و به دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز 0/7 درصد TAE، کیفیت و کمیت آن تعیین گردید.با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و بکارگیری آغازگرهای اختصاصی قطعه مورد نظر از ژن OLR1 که حاوی SNP مورد مطالعه بود تکثیر گردید.این قطعه 270 bp طول داشت که بر روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده گردید. قطعات تکثیر شده توسط آنزیم برشی PstI مورد هضم قرار گرفتند. در صورت برش، آلل C و در غیر اینصورت آلل A خواهد بود. به منظور تعیین ژنوتیپ محصول هضم بر روی ژل آگارز 2/5 درصد TBE الکتروفورز شد. به منظور بررسی تنوع چند شکلی مورد نظر در جمعیت با استفاده از برنامه ی نرم افزاری PopGen32 آنالیز ژنتیکی هر گله و مجموع گله ها صورت پذیرفت .

نتایج و بحث

پس از هضم توسط آنزیم برشی، محصول هضم بر روی ژل آگارز 2/5 درصد مشاهده گردید.هر دو آلل A(بدون برش 270 bp) و C(برش خورده به قطعات 250 bp و 20 bp)در هر پنج گله مشاهده شد.

فراوانی آلل های A و C در مجموع به ترتیب برابر با 0/5172 و 0/4828 بود که با مقادیر گزارش شده توسط خطیب و همکاران مطابقت داشت(خطیب،2006). فراوانی ژنوتیپ های AA،ACوCC به ترتیب برابر با 0/289 ،0/456 و 0/255 بود و هر پنج گله برای این چند شکلی در تعادل هاردی-وینبرگ قرار داشتند. تعداد آلل های مشاهده شده(na) در مجموع گله ها برابر 2 و تعداد مؤثر آلل ها[۲](ne) برابر 1.9986 بود که بالا بودن مقدار آن نشان دهنده ی هتروزیگوسیتی بیشتر می باشد.در ارزیابی واریانس ژنتیکی، میزان ne گویا تر از na می باشد زیرا مقدار na به اندازه نمونه وابسته است(تاجیما،1994).

شاخص اطلاعاتی شانن[۳] یکی دیگر از شاخص های تنوع می باشد که میزان پراکندگی در جمعیت را نشان می دهد(چائو،2003).مقدار این شاخص در جمعیت مورد بررسی برابر با 0.6926 بود که حاکی از وجود یکنواختی ژنتیکی برای چند شکلی مورد بررسی در جمعیت می باشد. مقادیر هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده (به ترتیب 0.4559 و 0.5441) با مقادیر مورد انتظار(0.500) اختلاف اندکی داشت .نزدیک بودن مقادیر هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده بدلیل نزدیکی فراوانی 2 آلل A و C می باشد. مقادیر بالای هتروزیگوسیتی نشان دهنده ی تنوع بیشتر میباشد. فاکتور دیگر مورد بررسی، شاخص تثبیت رایت[۴] می باشد که میزان تنوع

---

[۱] Marker-Assisted Selection

[۲] Effective number of alleles

[۳] Shannon's Information index

[۴] Wright's fixation index

آلل هایی که به طور تصادفی انتخاب شده اند را نسبت به کل جمعیت نشان می دهد و اغلب به صورت نسبتی از تنوع ژنتیکی که بواسطه تفاوت های فراوانی آللی در میان جمعیت ها ایجاد شده، بیان می گردد(هول سینگر،2009).مقدار این شاخص بین 0 تا 1 تغییر می کند که در جمعیت مورد بررسی برابر 0.0872 بود. نزدیک شدن این شاخص به صفر نشان دهنده ی همخونی بیشتر می باشد. وجود چند شکلی ژن OLR1 و تنوع بالای آن در جمعیت مورد مطالعه می تواند در برنامه های اصلاح نژادی به روش انتخاب به کمک نشانگرها بکار گرفته شود.

منابع

1.Chao, A., and T.J. Chen. 2003. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. Environmental and Ecological Statistics, 10:429-443.

2. Holsinger, K.E., and B. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating, and interpreting Fst. Nat Rev Genet, 10 (9):639–650.
3. Khatib, H., S. D. Leonard, V. Schutzkus, W. Luo, and Y. M. Chang. 2006. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein dairy cattle. J. Dairy Sci, 89:1753–1760
4. Komisarek, J., and Z. Dorynek. 2009. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. J Appl Genet, 50(2):125–132
5. Schennink, A., H. Bovenhuis, K. M. Le´on-Kloosterziel, J. A. M. van Arendonk and M. H. P. W. Visker. 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition, Anim Genet, 40(6):909-916.
6. Tajima, F., T. Tokunaga, and N.T. Miyashita. 1994. Statistical methods for estimating effective number of alleles, expected heterozygosity and genetic distance in self-incompatibility locus. Jpn. J. Genet, 69:287-295.

Evaluation of OLR1 gene polymorphism and diversity in Iranian Holstein dairy cattle

Masoud Soltani[1*], Saeid Ansari Mahyari[2], Golamreza Ghorbani[3], Mohammad-Ali Edriss[4], Badraldin Ebrahim Sayed-Tabatabaei[5]

[1]MSc Student of Animal Science of Technology University of Isfahan

[2,3,4و5]Academic member of Technology University of Isfahan

*** Corresponding E-mail address:** masoud_sol32@yahoo.com

Abstract

To investigate the OLR1 gene polymorphism and diversity in Iranian Holstein dairy cattle, blood samples werw obtained from 408 cows in 5 industrial dairy farms in Isfahan province. After extracting DNA, determining the quality and quantity of extracted DNA, amplification and digestion by restriction enzyme, digestion product was observed on a 2.5% agarose gel. Alleles A(uncut 270bp) and (cut into fragments 250bp and 20bp) were observed in all 5 herds. Genetic analysis was done by software PopGen32. Calculated indices showed high diversity for this polymorphism in studied population that can be used in Marker-Assisted Selection.

Keywords: OLR1 Gene, Holstein Cows, Polymorphism, Genetic Diversity.

تنوع اللی ژن FTO (اینترون ۳ و اگزون ۴) درگوسفندان آمیخته افشاری × برولا مرینو با استفاده از PCR-SSCP

وحید سلمانی[۱]، طاهر هرکی‌نژاد[۲]، معصومه صالح[۱]، مرادپاشا اسکندری نسب[۲]، داریوش سلیمی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه زنجان، ۲-هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه زنجان

Salmani.v88@Gmail.com

چکیده

چربی اعماء و احشا و دنبه بخش اصلی چربی لاشه دام است که از لحاظ ضریب تبدیل خوراک و صرفه اقتصادی برای تولید کنندگان گوشت مطلوب نیست. ژن‌های مختلفی از جمله ژن FTO (Fat mass and obesity associated) در ارتباط با میزان گوشت و چربی لاشه در برخی از پستانداران مورد مطالعه قرار گرفته اند. اما در ارتباط با ژن FTO درگوسفند نتایج منتشر شده ای وجود ندارد. به منظور تعیین پلی مورفیسم در ناحیه اینترون ۳ و اگزون ۴ ژن FTO از تعداد ۱۰۰ راس بره ۱۱ ماهه نمونه خون گرفته و پس از استخراج DNA، قطعه ۵۱۸bp توسط آغازگرهای اختصاصی ژن FTO به وسیله PCR تکثیر یافت. محصولات PCR با روش SSCP مورد بررسی قرار گرفتند. با بررسی نمونه‌ها و مشاهده باندها بر روی ژل اکریل آمید تمامی این نمونه‌ها درچهار گروه ژنوتیپی AA, AB, AC, AD به ترتیب با فراوانی‌های ۵، ۱۷/۴، ۶۳ و ۱۴/۶ درصد قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌توان گفت که تنوع ژنتیکی ناحیه اینترون ۳ و اگزون ۴ ژن FTO درگوسفندان آمیخته افشاری × برولا مرینو نسبتا بالا بوده و ضروری به نظر می رسد که ارتباط الل های مختلف این ژن با صفات لاشه مورد بررسی قرار گیرد و در صورت وجود ارتباط می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: گوسفند افشاری، پلی مورفیسم، ژن FTO، چربی لاشه، SSCP .

مقدمه

امروزه تمایل مصرف کنندگان برای خرید گوشت با چربی کمتر بیشتر شده است. ژن های زیادی از جمله DGAT1، FTO،TG و... میزان گوشت و چربی لاشه را کنترل می کنند(نظام آبادی و همکاران، ۱۳۸۹ و Fontanesi et al, 2008). در انسان FTO ژن کنترل کننده چاقی و توده چربی است. ژن FTO به طور گسترده در بافت های جنینی ، بالغ و به طور ویژه در هیپوتالاموس و پانکراس بیان می شود(Fontanesi et al, 2009). این ژن انزیم 2-oxoglutarat-dependent nucleik acid demethylas را کد می کند. انزیم ذکر شده دمتیلاسیون، ۳-متیل تیمین درDNA تک رشته را کاتالیز می کند. گزارش شده است که بیان ژن FTO به طور معنی داری پس از گرسنگی درهیپوتالاموس موش افزایش می یابد، وهمبستگی منفی با بیان ژنorexogenic galanin like peptid که در تحریک مصرف خوراک موثر است دارد(Fredriksson et al, 2007). براساس مطالعات همکاران این پژوهش تا کنون در ارتباط با این ژن در گوسفند

نتایجی گزارش نشده است. پژوهش حاضر جهت شناسایی چندشکلی در ناحیه اینترون ۳ و اگزون ۴ ژن FTO در گوسفندان نژاد افشاری× برولامرینو انجام شد.

مواد و روش‌ها

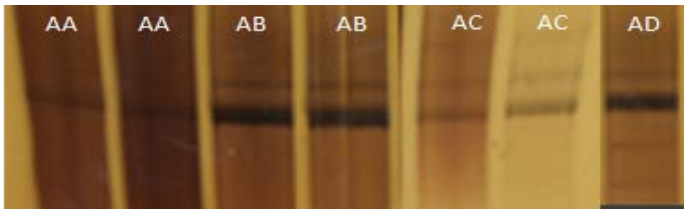
جهت اجرای تحقیق تعداد ۱۰۰ رأس بره نر ۱۱ ماهه افشاری که در گله اصلاح نژادی گوسفند افشاری مزرعه آموزشی- پژوهشی دانشگاه زنجان مورد استفاده قرار گرفتند. از آنها نمونه خون گرفته شد و DNA ژنومی با روش فنل- کلروفورم استخراج شد. . از آنجایی که توالی ژن FTO گوسفند در دسترس نبود آغازگرها از روی توالی این ژن در سایر پستانداران طراحی گردیدکه توالی آنها به صورت زیر است وبرای تکثیر یک قطعه bp ۵۱۸ از اینترون ۳ و اگزون ۴ در نظر گرفته شده اند:

F: 5' AGGCCCTGAAGAGGAAAGYG 3'
R: 5' GCTGTTCCTGMGARGAAAC 3'

هر مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) (۵۰ µl) شامل ۱۶ پیکو مول از هر پرایمر، ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، ۰/۸ IU تک- پلیمراز،µl ۰/۱ تک بافر PCR، ۲۰۰ µM از هرdNTP (سی‌نازن)، MgCl2 ۲mM و KCl ۵۰mM بود. برنامه حرارتی مناسب برای آغازگر مورد مطالعه به صورت: واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ سیکل شامل: واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه انتخاب و بسط نهایی در دمای۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. برای تعیین کیفیت قطعه به دست آمده ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر بافربارگذاری با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۵ دقیقه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصدالکتروفورز شدند. برای انجام روش SSCP ۸ میکرولیتر از محصولات PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردید. برای واسرشته کردن رشته ها ، نمونه ها به مدت ۱۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در دستگاه PCR قرار داده شدند. سپس بلافاصله نمونه ها در داخل یخ قرارگرفتند تا از اتصال مجدد رشته های مکمل جلوگیری شود. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی و از ژل اکریل آمید ۱۰٪ استفاده شد. برای این منظور ۱۳ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاری در هر چاهک ریخته شد با ولتاژ ۱۵۰ به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و با بافر TBE 1X، الکتروفورز شد. برای مشاهده ژنوتیپ ها از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

بحث و نتایج

با استفاده از PCR تکثیرقطعه bp ۵۱۸ بخشی از ناحیه اینترون ۳ و اگزون ۴ با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از روی ژن FTO در سایر پستانداران با موفقیت انجام گرفت. نمونه های تکثیر شده با PCR ، با استفاده از SSCP تعین ژنوتیپ شده، مورد آنالیز قرار گرفتندو الکتروفورز محصولات PCR واسرشته بر روی ژل اکریلامید، چهار الگوی باندی و ژنوتیپ مختلف را نشان داد (شکل ۱)



شکل ۱: چهار ژنوتیپ حاصل از مقایسه SSCP

مشخص شد که ژنوتیپ AB بیشترین (۶۳ درصد) و ژنوتیپ AD کمترین (۵ درصد) فراوانی را در جمعیت مورد مطالعه داشتند. در تحقیقی که توسط fontanesi وهمکاران(۲۰۰۸) انجام شد، ارتباط بین جهشی SNP(AM931150:g.276T>G) دراینترون ۳ ژن FTO با صفات مرتبط با چربی بین عضله و چربی پشت در حیوانات مزرعه ای مشخص شد. این جهش بر انباشت چربی و نرخ تبدیل خوراک موثر گزارش شده است(Gerken et al, 2007). همچنین Fontanesi و همکاران (۲۰۰۹) دو مارکر DNA درژن FTO که با افزایش وزن روزانه، ضخامت چربی پشت، اسکور چربی داخل ماهیچه ای و درصد کل چربی در ماهیچه ارتباط دارد را شناسایی کردند. فراوانی الل g.276T در حیوان های با ارزش ارثی بالا برای چربی بین عضله در مقایسه با حیوان های با ارزش ارثی پایین بیشتر بود. روی هم رفته از نتایج گزارش شده چنین به نظر می رسد که ژن FTO در تنظیم لیپولیز درتمام چربی های بدن و به طور نسبی توزیع چربی در بدن نقش دارد (Zabena et al, 2009). نتایج این پژوهش نشان می دهد که ژن FTO در جمعیت مورد مطالعه دارای چند شکلی است و بنا به نقش این ژن درارتباط با خصوصیات لاشه بر اساس گزارشهای موجود، بررسی ارتباط این ژن با خصوصیات لاشه در گوسفند و بخصوص در گوسفندانی که تیپ گوشتی دارند ضروری به نظر می رسد.

منابع

۱. نظام آبادی، م.، هرکی نژاد، م.، شهیر، م.، اسکندری نسب، م.، خرمتائی،ر. ۱۳۸۹. ارتباط هورمونهای تیروئیدی و تیروگلوبولین با خصوصیات لاشه در گوسفندان افشاری. چهارمین کنگره علوم دامی ایران. صفحه ۴۳۱.

2. Fontanesi, L., Scotti, E., Buttazzoni, L., Davoli, R and Russo, V. 2008. The porcine fat mass and obesity associated (FTO) gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs. Animal Genetics; doi:10.1111/j.1365-2052.01777.
3. Fontanesi, L., Scotti, E., Buttazzoni, L., Dallolio, S and others. 2009. Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the FTO gene and obesity-related traits in heavy pigs. Springer Science+Business Media; 37:461–466.
4. Fredriksson, R., Hagglund, M., Olszewski, P., Stephansson, O., Jacobsson, J., Olszewska, A., Levine, A., Lindblom, J., Schioth, H. 2007. The Obesity Gene, FTO, Is of Ancient Origin, Up- Regulated during Food Deprivation and Expressed in Neurons of Feeding-Related Nuclei of the Brain. The Endocrine Society doi: 10.1210/en -1457.

5. Gerken, T., Girard, C., Loraine Tung, Y., webby, C and others. 2007. The Obesity-Associated FTO Gene Encodes a 2-Oxoglutarate– Dependent Nucleic Acid Demethylase. UKPMC Funders Group; 318(5855): 1469–1472.

6. Zabena, C., Gonzalez, J., Sanchez, L., Martinez, M., Larrad, T and others. 2009. The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. Obes.Surg.;19(1): 87-95.

Allelic polymorphism of FTO Gene (3rd intron and 4th exon) in Afshari x Broola PCR-SSCP Merino cross lambs studied using

Wahid Salmani [1], Taher Harkinezhad[2], masoomeh saleh[1], Moradpasha eskandarinasab[2], daryush salimi[2]

1MSc Student of animal Genetics and Breeding of Zanjan University [2] Academic member of Faculty of Agriculture, the University of Zanja, Iran

Abstract

Tail and other adipose fat comprise a considerable fraction of carcass composition and due low rate of feed conversion and consequently economically it is not desired for meat producers. The association of variety of genes including fatty mass and obesity associated (FTO) gene with meat and fat composition of carcass has being studied in mammals but there is no reports on FTO gene in sheep. This study aimed to investigate polymorphism in FTO in Afshari x Broola Merino cross lambs. To do this, a study was conducted using 100 male lambs. Lambs were at age of 11 month before slaughtering. Since DNA sequence of this gene was not available for sheep primers were designed based on those of other mammals. To identify different genotypes SSCP procedure were conducted on PCR products. Four different genotypes namely AA, AB, AC and AD were found according to the bands on non-denaturing p*olyacrylamide* gel. The allelic frequency of this gene were 14.6, 63, 17.4 and 5 respectively. These results indicate that there is polymorphism in 3rd intron and 4th exon of FTO gene locus. Further study is necessary to determine the association of this polymorphism with carcass traits in sheep.

Sperm Status and DNA Dose Play Key Roles in Sperm/ICSI-Mediated Gene Transfer in Caprine

F. Shadanloo[1,2] , S. M. Hosseini[1], M. Hajian[1], M. Forouzanfar[1,3] , P. Abdei[1] , S. Ostadhosseini[1] , M. H. Najafi[4], M. P. Eskandari-Nasab[2], and M. H. Nasr-Esfahani[1,3*]

1 Department of Reproduction and Development, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

2 Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3 Department of Basic Science, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran

4 Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran

5 Department of Cell and Molecular Biology, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

Summary

In relation to the growing recent interest in the establishment of sperm-mediated gene transfer (SMGT) technology as a convenient and effective method for the simple production of transgenic animals, in this study the possibility of using SMGT to produce transgenic caprine embryos was investigated for the first time. Buck sperm were directly incubated with different concentrations (0–500 ng) of pcDNA/his/Lac-Z plasmid and used for IVF or ICSI. Sperm used for ICSI were categorized into motile or live-immotile group before being injected into oocytes. In a separate experiment, dead sperm prepared by repeated freezing/thawing were used for DNA-incubation before ICSI. Sham injection was carried out by intracytoplasmic injection of approximately the same volume of media containing different doses of DNA using an ICSI needle. Transgene expression and transmission were detected by X-Gal staining and PCR analysis of developed embryos, respectively. A reasonable blastocyst rate was observed in all the groups. Only embryos in the sham group were negative for transgene transmission. Transgene expression was completely dependent on the delivery technique and status of sperm, and was only observed in the live-immotile and dead ICSI groups. The results of this study showed that the technique (IVF vs. ICSI vs. sham injection), sperm status (motile vs. live-immotile vs. dead) and to some extent DNA concentration affect embryo development, transgene transmission and expression.

Key words: Transgenesis, SMGT, Goat, Sperm Status

Introduction

During the past three decades, the ability to change or modify genomic construction of an organism (transgenesis) has been considered to be the most important breakthrough achieved in the field of genetic engineering. Production of transgenic farm animals has been envisaged as a unique approach for the development of recombinant proteins, immuno-compatible organs suitable for xenotransplantation as well as animals that could more efficiently utilize nutrients, and those resistant to mastitis or bovine spongiform encephalopathy (Niemann and Kues, 2003). Pronuclear microinjection, viral-mediated gene transfer, and somatic cell nuclear transfer (SCNT) are the main approaches proposed for gene delivery and development of

transgenic animals. However, each of these approaches has their own shortcomings, including species limitations, biosafety hazards, and low efficiency. In addition, all three methods are technically demanding, costly and labor intensive with low reproducibility. Recently, sperm-mediated gene transfer (SMGT), which is based upon exploiting the sperm cell as a carrier of exogenous DNA into the oocyte has been proposed as an effective, simple, and convenient method for the production of transgenic animals. Despite limited reports describing SMGT as an efficient method, there are numerous contradictory reports questioning the efficiency of this technique in the production of transgenic embryos or offspring. In fact, literature reveals that the discrepancies have been mainly related to inter and intra species differences, the procedure of sperm preparation, the dosage of exogenous DNA, and more importantly, to the techniques of insemination. Therefore, further studies are of fundamental importance in order to investigate whether SMGT can be considered as an efficient technique for transgenes Thus, the aim of this study was to systematically investigate the effect of (a) concentration of exogenous DNA used to challenge sperm cells, (b) insemination technique [in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) methods], and (c) status of DNA-incubated spermatozoa (motile vs. live-immotile vs. dead sperm). This study was carried out in goats (caprine species) given the unique suitability of transgenic dairy goats to produce biopharmaceutical proteins in milk, their shorter gestational period, lower susceptibility to some critical diseases, high-milk yield and protein content, and more importantly the fact that to the best of our knowledge, there has been no reports on SMGT in this species.

Materials and methods

Experimental design

During this study, the effects of four concentrations of exogenousDNA, two states of sperm either at the time of incubation with exogenous DNA (viable vs. dead) or following incubation with exogenous DNA (motile vs. live-immotile), and two methods of sperm introduction into the oocyte (IVF vs. ICSI) were evaluated. Accordingly, the cryopreserved semen of three bucks were gently mixed and processed. Aliquots of 10^6 prepared sperm were directly incubated with 50, 100, 200, and 500 ng of plasmid pcDNA/his/Lac-Z. Incubated sperm were subsequently used for either IVF or deposited into PVP droplets in ICSI dishes to be categorized into two groups of motile versus liveimmotile sperm before injection into the oocytes. For preparation of dead sperm, aliquots of 10^6 prepared sperm were subjected to three consecutive rounds of freezing/thawing in liquid nitrogen/air without cryoprotectant. The dead sperm were subsequently incubated with the aforementioned concentrations of plasmid pcDNA3.1/his/Lac-Z before being used for ICSI. In the sham group, intracytoplasmic injection of approximately the same volume of media containing aforementioned doses of DNA was carried out with the aid of an ICSI needle. For each experimental group, a corresponding internal control was implemented using sperm not treated with DNA. Treated oocytes were cultured in vitro for up to 8 days. Subsequently, embryos at the morula and blastocyst stages were assigned to X-Gal staining to detect the efficiency of transgene expression before being used for genomic polymerase chain reaction (PCR) for detection of the transfection efficiency.

Reagents

Unless indicated otherwise, all chemicals were obtained from Sigma Chemical (St Louis, MO).

Plasmid

The plasmid pcDNA3.1/his/Lac-Z (8.6 kb) containing CMV promoter, Lac-Z cDNA and neomycin resistance gene was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA; Catalog No. V385-20).

Sperm and Oocyte

PreparationThree bucks of proven fertility were trained to ejaculate semen into a pre-warmed artificial vagina. Immediately after collection, semen was diluted (1:20) with commercially available freezing medium (Bioxcell_, Catalog No. 016218; IMV Technologies, L'Aigle, France) and cryopreserved according to Forouzanfar et al. (2010). In vitro maturation of oocytes (IVM), IVF and in vitro culture (IVC) were carried out according to Forouzanfar et al. (2010).

Sperm Transfection

For each experiment, one straw of frozen sperm from each buck was thawed (37_C, 40 sec), pooled, diluted 1:3 with Hepes-tissue culture medium 199 (H-TCM) and washed by centrifugation at 400g for 10 min. In 0.5 ml microtubes, aliquots of 10^6 prepared spermatozoa were incubated with different concentrations of circular plasmid (50, 100, 200, or 500 ng).

Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

At 20–22 hr post IVM, caprine oocytes were cleaned from expanded cumulus cells by vortexing for 3 min in H-TCM plus 10% fetal calf serum (FCS) containing hyaluronidase (80 IU/ml).

Denuded oocytes were washed three times in H-TCM before being selected based on first polar body extruded. In each ICSI group, the DNA-incubated spermatozoa of each experimental group were introduced into Polyvinylpyrolidone (PVP, Catalog No. K-SIPV-200-5; Cook, Queensland, Australia) drops and selected based on normal sperm morphology. Motile sperm were immobilized with the aid of a microinjection needle. Live-immotile sperm were selected based on tail flexibility using the mechanical touch technique (De-Oliveira et al., 2004).

Chemical Activation

Chemical activation was carried out according to Nasr-Esfahani et al. (2009) within 30 min post-sperm injection and cultured in sequential formulation of synthetic oviduct fluid (SOF; Tervit et al., 1972) for up to 8 days.

b-Galactosidase Activity Assessment or Detection of Lac-Z gene Expression

At the end of the in vitro culture, embryos at the morula to blastocyst stages were assigned to X-Gal staining as recommended by the manufacturer. Embryos were considered as positive with at least one dark blue blastomere. Proven stable transfected Chinese hamster ovary (CHO) cell lines were stained in a 24-well plate with the same protocol and conditions, as a positive control.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

To rule out the possibility of a false positive PCR result due to the presence of any trace of exogenous DNA in the medium accompanying the embryo and/or on the embryo surface, X-Gal stained embryos were first treated with 50 IU/ml DNase I at 55_C for 1 hr and then incubated at 85_C for 30 min to inactivate DNase I.

To preclude technical errors, each embryo underwent two sets of PCR; the first for goat b-Casein as an endogenous gene, and the second was a Nested-PCR for amplification of Lac-Z transgene.

The primer pair sequences for detection of the b-Casein gene were 5-ACAGCCTCCCACAAAACATC-30 and 50-TATCTCTCTGGGGCACTGCT-3. The primers were designed to amplify a 351 bp fragment from the goat b-Casein gene. The PCR conditions consisted of denaturation at 94_Cfor 5

min, followed by 40 amplification cycles of: denaturation at 94_C for 1 min; annealing at 56.6_C for 1 min; and extension at 72_C for 1 min. Cycle 40 contained an additional extension at 72_C for 20 min. To avoid any error and in order to detect limited traces of transgene, Nested-PCR was used for detection of the Lac-Z gene.

The external primer pair were 5-CTGGCCTAATAGCGAAGAGG-3 and 5-CATTAAAGCGAGTGGCAACA-3; and PCR conditions were the same as the b-Casein gene. Internal primer pair for detection of the Lac-Z gene were 5-CTTCCTGAGGCCGA TACTGTCGTCG-3 and 5-GCTCAGGTCAAATTCAGACGGCAAACG-3 and PCR conditions were as follows: denaturation at 94_C for 5 min, followed by 25 amplification cycles; denaturation at 94_Cfor 1 min; annealing at 68_Cfor 1 min; and extension at 72_C for 1 min. Cycle 25 contained an additional extension at 72_C for 20 min. The final product of Nested-PCR was a 291 bp fragment of the Lac-Z gene. For each 20 embryos, the negative controls for the b-Casein and Lac-Z genes were deionized H2O and normal (nontransgenic) caprine IVF embryos, respectively.

Statistical Analysis

Cleavage and blastocyst rates were modeled by ArcSin transformation and the transformed data were analyzed by one-way ANOVA using SPSS version 17 (SPSS Science, Chicago, IL). Differences were compared by the Tukey multiple comparison post hoc test. X-Gal staining and PCR data (categorical data) were analyzed with the logistic regression procedure of STATA 9
(College Station, TX). All data were presented as means_SEM and differences were considered significant at $P<0.05$.

Results and discussion

Effects of Exogenous DNA Concentration and Insemination Techniques on In Vitro Developmental Competence

Table 1 represents the overall results of in vitro development of caprine in vitro matured oocytes after insemination with sperm incubated with different concentrations of DNA, in comparison with non-DNA incubated sperm (control). The in vitro developmental competency of the oocytes in sham group is also shown in Table 1.

The cleavage and blastocyst rates for different doses of DNA (0, 50, 100, 200, and 500 ng) were similar, and there were no significant differences between these DNA doses in the IVF, motile sperm-ICSI, live-immotile sperm-ICSI, dead sperm-ICSI, or sham groups (Table 1) which is in agreement with the reports of Sciamanna et al. (2000) in mice. In addition, these authors reported that lethal effect of high DNA dose appeared immediately after implantation.

Transgene Expression

For transgene detection, embryos from each group that reached the morula or blastocyst stage by day 8 of in vitro culture were selected, washed in PBS containing 1 mg/ml PVA, fixed in 0.25% glutaraldehyde, and finally incubated in X-Gal staining buffer. Stained embryos with at least one dark blue blastomere were regarded as positive for Lac-Z gene expression (Fig. 1). As shown in Table 2, from 319 stained embryos in the IVF group (morula=186, blastocyst=133), none (0.0%) at any of the DNA concentrations were positive for Lac-Z expression. Similarly, in the motile sperm ICSI group, none of the DNA dosages resulted in Lac-Z expression in the stained embryos (morula=123, blastocyst=85).

However, after injection of DNA-incubated, live-immotile sperm, all concentrations of DNA were able to produce transgenic embryos, detected by their dark blue appearance.

Accordingly, the percentages of X-Gal positive embryos for sperm incubated with 50, 100, 200, and 500 ng DNA were 4.04%, 5.88%, 9.52% and 6.94%, respectively; which were insignificantly different between these groups. With the exception of 50 ng DNA, transgenic embryos were obtained when the dead sperm were used for incubation with the other DNA doses. X-Gal staining of 188 embryos produced through sham injection-parthenogenesis (morula=112, blastocyst=76) did not reveal expression of Lac-Z gene in any of the DNA concentration (Table 2).

Single Embryo PCR

The lack of expression of a gene does not disprove its presence. Therefore, to address the effects of different strategies of in vitro embryo production and DNA concentration on the efficiency of transgene transmission, single embryo PCR was randomly carried out on both X-Gal positive and negative embryos. Within the motile-ICSI group, there was no significant
difference between the percentages of PCR positive embryos produced from different dosages of DNAincubated with sperm. In oocytes injected with live-immotile sperm, the percentages of PCR positive embryos that developed after incubation with 50, 100, 200, and 500 ng DNA were
50.0%, 63.6%, 53.6%, and 58.3%; whereas, those that developed after injection with dead sperm were 58.6%, 41.9%, 68.2%, and 47.8%, respectively. There was no significant difference with different DNA doses within each group (Table 3).
Single embryo PCR analysis of 104 embryos produced through sham injection-parthenogenesis (morula=67, blastocyst=37) did not indicate the presence of Lac-Z gene
in any concentrations of DNA used (Table 3).

Effect of Different Embryo Production Techniques, on the Embryo Development, Transgene Expression and Transmission Rates

In order to provide a better comparison between the different embryo production techniques used in this study; the results of in vitro embryo production, transgene expression and transmission rates for different DNA doses were pooled (since no statistical difference was observed with different doses) for statistical analysis. As shown in Figure 2, parthenogenetic activation of the sham group resulted in significantly greater cleavage rate (95.6%). The blastocyst rate (33.9%) in this group was also significantly greater than the other groups, with the exception of the IVF group (27.6%). On the other hand, the dead ICSI group produced the lowest blastocyst rate (13.3%), which was significantly lower than all the other groups, except the motile ICSI group (19.0%). While the IVF, motile-ICSI, and sham groups were totally incapable of producing transgenic embryos, the live immotile ICSI group produced the highest percentages of transgenic embryos (6.5%) which was significantly greater than the dead ICSI group (2.6%). PCR analysis of embryos revealed that while none of the embryos in the sham group were PCR positive, 79.6% of tested embryos in the IVF group werePCRpositive, a rate significantly greater than the other groups. Analysis of embryos produced through ICSI with the introduction of live-immotile and dead sperm revealed that 56.0% and 53.3% of the tested embryos were PCR positive respectively, which were not significantly different with each other, but were significantly higher than the related rates of motile sperm (29.6%) and sham (0.0%) groups.
In conclusion, the results of this study may be regarded as a proof of principle for caprine transgenesis through the SMGT approach. Moreover, it was shown that the concentrations
of DNA used for sperm co-incubation, the methods of insemination, and more importantly, the status of sperm before and after co-incubation with DNA, have paramount effects on the efficiency of SMGT in caprine. Therefore, intracytoplasmic injection of live, but immotile, sperm selected after incubation

with 200 ng exogenous DNA followed by chemically assisted activation may be presented as the method of choice for the caprine species.

References

1. De-Oliveira, NM., R.V. Sanchez, SR. Fiesta, TL. Salgado, R. Rodriguez, JCA. Bethencourt, RB. Zamora. 2004. Pregnancy with frozenthawed and fresh testicular biopsy after motile and immotile sperm microinjection, using the mechanical touch technique to assess viability. Human Reproduction 19:262–265.
2. Forouzanfar, M., M. Sharafi, SM. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, HR. Rahmani, MH. Nasr-Esfahani. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean
3. lecithin-based extenders for cryopreservation of Ram semen. Theriogenology 73:480–487.
4. Nasr-Esfahani, MH., MR. Deemeh, M. Tavalaee. 2010. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility 94(2):520-6..
5. Niemann, H., WA. Kues. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. Animal Reproduction Science 79:291–317.
6. Sciamanna, I., S. Piccoli, L. Barberi, G. Zaccagnini, AR. Magnano, R. Giordano, P. Campedelli, C. Hodgson, R. Lorenzini, C. Spadafora. 2000. DNA dose and sequence dependence in sperm-mediated gene transfer. Molecular Reproduction and Development 56:301–305.

TABLE 1. Effects of Various Embryo Production Techniques, Sperm Status and Different Concentrations of Exogenous DNA Incubated With Spermatozoa on Developmental Competence of In Vitro Produced Caprine Oocytes

	IVF		Motile ICSI		Live-immotile ICSI		Dead ICSI		Sham injection	
[DNA]	Cleavage %	Blastocyst %	Cleavage %	Blastocyst %	Cleavage %	Blastocyst %	Cleavage %	Blastocyst %	Cleavage %	Blastocyst %
0	89.8 ± 1.3	33.4 ± 5.6	92.2 ± 2.8	21.5 ± 1.7	94.0 ± 1.5	25.3 ± 3.9	91.9 ± 2.3	16.9 ± 3.2	98.3 ± 1.2	38.5 ± 2.1
50	81.0 ± 4.2	30 ± 3.2	87.7 ± 3.8	15.0 ± 8.1	90.3 ± 2.2	20.8 ± 2.2	87.4 ± 2.9	9.4 ± 2.7	96.0 ± 1.6	30.0 ± 1.7
100	83.8 ± 2.7	30 ± 5.0	85.0 ± 5.9	19.3 ± 1.8	88.7 ± 5.5	21.8 ± 5.9	91.0 ± 4.3	13.0 ± 2.7	93.8 ± 1.7	34.8 ± 3.0
200	83.7 ± 3.6	20.2 ± 1.5	91.0 ± 2.1	18.5 ± 6.7	84.8 ± 3.0	29.5 ± 6.1	88.8 ± 3.5	16.1 ± 2.7	96.0 ± 2.4	31.0 ± 6.4
500	77.8 ± 7.0	25.4 ± 5.6	83.0 ± 4.4	20.0 ± 2.6	88.6 ± 4.3	26.2 ± 7.2	89.3 ± 3.3	11.7 ± 2.3	94.0 ± 1.5	35.0 ± 3.9

Within each column, no significant difference was observed between values compared at $P < 0.05$.[DNA]: ng plasmid per 10^6 sperm.

TABLE 2. Effects of Various Embryo Production Techniques, Sperm Status and Different Concentrations of Exogenous DNA Incubated With Spermatozoa on Lac-Z Expression Efficiency

	%X-Gal positive embryos [NO.]				
DNA	IVF	Motile ICSI	Live-immotile ICSI	Dead ICSI	Sham injection
50	0 [91]	0 [56]	4.0 ± 2.0 [99]	0.0 [92] a	0 [43]
100	0 [64]	0 [43]	5.9 ± 2.6 [85]	5.2 ± 2.3 [96] b	0 [52]
200	0 [92]	0 [57]	9.5 ± 3.2 [84]	3.8 ± 2.2 [78] b	0 [46]
500	0 [72]	0 [52]	6.9 ± 3.0 [72]	1.2 ± 1.2 [83] b	0 [47]

Within each column, values with at least one different letter are significantly different.[DNA]: ng plasmid per 10^6 sperm.[NO.]: Total number of X-Gal stained embryos.

TABLE 3. Effects of Various Embryo Production Techniques, Sperm Status and Different Concentrations of Exogenous DNA Incubated With Spermatozoa on Stable Transgene Transmission up to 8 days of In Vitro Embryo Culture

	%PCR positive embryos [NO.]				
DNA	IVF	Motile ICSI	Live-immotile ICSI	Dead ICSI	Sham injection
50	65.5 ± 9.0 [29]	25.9 ± 8.6 [27]	50 ± 10.0 [26]	58.6 ± 9.3 [29]	0 [22]
100	88.2 ± 8.1 [17]	38.1 ± 10.9 [21]	63.6 ± 10.5 [22]	41.9 ± 9.0 [31]	0 [29]
200	80.9 ± 8.8 [21]	23.5 ± 7.4 [34]	53.6 ± 9.6 [28]	68.2 ± 10.2 [22]	0 [27]
500	90.5 ± 6.6 [21]	34.6 ± 9.5 [26]	58.3 ± 10.3 [24]	47.8 ± 10.7 [23]	0 [26]

Within each column, no significant difference was observed between values compared at $P < 0.05$. [DNA]: ng plasmid per 10^6 sperm. [NO.]: Total number of PCR analyzed embryos.

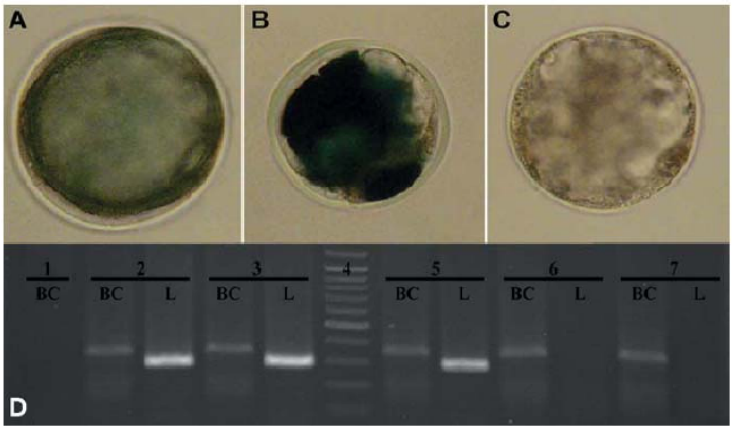


Figure 1. Transgene detection in embryos produced by sperm-mediated gene transfer. **A–C**: Detection of transgene expression in embryos by X-Gal staining. A: Lac-Z gene (transgene) expressing blastocyst, B: a mosaic Lac-Z gene expressing morula, and C: a completely negative Lac-Z gene expressing blastocyst. **D**: Genomic PCR on single caprine morula\blastocyst embryos. Detection of 351 bp fragment of the goat β-Casein gene (endogenous gene) labeled as BC, detection of 291 bp fragment of Lac-Z gene (transgene) labeled as L. Number: (1) dH_2O as a negative control, (2) Lac-Z expressing embryo (like embryo in Fig. 1A), (3) a mosaic Lac-Z expressing embryo (like embryo in Fig. 1B), (4) 100 bp DNA ladder, (5) completely negative Lac-Z expressing embryos (like embryo in Fig. 1C) that is, however, positive for the presence of the Lac-Z gene, (6 and 7) completely negative Lac-Z expressing embryos (like embryo in Fig. 1C) also negative for presence of Lac-Z gene.

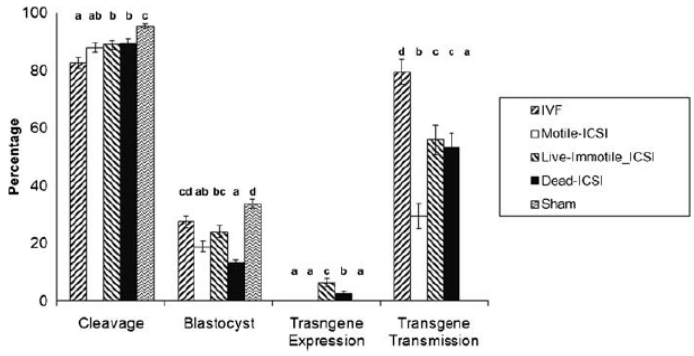


Figure 2. Effects of the in vitro embryo production technique and status of DNA-incubated sperm [in vitro fertilization (IVF) vs. intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with motile (motile-ICSI), live-immotile (live-immotile-ICSI), and dead spermatozoa (dead-ICSI) vs. parthenogenetic activation of sham-injected oocytes, which were injected with DNA-containing medium in the absence of sperm, (Sham)] on in vitro development, transgene expression and transmission, in the resultant caprine embryos.

بیان ژن کیس ـ ۱ در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش صحرایی

محمد سعید صالحی*[۱]؛ محمد رضا جعفرزاده شیرازی[۲]؛ محمد جواد ضمیری[۲]؛ فرید پژوهی[۱]؛ محمد رضا نام‌آور[۳]؛ علی نیازی[۴]؛ امین رمضانی[۴]؛ نادر تنیده[۵]؛ امین تمدن[۶]

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ۲ـ بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ۳ـ مرکز تحقیقات هیستومورفومتری و استریولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۴- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز ۵ـ مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک و گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۶ـ گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانس‌ژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

* نویسنده مسئول: محمد سعید صالحی، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، صندوق پستی: ۶۵۱۸۶-۷۱۴۴۱ sisas33@gmail.com

چکیده

کیس‌پپتین‌ها، خانواده‌ای از پپتیدهایی هستند که به وسیله ژن KiSS-1 بیان می‌شوند و از راه GnRH سبب تحریک آزادسازی LH می‌شوند. هدف از این پژوهش، بررسی الگوی بیان KiSS-1 mRNA در مغز موش صحرایی، در گامه‌های چرخه فحلی بود. داین‌سفالن ۱۵ موش صحرایی بالغ ماده پس از تعیین گامه فحلی، خارج و در نیتروژن مایع پودر شد. با به کار گیری Real time PCR، میزان بیان KiSS-1 mRNA در هر گامه ی چرخه فحلی تعیین شد. کمترین سطح بیان KiSS-1 mRNA در داین‌سفالن موش‌های صحرایی در گامه استروس (فحلی) مشاهده شد ($P<0/05$) اما سطوح KiSS-1 mRNA در دیگر گامه‌ها، همانند بود ($P>0/05$). به نظر می رسد برآیند فعالیت نورون‌های کیس‌پپتین در هسته‌های هیپوتالاموس، تراوش گونادوتروپین‌ها را در سراسر چرخه فحلی کنترل می کنند.

واژگان کلیدی: کیس پپتین، چرخه فحلی، هیپوتالاموس، موش صحرایی

مقدمه

اگرچه به شیوه کلاسیک، تراوش هورمون آزادکننده گونادوتروپین (GnRH) از نورون‌های GnRH هیپوتالاموس، به عنوان رخداد آغاز فعالیت‌های تولیدمثلی و هدایتگر محور گونادی در نظر گرفته می‌شود، اما شواهد جدید نشان داده اند که سیستم KiSS-1/GPR54[1] در پله-های بالاتری از نردبان تولیدمثلی عمل می‌کند و با انگیرش نورون‌های GnRH، موجب تحریک تراوش هورمون لوتئینیزه کننده (LH) می‌شود. کیس‌پپتین‌ها، خانواده‌ای از پپتیدهایی هستند که به وسیله ژن KiSS-1 بیان می‌شوند و گیرنده G پروتین ۵۴[2] را فعال می‌کنند. تاثیر کیس‌پپتین بر LH، با آنتاگونیست GnRH خنثی شد که نشان می‌دهد کیس‌پپتین از راه GnRH سبب تحریک آزاد سازی LH می شود (Roa et al., 2009). این پژوهش بر این فرضیه استوار بود که ممکن است میزان بیان کیس‌پپتین در گامه‌های گوناگون چرخه فحلی موش

---

[1]- G protein-coupled receptor
[2]- GPR54

صحرایی متفاوت باشد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی الگوی بیانKiSS-1 mRNA در گامه‌های چرخه فحلی، در مغز موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، از ۱۵ موش صحرایی (*Rattus norvegicus*) بزرگسال استفاده شد. موش‌های صحرایی پس از تعیین گامه های چرخه فحلی (بررسی میکروسکپی اسمیر واژن) با روش جابجایی مهره‌های گردن کشتار شدند (سه موش صحرایی در هر گامه). سه موش صحرایی نیز ۱۵ روز پس از تخمدان برداری کشتار شدند (به عنوان گروه شاهد). سپس مغز هر جانور بی‌درنگ خارج و بخش داین‌سفالن در نیتروژن مایع یخ زده شد و تا زمان انجام RT-PCR در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. استخراج RNA، تیمار با آنزیم DNase I جهت حذف آلودگی‌های ژنومی و سنتز رشته اول cDNA (همگی توسط کیت‌های شرکت فرمنتاز و مطابق دستورالعمل) انجام گرفت. برای طراحی پرایمر ژن KiSS-1 (NM_181692) و ژن کنترل داخلی GAPDH (M32599) از نرم‌افزار ALLELEID 6 استفاده شد. واکنش Real Time PCR به صورت مقایسه‌ای (Relative) با ۴۰ سیکل و دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد انجام و با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان محاسبه شد:

CT GAPDH) OVX− (CT KiSS-1 − CT GAPDH) phase −ΔΔCt = (CT KiSS-1

میانگین و انحراف معیار بیان مقایسه‌ای ژن‌های KiSS-1 در گامه‌های فحلی در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی با آزمون من ـ ویتنی مقایسه شد (نرم افزار SPSS).

نتایج و بحث

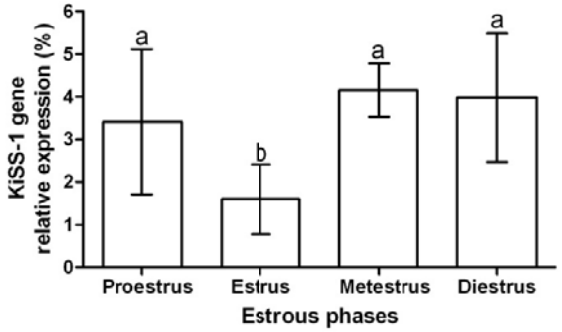
کمترین سطح بیان KiSS-1 mRNA در داین‌سفالن موش‌های صحرایی در گامه استروس مشاهده شد و سطوح KiSS-1 mRNA در دیگر گامه‌ها، همانند بود (P<۰/۰۵؛ نگاره ۱). پژوهش‌های پیشین نشان دادند که پپتید و mRNA کیس‌پپتین در دو جمعیت نورونی عمده در هسته آرکوات و هسته پیرا بطنی جلویی ــ شکمی[1] (AVPV) هیپوتالاموس جوندگان تمرکز یافته است (Kauffman et al., 2007). تخمدان برداری موجب افزایش معنی‌دار KiSS-1 mRNA در هسته آرکوات هیپوتالاموس می شود و ممکن است نورون‌های کیس‌پپتین این هسته میانجی اثر فیدبکی منفی استروژن بر تراوش گونادوتروپین باشند. بر خلاف هسته آرکوات، بیان KiSS-1 mRNA در هسته AVPV پس از تخمدان‌برداری کاهش و با ایمپلانت استرادیول افزایش می یابد و این احتمال مطرح شده که هسته AVPV ممکن است در ایجاد سرژ پیش از تخمک‌ریزی GnRH/LH نقش داشته باشد (Smith et al., 2005). در سال ۲۰۰۷، بیان KiSS-1 mRNA هسته آرکوات و AVPV در گامه‌های مختلف چرخه فحلی موش صحرایی بررسی شد (Adachi et al., 2007). بر پایه آن گزارش، سطوح KiSS-1 mRNA در AVPV در بعد از ظهر پرواستروس بیشینه و در مت استروس کمینه بود. از سوی دیگر، سطوح بیان KiSS-1 mRNA در آرکوات در دای استروس حداکثر و در پرواستروس حداقل بود و نظر می‌رسد در طول چرخه فحلی، بیان کیس-پپتین از گامه پرواستروس تا دای‌استروس به تدریج افزایش می‌یابد. نتایج پژوهش کنونی نشان داد بیKiSS-1 mRNA داین‌سفالن در گامه پرواستروس بالا بود (P<۰/۰۵)؛ از آنجایی که در این گامه بیان ژن در هسته AVPV زیاد و در آرکوات کم است چنین نتیجه‌ای منطقی به نظر می‌رسد. کمترین سطوح بیان ژن در گامه استروس مشاهده شد که با پایین بودن بیان ژن در هر دو هسته، سازگار است. در گامه های

[3]-Anteroventro-periventricular nucleus

متاستروس و دای استروس نیز سطوح بالایی از KiSS-1 mRNA مشاهده شد که با بالا بودن بیان ژن در هسته آرکوات در این دو گامه هماهنگی دارد. در پایان می‌توان گفت ممکن است برآیند فعالیت نورون‌های کیس‌پپتین هسته آرکوات و AVPV در برقراری الگوی تراوش GnRH/LH در سراسر چرخه فحلی نقش داشته باشد.

منابع

1. Adachi, S., S. Yamada, Y. Takatsu, H. Matsui, M. Kinoshita, K. Takase, H. Sugiura, T. Ohtaki, H. Matsumoto, Y. Uenoyama, H. Tsukamura, K. Inoue, K. Maeda. 2007. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. Journal of Reproduction and Development, 53:367–378.
2. Kauffman, A.S., M.L. Gottsch, J. Roa, A.C. Byquist, A. Crown, D.K. Clifton, G.E. Hoffman, R.A. Steiner, M. Tena-Sempere. 2007. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. Endocrinology, 148:1774-1783.
3. Roa, J., J.M. Castellano, V.M. Navarro, D.J. Handelsman, L. Pinilla, M. Tena-Sempere. 2009. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. Peptides, 30:57-66.
4. Smith, J.T., M.J. Cunningham, E.F. Rissman, D.K. Clifton, R.A. Steiner. 2005. Regulation of kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. Endocrinology, 146:3686-3692.



نگاره ۱ـ میانگین (± انحراف معیار) بیان نسبی ژن KiSS-1 در گامه‌های چرخه فحلی، در هیپوتالاموس موش صحرایی (n=۳). میانگین های دارای بند واژه ی همانند، تفاوت آماری معنی داری ندارند (P>0.05).

Expression of KiSS-1 genes in hypothalamus of rat during estrous cycle

Mohammad Saied Salehi [1,*], Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi [2], Farid Pazhoohi [1], Mohammad Javad Zamiri [2], Mohammad Reza Namavar [3], Ali Niazi [4], Amin Ramazani [4], Nader Tanideh [5], Amin Tamadon [6]

1- Graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 2- Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University, 3- Histomorphometry and Stereology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 4- Biotechnology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, 5- Stem Cell and Transgenic Technology Research Center & Department of Pharmacology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, 6- Division of Animal Health Management, School of Veterinary Medicine, Shiraz University & Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

*** Corresponding author: sisas33@gmail.com**

Abstract

Kisspeptins belong to a family of peptides which are expressed by KiSS-1 gene and through GnRH stimulate LH release. The aim of the present study was to evaluate the expression pattern of KiSS-1 mRNA during various phases of estrous cycle in the rat brain. the diencephalons of 15 female mature rats during various phases of estrous cycle were powdered in liquid nitrogen. Real time PCR was performed on tissue samples and expression of KiSS-1 mRNA was determined. Expression Kiss-1 mRNA was lowest during estrus compared with other phase of the cycle ($P<0.05$); however, no significant difference was found between mRNA expression during met-estrus, diestrus and pro-estrus. It may be concluded that co-ordinated actions of kisspeptin in various hypothalamic neuclei control the secretion of GnRH during estrous cycle.

In the present study, the expression level of KiSS-1 mRNA in diencephalon of rats was the least ($P<0.05$) and levels of KiSS-1 mRNA in other phases were the same ($P>0.05$). In conclusion it can be stated that resultant function of kisspeptin neurons in hypothalamic nucleus control the gonadotropins secretion during estrous cycle.

Keywords: KiSS-1, Estrous cycle, Hypothalamus, Rat

بررسی چندشکلی در دو جایگاه ژن STAT1 در گاوهلشتاین استان اصفهان

غلامحسین عسکری*[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، قدرت رحیمی میانجی[۳]،زربخت انصاری[۳]
۱ و ۳ – دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی و اعضا هیات علمی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
عضو هیات علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

mohsen4794@yahoo.com*

چکیده:

این مطالعه جهت بررسی وجود چندشکلی و محاسبه فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن STAT1 درگاوهای هلشتاین استان اصفهان صورت گرفت. STAT، پروتئینی از فاکتورهای رونویسی است که سیگنالهای بیولوژیک را از فضای خارج به داخل هسته عبور می‌دهد. ژن STAT1 در کروموزوم شماره ۲ در بازوی q و در موقعیت ۲q۳۲,۲ قرار دارد و دارای ۲۰ اینترون و ۱۹ اگزون است.در این مطالعه از ۳۵۰ راس گاو هلشتاین مربوط به پنج گاوداری این استان، پس از جمع آوری نمونه های خون، DNA ژنومی به روش نمکی بهینه استخراج گردید. سپس روی نمونه ها PCR انجام شد و محصولات حاصل از PCR در حضور آنزیم Pag1 مورد هضم قرار گرفتند. در این مطالعه دو جایگاه از ژن مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت که در یکی از جایگاه ها هیچگونه چند شکلی مشاهده نشد و در جایگاه دیگر ژنوتیپ‌های BB ، CC ، DD ، AC ،AB، BC، BD، CD با فراوانی‌های به ترتیب ۰/۰۹۹۹ ،۰/۰۸۵۶، ۰/۰،۰۵۱۴/۲۸۵، ۰/۰۰۸۵، ۰/۰۰۸۵/۰۳۴۱،۰/۰،و ۰/۴۲۷ مورد شناسایی قرار گرفتند. فراوانی آللی نیز برای A ، B ، C و D به ترتیب ۰/۰۲۹۸ ، ۰/۱۲۵ ، ۰/۳۴۲ و ۰/۵۰۳۲ به دست آمد. براساس نتایج بدست آمده جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار نداشت (p‹۰/۰۰۰۱).

کلمات کلیدی: چند شکلی، STAT1، گاو هلشتاین، RFLP_PCR

مقدمه

STAT [۱]، به عنوان یک تنظیم کننده در بیان و چگونگی فعالیت ژن های مرتبط عمل می‌کند (Weiguo and Hershei., 2007). بر اساس گزارشات منتشر شده، خانواده‌ی STAT گاوی، دارای ۷ عضو بوده که شامل:STAT1، STAT2، STAT3، STAT4، STAT5A، STAT5B و STAT6 می‌باشند (Cobanoglu et al., 2006). دو عضو STAT1وSTAT4 روی کروموزوم شماره دو و سه عضو STAT5B, STAT5A وSTAT3 روی کروموزوم شماره ۱۹ و یک عضو STAT6 روی کروموزوم شماره پنج قرار دارند. لازم به ذکر است STAT2 هنوز نقشه‌یابی نشده است (Durbin et al., 1996). ژن STAT1 در کروموزوم شماره ۲ در بازوی q و در موقعیت ۲q۳۲,۲ قرار دارد و دارای ۲۰ اینترون و ۱۹ اگزون است. یکی از رایج و اصلی‌ترین محدوده‌های فعالیت پروتئین STAT1، فعالیت وابسته به رونویسی STAT1 به عنوان بازدارنده تولید اینترفرونIFN [۲] برای جلوگیری از رشد بیش از حد سلول است. این احتمال وجود دارد که از دست دادن پروتئین STAT1 به هر دلیل باعث شیوع بیماری سرطان، به علت اختلال در مسیر کنترل منفی رشد سلولی می‌شود (levy and Gilliland., 2000). پژوهش‌های انجام شده نشان دادند که در موش کاهش STAT1 بر ابقای

---

[۱] - Signal Transducer and Activator of transcription

۲- interfron

لنفوسیت و افزایش آن در پاسخ به IFN تأثیر گذار است (Lee et al., 2000). همچنین موشهای دارای STAT1 با فعالیت ناکارآمد یا ناقص، نسبت به عفونت‌ها و آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی بسیار حساس‌تر هستند (Gavrilescu et al., 2004). اهمیت این پروتئین‌ها از نقطه نظر علم پرورش دام در تمایز، رشد و تکامل غدد پستانی می‌باشد (Watson and Neoh., 2008).

گزارش شده است که عامل STAT از راه های مختلفی در تمایز غدد پستانی موثر می‌باشد اما چون STAT1 طی تنظیم تکامل غدد پستانی نسبت به دیگر انواع STAT، مانند نوع ۳ و ۵، الگوی متفاوتی را نشان می‌دهد لذا تشخیص این موضوع که کدام STAT در غدد پستانی و در تنظیم پیشرفت و توسعه آن بیان می‌شود بسیار مهم است. با بررسی mRNA های به‌دست آمده از غدد پستانی در روزهای۷ ،۱۳و۱۶ آبستنی و روزهای ۱ و ۱۴ شیردهی به این نتیجه رسیدند که بیان STAT1 وSTAT3 در خلال دوره، ثابت بوده اما بیان STAT4 و STAT5 در طول تمایز غدد پستانی روی داده و متناسب با آن می‌باشد (Watson., 2001). نتایج مطالعات روی اثر STAT1 در سلولهای سوماتیک شیر که یک شاخص برای سلامتی غدد پستانی در گاو است با گزارش‌های مشابه در انسان و موش متناظر بوده و گزارش شده است که این ژن در این شاخص هم موثر است.

موادوروش ها:

خون گیری واستخراج DNA: پس از ارزیابی اولیه گله های تجاری شیری در سطح استان اصفهان به طور تصادفی ۳۵۰ رأس گاو هلشتاین ازپنج گاوداری انتخاب و از آن‌ها نمونه خون تهیه و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی منتقل گردید. نمونه ها درلوله های ونوجکت[1] حاوی ۵۰ میلی مول EDTA ریخته و فریز شدند. پس از یخ‌گشایی، DNA ژنومی به روش نمکی بهینه ازسلول‌های لکوسیت استخراج گردید و با استفاده از ژل آگاروز ۰/۷ درصد، DNA ازلحاظ کمیت وکیفیت موردارزیابی قرارگرفت.

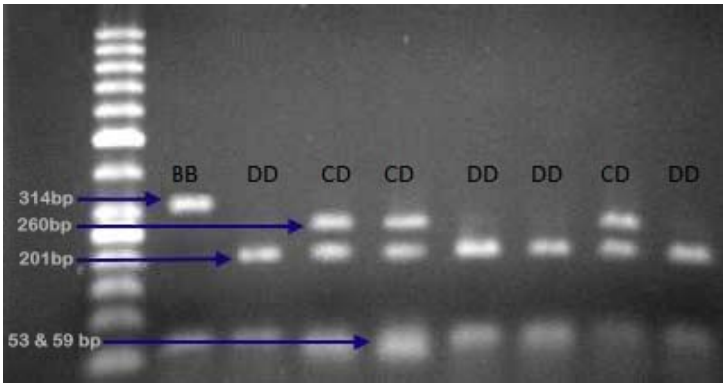
تکثیرقطعه موردنظر بوسیله PCR: واکنش PCR جهت تکثیر قطعه ۳۱۴ جفت بازی موردنظر با استفاده ازآغازگر F:5-GCCTCAAGTTTGCCAGTGGC-3 برای رفت و آغازگر R: 5-GGCTCCCTTGATAGAACTGT-3 برای برگشت صورت پذیرفت. شرایط واکنش PCR، برای جایگاه موردمطالعه به صورت زیر است: ۲میکرولیتردی ان آ، ۲میکرولیتر بافر پی سی آر ۱X، ۰/۷میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰میلی مولار، ۱/۵میکرولیتر از هر آغازگر، ۲۵۰ میکرومولار dNTPs و ۰/۵میکرولیترآنزیم TaqDNA پلیمراز و برای رسیدن به حجم موردنظر از آب مقطر استفاده شد. مراحل واکنش شامل واسرشته سازی ابتدایی دردمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵دقیقه، ۳۵سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت۳۰ ثانیه جهت واسرشته سازی، دمای ۶۳درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و۳۰ثانیه دردمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی شامل ۱۰ دقیقه دردمای ۷۲درجه سانتیگراد انجام گرفت. جهت صحت قطعه بدست آمده ازمحصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول را با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری (۶X) مخلوط شد و بر روی ژل آگاروز ۱,۵ درصد الکتروفورز شد و با رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد تائید و ارزیابی قرار گرفتند. از نشانگر وزنی M100 برای تشخیص اندازه قطعه مورد نظر استفاده گردید.

واکنش PCR برای جایگاه دیکر با استفاده از آغازگر 5'-ATGCGAAGAACTGACTCAACTGG-3' برای رفت و 5'-GTGCCCTTCAGAACTGTTTCAGG-3' برای برگشت صورت گرفت. شرایط واکنش PCR مشابه شرایط بیان شده بود و تنها دمای واسرشته سازی متفاوت بود و برابر ۶۲ درجه سانتیگراد بود. بررسی این جایگاه با روش PCR-SSCP انجام گرفت.

---

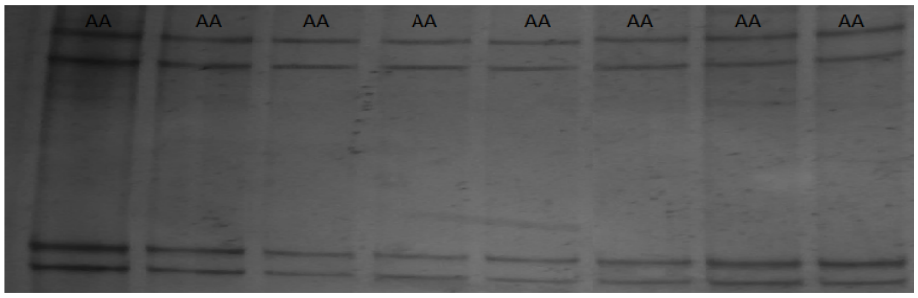
[1]- venoject

تعیین ژنوتیپ: دربررسی چند شکلی ژن STAT1 از آنزیم محدودگر Pag1 استفاده شد. جهت هضم آنزیمی، حجم نهایی واکنش ۲۰میکرولیتر در نظرگرفته شد. میزان محصول پی سی آر، آنزیم و بافرآنزیم مورد استفاده برای هضم به ترتیب ۱۲،۵/۰و۲ میکرولیتردرنظرگرفته شد و با استفاده از آب مقطر حجم نهایی به۲۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه ها در بن‌ماری و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۱۲ ساعت قرارگرفته و سپس نمونه ها روی ژل آگاروز۲ درصد الکتروفورز شد و برای تشخیص اندازه باندها، از نشانگر وزنی ۵۰bp استفاده شد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، محصولات هضم مورد شناسایی قرارگرفته شد. (شکل ۱) و با توجه به اینکه این آنزیم برشی اختصاصی ما دارای دو جایگاه برش در طول محصول پی سی آر بود تعداد ژنوتیپ‌های زیادی مشاهده شد بررسی وفور ژنی و ژنوتیپی با شمار مستقیم ژنوتیپ‌ها انجام پذیرفت. پس از بررسی هر ژل، بر اساس اختلاف در اندازه قطعات روی ژل نام گذاری زنوتیپ انجام گرفت.



شکل ۱ محصول هضم آنزیمی

در جایگاه دوم پس از بررسی های انجام شده هیچ گونه چند شکلی مشاهده نشد و تمامی نمونه ها یک شکل بودند.(شکل۲)



نتیجه آزمون PCR-SSCP قطعه ۳۲۱ جفت بازی از ژن STAT1 در نژاد هلشتاین

نتایج و بحث

محصول واکنش PCR قطعه ای به اندازه ۳۱۴ جفت باز است که روی ژل آگاروز ۱،۵ درصد مورد شناسایی قرارگرفت. الگوهای ژنوتیپی حاصل ازهضم، با توجه به اینکه این آنزیم برشی اختصاصی ما دارای دو جایگاه برش در طول محصول پی سی آر بود حاکی از وجود

دونوع آلل A و B درجایگاه اول برش آنزیم و C و D در جایگاه دوم برش آنزیمی بود. به این صورت که برش در جایگاه اول با آلل A و عدم برش با آلل B نشان داده می‌شود و در جایگاه برش دوم ایجاد برش توسط آنزیم برشی با آلل C و عدم برش با آلل D نشان داده می‌شود. ودر پایان فراوانی ژنی و ژنوتیپی برای ژنوتیپ‌ها و آلل‌های موجود محاسبه شد که به این صورت بود ژنوتیپ‌های BB ، CC ، DD ، AC ، AB، BC، BD، CD با فراوانی‌های به ترتیب ۰/۰۹۹۹ ،۰/۰۸۵۶، ۰/۰،۰۵۱۴/۲۸۵، ۰/۰۰۸۵، ۰/۰۰۸۵/۰۳۴۱،۰/۰،و ۰/۴۲۷ مورد شناسایی قرار گرفتند. فراوانی آللی نیز برای A ، B ، C و D به ترتیب ۰/۰۲۹۸ ، ۰/۱۲۵ ، ۰/۳۴۲ و ۰/۵۰۳۲ به دست آمد. **براساس آزمون مربع کای نتایج بدست آمده نشان دادند جمعیت مورد مطالعه از نظر ژن** STAT1 **در تعادل هاردی- واینبرگ قرار نداشت (۰/۰۰۰۱>p)**.

منابع:

1- Cobanoglu, O., I. Zaitoun, Y.M. Chang, G.E. Shook and H. Khatib. (2006). Effects of the signal transducer and activator of transcription 1 (*STAT1*) gene on milk production traits in Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science., 89: 4433-4437.

2- Durbin, J.E., R.E. Hackenmiller, M.C. Simon and D. E. Levy. (1996). Targeted disruption of the mouse STAT1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. Cell, 84: 443-450.

3- Gavrilescu, L.C., B.A. Butcher, L.D. Rio, G.A. Taylor and E.Y. Denkers. (2004) . STAT1 is essential for antimicrobial effector function but dispensable for gamma interferon production during Toxoplasma gondii infection. Infection and Immunity, 72: 1257-1264.

4- Lee, CK, E. Smith, R. Gimeno, R. Gertner, and DE. Levy. (2000). Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice .Journal of Immunology. 164: 1286-1292.

5- Watson, C.J. and K. Neoh. (2008). The STAT family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. Seminars in cell & developmental biology, 19: 401-406.

6- Weiguo, C., K. Gurjit and K. Hershey. (2007). Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. Journal Allergy Clinical Immunul., 119: 521-549.

Polymorphism study in STAT1 gene at two positions in Holstein cows of Isfahan province

Gholamhosain Askary*[1], Saeid Ansari Mahyari[2], Ghodrat Rahimimianji[3],Zarbakht Ansari[3]

1, 3- Department of Animal Science, University of Agriculture Sciences and Natural Resources of Sari

2- Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

Mohsen4794@yahoo.com*

Abstract

This experiment was performed to study a mutation in STAT1 gene and calculate allelic and genotypic frequencies. The STAT1 gene is one of a series of the genes which passes biological signals from out of nucleus into the inner parts. This factor has a regulator action in the gene expression and function. STAT1 is located on chromosome-2 at 2q32.2 containing 20 introns and 19 exons. Three hundred fifty blood samples were collected from Holstein cattle herds and DNA was extracted using modified salting out method. Two positions were studied. One fragment with 321bp polymerase chain reaction (PCR) products was studied but polymorphism was not observed. Another fragment with 314bp by specific

primer pairs was studied and PCR products were electrophorsed. RFLP method was used to for genotyping and the resultant PCR products were digested by Pag1 enzyme. Genotyping results showed that the genotypes BB, CC, DD, AC, AB, BC, BD, CD with frequencies of 0.0999, 0.0856, 0.0285, 0.0514, 0.0085, 0.0341, 0.0085 and 0.427; and the alleles A, B, C, D with frequencies 0.0298, 0.125, 0.342, 0.5032. *Results showed that in* STAT1 gene *there is not Hardy-Weinberg equilibrium* in this population.

Keywords: Holstein cow, STAT1, SSCP

بررسی تاثیر پلی مورفیسم ژن های اوستئوپونتین (OPN) و کاپاکازئین (KCN)
روی ترکیبات شیر در گاو براون سوئیس

***هادی غلامی[۱]، سونیا زکی زاده[۲]، رضا وکیلی[۳] ،سیما جعفری[۴]**

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر، ۲- استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش جهاد کشاورزی استان خراسان رضوی، ۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر،۴- دانشجوی کارشناسی دانشگاه پیام نور واحد کاشمر

*Hadi.Gholami2008@yahoo.com

چکیده

تحقیقات روی کروموزوم ۶ گاوی نشان داد برخی آلل های ژن های بخش پروتئین شیر با ترکیبات شیر ارتباط دارد. از جمله این ژنها میتوان به اوستئوپونتین (OPN)و کاپا کازئین(KCN) اشاره کرد که آلل های آنها بیشتر با ترکیبات شیر (تولید درصد چربی و درصی پروتئین شیر) در ارتباط است. برای این تحقیق خونگیری از تعداد ۱۰۰راس گاو شیری نژاد براون سوئیس واحد گاو داری مرکز تحقیقات خراسان رضوی به عمل آمد. استخراج DNA با استفاده از استخراج نمکی(salting out) انجام شد و قطعات مورد نظر ژنهایOPN و KCN به‌ترتیب به طول kb 290 و ۳۵۰kb تکثیر شد. هضم آنزیمی با PCR-RLFP صورت گرفت سپس فراوانی آللی و ژنوتیپی این دو ژن تعیین شد. دراین تحقیق تعیین فراوانی های پلی مورفیسم ژنهای اوستئوپونتین و کاپاکازئین، بررسی تاثیر این پلی مورفیسم ها روی تولید و ترکیبات شیر انجام شد. ارزش‌های ارثی دام‌ها برای صفات تولید شیر، درصدهای چربی و پروتئین شیر برآورد گردید. تاثیر پلی‌مورفیسم‌های مورد بررسی روی ارزش‌های ارثی با استفاده نرم‌افزار SAS آنالیزشد. نتایج مشخص نمود که هیچ ارتباط معنی داری بین ارزش ارثی صفات تولید شیر با ژنوتیپ های اوستئوپونتین و کاپاکازئین به صورت مجزا و توأم وجود نداشت.

کلمات کلیدی : اوستئوپونتین، پلی مورفیسم، روش نمکی، کاپاکازئین،PCR-RLFP

مقدمه

ژن اوستئوپونتین در بین ژنهای شناخته شده موثر بر درصد پروتئین شیر بیشترین حد بیان را دارا می باشد. پروتئینی با ۲۷۸ اسید آمینه را کد کرده و روی تولید شیر تاثیر دارد. آلل C این ژن بیشتر روی ترکیبات، درصدپروتئین وچربی شیر وآلل T غالبا روی رشد بدن تأثیر گذار می باشد (لئونارد و همکاران ۲۰۰۵و خطیب و همکاران ۲۰۰۷). کاپاکازئین از جمله ژنهایی است که در ناحیه میکروستلایت BM143 میانه کروموزوم ۶ واقع شده دارای ۵ اگزون می‌باشد و پروتئینی با ۱۶۹ اسید آمینه را کد می کند (زکی زاده و همکاران ۱۳۸۵). رایج ترین آلل های آن A و B می‌باشد که از نظر نوع اسید آمینه در بنیان ۱۳۶ و ۱۴۸ متفاوت هستند. آلل A آن با تولید بالای شیر ودرصد پایین پروتئین شیر و آلل B با تولید پایین شیر ودرصد بالای پروتئین وچربی شیر در ارتباط بود (زکی زاده و همکاران ۱۳۸۵و راجش پاتل و همکاران ۲۰۰۷). اهداف این تحقیق شامل شناسایی پلی‌مورفیسم ژن‌های اوستئوپونتین و کاپاکازئین، تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی، برآورد ارزش ارثی صفات تولیدی و همچنین بررسی ارتباط این پلی‌مورفیسم ها با ارزش ارثی برآورد شده صفات تولید می‌باشد.

موادو روشها

خونگیری از تعداد ۱۰۰ راس گاو شیری نژاد براون سوئیس واحد گاوداری مجتمع آموزش جهادکشاورزی خراسان رضوی از ورید دمی و به طور تصافی به‌عمل آمد. استخراج DNA از ۳ میلی‌لیتر خون کامل و به روش استخراج نمکی انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA اندازه گیری شد. از پرایمر های رفت و برگشت به ترتیب جهت تکثیر قطعه۲۹۰ و ۳۵۰ نوکلئوتیدی ژن استئوپونتین و کاپاکازئین استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت که شامل: نیم واحد آنزیم Taq Polymerase، ۲۰۰ میکرومول از dNTP، ۲۰۰ میلی مول MgCl2 ، 4 تا 10 پیکومولمخلوط آغازگرها، ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA و بافر استاندارد بود. شرایط سیکل‌های دمایی واکنش PCR و هضم آنزیمی ژن اوستئوپونتین طبق روش پیشنهادی(لئونارد و همکاران ۲۰۰۵) و برای ژن کاپا کازئین طبق روش پیشنهادی (زکی زاده و همکاران ۱۳۸۵)انجام شد. با استفاده از نرم افزار (PopGen) فراوانی آللی و ژنوتیپی دو ژن برآورد کردید. با استفاده از مدل دام و مدل یک نرم افزار DFREML پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی برای سه صفت مورد مطالعه (شیر ، درصد چربی و درصد پروتئین) به‌طور جداگانه برآورد شد. مدل مورد استفاده به صورت مقابل بود:

(مدل طرح) $\underline{Y= Xb + Za + e}$

برای بررسی چگونگی ارتباط ارزش ارثی با ژنوتیپ های OPN و KCN و ارتباط پلی مورفیسم های مد نظر باارزش ارثی صفات مورد مطالعه در سطح معنی داری ۵درصد،از رویه GLM (مدل خطی عمومی) نرم افزار SAS استفاده شد. شامل سه مدل: 1) $Yij = \mu + Xi + e\ ij$ 2) $Yij = \mu + X1j + X2j + e\ ij$ 3) $Yij = \mu + X1j2j + e\ ij$

۱- فقط ژنوتیپ یک ژن ۲- ژنوتیپ هردو ژن بصورت مجزا ۳- ژنوتیپ توأم دو ژن

در مدل سوم ژنوتیپ‌های OPN و KCN با هم و از ژنوتیپ ۱ تا ۹ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز صحت تکثیر قطعات ۲۹۰ و ۳۵۰ را به ترتیب برای ژن استئوپونتین و کاپاکازئین را نشان داد (شکل ۱). قطعه ۲۹۰ جفت بازی استئوپونتین توسط آنزیم محدودالاثر *Bsr I* و همچنین قطعه۳۵۰ جفت بازی کاپاکازئین توسط آنزیم *Hinf* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت (شکل ۲). در این تحقیق فراوانی سه ژنوتیپ TC،TT وCC ژن استئوپونتین به ترتیب 0/32 ، 0/46 و0/22و فراوانی آلل T 0/55وآلل C 0/45محاسبه گردید. همچنین فراوانی سه ژنوتیپ کاپاکازئین BB، AB و AA به ترتیب 0/47، ۰/۳۵ و 0/17 و فراوانی آلل B 0/65 و آلل A 0/35محاسبه گردید. جمعیت مورد بررسی برای این جایگاه های ژنی در تعادل هاردی وینبرگ بود.

نتایج برآورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین در جدول ۳ نشان داده شده است.

آنالیزصفات شیر

به منظور برآورد ارتباط ارزش ارثی صفات با جایگاه های ژنی مورد بررسی از ارزش ارثی مربوط به رکوردهای صفات تولید شیر استفاده گردید. نتایج ارتباط معنی داری بین ارزش ارثی صفات تولید شیر با ژنوتیپ های اوستئوپونتین و کاپاکازئین به‌طور جداگانه نشان نداد. همچنین ارتباط ارزش های ارثی با ژنوتیپ های اوستئوپونتین و کاپاکازئین به صورت همزمان بررسی گردید که در این حالت نیز نتایج معنی داری یافت نشد($P<۰/۰۵$).

بحث

در تحقیقی روی گاوهای شیری آمریکا، فراوانی آلل C , T به ترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۹ محاسبه گردید برآورد شد همچنین محققین بیان کردند که آلل C آن با یک افزایش در درصد پروتئین شیر و درصد چربی شیر مرتبط بود (لئونارد و همکاران، ۲۰۰۵). در بررسی دیگری، ارتباط بین ژن‌های OPN وPPAR GCLA با ترکیبات شیر در جمعیت گاو هلشتاین مورد مطالعه قرار گرفت که مقدار فراوانی ژنوتیپ‌های CC و CT و TT به ترتیب ۲۶٪ ، ۵۱٪ ، ۲۳٪ و فراوانی آلل‌های T,C به ترتیب ۰/۴۹ و ۰/۵۱ محاسبه گردید همچنین مشخص شد اثرات افزایشی برای درصد چربی شیر، درصد پروتئین شیر و تولید چربی معنی دار بودولی اثرات غالبیت برای هیچ یک از صفات مورد آزمایش در سطح معنی داری نبود (خطیب و همکاران ۲۰۰۷). در ایران تحقیقی روی نژاد هلشتاین و چند نژاد دیگر انجام شد فراوانی آلل A و B نژادهای سرابی به‌ترتیب 0/43 و 0/57 و هلشتاین به‌ترتیب 0/45 و 0/55 برآورد شد (زکی زاده و همکاران ۱۳۸۵). در مطالعه ای روی ارتباط پلی مورفیسم های ژن کاپاکازئین گاوی با صفات تولید شیر در دو نژاد هندی ساهیوال و تارپاکار، نتایج نشان داد که آلل B کاپاکازئین روی تولید شیر و پروتئین آن اثر معنی داری داشت (راجش پاتل وهمکاران ۲۰۰۶). در تحقیقی اثر جایگاه‌های کاپاکازئین و بتالاکتوگلوبولین روی صفات تولید شیر درگاوهای هلشتاین مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان داد که ژنوتیپهای کاپاکازئین روی تولید پروتئین اثر معنی داری داشت و همچنین آلل A تمایل به افزایش تولید شیر وچربی و آلل B با مقدار پروتئین ارتباط معنی داری داشت (تسیاراس و همکاران ۲۰۰۵). یک تحقیق روی آللهای کاپاکازئین در دو نژاد هلشتاین و جرسی روسیه انجام شد که بیان داشت ، آلل B کاپاکازئین با مقدار پروتئین بالای شیر ارتباط معنی داری داشت (علی پناه و همکاران ۲۰۰۹). در اکثر مطالعات بین ژنوتیپ CC و آلل C اوستئوپونتین و همچنین ژنوتیپ BB، آلل B کاپاکازئین با ارزش ارثی صفات تولید ارتباط معنی داری وجود داشت (لئو نارد و همکاران در سال ۲۰۰۵، خطیب و همکاران ۲۰۰۷، راجش پاتل وهمکاران ۲۰۰۶، تسیاراس و همکاران ۲۰۰۵و علی پناه و همکاران ۲۰۰۹) ولی در تحقیق حاضر این ارتباط پیدا نشد که البته می‌تواند بدلیل نوع نژاد، نقص رکوردها، تعداد کم نمونه و عوامل محیطی تاثیرگذار بر جمعیت باشد. در بررسی های دیگر می توان لینکاژ این دو ژن ویا در گاوهای نر یا دیگر نژادهای شیری استفاده شود.

منابع

۱- زکی زاده، س. ۱۳۸۵. تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی پنج جایگاه ژنی مرتبط با تولید شیر سه نژاد بومی و هلشتاین ایران. دانشگاه تهران. پایان نامه دکترا

2- Alipanah, M., L. Alexandrovna Kalashnikova and G. Veladimirovich Rodionov, 2008 KAPPA-CASEIN AND PRL-RSA I GENOTYPIC FREQUENCIES IN TWO RUSSIAN CATTLE BREEDS. *Archivos de zootecnia vol. 57, núm. 218*

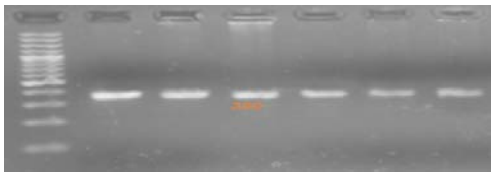
3- A.M. Tsiaras,1 G. G. Bargouli,1 G. Banos,2 and C. M. Boscos , 2005. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows, J. Dairy Sci. 88:327–334

4- Khatib H., I. Zaitoun, J. Wiebelhaus-Finger, Y. M. Chang, and G. J. M. Rosa. 2007. The Association of Bovine PPARGC1A and OPN Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. Journal. Dairy Sci. 90:2966–2970

5- Leonard S., H. Khatib, V. Schutzkus, Y. M. Chang, and C. Maltecca. 2005. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. J. Dairy Sci. 88:4083–4086
6- Rajesh K. PATEL, Jenabhai B. CHAUHAN, Krishna M. SINGH, Kalpesh J SONI,2007 , Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin in Indian Crossbred (Bos taurus, Bos indicus) Dairy Bulls, Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31(6): 399402 TÜB‹T

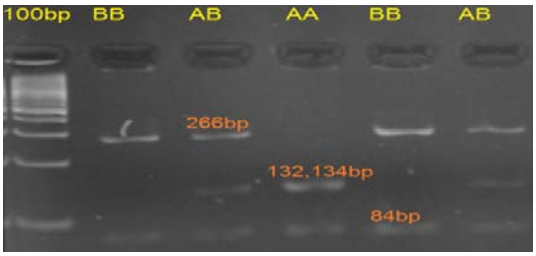
جدول ۱- پرایمرهای ژنهای اوستئوپونتین و کاپاکازئین

پرایمر	توالی	شماره دستیابی
OPN-F	F5′- GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC -3′	NW_255516
OPN-R	R5′- CCAAGCCAAACGTATGAGTT -3′	
KCN-F	F5′- ATCATTTATGGCCATTCCACCAAAG -3′	X14908
KCN-R	R5′- GCCCATTTCGCCTTCTCTGTAACAGA -3′	



الف

شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR برای ژن استئوپونتین (الف) و



الف

شکل۳- نتایج هضم آنزیمی برای ژن استئوپونتین (الف) و کاپاکازئین (ب)

جدول ۳- برآورد پارامترهای ژنتیکی و فنوتیپی صفات تولید

	شیر	درصد چربی	درصد پروتئین
وراثت پذیری	0/22	0/08	0/27
انحراف معیار	2089/44	0/20	0/15
واریانس ژنتیکی	962459/76	0/37	0/69
واریانس باقی مانده	3403332/23	0/39	0/18
واریانس فنوتیپی	4365792/0	0/42	0/25
ضریب تغییرات	41/24	5/87	4/43

Effect of gene polymorphisms Osteopontin(OPN) and Kappa casein(KCN) on the composition of milk of Brown Swiss cows

Hadi Gholami 1, Sonia Zaki Zadeh2, Reza Vakili, 3, Sima Jafari4 A graduate student in Genetics and Breeding, Islamic

2 Department of Animal Science, Agriculture Education Complex Khorasan Razavi

3 Department of Animal Science, Islamic Azad University of Kashmar

4 Student Glider Unit Kashmar

Abstract

Research on bovine chromosome 6 allele showed some of the milk protein genes are associated with milk ingredients. Among these genes can Osteopontin (OPN) and kappa casein (KCN) noted that their alleles are associated with milk ingredients (product and %fat and %protein). Blood sampling for the survey of 100 head of dairy breed Brown Swiss cows have a research unit of Khorasan were performed. DNA extracted using salt extraction (salting out) was to be genes or parts of KCN and OPN - Order kb 350 and 290 kb in length was amplified. DNA extracted using salt extraction (salting out) was to be genes or parts of KCN and OPN - the length of 290 kb and kb 350 was reproduced. Enzymatic digestion of the PCR-RLFP took the genotypic and allelic frequencies of these two genes was determined. In this study, the prevalence of polymorphisms of genes Osteopontin and Kappa casein , effect of this polymorphism on milk production and composition was performed. Animal genetic values for milk yield, milk fat and protein percentages were calculated. The effect of polymorphisms on inherited values using SAS software Analyzed. Results indicated that no significant relationship between the value of inherited genotypes with milk production traits Osteopontin and Kappa casein separately and were not coupled.

Keywords: Osteopontin , polymorphism, salt method, Kappa casein, PCR-RLFP

شناسایی بیماری نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات با استفاده از تکنیک PCR –R FLP در گاوهای شیری هولشتاین استان البرز

سمیه قرائی فتح آباد[۱]، بهزاد همتی[۱]، محمد هاشم فاضلی[۲]، زهرا نامور*[۳]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه علوم دامی، کرج، ایران ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ۳- مرکز اصلاح نژاد دام کشور
*نویسنده مسئول: زهرا نامور، zahranamvar@gmail.com

چکیده:

تاکنون تعیین نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات از طریق بررسی نمونه‌های خون و اسپرم انجام می‌شد. برای اولین بار این موضوع از طریق سلول‌های سوماتیک شیر در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز اصلاح نژاد دام کشور صورت گرفته است. در این تحقیق نمونه شیر ۱۰ گله از استان البرز که هر یک نماینده ۴۰۰-۳۰۰ گاو دوشا بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری از تانک شیر هر گله، به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز اصلاح نژاد دام کشور منتقل شد و سپس DNA نمونه‌ها استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۲۳۳ bp از اگزون ۴ ژن SLC35A3 با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی انجام شد. عمل هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *NSi* I برای شناسایی ناقلین نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات، روی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن SLC35A3 انجام و روی ژل آگارز ۲٪ TBE الکتروفورز شد. نتایج نشان داد که جهش G به T در موقعیت ۵۵۹ ژن SLC35A3 در گاوهای هولشتاین شیری استان البرز وجود ندارد و در نتیجه در هیچ یک از ۱۰ گله مورد بررسی، دام ناقلی مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: ناهنجاری ستون فقرات، گاو هولشتاین، نقص ژنتیکی، سلول‌های سوماتیک شیر

مقدمه:

نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات (CVM)[۱] برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ در دانمارک کشف شد. در این عارضه، گوساله معمولا ۲-۱ هفته زودتر از موعد و همراه با اختلالاتی همچون گردنی کوچکتر از حد طبیعی و پاهای بد شکل و مرده متولد می‌شود (Agerholm et al, 2000). اثرات اصلی CVM روی استخوان‌های ستون مهره‌هاست. از دیگر نشانه‌های CVM، ستون فقرات خمیده، دنده‌های متصل به‌هم و ناهنجاری‌های قلبی می‌باشد. برای جلوگیری از اثرات منفی این نقص، باید از تلاقی دو دام که ناقلژن این بیماری هستند، جلوگیری کرد (Duncan et al, 2001). آجرهولم و همکاران مشاهده کردند که از اکتبر سال ۱۹۹۹ در دانمارک تعداد گوساله‌های ناهنجار متولد شده از نژاد هولشتاین رو به افزایش است و در اوایل سال ۲۰۰۰ مشخص شد که این گوساله‌ها، دارای یک نقص ژنتیکی آتوزومی مغلوب می‌باشند. پس از مدت کوتاهی وجود این نقص در گاوهای آمریکا (Duncan et al, 2001)، سوئد (Britle et al, 2004)، و ژاپن Nagahata et al (2002,) نیز گزارش شد. ناگاهاتا و همکاران (۲۰۰۲) در ژاپن گوساله‌هایی را که مرده به‌دنیا آمده بودند مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند

---

[۱]- Complex vertebral malformation

که این گوساله‌ها ناقل CVM هستند و این ژن مرگبار را از مادر خود به ارث برده اند. گوساله‌های مرده ۳۲ کیلوگرم وزن داشتند یعنی تنها ۷۷٪ از وزن یک گوساله سالم را دارا بودند. توارث CVM به صورت آتوزومی مغلوب است و علت آن جهش نوکلئوتید G به T در موقعیت ۵۵۹ کروموزوم ۳ (اگزون ۴) ژن SLC35A3 می‌باشد. این جهش باعث تغییر یوریدین ۵-دی فسفات-ان-استیل گلوکز آمین و در نتیجه تبدیل اسید آمینه والین به فنیل آلانین می‌گردد (Kanae et al, 2005). لذا می‌توان با شناسایی دام‌های هتروزیگوت از گسترش این بیماری نهفته ژنتیکی در نسل‌های بعدی جلوگیری نمود.

مواد و روش‌ها:

نمونه شیر به مراتب راحت‌تر از نمونه خون جمع‌آوری و نگهداری می‌شود، لذا در این تحقیق برای بررسی وجود ژن مربوط به نقص ژنتیکی CVM در ۱۰ گله از استان البرز ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر نمونه شیر از تانک شیر هر گله جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز اصلاح نژاد دام کشور منتقل شد. DNA نمونه‌ها توسط کیت استخراج DNA شرکت کیاژن (DNeasy Blood &Tissue;cat.No:69504) استخراج گردید. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۷ درصد TAE جهت الکتروفورز استفاده گردید (شکل ۱).

توالی آغازگرها برای شناسایی ناحیه پلی مورفیک ژن SLC35A3 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[1] بدین شرح بود:

آغازگر رفت: 5'- CACAATTTGTAGGTCTCACTGCA-3'

آغازگر برگشت : 5'-CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG-3'

برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز از کیت PCR شرکت کیاژن (Hot StarTaq PCR) استفاده شد. برنامه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۳۵ سیکل تکثیر با دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵٪ TBE الکتروفورز گردید. عمل هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *NSi* I (Fermentas) برای شناسایی ناقلین نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات، روی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن SLC35A3 انجام شد و نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر (Thechne, UKمدل TC-512) قرار داده شدند. در ادامه جهت بررسی و تشخیص ژنوتیپ از ژل آگارز ۲٪ TBE استفاده شد (شکل ۲).

نتایج و بحث:

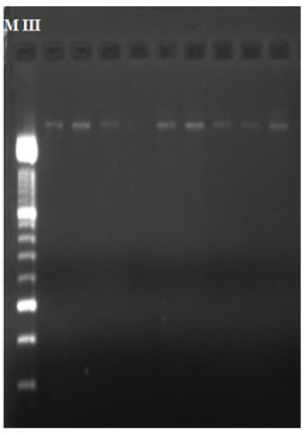
با بررسی باندها و مقایسه آن‌ها با نمونه‌های شاهد، مشخص گردید آنزیم مورد نظر روی هیچ یک از نمونه‌ها، باندهای bp ۲۱۲ و bp ۲۱ را ایجاد نکرده است. لذا هیچ یک از گله‌های مورد بررسی، که هر کدام نماینده ۳۰۰-۴۰۰ گاو دوشا بودند حامل ژن جهش یافته نبودند. بدیهی است که در صورت مثبت بودن بیماری در هر یک از گله‌ها، به بررسی هر گاو درون آن گله پرداخته می‌شد. نتایج حاصل از این آزمایش

[1] Polymerase chain reaction

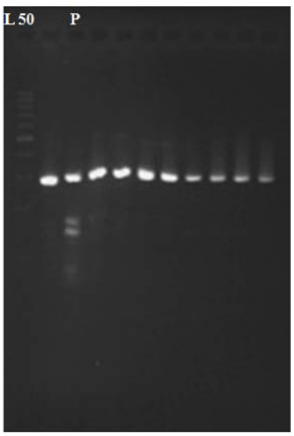
برخلاف نتایج حاصل از مطالعه راسک و همکاران(۲۰۰۷) است که در لهستان روی ۶۰۵ گاو نر انجام دادند و ۱۵۰ ناقل CVM شناسایی کردند.

منابع:

1. Agerholm. J.S., C. Bendixen, O. Andersen, J. Arnbjerg. 2000. Complex vertebral in Holstein calves. Report LK-564. National Committee on Danish Cattle Husbandry Aarhus, Denmark.
2. Britle. B., A. Persson, H. Stalhammar. 2004. Effects of complex vertebral Malformation on fertility in Swedish Holstein cattle. Journal of Acta. Vet. Scand., 45:161-163.
3. Duncan. R.B., J.R. Colin, B. Carrig, J.S. Agerholm, C. Bendixen. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 13:333–336.
4. Kanae.Y., D. Endoh, H. Nagahata, M. Hayashi. 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. Journal of Vet. Diagn. Invest., 17:258-259.
5. Nagahata. H., H. Oota, A. Nitanai, S. Oikawa, H. Higuchi, T. Nakade, T. Kurosawa, M. Morita, H. Ogawa. 2002. Complex Vertebral Malformation in a Stillborn Holstein Calf in Japan. Journal of Veterinary Medical Science, 64:1107-1112.
6. Rusc. A., S. Kaminski. 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. Journal of Applied Genetics, 48:247-252.



شکل ۱- DNA ژنومی استخراج شده
M III: مارکر III (Fermentas SMO192)



شکل ۲- هضم آنزیمی نمونه‌ها
L 50: (Fermentas SM0371) و P: کنترل مثبت

Identification of Genetic defect of Complex vertebral malformation

(CVM) Using techniques PCR-RFLP in Holstein dairycattle of Alborz province of Iran

Somayeh Gharaie-Fathabad[1], Behzad Hemati[1], Mohammad Hashem Fazeli[2], Zahra Namvar[*3]

1-Karaj Azad University, Animal Science Department, Karaj, Iran , 2- Shahre kord Azad University,

3-Animal Breeding Center of Iran

Corresponding author: zahranamvar@gmail.com

Abstract:

For detecting of CVM, it needs to be collected blood and/or semen sample. Now, and for first time we have reported that it is possible to do by taking sample of somatic cells in milk. The project has been done in Biotechnology Laboratory of Animal Breeding Center of Iran. In order to evaluation of CVM, milk samples from 10 herds on about 300 to 400 dairy cows in alborz province has been collected and transferred to the laboratory for DNA extraction. All samples were collected from milk reservation tank. DNA extraction has been done by Qiagene Kit. 233bp of exone 4 of SLC35A3 gene was amplified by Polymerase chain reaction (PCR). *NSi* I enzym used for digestion of this PCR products. The result of this study indicated that there was no mutation from G to T at nucleotide position 559 of SLC35A3 gene in those cows which has been sampled.

Keywords: CVM, Holstein dairy cattle, primer, somatic cells of milk, RFLP-PCR

همایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰
دانشگاه صنعتی اصفهان
همایش ملی
نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی

بررسی چندشکلی ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفندان نژاد زل مازندران با روش PCR-RFLP

شهاب الدین قره ویسی*، حسینعلی عباسی، مهرداد ایرانی و روح الله عبدالله پور
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر، گروه علوم دامی، قائمشهر، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: شهاب الدین قره ویسی
آدرس: مازندران- قائمشهر- بلوار بسیج- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر- حوزه معاونت پژوهش و فناوری- دفتر مدیر پژوهش **تلفن:** ۰۹۱۲۷۶۴۰۴۶۴
آدرس الکترونیکی: S.gharavysi@Googlemail.com و S.gharavysi@Qaemshahriau.ac.ir

چکیده

تردی گوشت یکی از صفات مهم در صنعت تولید گوشت و از خصوصیات مورد توجه مصرف کنندگان می باشد. از طرفی کالپاستاتین به عنوان آنزیم مهارکننده کالپاین بوده و نقش مهمی را در رشد عضلات و کیفیت گوشت ایفا می کند. این ژن روی کروموزوم ۵ گوسفند قرار دارد. چند شکلی ژن کالپاستاتین با صفات اقتصادی مرتبط است. این پژوهش به منظور شناسایی چند شکلی ژن کالپاستاتین با استفاده از روش PCR-RFLP انجام شد. به طور کاملا تصادفی از ۱۰۰ گوسفند نمونه خون اخذ شد. DNA به کمک روش نمکی بهینه یافته استخراج و با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط روش طیف سنجی و الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید. برای تکثیر، قطعه ۶۲۲ جفت بازی از اگزون شماره ۱ ژن کالپاستاتین مورد استفاده قرار گرفت. قطعه تکثیر شده به وسیله آنزیم برشی MspI جهت تشخیص ژنوتیپ های ژن کالپاستاتین مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و دو آلل M و N تشخیص داده شد. در این جمعیت ژنوتیپ های MN،MM و NN دارای فراوانی های ۰/۶۲، ۰/۲۶ و ۰/۱۲ بودند. فراوانی آلل های Mو N به ترتیب ۰/۷۵ و ۰/۲۵ بود. با بررسی فراوانی آلل ها مشاهده شد که برای ژن کالپاستاتین در جمعیت گوسفند نژاد زل تعادل هاردی واینبرگ وجود ندارد($P<0/05$).

کلمات کلیدی: ژن کالپاستاتین، پلی مورفیسم، گوسفند زل و PCR-RFLP.

مقدمه:

گوشت گوسفند یکی از مهمترین منابع تأمین پروتئین برای بشر است. مصرف کنندگان تردی گوشت را جزو مهمترین خصوصیات کیفیت گوشت می دانند. عواملی که بر تردی و کیفیت گوشت اثر می گذارند عبارت از تغذیه، استرس، ژنتیک، جنس و مدیریت است. اکثر مشکلات کیفی گوشت مربوط به تردی آن است(۱۱).

سیستم آنزیمی کالپاین مسئول تغییراتی است که منجر به تردی گوشت می شود. بنابراین بهترین روش در پیشگویی تردی گوشت شناسایی صفتی است که ظرفیت این سیستم آنزیمی را اندازه گیری کند. تنظیم کننده اصلی سیستم آنزیمی کالپاین در ماهیچه (پس از مرگ حیوان) یک بازدارنده اختصاصی به نام کالپاستاتین است. فعالیت کالپاستاتین در ۲۴ ساعت پس از مرگ بیشترین سهم را در تردی گوشت دارد(۱۴و۱۵). فعالیت کالپاستاتین به میزان زیادی قابل توارث است(h^2=۰/۶۵). انتخاب حیوانی که فعالیت کالپاستاتین کمتری دارد می

تواند منجر به بهبودی تردی گوشت آن شود (۷ و۱۰). یکی از روش های برآورد تردی گوشت تعیین میزان کالپاین و کالپاستاتین می باشد(۱۴). ژن کالپاستاتین روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند واقع است و ۱۰۰ کیلو باز طول دارد و دارای ۴ اگزون می باشد. (۹).
در مطالعات مختلف، ارتباط بین برخی از اشکال آللی ژن کالپاستاتین و کیفیت گوشت گزارش شده است(۱، ۶ و۸). در یک تحقیق که در مورد رابطه چندشکلی ژن کالپاستاتین با صفات رشد روی گوسفند افشاری انجام شد، رابطه قوی بین چندشکلی ژن مذکور و صفات رشد گزارش شد(۵). از آنجا که گوسفند نژاد زل تنها نژاد بدون دنبه کشور بوده و به دلیل عدم وجود اطلاعات کافی در مورد خصوصیات کیفی لاشه آن، مطالعه چندشکلی ژن کالپاستاتین می تواند به عنوان ابزاری در اختیار اصلاح نژاد کنندگان برای بهبود کیفیت گوشت نژاد مذکور قرار گیرد. هدف از این تحقیق بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین در گوسفند نژاد زل مازندران با روش PCR-RFLP می باشد.

مواد و روش‌ها:

کیفیت گوشت نژاد زل مورد توجه است و بخشی از نیازهای پروتئینی استان های شمالی کشور و تهران را مرتفع می سازد(۴). در این تحقیق به صورت کاملاً تصادفی از سیاهرگ وداجی ۱۰۰ رأس گوسفند نژاد زل مازندران واقع در ایستگاه تحقیقاتی شهرستان جویبار نمونه خون اخذ شد. سپس با روش نمکی بهینه یافته استخراج DNA انجام شد. توالی پرایمر (آغازگر) قطعات مورد نظر ژن کالپاستاتین در روش PCR-RFLP انتخاب شد(جدول ۱).

جدول۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن کالپاستاتین

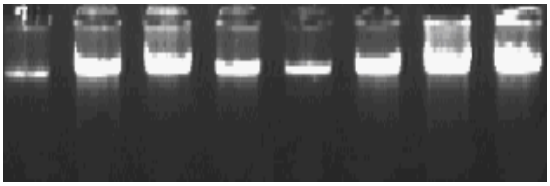
F:5'-TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG-3 R:5'-GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC-3'

پرایمر مورد نظر از شرکت سیناژن و به صورت لیوفیلیزه[1](غیر حساس به دما) تهیه شد. طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دوبار تقطیر رقیق گردیدند. پس از حل کردن و رقیق ساختن (طبق دستورالعمل مربوطه) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.
برای ایجاد سیکلPCR از دستگاه PCR دارای گرادیان دمایی تمام اتوماتیک استفاده شد. همانند سازی و تکثیر توالی مورد نظر در PCR در طی سه مرحله انجام شد. ۳۳ سیکل برای تکثیر این ژن انجام شد. بعد از اینکه PCR با موفقیت انجام شد برای تشخیص باندهای تکثیر شده، تعین وزن مولکولی این باندها و مشاهده آلل‌های مختلف برای ژن کالپاستاتین از ژل آگارز ۱/۲٪ استفاده شد. از آنزیم برشی MSPI برای بررسی چندشکلی استفاده شد. این آنزیم توالی ´۳ -CCGG–´۵ را در طول قطعه شناسایی کرده و آن را به دو قطعه دارای '۳ GG و CC '۵ می شکند. برای آشکارسازی قطعات حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز ژن کالپاستاتین از ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد و الکتروفورز عمودی استفاده شد. قطر ژل مورد استفاده در این تحقیق ۰/۲ میلی متر و ابعاد ژل ۲۵×۲۰ سانتی متر بود.

[1]- Lyophilize

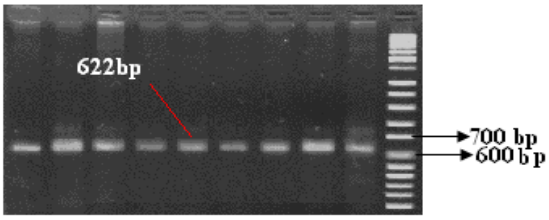
نتایج و بحث:

در شکل ۱ نمونه ای از DNA الکتروفورز شده مشاهده می گردد، که کیفیت و کمیت همه نمونه ها در سطح عالی قرار دارد.



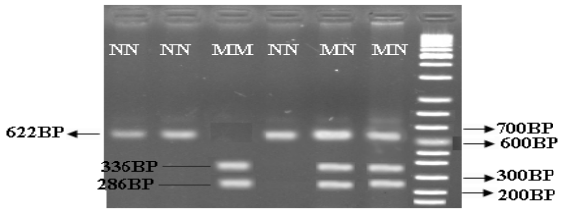
شکل۱: نمونه های DNA استخراج شده

توالی محصول PCR تکثیر شده از نوکلئوتید ۹۲۵ شروع شده و تا نوکلئوتید ۱۵۴۷ ادامه دارد. توالی جایگاه برش ۴ جفت بازی CCGG در وسط آغازگر قرار دارد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعه مورد نظر ژن کالپاستاتین تکثیر گردید که نمونه هایی از این قطعه تکثیر شده در شکل ۲ مشاهده می شوند. قطعه ۶۲۲ جفت باز (شکل ۲) پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز تولید شده که بین قطعه ۶۰۰ و ۷۰۰ جفت باز از خط کش مارکر ۱۰۰bp قرار دارد. آنزیم MSPI دارای محل برش در توالی CCGG موجود در باز ۲۸۶ این قطعه است. این آنزیم توالی را بعد از دومین باز(C) برش می دهد و ۲ قطعه با انتهای چسبنده به اندازه های ۳۳۶ و ۲۸۶ جفت باز ایجاد می کند.



شکل ۲ : محصولات حاصل از PCR نمونه های مختلف

الگوی هضمی آنزیم مربوطه با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و پراش اشعه ماوراء بنفش مشاهده گردید. با بررسی تعداد و طول قطعات حاصل از هضم با آنزیم MSPI، سه نوع ژنوتیپ مشاهده شد که NN، MN و MM نامگزاری شدند(شکل۳). آزمایش سه بار تکرار شد و چند شکلی بودن ژن کالپاستاتین در گله گوسفندان نژاد زل مازندران تأیید شد.



شکل ۳: محصولات هضم آنزیم MspI برخی از نمونه **ها**

فراوانی آلل‌های M و N به ترتیب ۰/۷۵ و ۰/۲۵ و فراوانی ژنوتیپ‌های MM، MN و NN به ترتیب۰/۶۲، ۰/۲۶ و ۰/۱۲ محاسبه شد. با انجام آزمون کای اسکور مشخص گردید که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار ندارد.

در یک تحقیق که چندشکلی ژن کالپاستاتین گوسفندان نژاد دورست داون نیوزیلندی با استفاده از آنزیم MspI بررسی شده است، ۲ نوع آلل و ۳ نوع ژنوتیپ گزارش شده است(۱۳)که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. غیر از مورد ذکر شده تحقیقات مشابهی روی نژادهای دیگری نیز انجام شده(۲، ۳، ۵ و ۱۲) که نتایج کلیه آن ها با نتایج مطالعه حاضرمطابقت دارد. تنها یک تحقیق یافت شد که نتایج آن با نتایج این آزمایش مطابقت ندارد(۱۳) و دلیل آن را می توان تفاوت از نظر جایگاه ژن کالپاستاتین، پرایمر مورد استفاده و تعداد نمونه مورد مطالعه دانست. با انجام آزمون وجود یا عدم وجود تعادل هاردی وینبرگ مشاهده شده که جامعه مورد بررسی از نظر ژن کالپاستاتین در تعادل نمی باشد($p <$۰/۰۵). با توجه با اینکه گله تحت مطالعه مربوط به ایستگاه تحقیقاتی شهرستان جویبار استان مازندران بود و در گله مذکور عملیات اصلاح نژادی انجام می شود، طبیعی به نظر می رسد که جامعه در تعادل نباشد.

با توجه به اینکه در این تحقیق برای ژن کالپاستاتین چندشکلی مشاهده شد، در صورتیکه داده های مربوط به صفات رشد، صفات لاشه و سایر صفات مرتبط موجود باشد، می توان ارتباط بین آلل ها و ژنوتیپ های کالپاستاتین با صفات و عملکرد آن ها را محاسبه کرد و در برنامه های انتخاب از آن برای بهگزینی گوسفند استفاده نمود.

منابع:

۱- الیاسی، ق.، شجاع، ج.، نصیری، م.، پیراهری، ا. و جوانمرد، آ. ۱۳۸۷. فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن کالپاستاتین در گوسفندان قزل، آرخامرینو و آمیخته‌های آنها. فصلنامه علمی پژوهشی دانش نوین کشاورزی. ۱۳: ۱-۶.

۲- بهرامپور، و.، محمدآبادی، م.، میرزایی، ح.، باقی زاده، ا.، داشاب، غ.، محمدی، ا.، علی نقی زاده، ر.، سفلایی، م. و حصالی، ا. ۱۳۸۷. آنالیز مولکولی ژن کالپاستاتین در گوسفند کرمانی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۳۱:۱۲۴-۴.

۳- ترابی، ا.، شجاع، ج.، پیرانی، ن.، الیاسی، ق. و ولی زاده، م. ۱۳۸۷. بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین در گوسفند مغانی با روش PCR-RFLP. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۴۱:۱-۱۴۸.

۴- سعادت نوری، م. و ص. سیاه منصور. ۱۳۸۲. اصول نگهداری و پرورش گوسفند. چاپ نهم. انتشارات اشرفی تهران.

۵- نیک مرد، م.۱۳۸۶. پلی مورفیسم ژن کالپاستاتین در گوسفند افشاری و ارتباط آن با صفات رشد. مجله دانش کشاورزی. ۲: ۳۵-۴۱.

6) Bodin, L., Pasquale, E. D., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., and Mulsant, P. 2006. A novel mutation in the BMP15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. Endocrin. 10:1210-1215.

7) Chung, H. Y. 2001. Effect of calpain and calpastatin genotypes on growth of Angus Bulls. Research and reviews: beef and sheep,18-21.

8) Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Ouali, A. 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. Canadian J. Anim. Sci., 78: 503-512.

9) Huang, J., Forsberg, N. E. 1998. Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 12100- 12105.

10) Lande, R., and Thampson, F. 1990. Efficiency of marker assisted selection in the improvement of quantitative traits. Genet. 124: 743-756.

11) Montaldo, H. H. and Meza, H. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. E. I. B. Electronic J. Biotec. 1(2): 0717-3458.
12) Nassiry, M. R., Tahmoorespour, M., Javadmanesh, A., Soltani, M. and ForoutaniFar, S. 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. Iran. J. Biotecnol. 4: 188-192.
13) Palmer, B. R., Roberts, N., Hickford, G. G. and Bickerstaffe, R. 1998. PCR-RFLP for MspI and NcoI in the ovine calpastatin gene. J. Anim. Sci. 76: 1499-1500.

14) Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Waipple, G., Wheeler, T. L., Miller, M. F., Crouse, J. D. and Reagan, J. O. 1991b. Predictors of beef tenderness: Development and verification. J. Food Sci. 56:1130-1135.

15) Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M. E., Crouse, J. D., Hunt, M. C., and Klemm, R. D. 1990. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. Journal of Animal Science. 68:2716-2728.

Polymorphism Investigation of Calpastatin Gene in Zel sheep Population of Mazandaran by PCR- RFLP Method

S.Gharahveysi*, H.A.Abassi, M.Irani and R.Abdollahpour
Department of Animal Science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

Abstract
Tenderness is one of the important characteristics of meat and desired to consumers. Calpastatin (CAST), the specific inhibitor of the calpain proteases, plays a role in muscle growth and meat quality. This gene has been located to chromosome 5 of sheep. Polymorphism of calpastatin gene is linked with economic traits. In this studying order to identifity allelic polymorphism in calpastatin gene we have used a restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. Blood samples were collected randomly from 100 individuals. The DNA extraction was based on salting – out method and used amplified polymerase chain reaction technique. The quantity and quality of extracted DNA were examined using spectrophotometric and agarose gel electrophoresis. A strategy employing polymerase chain reaction was used to amplify a 622 bp fragment of 1 exon calpastatin gene. Digestion of amplicons with MspI revealed calpastatin gene and revealed two alleles, allele M and allele N. In this population, MM, MN and NN genotype have been identified with the 0.62, 0.26 and 0.12% frequencies. M and N allele's frequencies were 0.75, 0.25, respectively. Comparision of allele frequencies indicated that Zel breed population was not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P<0.05$).
Key words: Calpastatin gene, polymorphism, Zel sheep and PCR-RFLP.

شبیه سازی دام و امنیت غذایی

مجتبی قنبری۱ ، محمود کرمی۲
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر۲- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نوشهر چالوس
Mojtaba_ghanbari40@yahoo.com

چکیده

شبیه سازی یکی از تکنولوژی های پیشرفته در رشته مهندسی ژنتیک می باشد که امروزه توسعه قابل توجهی پیدا کرده است. شرکت های بیوتکنولوژی از شبیه سازی برای تکثیر پی در پی حیوانات که خصوصیات تولیدی (مثل شیر و گوشت) ممتاز دارند، استفاده می کنند.در رابطه با امنیت غذایی دام های شبیه سازی شده تحقیقات کمی صورت گرفته ولی کلیه تحقیقات،سلامت محصولات تولیدی را تأیید کرده و نگرانی در این باره را بی مورد دانسته اند.همچنین بروز مشکلات متعدد در حیوان شبیه ساز شده باعث نگرانی در مورد بروز احتمالی بیماری های مشابه آن در مصرف کنندگان این محصولات می شود. بنابراین توصیه می شود در مسیر هر تکنولوژی از جمله شبیه سازی جانب احتیاط حفظ شود.وهمراه توسعه این تکنولوژی، خطرات احتمالی و پیامدهای حاصل از استفاده از آن نیز با دقت بالایی مورد بررسی و تحقیق قرار گیرد. تا اینکه در آینده جامعه انسانی با مسائل ناشناخته و پیچیده حاصل از آن از قبیل بروز بیماری های جدید مواجه نگردد.

کلمات کلیدی: امنیت غذایی – انتقال هسته- انتقال رویان- شبیه سازی

مقدمه:

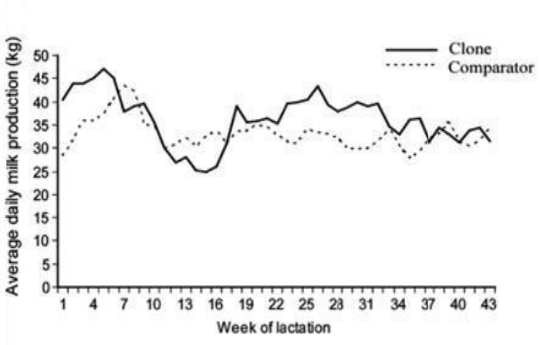
امروزه محصولات غذایی که از طریق اصلاح ژنتیکی تولید می شود به طور گسترده در بازارهای جهانی توزیع می شوند. همچنین کارشناسان صنعت بیوتکنولوژی درصدد عرضه محصولات غذایی دیگری مثل گوشت و لبنیات از طریق شبیه سازی دام ها می باشند(۱). بطوریکه پیش بینی می شود بزودی استفاده از روش شبیه سازی و مهندسی ژنتیک روشی برای تولید مواد غذایی خواهد شد. حیوان شبیه سازی شده حاصل تولید مثل غیرجنسی است و نتیجه آن تولید افرادی است که از لحاظ ژنتیکی با هم یکسان هستند. به عبارت دیگر شبیه سازی نوعی تولید مثل غیرجنسی است و در طبیعت بسیار فراوان دیده می شود. موجودات تک سلولی و گیاهان از این طریق تولید مثل می کنند(۱). در مهره داران عالی افراد با ژنتیک یکسان بطور طبیعی از طریق تقسیم خود بخودرویان در مراحل اولیه تقسیم تولید می شوند (دوقلوهای منوزیگوت) در شبیه سازی مصنوعی موجودات عالی اصولاً از دو روش استفاده می شود(۲). ۱) تقسیم رویان و ۲) انتقال هسته (پیوند هسته به سلولهای تخمک یا سلولهای رویانی که مواد ژنتیکی آن برداشته شده است).در تقسیم رویان اصول کلی ایجاد نسل بعد یعنی جفت شدن گامتهای دو جنس نر و ماده رعایت می شود و دو یا چند رویان تقسیم شده از لحاظ ژنتیکی کاملاً شبیه به هم هستند(۴). ولی در روش انتقال هسته اولاً عمل لقاح و ایجاد سلولهای اولیه جنسی بدون مشارکت اسپرم صورت می گیرد و از هسته یک سلول بدنی برای انتقال به سلول تخمک فاقد هسته استفاده می شود بنابراین با این روش موجودات شبیه ساز شده از لحاظ ژنتیکی کاملاً شبیه هم نیستند زیرا همه ژنهای یک فرد در هسته وجود ندارد و بخشی از آن (هرچند کوچک) در بخش سیتوپلاسم و در اندامک میتوکندری وجود دارد(۵).

انتقال هسته

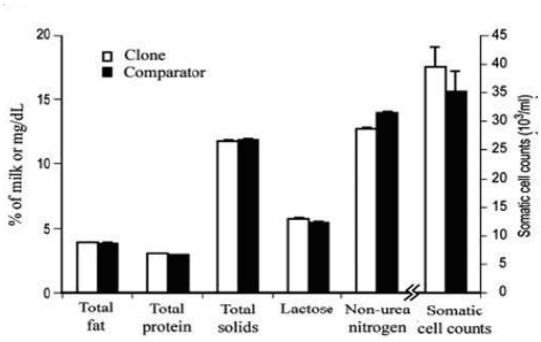
شبیه سازی در دام به روش انتقال هسته اولین بار در سال ۱۹۹۷ با تولد گوسفند دالی با موفقیت انجام شد و از آن پس این روش در بسیاری از گونه های دیگر حیوانی مثل گاوهای گوشتی، شیری، طیور، خوک و ... رواج یافت(٤).

امروزه بعضی از تولید کنندگان دام تمایل به استفاده از تکنولوژی شبیه سازی هستند زیرا بر این باورند که این تکنولوژی آنها را قادر میسازد تا نسلی از حیوانات با ارزش ژنتیکی یکسان و ممتاز بوجود بیاورند.مثلاً در حال حاضر گاوهای شیری شبیه سازی شده ای وجود دارند که روزانه بیش از ۹۰کیلوگرم شیر تولید می کنند که می تواند با استفاده از این تکنولوژی به تعداد دلخواه گاوهای با عملکرد مشابه با آن تولید کرد.اما نکته ای که قابل توجه است امنیت غذایی حیوانات شبیه ساز شده می باشد که تا به امروز تا حدود زیادی ناشناخته باقی مانده است. چون تحقیقات کمی در این مورد انجام شده است. در اواخر اکتبر ۲۰۰۳ FDA (سازمان جهانی نظارت بر دارو و غذا) گزارشی از امنیت غذایی محصولات شبیه سازی شده ارائه داد و در آن ذکر شده بود که هیچ دلیلی برای عدم امنیت در این محصولات وجود ندارد(۲). البته این اظهارات FDA تنها بر مبنای تحقیق و بررسی بر روی تعداد محدودی از دام های کلون شده و مقایسه آن با تولید شیر گاوهای معمولی بوده است. در این بررسی هیچ اختلافی از لحاظ فاکتورهای مورد بررسی بین دو گروه مقایسه مشاهده نشد(نمودار۱،۲).سپس در سال ۲۰۰۴ تحقیق در مورد مقایسه کیفیت و ترکیبات گوشت حیوانات شبیه ساز شده انجام شد که در نمودار(۳)مربوط به مقایسه بعضی از ترکیبات گوشتی گاوهای شبیه سازی شده و معمولی نشان داده می شود (۶).

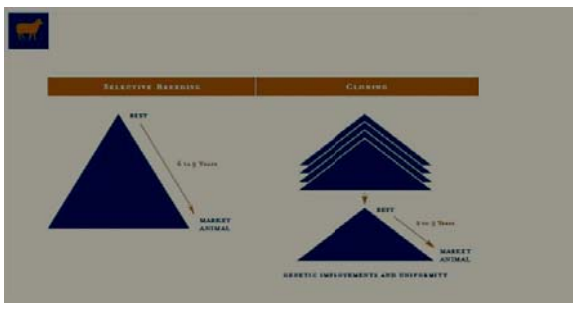
نمودار۱: مقایسه تولید شیر گاوهای شیری شبیه سازی شده و شاهد



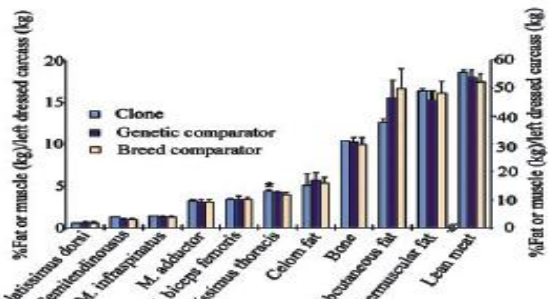
نمودار۲: مقایسه ترکیبات شیر گاوهای شیری شبیه سازی شده و شاهد



نمودار۴: مقایسه روند پیشرفت ژنتیکی و مدت زمان لازم برای عرضه محصولات حاصل از دام های اصلاحی در دو روش شبیه سازی و اصلاح نژاد انتخابی و شاهد



نمودار ۳: مقایسه اجزای مختلف لاشه در گاوهای گوشتی شبیه سازی شده و شاهد



از امتیازات دیگر روش شبیه سازی که باعث ترغیب کارشناسان و دامداران به انجام آن می شود پیشرفت ژنتیکی قابل ملاحظه آن نسبت به اصلاح کمی که بصورت معمول در گله انجام می گیرد می باشد. درنمودار(۴)روند پیشرفت ژنتیکی و مدت زمان لازم برای عرضه محصولات حاصل از دام های اصلاحی در دو روش شبیه سازی و اصلاح نژاد انتخابی نشان داده می شود(۳).

نتایج وبحث:

علاوه بر اینکه این تحقیقات فقط بر روی تعداد محدودی گاو انجام شده اعتبار علمی آنرا زیر سؤال می برد، دانشمندان عقیده دارند که شبیه سازی ذاتاً باعث تولید حیوانان ضعیف و متزلزل می شود بطوریکه حتی اگر حیوانات شبیه سازی شده به ظاهر کاملاً سالم باشند ممکن است ناگهان بیمار شده یا دارای بیماری پنهانی باشد و می تواند امنیت غذایی را به خطر بیندازد.اندازه گیری امنیت غذایی حیوانات شبیه سازی شده کار دشواری است. چون مشکلات و بیماری در حیوانات شبیه سازی شده به طور ناگهانی آشکار می شود(۵). علاوه بر آن در حدود۸ ۹ درصد از موارد شبیه سازی، شبیه سازی با موفقیت همراه نیست و حیوانات با فرم طبیعی تولید نمی شود و بسیاری از ناهنجاری های ظاهری ایجاد می شود، که اغلب بخاطر عدم وجود شرایط نامناسب برای رشد و تولد حیوانات شبیه سازی میزان سقط جنین و مرگ زودرس افزایش می یابد(۵). نقص هایی از جمله بزرگ بودن بیش از اندازه گوساله، زبان بزرگ، صورت سخت و له شده، انسداد روده، دیابت و نقص تنفسی باعث شده که دشواری های دوران حاملگی و ایجاد سزارین در دام های شبیه سازی شده رایج باشد. بطوریکه ۶۴درصد از گاوها ۴۰درصد گوسفندان و ۹۳ درصد موشهای شبیه سازی شده یکی از حالتهای ناهنجاری را بروز داده اند. درصد بالایی از آنها در طول حاملگی یا مدت کوتاهی بعد از تولد مردند.در گاوهای ماده ناهنجاری هایی مثل سندرم نوزادی، دیابت، نقص تنفسی، اتساع عضلات قلبی، خونریزی داخلی بند ناف، عفونت ویروسی، زایمان غیرطبیعی، مشکلات کلیوی، نقص پا، ذات الریه، حملات قلبی، فیبرولیز کبدی، کم خونی، ناهنجاری جفت مشاهده شده است.در گوسفندان هم ناهنجاری هایی مثل سندرم نوزادی، بزرگی جفت، خونریزی بندناف، نقص تنفسی و نقص غدد شیری مشاهده شده است. به عنوان مثال دالی به علت التهاب مفاصل و عفونت ششی در ۶ سالگی تلف شد در صورتیکه گوسفند بطور طبیعی ۱۱ تا ۱۲ سال عمر می کند. در بز و خوک نسبتاً ناهنجاری کمتری مشاهده شده و شامل عفونت های باکتریایی شش ها (در بز) و نرمال نبودن تعداد پستانها، شکاف لبها و شکل غیر طبیعی در خوکها مشاهده شده است.علاوه بر مشکلات ذکر شده در فوق، شبیه سازی همچنین باعث از بین رفتن تنوع ژنتیکی در بین دام ها می شود. بطوریکه حساسیت به یک بیماری می تواند حیات گونه را شدیداً تهدید کند(۵).

منابع:

1- Azim k. Animal Cloning and Food afety ,2007. Nature 2007:32-38.
2- FDA Consumer.2003. Cloning: Revolution or Evolution in Animal in Animal Production May/June 2003.
3- Hentges,E.2005. Animal Cloning and Production of Food:PERSPECTIVESFROM THE FOOD CHAIN.Center for Veterinary Medicine of the U.S. Food and Drug Administration.
4- McGrath J,Solter D.2002.Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science 7. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature 2002; 320:63–65.
5- The U.S. FDA and Animal Cloning: Risk and Regulatory Approach," op cit.10.
6- Tian,X.C., Kubota,C., Sakashita,K., Izaike,Y., Okano,R., Tabara,N., Curchoe,C., Jacob,L., Zhang,Y.Q.,Smith,S., Bormann,C., Xu,J., Sato,M., Andrew,S., Yang,X.Z. 2005. Meat and milk

compositions of bovine clones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 6261- 6266.

Animal cloning and food safety

Mojtaba ghanbari[1],Mahmoud karami[2]

1,2 corresponding an M.S student of Animal nutrition, Islamic Azad Universityof Qemshahr Branch , a faculty member in Chaloos Islamic Azad University of Noshahr Branch

mojtaba_ghanbari40@yahoo.com

Abstract

Cloning is one of the most advanced technologies in genetic engineering which today it has remarkably been developed.Biotechnological companies use cloning to continuous propagating that owns the prominent producing features (like milk and meat). Although it wasn't done much research in food safety in cloned cattle, but all the studies have already confirmed that the products are healthy, so there won't be anything to be worry about. Since there are lots of problems in cloned animal caused kinds of worry in consumers using their products, so they may get some illnesses as well as the animal.Therefore it's recommended while cloning it'd be better to consider all the possibilities, it means while you are developing this kind of technology you have to consider very precisely all the possible risks and the results in such a way the future human society won't face lots of unknown and complicated resulted problems such as new illnesses.

بررسی چندشکلی ژن هورمون رشد مرغ‌های بومی فارس به روش PCR- RFLP با آنزیم Msp I

سمانه گرجی مخصوص[3,1]، سید ضیاءالدین میرحسینی[1*]، محمد جواد ضمیری[2]، عبدالاحد شادپرور[1]، علی نیازی[3] و محمد دادپسند[2]
۱-گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، ۲- گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز ۳-پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شیراز
szmirhoseini@gmail.com

چکیده

برای بررسی چند شکلی ژن هورمون رشد ، از ۱۴۲ قطعه مرغ بومی فارس به طور تصادفی خون‌گیری شد. استخراج DNA به روش نمکی تغییر یافته انجام، و کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز یک درصد کنترل شد. با به‌کارگیری یک جفت پرایمر اختصاصی، یک قطعه ۱۱۶۴ جفت بازی در ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. قطعه تکثیر شده، با آنزیم MspI هضم و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. یافته‌ها نشان دهندهٔ وجود سه نوع آلل A، B و C در این جایگاه و با فراوانی‌های ۰/۵۹۹، ۰/۱۰۲ و ۰/۲۹۹ در این جامعه بود. در جمعیت مورد مطالعه ژنوتیپ‌های AA، AB، AC، BB، BC و CC به ترتیب با فراوانی ۰/۳۳۸ ، ۰/۱۱۳، ۰/۴۰۹، ۰/۰۰۷، ۰/۰۷۰ و ۰/۰۶۳ مشاهده شدند، آزمون χ^2 تعادل هاردی- واینبرگ را در جمعیت نشان داد. با توجه به بررسی‌های انجام شده، اثر چندشکلی ژن هورمون رشد با صفات تولیدی در مرغ‌ها ارتباط داشته است. ارتباط بین رکوردهای فنوتیپی با چندشکلی در این جایگاه ژنی می‌تواند به عنوان یک نشانگر در برنامه‌های به‌گزینی برای بهبود این ویژگی در نژادهای بومی به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: هورمون رشد، چندشکلی، مرغ بومی، PCR- RFLP

مقدمه

شناسایی جهش‌ها می‌تواند در انتخاب ژنتیکی موجودات در سطح DNA به متخصصین بهنژادی کمک نماید. بررسی‌های مختلف حاکی از وجود رابطه بین ژن هورمون رشد و برخی صفات اقتصادی مرغ است (کوهنلین و همکاران، ۱۹۹۷). ژن هورمون رشد پرندگان با ۴۱۰۱ جفت باز، دارای ۵ اگزون و ۴ اینترون، کد کننده پروتئینی با ۱۹۱ اسیدآمینه است که نقش مهمی در کنترل رشد و متابولیسم دارد و تأثیر شایانی بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند رشد، ترکیب بدن، بلوغ، پاسخ‌های ایمنی و تولید مثل می‌گذارد (استفن و همکاران، ۲۰۰۱) و لذا به‌عنوان یک ژن کاندید برای صفت تولید تخم پیشنهاد شده است (یان و همکاران، ۲۰۰۳). هدف از پژوهش کنونی، شناسایی چندشکلی موجود در ناحیه اینترون ۴ ژن هورمون رشد در مرغ‌های بومی استان فارس و نیز تعیین فراوانی‌های آللی وژنوتیپی برای این جایگاه با روش PCR-RFLP بود.

مواد و روش ها

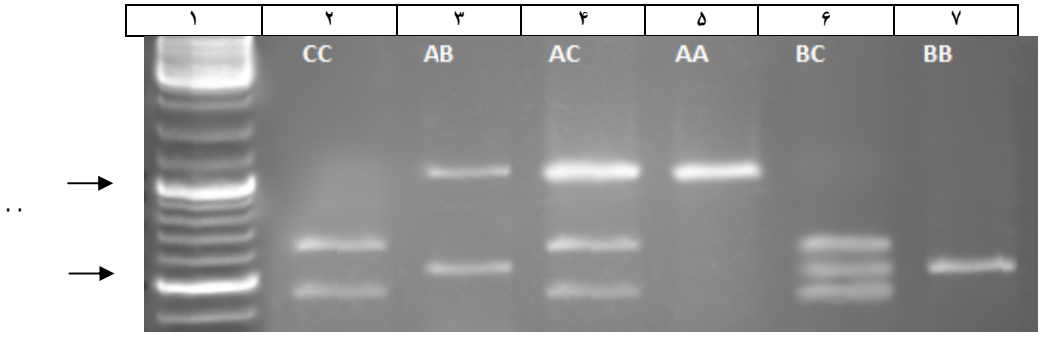
برای تهیهٔ DNA، ۱۴۲ مرغ از نسل پانزدهم مرغ‌های بومی مرکز تحقیقات مرغ بومی فارس خون‌گیری شدند. نمونه ها، در فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش نمکی تغییر

یافته انجام شد. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، یک جفت آغازگر رفت و برگشت به تربیب با توالی-'5 CTAAAGGACCTGGAAGAAGGG-3' و '5'-AACTTGTCGTAGGTGGGTCTG-3' به‌کار برده شد. قطعه‌ای به طول ۱۱۶۴ جفت‌باز را از ناحیهٔ اینترون ۴ ژن هورمون رشد تکثیر کنند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر نمونه در یک حجم ۲۰ میکرو لیتری انجام شد. بعد از مرحلهٔ واسرشتی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی گراد، ۳۵ سیکل واکنش؛ هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۲ درجهٔ سانتی گراد؛ ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی گراد انجام شد. سیکل آخر، برای ده دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی گراد ادامه یافت. صحت قطعه‌های به دست آمده از فرآوردهٔ PCR روی ژل آگارز ۱ درصد و در پی رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید تأیید شد. هشت میکرولیتر از فرآوردهٔ PCR با یک واحد از آنزیم *MspI* و ۲ میکرولیتر بافر *MspI* با حجم پایانی ۲۰ میکرولیتر برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد هضم و فرآورده‌های هضم، با روش الکتروفورز روی ژل آگارز 1.5 درصد جدا شدند. آلل‌های موجود در این جایگاه ژنی و هم‌چنین ژنوتیپ، مشخص و فراوانی‌های مربوطه محاسبه گردید. با استفاده از آزمون χ^2 تعادل هاردی – واینبرگ این جایگاه ژنی در جمعیت مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج با نرم افزار Popgene 2.0 انجام شد (فنگ و همکاران، ۱۹۹۷).

نتایج و بحث

پس از الکتروفورز نتایج هضم با آنزیم MspI (جایگاه C-2896T) و عکس برداری از آن به وسیلهٔ اشعهٔ U.V، شش ژنوتیپ (AA، AB، AC، BB، BC و CC) مشاهده شدند. مرغ‌های هتروزیگوت با ژنوتیپ AB دارای قطعه‌های ۱۱۶۴، ۵۸۶ و ۵۷۸ جفت‌بازی، مرغ‌های هتروزیگوت با ژنوتیپ AC دارای قطعه‌های ۱۱۶۴، ۴۸۲ و ۶۸۲ جفت‌بازی، مرغ‌های هتروزیگوت با ژنوتیپ BC دارای قطعه‌های ۴۸۲، ۶۸۲، ۵۸۶ و ۵۷۸ جفت‌بازی، مرغ‌های هموزیگوت AA دارای قطعهٔ ۱۱۶۴ جفت‌بازی، مرغ‌های هموزیگوت BB دارای قطعه های ۵۸۶ و ۵۷۸ جفت‌بازی و مرغ‌های هموزیگوت CC دارای قطعه‌های ۴۸۲ و ۶۸۲ جفت‌بازی بودند (شکل ۱). تعداد ژنوتیپ، تعادل هاردی– وینبرگ، فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی در جدول شماره ۱ و ۲ آورده شده است .

تعداد ژنوتیپ، تعادل هاردی– وینبرگ، فراوانی ژنوتیپی و فراوانی آللی در جدول شماره ۱ و ۲ آورده شده است.



شکل۱– ژنوتیپ‌های نمونه‌های انفرادی (ستون ۷–۲) در جایگاه برش آنزیم MspI. ستون ۱ نشان‌دهنده نشانگر اندازه است.

جدول ۱- تعداد ژنوتیپ در جایگاه برشی MspI

جایگاه	تعداد ژنوتیپ					
جایگاه	AA	AB	AC	BB	BC	CC
C-2983T	۴۸	۱۶	۵۸	۱	۱۰	۹

جدول ۲- فراوانی آللی، فراوانی ژنوتیپی و مقدار X2

	X^2	فراوانی آللی			فراوانی ژنوتیپی					
جایگاه		A	B	C	AA	AB	AC	BB	BC	CC
C-2983T	۱/۸۸	۰/۵۹۹	۰/۱۰۲	۰/۲۹۹	۰/۳۳۸	۰/۱۱۳	۰/۴۰۹	۰/۰۰۷	۰/۰۷	۰/۰۶۳

بخش تکثیر شده ژن هورمون رشد دارای یک قطعه با ۱۱۶۴ جفت‌باز است که پس از هضم آنزیمی، قطعه‌های ۴۸۲، ۶۸۲، ۵۸۶ و ۵۷۸ جفت‌بازی ایجاد می‌کند. جعفری و همکاران (۱۳۸۷)، چندشکلی‌های موجود در ژن هورمون رشد در مرغ‌های بومی استان اصفهان را مورد بررسی قرار دادند. فراوانی آلل A، B و C به ترتیب ۰/۲۸، ۰/۳۱ و ۰/۴۱، هم‌چنین فراوانی ژنوتیپی AA، AB، AC، BB، BC و CC به ترتیب ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲۱، ۰/۱، ۰/۲۶ و ۰/۱۸ گزارش شده است (جعفری و همکاران، ۲۰۰۹). تنوع ژنتیکی در این دو جمعیت (جمعیت مرغ‌های بومی فارس و اصفهان) متفاوت است، با توجه به انتخاب در دو جمعیت و اینکه این دو جمعیت از نظر فاصله جغرافیایی متفاوت هستند، تعداد محدود افراد جمعیت که خود ممکن است منجر به رانش ژنتیکی در این دو جمعیت شود، این تفاوت طبیعی به نظر می‌رسد . ارتباط آلل‌های مشاهده شده با صفاتی نظیر چربی شکمی، وزن بدن در دوران جوانی، وزن تخم‌مرغ و چگالی تخم‌مرغ (۴ و ۵). به‌نظر می‌رسد تنوع آللی در این جایگاه ژنی در مرغ بومی استان فارس بتواند زمینه ساز برای مطالعات تکمیلی جهت استفاده از این نشانگر در انتخاب‌های ژنتیکی باشد. اثر چندشکلی ژن هورمون رشد با صفات تولیدی در مرغ‌ها ارتباط داشته است. ارتباط بین رکوردهای فنوتیپی با چندشکلی در این جایگاه ژنی می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر در برنامه‌های به‌گزینی برای بهبود این ویژگی در نژادهای بومی به‌کار گرفته شود.

سپاسگزاری

با تشکر از مسئولین سازمان جهاد کشاورزی استان فارس و رئیس محترم پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه کشاورزی شیراز، هم‌چنین آقایان دکتر زربخت انصاری پیرسرائی و هم‌چنین از آقای مهندس رمضانی و خانم مهندس آرام.

منابع

1- Beuzen, N. D., Stear, M. J., Chang, K. C., 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. Vet. J. 160: 42-52.
2- Feng, X.P., Kuhnlein, U., Aggrey, S. E., Gavora, J. S., Zadworny, D., 1997. Trait association of genetic markers in the growth hormone and growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. Poult Sci. 76:1770–1775.
3- Jafari, A., Pakdel, A., Esmaeilkhaniyan, S., 2009. Simultaneous identification of tow MspI polymorphisms of the chicken growth hormone in Iranian native fowls. Inter. Cong. Bioche. And Mol. Bio. 194.
4- Kuhnlein, U., Liu, N., Weigend, S., Gavora, J. S., Fairfull, W., Zadworny, D., 1997. DNA polymorphisms in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. Anim. Genet. 28:116-123.
5- Stephen, C.Y., Zhang , X., Leung, F. C., 2001. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens.Experimental Bio & Medic. 226(5): 458–462.
6- Yan, B., Deng, X., Fei, Q., Hu, X., Wu, C., Li, N., 2003. Association between single nucleotide polymorphisms of the chicken growth hormone gene and chicken growth and carcass traits. Sci. Bull. Sin. 48: 1304- 1307.

DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene in native Fars chickens with PCR-RFLP method

Samaneh Gorji Makhsos[1,2], Seyed Ziaedin Mirhosseini[1*], Mohammad Javad Zamiri[3], Abdoalahad Shadparvar[1], Ali Niazi[2], Mohammad Dadpasand[3]

1. Animal Science Department, School of Agriculture, Gilan University

2. Biotechnology center, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz

3. Animal Science Department, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz

*** Corresponding E-mail address**: szmirhoseini@gmail.com

Abstract

The aim of the present study was to detect the growth hormone gene (GH), polymorphisms. Blood samples were collected from 142 individual at Fars native breeder hens breeding station and genomic DNA was extracted using salting out method. DNA fragment with 1164 bp for GH gene were amplified using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were digested with MspI endonucleas enzyme for GH The PCR products were electrophoresed on 1% agaros gel. The digested amplified fragment with MspI enzyme revealed two A, B and C alleles with the frequency of 0.599, 0.102 and 0.299 respectively. The frequencies of AA, AB, AC, BB, BC and CC were calculated at 0.338, 0.113, 0.409, 0.007, 0.070 and 0.063, respectively in studied population. The $\chi 2$ test showed Hardy-Weinberg equilibrium at marker loci in this population.

Key word: growth hormone, polymorphism, native chicken, PCR- RFLP

همایش ملی نقش بیوتکنولوژی در علوم دامی
گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
۳۱ شهریور ماه ۱۳۹۰

کلونینگ وکتور کد کننده قطعهC3dگاو به عنوان ادجوانت مولکولی جهت کاربرد در واکسیناسیون

طناز لایق*[۱]، حسین معتمدی[۱]، مسعود رضا صیفی‌آباد شاپوری[۱]
۱- دانشگاه شهید چمران اهواز
*نویسنده مسئول: طناز لایق. Tannaz.layeq@gmail.com

چکیده

دفاع بدن در برابرمیکروارگانیسم‌ها توسط سیستم ایمنی انجام می‌پذیرد که نخست با مکانیسم‌های ایمنی ذاتی آغاز شده و سپس پاسخ‌های ایمنی اکتسابی بوجود می‌آیند. سیستم کمپلمان از عمده‌ترین مکانیسم‌های اجرایی در ایمنی‌زایی است که آن را پلی میان ایمنی ذاتی و اکتسابی نامیده‌اند. کمپلمان بیش از ۳۰ پروتئین با گستره متنوعی از عملکردهای بیوشیمیایی را تشکیل می‌دهد و هر یک از اجزای کمپلمان با عدد (C2،C1) یا عدد به همراه حروف (C3b ،C1q) نشان داده می‌شوند. سه مسیر فعال شدن در کمپلمان وجود دارند که عبارتند از مسیرهای کلاسیک، آلترناتیو و لکتین.C3فراوانترین جزءکمپلمان، پروتئینی کلیدی و فاکتور عمده ایمنی هومورال در دفاع میزبان در سیستم کمپلمان می‌باشد. پژوهش‌های گوناگون در سرتاسر جهان نشان داده‌اند که همراهی سه نسخه از C3d(آخرین جزء ناشی از شکست C3) در واکسن‌های DNAبه فعالیت پرتوان ادجوانتی انجامیده است. ادجوانت‌هااغلب برای تقویت پاسخ ایمنی زمانی که یک آنتی‌ژن ایمنی‌زایی اندک داشته یا زمانی که میزان کمی از یک آنتی‌ژن در دسترس بوده و مقدار ایمنی‌زایی آن محدودیت دارد استفاده می‌شوند. در پژوهش حاضر سه نسخه از ژن C3d گاوی به منظور ساخت یک وکتور ادجوانتی جهت کاربردهای واکسیناسیون کلون گردید.

واژگان کلیدی: سیستم کمپلمان؛ C3d؛ وکتور؛ ادجوانت؛ واکسیناسیون.

مقدمه

ویژگی‌های گوناگونی در قدرت و توان بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها مؤثرند و برای رویارویی با این مکانیسم‌ها، سیستم ایمنی این توانایی را دارد که در برابر میکروب‌های مختلف به روش‌های گوناگون تخصصی پاسخ دهد(عباس، ۱۳۸۰). ایمنی به میکروارگانیسم‌های عفونت‌زا می‌تواند از دو راه ایمنی‌زایی فعال یا غیر فعال بدست آید که این ایمنی یا به طور طبیعی کسب شده یا با روش‌های مصنوعی مانند تزریق آنتی‌بادی یا واکسن ایجاد می‌گردد. واکسن‌ها با القای دگرگونی سلول‌های ایمنی به سلول‌های اجرایی با عمر طولانی و سلول‌های خاطره‌ای، سبب ایجاد ایمنی حفاظتی و پایدار در رویارویی با عفونت‌ها می‌شوند. بیشتر واکسن‌های کاربردی و در دسترس امروزی، پاسخ‌های ایمنی هومورال را برمی‌انگیزند که در نتیجه فعال‌سازی لنفوسیت‌های B است.فعال شدن لنفوسیت‌های Bافزون بر آنتی‌ژن‌های عوامل بیماری‌زا، به پیام‌های ثانویه دیگری نیاز دارد کهپروتئین‌های سیستم کمپلمانمولد آن‌ها هستند(رویت، ۱۳۸۲).سیستم کمپلمان شامل بیش از ۳۰ پروتئین سرمی محلول است و بخشی از سیستم ایمنی ذاتی بوده که ثابت شده به شکل پلی میان پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی عمل می‌نماید(راس، ۲۰۰۶).هر یک از اجزای کمپلمان با عدد (C1، C2،...) یا عدد به همراه حروف اختصاری (C3b ،C1q) نشان داده می‌شوند(عباس، ۱۳۸۰). مسیرهای فعال کننده کمپلمان (کلاسیک، آلترناتیو و لکتین) به شکل‌گیری مبدل‌های C3 می‌انجامند. این مرحله بسیار حیاتی است زیرا به عملکردهای نهایی کمپلمان می‌انجامد: ۱- شکل‌گیری آنافیلاتوکسین‌ها (C3a و C5a)، ۲- نابود کردن پاتوژن‌ها توسط مجموعه حمله به غشا یا MAC(C5b-9) و ۳- بیگانه‌خواری پاتوژن‌ها (C3b ،iC3bو C3d). C3dمحصول نهایی شکست C3است که در

صورت اتصال آنتی‌ژن‌های میکروبی به این قطعه و سپس با اتصال به CR2 (که گیرنده نوع دوم کمپلمان بر روی لنفوسیت‌های B، FDC-ها و برخی از سلول‌های اپی‌تلیال می‌باشد)موجب راه اندازی آبشارهای پیام‌رسانی و پاسخ‌دهی می‌شوند(راس، ۲۰۰۶). نشان داده شده که پاسخ لنفوسیتB به مجموعه آنتی‌ژن –C3d قوی‌تر از پاسخ در برابر آنتی‌ژن به تنهایی است(رویت، ۱۳۸۲).بر همین اساس، دمپسی و همکاران در سال ۱۹۹۶با کلون کردن یک، دو و سه نسخه از ژن C3d، نشان دادند که با افزایش تعداد نسخه‌های این ژن، وکتور تولید شده ویژگی ادجوانتیرا برای طراحی واکسن نشان می‌دهد(دمپسی، ۱۹۹۶).واژه «ادجوانت» در تعریف به ماده‌ای گفته می‌شود که اگر با یک آنتی-ژن همراه شده و تزریق گردد، ایمنی‌زایی آن آنتی‌ژن را به عنوان واکسن تقویت کرده و افزایش می‌دهد. ادجوانت‌ها اغلب برای تقویت پاسخ ایمنی زمانی که یک آنتی‌ژن ایمنی‌زایی اندک داشته یا زمانی که میزان کمی از یک آنتی‌ژن در دسترس بوده و مقدار ایمنی‌زایی آن محدودیت دارد استفاده می‌شوند. می‌توان ژن کد کننده آنتی‌ژن‌های مهم پاتوژن‌ها را به ویروس‌ها یا باکتری‌های ضعیف شده ارائه و آن‌ها را به ارگانیسم‌هایی تبدیل نمود که به عنوان وکتور عمل می‌کنند. این وکتورها درون میزبان تکثیر شده و محصول ژن پاتوژن را بیان می-نمایند(عباس، ۱۳۸۰). در همین راستا، هدف از انجام پژوهش حاضر، ساخت یک وکتور کد کننده C3dبوده که در نقش ادجوانت برای ساخت واکسن‌های DNA که آنتی‌ژن‌ها یا ژن‌هایی را به منظور ایجاد ایمنی در برابر پاتوژن‌های گوناگون کد می‌نمایند کارآمد باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA از بافت کبد گاو تازه کشتار شده که درون محیط کشت سلولی در کنار یخ به آزمایشگاه انتقال یافته بود انجام گرفت. با انجام RT-PCR بر روی RNA ، cDNAساخته شد و با پرایمرهای اختصاصی PCRانجام گرفت. توالی پرایمرهای C3dF و C3dRعبارتند از:

GCCGGAATTCAGATCTCACCTTATCCAAACC	C3d F
GCCGGGATCCGTTGCGGCTGGGCAGT	C3d R

برای اتصال قطعه‌های C3dبه یکدیگر در وکتور، وجود رابط‌هایی که تکرار مشخصی از اسید آمینه‌های GS[G4S]2GS بودند طراحی گشتند. توالی آن‌ها عبارتند از:

GCCGGAATTCAGATCTGGGTCCGGAGGGGGAGGGAGCGGAGGGG	Linker F
GCCGGGATCCGCTTCCGGACCCTCCCCCTCCGCTCCCT	Linker R

توالی ژن C3dدارای جایگاه برشی برای هر سه آنزیم‌های *BamHI*،*EcoRI*و*BglII* می‌باشد. *BglII* و*BamHI* در دو انتهای توالی و *EcoRI*درون توالی در ناحیه‌ای نزدیک‌تر به جایگاه *BamHI* قرار گرفته است. اما توالی Linker تنها دارای جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های *EcoRI*و*BamHI* است. این جایگاه‌ها برای برش‌های بعدی ژن و Linker به منظور جدا ساختن آن‌ها از پلاسمیدهایی که در

آن‌ها کلون می‌شوند و قرارگیری آن‌ها در کنار هم ضروری می‌باشد. اندازه باند بدست آمده از PCR ژن C3d برابر با bp ۹۰۰ می‌باشد که هنگام الکتروفورز نیز در مقایسه با مارکر kbp ۱ نیز تایید گشت. خالص‌سازی این ژن و الگوی Linker با کیت خالص‌سازی از ژل انجام گرفت. ژن C3dو الگوی Linkerهر کدام در دو پلاسمید جداگانه pTZ57R کلون شدند. آنزیم‌های محدود الاثر *BamHI*و*EcoRI* برای برش

هر دوبکار رفتند. تایید حضور آن‌ها در پلاسمید، با تعیین توالی انجام شد. پس از مرحله کلون جداگانه، این دو الگو بایستی به یکدیگر در یک پلاسمید مشترک اتصال می‌یافتند. بدین منظور، پلاسمید دربر دارنده ژن C3dبا آنزیم‌های *BamHI*و *BglII*بریده و ژن جدا شده بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده و از روی ژل، خالص گشت. پلاسمید دربر دارنده Linkerنیز با آنزیم *BamHI*بریده و به شکل خطی درآمد. عمل ترانسفورماسیون انجام شد و پلاسمید بدست آمده، پلاسمید شماره ۱ نام گرفت. برای ساخت پلاسمید شماره ۲ که دربر دارنده دو ژن و دو الگوی Linker باشد، نخست، پلاسمید شماره ۱ یک‌بار با آنزیم‌های *BamHI*و*BglII*برای جداسازی Linker + C3d و بار دیگر با آنزیم *BamHI*برش داده شد. هر دو خالص‌سازی گشته و پس از اتصال، ترانسفورماسیون انجام گرفت. برای تایید، عمل هضم دوگانه و مقایسه با پلاسمید شماره ۱ صورت پذیرفت. به منظور ساخت پلاسمید شماره ۳، از الگوی بدست آمده از هضم دوگانه پلاسمید شماره ۱ و هضم یگانه روی پلاسمید شماره ۳ برای ترانسفورماسیون استفاده شد.

نتایج و بحث

برای نخستین بار در جهان، دمپسی و همکارانویژگی C3d را به عنوان یک ادجوانت مولکولی نشان داده و ثابت کردند که کلونینگ دو و سه نسخه از این ژن به ترتیب ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ برابر میزان پاسخ‌های ایمنی ثانویه را افزایش خواهد داد(دمپسی، ۱۹۹۶). پژوهش‌های دیگری که در سال‌های پس از ارائه این نتایج انجام گرفت، اثر ادجوانتی آن را به شکل همراهی با ژن‌ها و آنتی‌ژن‌های گوناگونی که برای آزمون ساخت واکسن‌های DNA بکار می‌رفتند، اثبات نمودند. بیشترین پژوهش‌ها C3dموش را به عنوان ادجوانت بکار گرفته‌اند و تنها در چند پژوهش از C3d گاوی استفاده شده است که در مهم‌ترین آن‌ها، فیرث و همکاران ژن C3d گاورا به منظور تقویت پاسخ ایمنی در واکسن طراحی شده برایلوکوتوکسین (LKtA) باکتری*Mannheimiahaemolytica*در *E.coli*وارد نمودند(فیرث، ۲۰۰۶). در پژوهش حاضر، وکتور ادجوانتی دربر دارنده سه نسخه از ژن C3dگاو تولید شده که این وکتور بیشینه حالت ادجوانتی را در هنگام همراهی با ژن یا آنتی‌ژن مورد استفاده برای ساخت واکسن‌های DNA دارا است. پیشنهاد می‌گردد در پژوهش‌های آینده، بیان پروتئینی وکتور و نیز وارد سازی ژن یا آنتی‌ژن کاربردی به درون آن، به منظور تحقیقات واکسن‌سازی انجام گیرد.

منابع

۱- عباس ا. ک.، لیچمن ا. اچ. و پوبر ج. اس. (ویرایش چهارم). ایمونولوژی سلولی و مولکولی. فرید حسینی ر.، محمودی م. و رضایی، ع. (۱۳۸۰). جهاد دانشگاهی مشهد.

۲- رویت ا.، بروستوف ج. و میل د. (۲۰۰۲). ایمونولوژی رویت. قاضی جهانی ب.، عاقلی ح. و مهدیان ع. (۱۳۸۲). انتشارات گلبان. تهران.

3- Ross, T.M., Toapanta, F.R. 2006. Complement- mediated activation of the adaptive immune responses (Role of C3d in linking the innate and adaptive immunity). Immunological research. 36/1-3: 197-210.

4- Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., Fearon, D.T. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. Science. 271:348-350.
5- Firth, A.M., Moore, D.P., Pei, Y., Shewen, P.E., Lo, R.Y.C., Yoo, D, Hodgins, D.C. 2006. Cloning of a gene fragment encoding bovine complement component C3d with expression and characterization of derived fusion proteins. Veterinary immunology and immunopathology. 114:61–71.

Cloning an encoding vector of bovine C3d as molecular adjuvant for vaccination.

Tannaz Layegh[1*], Hossein Motamedi[1] and Masoud Reza Seifi Abad Shapouri[1]
1- University of ShahidChamran Ahvaz
Corresponding E-mail address: tannaz.layeq@gmail.com

Abstract:
The immune system is the body's defense against infectious organisms and other invaders which is initiated by innate immunity at first, then the responses of acquired immunity are appeared. The complement system is the main part of innate immune system which bridges the innate and acquired immune system. The complement is composed of more than 30 soluble serum proteins that are called in number (C1 ،C2) or number and letters (C3b, C1q) forms. Complement is activated through three distinct pathways termed as classical, alternative and lectin pathways.C3, the most abundant complement component, is a key protein and important factor of humoral immunity to the immune system. There is a large body of information indicating that conjugation of three repeats of C3d (the last degradation part of C3) in DNA vaccines represents adjuvant activity. Adjuvants are used to enhance immune responses while an antigen has low immunization or low doses of an antigen is available. In this study, three tandom repeats of bovine C3d were cloned to construct an adjuvant vector for vaccination.
Keywords: Complement system; C3d; vector; adjuvant; vaccination.

عیین چند شکلی ژن بورولا در گوسفندان نژاد زل استان مازندران با استفاده از روش PCR-RFLP

هادی محمودی[1]*، رضا اسدپور[1]، صادق علیجانی[2]، رضی اله جعفری جوزانی[1]، صابر اسمعیلی[1]، اسحق کوچکی پنچاه[1]

۱- گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، ۲- گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

* نویسنده مسئول: هادی محمودی، دانشگاه تبریز، دانشکده دامپزشکی، پست الکترونیکی: Dvm.mahmoudi@gmail.com

چکیده

تنوع ژنتیکی در میزان تخمک گذاری در گوسفندان بصورت گسترده ای ثبت شده است و تفاوت قابل توجهی در میان نژادهای مختلف گوسفند مشاهده شده است. FecB یک ژن اصلی مسئول برای افزایش باروری است که برای اولین بار در گوسفندان نژاد بورولا مرینو شناسایی شده است. مطالعه حاضر جهت بررسی حضور جهش ژن FecB در ۶۸ میش نژاد زل از ۳ گله می باشد. DNA ژنومی از نمونه خونی گوسفندان با سابقه بره زایی تک قلو و دوقلو استخراج گردید و با استفاده از روش PCR-PFLP چندشکلی ژن FecB مورد بررسی قرار گرفت. هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم محدودگر AvaII انجام شد و در الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵ درصد جهت مشاهده باندهای ۱۹۰ و ۱۶۰ و ۳۰ بارگذاری شد. نتایج عدم هماهنگی در فراوانی چندشکلی ژن FecB را نشان داد که در این نژاد ژنوتیپ های BB و +B و ++ به ترتیب با فراوانی ۰ و ۱ (۱/۴۷٪)و ۶۷ (۹۸/۵۳٪) مشاهده شد. **واژگان کلیدی:** گوسفند زل، ژن بورولا، دوقلوزایی، جهش، PCR-RFLP

مقدمه

کشور ایران با دارا بودن بیش از ۵۰ میلیون راس گوسفند از بیش از ۲۵ نژاد مختلف، در زمره مهمترین کشورهای پرورش دهنده گوسفند جهان قرار داردچندقلوزایی یکی از صفات مهم اقتصادی در گوسفند می باشد که تحت تاثیر محیط و ژنتیک بوده و افزایش آن با سودمندی اقتصادی همراه است و از دیدگاه های موجود در بهبود صفات اقتصادی گوسفند همین افزایش میزان درصد دوقلوزایی می باشد. در بحث ژنتیک امروزه ثابت شده است که چندین ژن در میزان چندقلوزایی در گوسفند تاثیر گذارند که مهمترین آنها ژنهای BMPR-IB و BMP15 و GDF9 می باشند که در این مطالعه ژن BMPR-IB که با نام ژن بورولا و علامت اختصاری FecB معروف است (دیویس و همکاران، ۲۰۰۶)، پرداخته‌ایم.

در دهه های اخیر مشاهده شده است که گوسفندانی که از نژاد بورلا مشتق شده‌اند و دارای بازدهی تولید مثلی بالایی هستند، حامل جهشی اتوزومی به نام FecB می باشند (مونتگومری و همکاران، ۲۰۰۱). دوقلوزایی در این نژاد حاصل جهش نقطه‌ای در بخشی از کروموزوم ۶، در ژن گیرنده پروتئین مورفوژنیک استخوان IB (BMPR-IB) می باشد (مولسنت و همکاران ۲۰۰۱). این جهش نقطه‌ای باعث تغییر نوکلئوتید ۷۴۶ (G←A)در ناحیه کد کننده باعث تبدیل اسیدآمینه گلوتامین بجای آرژنین شده است (سوزا و همکاران ۲۰۰۱). در میش های هموزیگوت (BB) و هتروزیگوت (+B) در مقایسه با هموزیگوت نوع وحشی (++) فولیکول ها به طور معنی داری در اندازه کوچکتر بالغ شده و آزاد می شوند (مونتگومری و همکاران ۲۰۰۱). هدف این مطالعه تعیین چندشکلی ژن بورولا در گوسفندان نژاد زل استان مازندران با استفاده از روش PCR-RFLP می باشد.

مواد و روش کار:

در این طرح از ۶۸ میش خالص نژاد زل حدود ۵ میلی لیترخون بوسیله لوله ونوجکت دارای ماده ضد انعقاد EDTA از ورید وداجی گرفته شد. استخراج DNA با استفاده از کیت BIONEER و روش لیز سلولهای خونی و استفاده از پروتئیناز K و استحصال DNA در ژل سیلیکا صورت پذیرفت. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. برای شناسایی وجود جهش ژن بورولا و تعیین چند شکلی این ژن در نمونه ها، آغازگرهایی که توسط دیویس و همکاران (۲۰۰۲) طراحی شده بود توسط شرکت سیناژن بترتیب زیر ساخته شد:

TestR15: (5'- CAAGATGTTTTCATGCCTCATGAACACGGTC- 3')
TestF2: (5'- CCAGAGGACAATAGCAAAGCAAA- 3')

برنامه حرارتی عبارت بود از: بسته شدن درب دستگاه و رساندن دمای دستگاه به ۱۱۰ درجه سانتی گراد، واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه، شروع اولین چرخه با واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد بمدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه، پایان چرخه اول با امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ ثانیه بود که در ۳۵ چرخه تکرار گردید.
جهت هضم آنزیمی برای ژن بورولا از آنزیم AvaII (Eco47I) استفاده شد. محصولات نهایی PCR-RFLP پس از هضم آنزیمی، جهت مشاهده باندهای ۱۹۰ جفت بازی و ۱۶۰ جفت بازی جایگاه ژن بورولا در الکتروفورز ژل ۲/۵ درصد قرار داده شد.

نتایج و بحث:

مطالعه الگوی باندی مشاهده شده در الکتروفورز بین حیوانات چندقلوزای نژاد زل فقط یک نمونه دارای باندهای ۳۰ و ۱۶۰ و ۱۹۰ جفت بازی بود که دارای آلل +B و بقیه نمونه ها از آلل وحشی (++) و دارای یک باند ۱۹۰ جفت بازی بود. درحالیکه در مطالعه محمدی و همکاران (۱۳۸۵) در گوسفندان لری- بختیاری و عربی، هیچ تفاوتی در الکتروفورز حیوانات چندقلوزا، مشاهده نشد. نتایج مشابه توسط Amiri و همکاران (۲۰۰۷)، غفاری و همکاران (۲۰۰۷) و ایرجیان و همکاران (۲۰۰۹)، نشان داد که نژادهای بختیاری، شال و سنگسری، حامل جهش ژن بورولا نبوده و همگی دارای ژنوتیپ وحشی می باشند. در نژادهای دیگر ایرانی مطالعه شده، علی سامعی و همکاران (۱۳۸۴)، چند شکلی ژن بورولا را در نژاد های قره گل، بلوچی و ایران بلک بررسی کردند. صابر قنبری و همکاران (۲۰۰۷)، چند شکلی ژن بورولا را در گوسفندان نژاد افشاری، بررسی کردند. کثیریان و همکاران (۲۰۰۹)، این ژن را در نژاد سنگسری بررسی کردند و چند شکلی جایگاه ژن بورولا در این نژادها مشاهده نگردید. به طوری که در همه این بررسیها، تنها آلل نوع وحشی مشاهده و تمام نمونه ها دارای ژنوتیپ ++ بودند. بررسی‌های انجام گرفته در ۲۱ گونه گوسفند در کشورهای مختلف، نشان داده که فقط نژادهای هو و هان چینی، دارای جهش ژن بورولا هستند. به طوری که همه گوسفندان نژاد هو، حامل ژن بورولا و ژنوتیپ BB داشتند (Davis و همکاران، ۲۰۰۲). در مطالعه دیگر Guan و همکاران (۲۰۰۷) که بر روی ۹ نژاد انجام گرفت تنها نژادهای هو و مرینوی چینی حامل ژن بودند.

منابع :

1- Davis, G., L. Balakrishnan, et al. (2006). "Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries." Animal reproduction science 92(1-2): 87-96.
2- Montgomery, G. W., S. M. Galloway, et al. (2001). "Genes controlling ovulation rate in sheep." Reproduction 121(6): 843
3- Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 : 5104-5109.
4- Souza, C., C. MacDougall, et al. (2001). "The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene." Journal of Endocrinology 169(2): R1.
5- Davis, G. H., S. M. Galloway, et al. (2002). "DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation." Biology of Reproduction 66(6): 1869.
6- Guan, F., S. R. Liu, et al. (2007). "Polymorphism of FecB gene in nine sheep breeds or strains and its effects on litter size, lamb growth and development." Animal reproduction science 99(1-2): 44-52.

Determinations of polymorphism of FecB gene in sheep of ZEL breed by PCR-RFLP

, Reza Asadpour[1], Sadegh Alijani[2], Razi Alah Jaffari Joozani[1], Saber *Hadi Mahmoudi[1] Esmaiili[1], Isaac Koochaki Panchah[1]
[1]Faculty of Veterinary Medicine, university of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran.
*** Corresponding E-mail address: Dvm.Mahmoudi@gmail.com**

Abstract

Genetic variation in ovulation rate in sheep has been documented and the evidence shows substantial differences among world sheep breeds. FecB gene is a major gene responsible for high prolificacy firstly identified in Booroola Merino sheep. The present study carry out to examine the presences of Booroola FecB mutation gene in 68 selected prolific ewes from 3 flocks representing Zel sheep breed by forced PCR-RFLP. Genomic DNA was extracted from the blood 68 Zel maturated ewes with litter size varied from 1 two 2 lambs per ewe lambing. Digestion of FecB gene 190, 160 and 30 base pair with AvaII restriction enzyme for FecB gene. Genotype of each individual were detected by agarose gel electrophoresis (2/5%). Results showed that the polymorphism frequencies of FecB gene imbalanced in this breed. In the zel sheep the genotype frequencies of BB, B+ and ++ were 0%, 1.47% and 98.53% respectivel. Result showed that there was 190bp band wild type in nearly all samples and one samples there was genotype B+.

Keywords: FecB, Zel sheep, PCR-RLFP, Polymorphism

کلون قطعه Fc توکسین باکتری *کلستریدیوم تتانی* با هدف کاربرد در واکسن‌های DNA در واکسیناسیون دام‌ها علیه بیماری کزاز

حسین معتمدی*[۱]، مسعودرضا صیفی‌آباد شاپوری[۲]، مسعود قربانپور نجف‌آبادی[۲]، ندا عارف زاده[۳]

۱- استادیار گروه زیست شناسی- دانشکده علوم- دانشگاه شهید چمران اهواز، ۲-استاد گروه پاتوبیولوژی- دانشکده دامپزشکی- دانشگاه شهید چمران اهواز

۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی- دانشکده علوم- دانشگاه شهید چمران اهواز

*نویسنده مسئول: اهواز- دانشگاه شهید چمران- دانشکده علوم- گروه زیست شناسی hhmotamedi@yahoo.com

چکیده

کلستریدیوم تتانی **باکتری بی‌هوازی اجباری است که در خاک، کود و روده دام‌ها از جمله تک‌سمی‌ها یافت می‌شود و به علت اسپورزا بودن ریشه کنی عفونت حاصل از آن ممکن نیست. این باکتری در بدن میزبان با تولید توکسین کزاز که مهارگر قوی آزادسازی نوروترانسمیتر مهاری در سیستم عصبی مرکزی است باعث بیماری کشنده کزاز می‌گردد که فلجی انقباضی است. قطعه C (Fc)** **این توکسین (با وزن مولکولی ۵۲ کیلو دالتون) مسؤول اتصال توکسین به غشاء سلول‌های عصبی است. از اینرو و با توجه به غیر سمی بودن و خاصیت ایمنی‌زایی بالا، این قطعه می‌تواند هدف خوبی برای طراحی و ساخت واکسن جدید علیه این بیماری باشد. در حال حاضر با توجه به شیوع بیماری درحیوانات بخصوص اسب‌ها و مشکلات و اثرات جانبی واکسن توکسوئیدی موجود، نیاز به طراحی واکسن موثرتر و کاراتری به منظور پیشگیری از بیماری احساس می‌گردد. در این مطالعه قطعه‌ای از DNA مربوط به Fc *کلستریدیوم تتانی* با استفاده از PCR تکثیر شد و سپس این قطعه در وکتور بیانی pMALc2x تحت کنترل پروموتور *lac* کلون شد. در این مطالعه وکتور مورد استفاده پروموتور قوی دارد که امکان بیان بالای Fc را فراهم می‌آورد. نتایج این تحقیق نشان داد پلاسمید نوترکیب ایجاد شده ممکن است جهت تولید و توسعه واکسن‌های نوترکیب مناسب باشد و همچنین کاربردهای بسیار دیگری همچون استفاده در کیت‌های تشخیصی، تولید آنتی‌سرم برای سرم درمانی و جهت برای تحویل دارو به سیستم عصبی نیز دارد.**

واژگان کلیدی: *کلستریدیوم تتانی*، پروتئین نوترکیب، واکسن، Fc، pMALc2x

مقدمه

کزاز بیماری فلجی عصبی کشنده‌ای است که در دام و انسان اتفاق می‌افتد. عامل این بیماری *کلستریدیوم تتانی*، باکتری بی‌هوازی اجباری است که در خاک، کود و روده دام‌ها از جمله تک‌سمی‌ها یافت می‌شود و به علت اسپورزا بودن ریشه کنی عفونت حاصل از آن ممکن نیست. در حال جاضر این بیماری علاوه بر دام‌ها، در انسان بخصوص در کشورهای در حال توسعه نیز اتفاق می‌افتد و کزاز نوزادان یکی از

علل مهم مرگ نوزادان است. توکسین این باکتری یک پلی‌پپتید ۱۵۰ کیلودالتونی است که در بدن میزبان به دو قطعه ۱۰۰ و ۵۰ کیلودالتونی تفکیک می‌شود. قطعه C (Fc) از قطعه کوچک‌تر عامل اتصال به گانگلیوزید سلول‌های عصبی است و در صورت خنثی سازی آن از بروز بیماری جلوگیری می‌شود. در حال حاضر از توکسوئید کزاز برای ایمن‌سازی استفاده می‌شود که معایبی دارد از جمله تحریک و دردناک شدن محل تزریق، ایمنی‌زایی متفاوت بسته به روش غیرفعال‌سازی توکسین و خطر سمیت آن در صورتیکه به طور کامل غیر فعال نگردد. به این دلیل جستجوی روش‌های جدید تولید واکسن که بی‌خطر باشند و سطح ایمنیت بالایی ایجاد کنند ضروری می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر تکثیر و کلون قطعه Fc توکسین کزاز در وکتور پروکاریوتی است که می‌تواند پایه‌ای برای بررسی بیان آن و نیز امکان انتقال آن به وکتور یوکاریوتی جهت کاربرد در DNA واکسن است. این نوع واکسن می‌تواند عوارض واکسیناسیون برای دام‌ها بخصوص اسب را به حداقل و ایمنیت را ارتقاء دهد.

مواد و روش‌ها

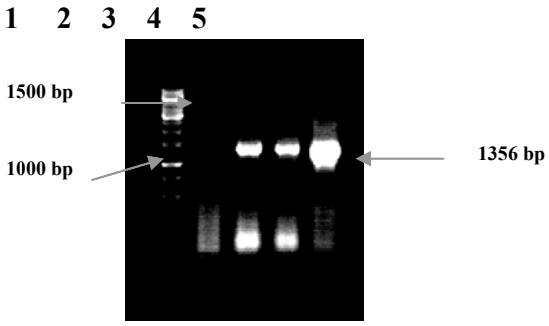
تکثیر قطعه Fc.. برای این منظور پرایمرهای اختصاصی این توالی با استفاده از نرم افزار الیگو طراحی شد و محل‌های برش با آنزیم‌های محدود کننده در آن در نظر گرفته شد. DNA باکتری کلستریدیوم تتانی با استفاده از کیت استخراج شد و واکنش PCR با استفاده از اجزاء زیر انجام گرفت: ۱ واحد آنزیم *pfu* ، مخلوط ۱۰ میلی مولار dNTPs، ۵۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، سولفات منیزیوم ۲/۵ میلی مولار، بافر *pfu* و ۳ میکرولیتر از DNA الگو. شرایط دمایی ترموسایکلر طبق شرایط زیر انجام شد: ۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، سپس ۳۵ سیکل هر کدام شامل ۱ دقیقه دناتوراسیون در ۹۴ درجه، ا دقیقه اتصال در ۵۰ درجه و ۴ دقیقه گسترش در ۷۲ درجه و در مرحله پایانی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه گسترش نهایی انجام گرفت. محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید انجام شد. محصول توسط کیت استخراج از ژل خالص گردید. سکانس قطعه تکثیر شده نیز تعیین گردید.برای کلون کردن از وکتور pMALc2x استفاده شد. این وکتور و فرآورده PCR با آنزیم های *BamHI* و *SalI* به صورت جداگانه در ۳۷ درجه به مدت ۹۰ دقیقه برش داده شدند و هضم با الکتروفورز در ژل آگارز تایید شد. سپس لیگاسیون با استفاده از آنزیم *T4* به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه انجام شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه آنزیم غیر فعال شد. این وکتور برای ترانسفورماسیون به باکتری *E. coli DH5α* استفاده شد و طبق روش چانگ ترانسفورماسیون انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتریهای پذیرای ترانسفورمه روی محیط LB agar دارای آمپی سیلین کشت داده شد و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. به منظور تایید کلونیزاسیون ۱۰ کلنی رشد کرده روی محیط LB انتخاب و DNA آنها به روش جوشاندن استخراج گردید. این DNA مطابق شرایط فوق تحت واکنش PCR قرار گرفت و حضور فرآورده با الکتروفورز تایید شد. بعلاوه استخراج وهضم پلاسمید نیز انجام شد.

نتایج و بحث

در نتیجه PCR فرآورده حاصل از تکثیر ژن قطعه Fc در الکتروفورز ژل آگارز مشاهد شد که ۱۳۵۶ جفت باز اندازه آن بود .

پرایمرهای

استفاده شده در این تحقیق پرایمرهای جدیدی هستند که دارای محل های برش برای آنزیم های فوق الذکر بوده و جهت وارد شدن به وکتور *pMALc2x* مناسب هستند. شکل ۱ نتیجه الکتروفورز را نشان می دهد.



شکل ۱. فرآورده PCR ژن Fc. ۱: مارکر ۱ کیلو باز. ۲: کنترل منفی. ۳و۴ و ۵: فرآورده ۱۳۵۶ جفت بازی ژن Fc.

نتایج هضم پلاسمید و انجام واکنش PCR متعاقب آن تایید کننده کلونیزاسیون موفق فرآورده حاصل از تکثیر ژن Fc می باشد. نتایج تعیین سکانس نیز با توالی ثبت شده برای این قطعه در بانک ژن توافق داشت. این نتایج بیان کننده مناسب بودن پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر قطعه Fc و استفاده از آن در فرآیند کلون و بیان این ژن می‌باشد. وکتور بکار رفته در این تحقیق نیز به طور موفقیت آمیزی پذیرای قطعه تکثیر شده بود که موجب تسهیل انجام مطالعات بعدی نیز می‌شود؛ بعلاوه پروموتور قوی موجود در این وکتور موجب بیان بالای پروتئین و در نتیجه استحصال مقادیر کافی از آنتی‌ژن جهت اهداف ایمونیزاسیون می‌شود. وارفلومیوا و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیقی مشابه به این موضوع پرداخته است که البته وکتور بکار رفته در تحقیق آنها متفاوت با تحقیق حاضر است. آنها بیان کرده اند که از آنجائیکه قطعه Fc مسئول اتصال به غشاء سلول میزبان می‌باشد، گزینه مناسبی برای طراحی واکسن مولکولی است و با امنیت بیشتر پاسخ ایمنی قویتری را ایجاد می کند. تا کنون در ایران جهت واکسیناسیون دام‌ها و انسان‌ها از توکسوئید استفاده شده است و تحقیق حاضر اولین مورد در استفاده از تحت واحدهای این توکسین جهت طراحی واکسن در ایران است که همراه با موفقیت انجام شده است. علاوه بر بحث ایمن سازی بیان قطعه *Fc* کلون شده و استحصال پروتئین خالص می تواند در طراحی کیت‌های تشخیصی نیز استفاده شود. همچنین با توجه به اتصال اختصاصی این قطعه به سلول‌های عصبی می‌توان از آن به عنوان حامل اختصاصی داروها به سیستم عصبی استفاده کرد.

منابع

1.Ghaffari, Sh; Seyfiabad Shapouri, MR; Moatamedi, H; Roayaei, M and Goodarzi, H (2010). Cloning and secretory expression of *VP2* gene of infectious bursal disease virus in eukaryotic cells. Iranian J. Vet. Res., 11: 72-78.

2.Varfolomeeva, N; Makhotina, O; Sergeeva, T and Belyi, I (2003). Production of recombinant fragments or the *Closteridium tetani* neurotoxin for the development of new immune-prophylaxis preparations against tetanus. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol., 3: 29-33.

3.Saikh, K; Sesno, J; Brandler, P and Ulrich, R (1998). Are DNA-based vaccines useful for protection against secreted bacterial toxins? Tetanus toxin test case. Vaccine. 16: 1029-1038.

Construction a plasmid encoding Fc fragment of *Clostridium tetani* in order to application in DNA vaccine against tetanus disease in animals

Hossein Motamedi[*1], MasoudReza Seifi abad Shapouri[2], Masoud Ghorbanpour[2], Neda Arefzadeh[3]
1- Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
3-Graduate student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran
* Corresponding E-mail address: hhmotamedi@yahoo.com

Abstract
Clostridium tetani is an obligate anaerobic bacterium that inhabits in soil, manure and intestinal tract of animals especially equidae family and due to spore formation its eradication is impossible. This agent produces tetanus toxin inside the host tissue which is, a potent inhibitor for the release of inhibitory neurotransmitter in the central nervous system that causes fatal tetanus disease which is spastic paralysis. Fragment C (52 kD) of this toxin is responsible for binding to the neuronal membrane. For this reason, and also its non toxigenic and immunogenic nature, this fragment might be ideal for new vaccine development. Presently, with respect to the incidence of disease in animals especially and the side effects of toxoid vaccine, designing a more effective and efficient vaccine for prevention of this disease is crucial. A segment of *Clostridium tetani* DNA corresponding to C fragment of tetanus toxin was amplified using polymerase chain reaction. This fragment was cloned into expression vector pMalc2x, under the control of the *lac* promoter. In this study, this vector has a strong promoter to allow high level expression of C fragment. Based on our results it appears that this recombinant plasmid may be suitable for the production and development of recombinant vaccine and also has many other applications, such as construction diagnostic kits, production hyperimmune antiserum for serotherapy and as a vehicle for drug delivery to CNS.

Key words: *Clostridium tetani*, Recombinant protein, Vaccine, Fc, pMALc2x

ارتباط بیان ژن HSP70 و عادت‌پذیری جوجه‌های گوشتی به تنش‌های حرارتی در اوایل دوره پرورش

محمد طاهر هرکی نژاد، رقیه رحمانی فیروزی ، محمد حسین شهیر
دانشگاه زنجان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی
مسئول مکاتبه : ro_rahmani@yahoo.com

چکیده

در این آزمایش اثرات عادت‌دهی حرارتی در اوایل دوره پرورش بر بیان ژن HSP70 در مغز جوجه‌های گوشتی بررسی شد. ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر ROSS 308 در ۳ گروه آزمایشی توزیع شدند: ۱) عادت‌دهی حرارتی[۱](TC) برای ۲۴ ساعت در روز سوم تحت دمای 38 ± 1 °C ۲) ترکیبی از عادت‌دهی حرارتی در روز سوم و استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی[۲](TCHS) ۳) گروه کنترل پرورش در شرایط نرمال سالن. نمونه های مغز جهت بررسی سطوح بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از تکنیک Real- Time PCR در ۴۲ روزگی جمع‌آوری شد. پرایمر های اختصاصی برای ژن HSP70 به عنوان ژن اصلی مورد مطالعه و نیز ژن های GAPDH و YWH به عنوان ژن های شاهد یا کنترل طراحی گردید. **نتایج بررسی اختلاف معنی‌داری در سطوح بیان ژن HSP70 بین گروه کنترل و TCHS را نشان داد. سطوح بیان ژن HSP70 در گروه TCHS به طور معنی‌داری افزایش یافت و گروه TCHS و TC تفاوت معنی داری نشان ندادند. نتایج نشان داد عادت‌دهی حرارتی موجب بهبود تحمل گرمایی در جوجه‌های گوشتی تحت شرایط تنش گرمایی می‌شود. افزایش بیان HSP70 در مغز در پرنده‌های TCHS ممکن است در بهبود تحمل گرمایی در آنها نقش داشته باشد.**

کلمات کلیدی: ،جوجه‌های گوشتی، عادت‌دهی حرارتی، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، تنش گرمایی، Real- Time PCR

مقدمه

استرس گرمایی یکی از پر خطر ترین شرایط محیطی است که بر عملکرد طیور تجاری تاثیر می گذارد که که دامنه خسارت آن به میلیون ها دلار در هر سال می رسد. سلول ها در مقابل عوامل استرس با کاهش سنتز تقریبا همه پروتئین های سلولی و افـزایش سـنتز پـروتئین هـای شوک حرارتی پاسخ می دهند. بر اساس اندازه HSPs به صورت ۶ خانواده اصلی طبقه بندی می شوند، بهبود تحمل گرمایی در جوجه‌های گوشتی به بیان بیشتر پروتئین شوک حرارتی ۷۰ نسبت داده می‌شود(Yan et al., 2009). در جوجه‌های گوشتی نیز عادت دهی دمایی در اوایل دوره پرورش منجر به حالت اپی‌ژنتیک در ژنوم می‌شوند که منجر به سازگاری گرمایی یا سرمایی طولانی مدت در طی تکامل بعـد از هچ می‌شود. بنابراین اپی‌ژنتیک می‌تواند برای جلوگیری از اثرات مخرب محیط بر رفتاروفیزیولوژی بکار رود. تحقیقات کمی جهت بررسـی اثرات عادت‌دهی حرارتی و استرس گرمایی بر بیان ژن HSP70 انجام شده است. لذا در این تحقیق به بررسی اثرات عادت‌دهی حرارتی بر بیان ژن HSP در شرایط تنش گرمایی پرداخته شده است.

---

[۱] Thermal conditioning
[۲] Thermal conditioning with heat stress

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر ROSS 308 در ۳ گروه آزمایشی (۳ تیمار و ۵ تکرار) با ۱۶ پرنده به ازای هر تکرار توزیع شدند: ۱) عادت دهی حرارتی برای ۲۴ ساعت در روز سوم تحت دمای $38 \pm 1\ ^{o}C$ ۲) ترکیبی از عادت‌دهی حرارتی در روز سوم و استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی(TCHS) ۳) گروه کنترل پرورش در شرایط نرمال سالن. نمونه برداری از تعداد۳۰ پرنده جهت تهیه نمونه هیپوتالاموس انجام شد. نمونه ها تا زمان استخراج RNA در منهای۸۰ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. پرایمر های اختصاصی برای ژن TRH[1] به عنوان ژن اصلی مورد مطالعه و نیز ژن های GAPDH[2] و YWH[3] به عنوان ژن های شاهد یا کنترل طراحی گردید استخراج RNA کل توسط کیت CinnaPure RNA و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تهیه cDNA از RNA کل توسط واکنش رونویسی معکوس (RT- PCR)[4] با استفاده از کیت Vivantis(2-steps RT-PCR ، سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی بیان ژن از واکنش Real-time PCR استفاده شد. ترکیبات واکنش به همراه غلظت آن شامل: SYBR Grean PCR Master Mix ۱۲/۵ میکرولیتر، ۰/۳ µM از هر کدام از پرایمرها بود، DNA 300 ng الگو، و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمانی و دمایی مورد استفاده در واکنش PCR شامل: تیمار اولیه ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و فعال سازی اولیه ۹۵درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود، و چرخه های حرارتی شامل ۹۵درجه سانتیگراد واسرشت سازی به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت گسترش قطعه مورد نظرانجام شد. جهت بررسی بیان ژن اندازه های Ct و نیز اندازه مطلق تعداد کپی های DNA که با مقایسه با منحنی استاندارد رسم شده بدست آمد مقایسه نمونه های تیمار با گروه شاهد انجام شد. جهت نرمال کردن داده و نیز حذف اثر خطا احتمالی از ژن های شاهد[5] استفاده شد.

نتایج و بحث

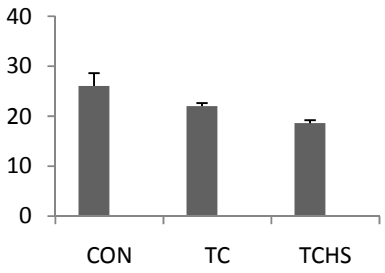
نتایج حاصل از Real time PCR تفاوت معنی‌دار در بیان ژن HSP70 در گروه TCHS نسبت به گروه کنترل نشان داد($P<0/05$). گروه TCHS و TC تفاوت معنی‌داری نداشتند(شکل ۱). بیان بیشتر HSP70 در جوجه‌های TCHS نشاندهنده تحمل گرمایی در شرایط استرس گرمایی از ۲۴ تا ۴۲ روزگی می‌باشد. یکی از مهمترین اعمال HSP حمایت ارگانیسم ها از اثرات مخرب گرما می باشد(Yu et al., 2008). در طی استرس گرمایی رونویسی و بیان HSP70 در بافت‌های مختلف نشاندهنده نقش حمایتی این پروتئین می‌باشد. از طرف دیگر HSP mRNA می‌تواند به عنوان بیومارکر در خسارت‌های ناشی از استرس گرمایی باشد (sun et al.,

---

[1] Thyrotropin-releasing hormone
[2] Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
[3] Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
[4] Reverse transcription

[5] House keeping gene

2007) نتایج این تحقیق نشان می دهد که دمای محیطی۱ ± ۳۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت در ۳ روزگی موجب تحمل گرمایی در جوجه های گوشتی می شود و جوجه های که در این دوره دچار چالش حرارت بالا شده بودند در مواجهه با چالش حرارتی اواخر دوره پرورش بیان ژن HSP بالاتری نسبت به گروه شاهد نشان دادند. بنابراین بیان ژن HSP می تواند در شرایط تنش گرمایی دارای نقشی موثر بوده و افزایش بیان آن می‌تواند نشاندهنده تحمل گرمایی در شرایط استرس گرمایی باشد و در نتیجه یکی از مکانیسم‌های مقابله با تنش گرمای‌باشد.



شکل۱- مقایسه نمونه‌های تیمار و شاهد(± **انحراف استاندارد**) با مقدار سیکل آستانه، C_t (P<0/05).

منابع

1. Sun, P.M., Liu, Y.T., Zhao, Y.G., Bao, E.D.,Wang, Z.L., 2007. Relationship between heat damages and HSPs mRNA in persistent heat stressed broilers. Agricultural Science in China 6, 227–233
2. Yan, J. Bao, E., Yu, J., 2009. Heat shock protein 60 expression in heart, liver and kidney of broilers exposed to high temperature. Research in Veterinary Science. 86: 533–53.
3. Yu, J ., Bao, E., Yan,J ., Lei, L. 2008. Expression and localization of Hsps in the heart and blood vessel of heat-stressed broilers. Cell Stress and Chaperones. 13:327–335.

Relationship of Heat shock protein 70 gene expression and thermal adaptation in early growing period in broiler chicks

Taher Harkinezhad , Roghayeh Rahmanifirozi, Mohammad Hosein Shahir
University of Zanjan, Faculty of Agriculture, Department of animal science
Corresponding E-mail address: t_harki@yahoo.com

Abstract

This study was aimed to assess effects of thermal manipulation in early growing period on CRH gene expression in broiler chicks under thermal challenge. Two hundred forty broiler chicks of ROSS 308 in three experimental groups namely: 1) Thermal conditioning(TC) for 24 h at the 3 days of age 2) combination of TC at the 3 days of age and subsequent heat stress (32 ºC ± 2) from 24 to 42 days of age (TCHS) and 3) the control. Samples of brain were taken to evaluate the level of gene expression by real-time PCR. Specific primers were designed for HSP70 as gene of interest and GAPDH and YWH as housekeeping reference gene. The rate of HSP70 gene expression was significantly different between treatments and control groups. Results showed that thermal adaptation lead to increase in HSP70 gene expression in chicks of TCHS group when compared to control group under thermal stress condition. Therefore, thermal adaptation in early growing period and consequently increase in HSP 70 gene expression can be considered as one of the mechanisms involved in improvement of thermotolerance in broiler chickens under thermal challenges.

Key words: Broiler,Thermal conditioning ,HSP70, Thermotolerance, Real-time PCR

آنالیزساختار ژن در آلل ای Ovar-DRB*I* مختلف گوسفندی

حافظعلی دلجو عیسی لو*-سید محمد حسینی[۲] – سمیرا وره زردی[۳]

۱- کارشناس ارشد علوم دامی (ژنتیک و اصلاح دام) دانشگاه زنجان۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه زنجان ،۳-کارشناس ارشد علوم دامی دانشگاه رازی کرمانشاه

* سمیرا وره زردی: s_varahzardi@yahoo.com

چکیده :

پیتر گرر(۱۹۳۰) در تحقیق به گروهی از آنتی ژن های سطح سلولی در موش دست یافت که تشابه آنها در دهنده و گیرنده عضو به طور محسوسی باعث بقای عضو پیوندی می شد. به همین دلیل این مولکولها را آنتی ژن های سازگار بافتی MHC نام نهادند.در دهه های ۱۹۶۰ تا ۱۹۷۵ مشخص شد، ژن های MHC در ایجاد پاسخ ایمنی نسبت به آنتی ژن های پروتیئنی اهمیت اساسی دارند. جایگاه ژنی MHC دسته II یکی از خانواده های بزرگ ایمونولوژی می باشدکه برای عرضه پپتید های آنتی ژنی به سلول های T کمک کننده اختصاص یافته اند. در میان ژن های MHC جایگاه ژنی DRB از سایر جایگاه ها منتوع تر است. در بررسی اگزون شماره ۲ Ovar-DRBI ، گزارش شده است که ارتبط میان Ovar و مقاومت نسبت به آلودگی های نماتودی وجود دارد.همچنین شایگر گزارش کرده که Ovar-DRBI با حضور تعداد کم تخم انگل در مدفوع ، به دنبال آلودگی با استرتاؤیا سیرگومسینکتا در ارتباط است. از طریق نرم افزار clustal w این ژن در الهای گوناگون در سه گروه کلی قرار گرفتند که گروه ۲ و۳ با توجه به طول یکسان ،تمایز بین ژن های موجود در آلل‌های گوناگون را به خوبی مشخص کرد.

واژگان کلیدی: گوسفند- Ovar-DRB*I* - آلل- نرم افزار

مقدمه :

ناحیه ژنتیکی MHC کمپلکس پذیرش بافتی نسجی در سال ۱۹۳۰ توسط بیتر گرر شناسایی شد این ژن در رد پیوندهای بافتی نقش دارد.تمام مهره داران از ماهیان غضروفی تا پستانداران (به جز ماهیان فاقد اروراره) دارای ژن MHC هستند.یکی از عمده عملکرد های MHC رمز کردن مولکول های عرضه کننده آنتی ژن است این منطقه ژن از سه دسته تشکیل شده است که دسته های I α و II پذیرنده هایی هستند که به قطعات آنتی ژنی متصل شده و آن ها را لنفوسیت های T که عملکرد کشنده سلول ها را دارند عرضه می نمایند (۴). بعدها مشخص شد که ژنهای Ir همان ژنهای MHC هستند. امام فعالیت اصلی و نقش مرکزی ژنهای MHC در پاسخهای ایمنی زمانی روشنتر شد که دانشمندان دریافتند لنفوسیتهای T یاور، نمی توانند آنتی ژن ها را در حالت آزاد یا محلول شناسایی کنند. با نگاهی گذرا به انواع عوامل آسیب زای میکروبی متوجه می شویم که آنها یا انگل خارج سلولی یا

داخل سلولی هستند. در سال ۱۹۸۷ برای اولین بار کمپلکس پذیرش بافتی نسجی در گوسفندان (Ovar-MHC) با کمک مطالعات سرولوژیکی انجام شده روی آنتی ژن های لمفوسیتی مورد شناسایی قرار گرفت(۳). مطالعات اولیه ژن های کلاس II گوسفند با تکنیک ساترن بلاتینگ و با بکار گیری نشانگرهای مولکولی انسانی الگوی پیچیده ای را نشان داده است که بیان گر این مطالب است که گوسفندان دارای نواحی ژن متفاوت مانند همولوگ DR-DQ بوده ولی احتمالا فاقدDP میباشد(۱).محققین بیش از ۵۰ الMHC تشخیص داده اند. درجه بالایی از پلی مورفیسم برای ژنهای MHC که برای هر فرد منحصر به فرد هستند..تا حدودی توجیح می کنند که چگونه سیستم مصونیت میزبان می توانند به چنین تعداد زیاد آنتی ژن ها حمله کنند. برای حمله به آنتی ژن بایستی میزبان خودش را از عامل بیماریزا تشخیص بدهد. در بین الل های متفاوت DRBI توالی اگزون ۲ در ساخت لنفوست T بیشترین عملکرد را دارند.با بررسی ساختار ژن در آلل هایOvar-DRB*I* مختلف گوسفندی تفاوت عملکرد آن را میتوان نشان داد.

مواد و روش‌ها:

اطلاعات مربوط به توالیهای الل های مختلف ژن DRBI در گوسفند را از بانک‌های اطلاعاتی بدست آورده و توسط نرم افزار EXCEL جایگاه نوکلئوتید ها بررسی شد و همچنین هم آرایی توالی ها بااستفاده از http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgiو گروه بندی ژنها نیز با http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html صورت گرفت.

نتایج و بحث:

ژن MHCدر آلل هایOvar-DRBI قرار دارد و در کمک به سیستم ایمنی باعث پس زدن پیوند می شود در اگزون ۲ ایت توالی طولهای متفاوتی دیده شد با اینکه ۶۶,۶ درصد در توالی های مورد بررسی قرار گرفته ۴۷۴ نوکلئوتید داشتند اما ،۱۱,۱ در صد ۲۵۸ نوکلوتید ،۱۶,۶ درصد ۳۲۴نوکلوتید ،۵,۵ در صد ۲۲۶ نوکلوتید و ۵,۵ در صد ۳۲۸ نوکلئوتید را دارا بودند.

با استفاده از نرم افزار بلاست توالی های مشابه این ژن مورد آنالیز قرار گرفت وسپس توالی ها گروه بندی شدند. در گروه بندی ایجاد شده توالی ها در ۳گروه قرار گرفتند.در گروه I توالی های باطول DRB1*2301.exon2 (324n) وDRB1-new I- exon2(n۲۲۶)و DRB1-DRB gene(n۲۵۸)و DRB1*9310.exon2(n۳۲۴)وDRB1-F.exon2(n۳۲۸)و DRB-gene.exon2(n۲۵۸) قرار گرفتند.

توالی های گروه II و III با این که دارای طول یکسانی(۴۷۴) بودند ولی در دو گروه متفاوت قرار گرفتند وتمایز بین توالی های در اللهای مختلف را به خوبی مشخص کرد، به طوری که توالی های DRB1-C, DRB1-D, DRB1-H, DRB1-I, DRB1-N, DRB1-B, DRB1-J, در گروه II و توالی های DRB1-G, DRB1-L, DRB1-M, DRB1-O, DRB1-F در گروه III قرار گرفتند. در نرم افزار بلاست شباهت سایر ژنهای که با ژنها ی مورد نظر بررسی شد و مشخص شد که شباهت بالای ۸۰در صد و E valu نزدیک به صفر جهش پذیری پائینی در توالی این ژن در آلل های مختلف رخ داده و کارکرد خود را از دست نداده است.

منابع

1. Dukkipati VSR.Blair.H.T . Garrick D.J.and Murray,A.(2006).”Ovar-Mhc”-Ovine major histocompatibility complx: structure and gene polymorphisms.Gene.Mol.Res.5(4):581-608.

2- Gruen JR and Weissman SM(1998).Evolving views of the major histo compatibility complex. Blood 90:4252-4265.

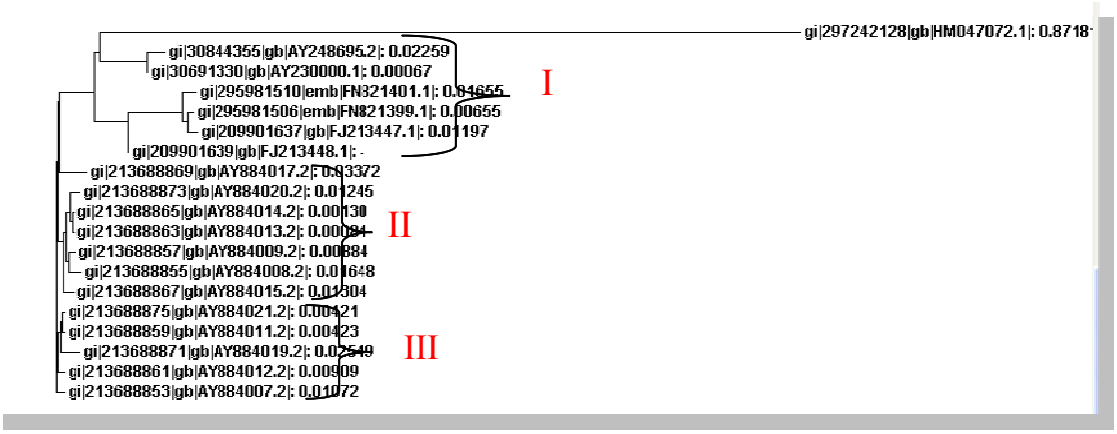
3. Konnai S.Y, Nagaoka S,takesima. M, Onuma,et al.(2003).sequence and diversity of 17 new Ovar-DRB 1 allels from three breeds of sheep .Eur J.Immunogenet.30;275-282.

4-Puri NK,Gorrell MD and Brandon MR (1987) , sheep MHC class II molecules :I. Immunochemical characterization. Immunology 62:567-57.

جدول۱: در صد هر نوکلئوتید در هر طول الل های مختلف به قرار زیر می باشد.

طول n / n	۴۷۴	۲۵۸	۳۲۴	۲۲۶	۳۲۸
A	۲۱/۵	۲۴/۳۰	۲۰/۳	۲۳/۸	۲۳/۲
T	۱۸/۳	۱۷/۴	۱۷/۹	۱۶/۳	۱۷/۴
C	۲۷/۴	۲۳/۲	۲۳/۷	۲۳/۸	۲۳/۶
G	۳۲/۷	۳۵/۲	۳۷/۹	۳۵/۸	۳۵/۶

شکل۱: نمایی از توالی ها در نرم افزار **clustalw**



شکل۳: نمودار فیلوژنیک الل‌های مختلف

Analysis of gene structure in Ovar-DRB*I* alleles in different sheep

Hafezali Deljoo isalo[1]- seyed Mohamad Hoseyni[2]-Samira varezarezardi[3]
1, 2 corresponding author affiliations
*** Samira Varezardi : s_varahzardi@yahoo.com**

Abstract:

Gvrr same proposal led to a group of cell surface antigens in mice to achieve the similarity in donor and recipient member to significantly transplant survival was caused. That's why these molecules MHC antigen tissue compatible with the role MHC molecules in transplantation immunologic rejection, according to the researchers was attracted, but their importance in controlling immune responses 20 years after the discovery of these genes were identified. In decades 1960 to 1975 were identified, MHC genes in causing the immune response to protein antigens are essential. Among the MHC genes of other DRB gene status of the position is more Mntv. The position of a gene exon 6 and intron 5 is composed of exon 2 from the rest of exon polymorphs reviews are more genes in different alleles length is different in different frequency And at length the number of bases were different. Through the software clustal w L gene in three different groups were generally the group 2 and 3 during the same distinction between genes in different alleles well identified.

Keywords: Sheep - Ovar-DRBI-allele - Software

استفاده از نانوبیوتکنولوژی در پرورش و سلامت دام

علی خطیبی بردسیری* [۱]، رضا طهماسبی[۲]، محسن ابراهیمی بسابی[۳]

[۱ و ۲] دانشگاه شهید باهنر کرمان- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی، [۳] دانشگاه تهران- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

* نویسنده مسئول: علی خطیبی بردسیری، کرمان – بردسیر- بلوار شهید کلانتری- کدپستی : ۷۸۴۱۹۳۳۱۴۷

Khatibi_a@edu.uk.ac.ir

چکیده

نانوتکنولوژی به عنوان تکنولوژی استفاده از مواد و ساختارهایی تعریف می شود که در مقیاس نانومتری وجود دارند و چون مواد با مقیاس های کوچک دارای خصوصیات و کاربردهای متفاوتی در مقایسه با مقیاس های بزرگتر هستند، کاربرد و تحقیقات آنها افزایش بیشتری یافته است. اخیرا تحقیقات در زمینه نانوبیوتکنولوژی و خصوصا آزمایشاتی که بر تولید دارو و درمان در سلامت انسان متمرکز شده اند افزایش یافته است. این تحقیقات نخست نیازمند آزمون در سلامت حیوان و در جهت بهبود فرآیندهای تولید حیوانات هستند، بنابراین هدف از این تحقیق این است که یک دید کلی از نانوتکنولوژی و کاربردهای آن در پرورش حیوانات و دامپزشکی بدست آید.

واژگان کلیدی: نانوبیوتکنولوزی، نانوذرات، نانومواد، دامپزشکی، علوم دامی.

مقدمه:

عبارت نانوتکنولوژی (برگرفته از کلمه لاتین "Nanus" به معنی خیلی کوچک) به عنوان تکنولوژی مواد و ساختارهایی است که اندازه آنها در واحد نانومتر(۱-۱۰۰ نانومتر) اندازه گیری شده و در زمینه های مختلف همچون فیزیک، شیمی، بیولوژی(زیست شناسی) کاربرد دارند(REA, 2001). چون این اندازه ها خیلی کوچک هستند، خصوصیات مواد نیز می توانند نسبت به مقیاس های بزرگتر (حتی میکرون) تفاوت های قابل ملاحظه ای داشته باشند.

نانوذرات از زمانهای خیلی دور بر روی زمین حضور داشته و براساس پدیده های طبیعی مختلف همچون واکنش های فتوشیمیایی، فوران های آتشفشانی یا آتش سوزی های جنگل ها(بازآ، ۲۰۰۷) بوجود آمده اند. و برطبق آخرین تحقیقات، اگرچه در زمانهای قدیم هیچگونه اطلاعاتی در مورد نانوتکنولوژی و تعاریف آن نداشتند ولی از نانوتکنولوژی استفاده می شده است. به عنوان مثال، در کشورهای شرقی از کلوئیدهای شامل نانوذرات طلا در درمان بیماری های استخوانی همچون آرتریت(کائو، ۲۰۰۴) استفاده می شده است. امروزه بیوتکنولوژی کاربردهای زیادی در علوم مختلف دارد. به عنوان مثال در کشاورزی از نانوذرات به شکل کودهای نانو، فیلترهای آب و تله های مواد سمی (لعل، ۲۰۰۷) و سایر کاربردها استفاده می شود. با این وجود یکی از مهمترین و گسترده ترین استفاده های نانوتکنولوژی در زمینه های داروهای انسانی است که از نانوذرات برای آزمایش داروهای سرطان(سینها و همکاران، ۲۰۰۶)، مواد مغذی خوراکی (رآس و همکاران، ۲۰۰۴)، هورمون ها (چافازیک و همکاران، ۲۰۰۶)، ژن درمانی(بوومن و لئونگ، ۲۰۰۶) و به عنوان یک ماده حاجب در مطالعات تصویر

برداری (مک نیل، ۲۰۰۵) استفاده می شود. در زمینه داروسازی دامپزشکی و پرورش حیوانات نیز تمایل زیادی در استفاده از نانوتکنولوژی وجود دارد اما به هر حال تحقیق در این زمینه هنوز دارای محدودیت هایی است.

کاربردهای نانوتکنولوژی در پرورش حیوانات

بخش زیادی از تحقیقات فناوری نانو که در زمینه طب انسانی به کار می رود ابتدا در حیوانات آزمایشگاهی آزمون شده است و لذا این آزمایشات نیازمند همکاری بین گروه های علمی تخصصی بیوتکنولوژی(خصوصا متخصصان نانوتکنولوژی)، دامپزشکی، دامپروری و سایر زمینه های مرتبط است. با توجه به این موضوع اسکات(۲۰۰۵) ۴ زمینه کاربردی نانوتکنولوژی در حیوانات ارائه کرده است: ۱) تامین دارو، مواد مغذی، پروبیوتیک ها، مکمل ها و سایر مواد در بدن ۲) تشخیص و درمان بیماری ها با نانوذراتی که توانایی تشخیص و حذف علت بیماریها را بدون عمل جراحی فراهم می کنند. ۳)تشخیص نشانگرهایی که در پیگیری پیشینه و تولیدات حیوان (خصوصا گوشت، شیر و تخم) کمک می کنند. ۴) مدیریت تولیدمثلی با استفاده از حسگرهای ایمنی هورمونی.

اخیرا رومرو- پرز و همکاران (۲۰۱۰) با طراحی و ارزیابی مطالعات آزمایشگاهی(in vitro) از نانوذرات سدیم به صورت مصرف خوراکی در نشخوارکنندگان و به شکل کو- پلیمرهای متاکلریلات استفاده کردند. این ماده در شکمبه تجزیه نمی شود ولی به اسیدیته پایین شیردان حساس است. در آزمایش انجام شده دیگر استفاده از نانوذرات نقره به دلیل خاصیت آنتی باکتریایی، بر رشد جنین جوجه در تخم تاثیری نداشته ولی تعداد و اندازه فولیکول های لنفاوی غده بورسا فابرسیوس را کاهش می دهد(گرودزیک، ۲۰۰۶). حسگرهای ایمنی براساس نانوساختارها قادر به تشخیص غلظت پروژسترون در شیر گاو، تسهیل در تشخیص تخمک گذاری در حیوانات(کارالرو و همکاران، ab، ۲۰۰۷) و Clembuterol (یک ضد-β) در گوشت حیوانات علفخوار(این ماده به عنوان یک پروموتور رشد استفاده می شود ولی بقایای آن در بافت های حیوانی می تواند تاثیر منفی بر سلامت انسان بگذارد) استفاده می شوند.

در زمینه پیشگیری و مبارزه با بیماری ها، واکسن های کمک کننده حاوی نانوذرات فسفات کلسیم تولید شده اند که قادر به ایجاد ایمنیت موثر ضد ویروسی هستند(هی و همکاران، ۲۰۰۰). دویل وهمکاران(۲۰۰۵) با استفاده از واکسن کمکی نانوذرات توانستند که در بدن موش برضد آنتی ژن Trichinella (انگل مسئول بیماری آلودگی باتریشین (Trichinosis) در انسان) پاسخ ایمنی ایجاد کنند که باعث کاهش لارو انگل در بافت ماهیچه ای گردید. از سوی دیگر در استفاده معمول از آنتی بیوتیک ها باقی مانده این مواد ممکن است از طریق محصولات تولیدی حیوان دفع شده و در نهایت به مصرف انسان برسد. به هر حال با استفاده از علم نانوتکنولوژی، چون در کاهش اندازه ذرات به حد چند نانومتر میزان تاثیر گذاری و سایر خواص این مواد افزایش می یابد، می توان از مقادیر کمتر آنتی بیوتیک ها استفاده کرد. این مسئله توسط فتال و همکاران (۱۹۸۹) به اثبات رسید. در این آزمایش موش ها به Salmonella Typhimurium مبتلا گشته و سپس با فرم ها و مقادیر مختلف آمپیسیلین درمان گشتند. گروهی با آمپیسیلین متصل به نانوذرات مورد درمان قرار گرفتند درصد زنده مانی برابری با گروه درمان معمولی داشتند ولی تفاوت موجود در مقدار مورد نیاز آنتی بیوتیک است که حدود ۴۰ برابر کمتر و دارای تاثیریکسان بود. علاوه بر این توزیع آن در بافتهای بدن مشخص تر بوده و بنابراین مقادیر کمتری از آنتی بیوتیک برای کسب نتایج یکسان نیاز است.

در زمینه تغذیه، مواد معدنی یکی از پر کاربرد ترین مکمل های مورد استفاده در تغذیه حیوان می باشند. با این حال قابلیت دسترسی زیستی مواد معدنی تحت تاثیر روش تهیه آن هاست و بنابراین اگر آن ها دارای قابلیت زیستی پایینی باشند حیوان توانایی استفاده

مناسب از آن ها را ندارد و از بین می روند. یک مثال از این مطلب در مورد آهن است که کمبود آن هنوز یکی از مشکلات تغذیه انسان و حیوان، خصوصا در مراحل اولیه زندگی، دوران آبستنی و آلودگی های انگلی است(چرچ، ۲۰۰۳). یکی از بهترین منابع قابل دسترس زیستی این عنصر به شکل سولفات آهن (Ferrous Sulfate) است(مک دویل، ۱۹۹۷). ماده جایگزین آن که دسترسی کمتری دارد ولی پایدار تر است فسفات آهن Ferric Phosphate می باشد. در این مورد رونر و همکاران (2007) توانستند شدیدا قابلیت دسترسی نانوذرات فسفات آهن را بهبود ببخشند و ثابت کنند که منابع این ماده در مقیاس نانو می تواند ارزش غذایی آن را افزایش دهد.

ایمنی و سمیت نانو مواد استفاده شده در حیوانات :

به طور کلی، سمیت نانومواد بسته به فاکتور های متعددی همچون میزان استفاده(دوز)، غلظت عامل موثره، نوع پلیمر مورد استفاده برای نانوکپسول کردن، و سایر موارد است. بر این اساس، بردیک استول و همکاران (۲۰۰۵) در یافتند که نانوذرات نقره دارای تاثیر منفی بر گامتوژنیز در موش دارند و لذا هنگامی که از حیوانات با هدف تولید مثل استفاده می شود نباید از این عنصر استفاده شود.

نتیجه گیری :

نانوتکنولوژی یکی از زمینه های توسعه پایدار است و دارای برنا مه های کاربردی متنوع و خاص بوده و پتانسیل بالایی برای بهبود تولید حیوانات دارد. مطالعات نانوتکنولوژی در این زمینه ها هنوز محدود است. با این وجود، اجرای آن امکان پذیر است و احتمالا با نتایج حاصله امکان انجام فرایند های سریعتر و کارآمد را فراهم کرده و باعث بهبود شرایط زندگی برای موجودات و خصوصا انسان می شود.

منابع

1. Buzea, C., Pacheco, B. I., and Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases. 2(4):1-103.
2. Cao, G. 2004. Nanostructures & nanomaterials: Synthesis, properties & applications. Imperial College Press. England.
3. Fattal E., Youssef M., Couvreur P., Andremont A. 1989: Treatment of experimental salmonellosis in mice with Ampicillin-bound nanoparticles. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 33, 1540–1543.
4. Lal, R. 2007. Soil science and the carbon civilization. Soli Science Society of American Journal. 71:142. 147
5. McNeil, S. 2005. Nanotechnology for the biologist. Journal of Leukocyte Biology. 78:585-594.
6. Scott, N. R. 2005. Nanotechnology and animal health. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 24:425- 432.

The Use of Nanobiotechnology in Animal Production and Health

Ali Khatibi [1 *] , Reza Tahmasbi [2] , Mohsen Ebrahimi Basabi [3]
[1 , 2] Shahid Bahonar University of Kerman, [3] University of Tehran
*** Corresponding E-mail address: Khatibi_a@edu.uk.ac.ir**

Abstract

Nanotechnology is defined as the technology of materials and structures that have nanometer-scales which have different characteristics and applications in comparison with the larger ones, their applications are increased. Recently the researches on the Nanobiotechnology, especially on the drug production and human health treatment have increased. These researches need to be tested on animal's health and for improving animal production processes. So, our aim is to get a general view about Nanotechnology and its applications in animal science and veterinary.

Keywords: Nanobiotechnology, Nanoparticles, Nanomaterials, Veterinary, Animal Science.

کاربرد نانوبیوتکنولوژی در آبزی پروری و شیلات

علی خطیبی بردسیری[۱*]، محمد حسن زاده [۲]، جلال بیاتی زاده[۳]، محسن ابراهیمی بسابی[۴]

[۱-۲ و ۳] دانشگاه شهید باهنر کرمان- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی، [۴] دانشگاه تهران- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

* نویسنده مسئول: علی خطیبی بردسیری، کرمان – بردسیر- بلوار شهید کلانتری- کدپستی : ۷۸۴۱۹۳۳۱۴۷

Khatibi_a@edu.uk.ac.ir

چکیده

نانوتکنولوژی می تواند به عنوان یک پتانسیل فوق العاده در ایجاد انقلاب در کشاورزی و زمینه های مرتبط از جمله آبزی پروری و شیلات استفاده شده و ابزارهای جدیدی برای آبزی پروری، بیوتکنولوژی، ژنتیک، تولید مثل، بهداشت و درمان آبزیان و غیره فراهم کند. ابزارهای نانوبیوتکنولوژی مانند نانومواد، نانوحسگرها، نانوواکسن های DNA، انتقال ژن و انتقال هوشمندانه دارو و غیره راه حل بسیاری از مشکلات مربوط به تولید، تولید مثل و بهداشت حیوانات در پیشگیری، و درمان بیماری است. کاربردهای فناوری نانو در صنایع پرورش ماهی می تواند در شناسایی باکتری ها در بسته بندی، تولید طعم دهنده های قوی تر، کیفیت رنگ و ایمنی از طریق افزایش خواص ممانعت کنندگی مورد استفاده قرار گیرد. این مقاله به بررسی فناوری نانو و کاربردهای آن در آبزی پروری و شیلات می پردازد.

واژگان کلیدی: آبزی پروری، نانوبیوتکنولوژی، نانو مواد، نانو حسگر ها، نانوواکسن های DNA.

مقدمه

تعاریف متعددی از نانو تکنولوژی وجود دارد. علمی ترین تعریف بصورت "مطالعه، طراحی، ایجاد، سنتز، دستکاری و استفاده از مواد کاربردی، دستگاه و سیستم های مطالعه ماده در مقیاس ۱-۱۰۰ نانومتری" است. نانو تکنولوژی یک تکنولوژی بسیار رو به رشد است که زمینه بسیاری از حوزه های علم و برنامه های کاربردی فن آوری است. پیشرفت سریع در علوم نانو و فناوری نانو در سالهای اخیر افق های جدیدی را برای صنایع مختلف و بخش های مصرف کننده باز کرد که به عنوان سرآغاز انقلاب جدید صنعتی از جمله در بخش کشاورزی نمایان ساخته است. در بین پیشرفت های اخیر در علوم مختلف، فناوری نانو به عنوان یک علم جدید و بستر فناوری در توسعه و تحول سیستم های تغذیه کاربرد دارد{۱}. برنامه های کاربردی استفاده از فناوری نانو در آبزی پروری در حال توسعه هستند. با پیشینه خوب استفاده از فناوری های جدید، صنعت پرورش ماهی متراکم می تواند یکی از زمینه های مطلوب در تولید نانو محصولات تجاری باشد.

فن آوری نانو در آبزی پروری و شیلات

صنعت شیلات و آبزی پروری با استفاده از فناوری نانو و ابزارهای جدید همچون تشخیص سریع بیماری ها، افزایش توانایی ماهی در جذب مواد دارویی مانند هورمون ها، واکسن ها، و مواد مغذی و غیره به سرعت در حال پیشرفت است. این مسئله در بخش های مرتبط با کشاورزی، تغذیه انسان و حیوان شامل آبزی پروری و کاربردهای آن در علوم پزشکی و زیست شناسی برای تجزیه بیومولکول ها، درمان سرطان، توسعه روشهای غیر ویروسی برای ژن درمانی به عنوان وسیله انتقال DNA، پروتئین و یا سلولها، هدف

قرار دادن و ارسال دارو به قسمت های مختلف بدن، تشخیص بالینی و درمان و... استفاده خواهد شد. درحال حاضر ایده های متعددی در جهت استفاده از این فن آوری در مدیریت بهداشت ماهی، تصفیه آب در آبزی پروری، اصلاح نژاد، فن آوری در صید و پس از صید وجود دارد. زمینه های مربوط به آبزی پروری و شیلات که امکان استفاده فناوری نانو دارند عبارتند از:

نانو واکسن های DNA : شیوع بیماری یکی از عمده ترین موانع در توسعه و پایداری آبزی پروری است. رویکردهای متعددی در تلاش برای حل مشکل بیماری در آبزی پروری وجود دارد که یکی ازاین موارد واکسیناسیون می باشد. در این زمینه از نانو ذرات حامل موادی مثل کیتوزان و اسید پلی لاکتید-کو-گلیکولید(PLGA) {۲} استفاده می شود که آنتی ژن های واکسن با القاء التهاب خفیف ممکن است سطح بالایی از ایمنیت را همراه با عوارض جانبی واکسیناسیون برای ماهی ها و نرم تنان در برابر بیماری های باکتریایی و برخی از بیماری های ویروسی ایجاد کنند. علاوه بر این، واکسیناسیون توده ای ماهی ها را می توان با استفاده از نانوکپسول های حاوی نانو ذرات انجام داد. این مواد در مقابل عمل هضم و تجزیه مقاوم هستند. این نانوکپسول ها حاوی رشته کوتاه DNA هستند که به آب استخر های پرورش افزوده شده و از این طریق به سلولهای بدن ماهی جذب می شوند. مکانیسم سونوگرافی(اولتراسونیک)برای شکستن کپسول استفاده شده است که باعث آزادی DNA شده و بنابراین به این شکل واکسیناسیون در بدن ماهی پاسخ ایمنی سلولی ایجاد می شود. به طور مشابه، تجویز خوراکی این واکسن ها تحت عنوان واکسیناسیون باعث کاهش هزینه ها و بهبود مدیریت کنترل بیماری ها، بهبود دریافت و استفاده از داروها و واکسن ها می شود و در عین حال هزینه های تغذیه ثابت می ماند.

۱) **تحویل ژن** : توسعه سیستم های حامل جدید برای تحویل ژن نشاندهنده فن آوری های در دسترس برای درمان بسیاری از اختلالات و بیماری های ژنتیکی است. نتایج امیدوار کنندهای در زمینه تشکیل کمپلکس هایی بین کیتوزان و DNA {۷} گزارش شده است که کیتوزان باعث افزایش عملکرد تحول بهره وری شده و علاوه براین به نظرمی رسد که لیگاندهای مناسب ترکیب DNA-کیتوزان باعث عملکرد بهتر و بیشتر تحویل ژن از طریق واکنش آندوسیتوژنسیز با واسطه گیرنده می شود. این نتایج نشان می دهد که کیتوزان دارای اثربخشی و عملکرد قابل مقایسه ای دارد که ایجاد مسمومیت های مرتبط با سایر حامل های دارویی ندارد و بنابراین می تواند به عنوان یک ابزار موثر در تحویل ژن در آزمایشات in vivo مورد استفاده قرار گیرد..

۲) **تحویل هوشمندانه دارو** : امروزه، استفاده از آنتی بیوتیک ها، پروبیوتیک ها. داروهای تغذیه ای که از طریق غذا و یا تزریق انجام می شود که به عنوان پیشگیری کننده از بروز بیماری و یا درمان بیماری کاربرد دارند. دستگاه های در مقیاس نانو ممکن است توانایی تشخیص و درمان عفونت و مشکلات سلامتی را داشته باشند {۹}.

۳) **استفاده از نانو ذرات برای بهبود رشد ماهی** : دانشمندان آکادمی علوم روسیه گزارش کردند هنگامی که ماهیان خاویاری و ماهیان کپور با نانو ذرات آهن تغذیه می شوند به ترتیب ۳۰ و ۲۴ درصد سرعت رشد سریعتر خواهند داشت. {۱۰}. همچنین تحقیقات نشان داده است که استفاده از منابع مختلف مکمل سلنیوم (نانو سلنیوم، سلنومتیونین) افزوده شده در یک جیره خوراک پایه می تواند باعث بهبود وزن نهایی، نرخ رشد نسبی، وضعیت آنتی اکسیدانی فعالیت های گلوتاتیون پراکسیداز(GSH-PX) و غلظت سلنیوم ماهیچه ای ماهی کپور (Carassius Auratus Gibelio) شود. علاوه بر این به نظر می رسد نانو سلنیوم در مقایسه با سلنومتیونین آلی در افزایش مقدار سلنیوم ماهیچه موثرتر باشد {۱۱}. علاوه بر این تولید خوراک های نانو در ماندگاری بهتر و بهبود طعم و مزه غذا کمک می کند {۱۲}.

۴) **تصفیه و بازیافت آب** : نانو مواد در شکل فعال شده همچون کربن و آلومینیوم با مواد افزودنی مانند زئولیت و ترکیبات حاوی آهن، می تواند در فعالیت های آبزی پروری در جهت حذف آلاینده های آمونیاک، نیتریت ها و نیترات ها استفاده شوند. به همین ترتیب از نانو پودرهای ریز که از ذرات آهن در مقیاس نانو ساخته می شوند می توان به عنوان یک ابزار موثر برای تمیز کردن ناخالصی هایی از قبیل تری کلرو اتان، کربن تترا کلرید، دیوکسین ها و بیو فنیل های پلی کلرونات به ترکیبات کربنی ساده تر که اثر سمیت کمتری دارند استفاده کرد.

۵) **نانوفناوری در صید و پس از صید** : برای صید ماهی تورهای ماهیگیری دارای رنگ منعکس کننده نور هستند که باعث جلب توجه ماهی می شود. با این حال این تورهای معمولی فقط می توانند نور را در یک جهت بازتاب و منعکس کنند. برای رفع این مشکل ابتدا سطح تور را رنگ کرده و سپس با فیلم نانو پلیمید پوشش داده می شوند که در این حالت احتمال صید در مقایسه با زمانی که در پوشش تورها از نانو پلیمید استفاده نمی شود ۲ –۳ برابر بیشتر می شود.

نتیجه گیری

بدون شک نانو تکنولوژی یک فرصت بزرگ را برای اقتصاد و توسعه پایدار منابع آبزی پروری در خیلی از مناطق فراهم کرده است. اگرچه استفاده از فناوری نانو هنوز در مراحل ابتدایی در آبزی پروری قرار دارد ولی دارای زمینه و پتانسیل زیادی در حل بسیاری از مشکلات آبزی پروری و شیلات با نوآوری های فنی بهتر و در سطوح مختلف است .

منابع

1) Kuzma J, Verhage P, 2006. Nanotechnology in Agriculture and Food Production: Anticipated Applications. Project on Emerging Nanotechnologies and the Consortium on Law, Values and Health and Life Sciences. Centre for Science, Technology and Public Policy (CSTPP).
2) Rajeshkumar S, Venkatesan C, Sarathi M ,Sarathbabu V, Thomas J, Anver Basha K, Sahul Hameed AS, 2009. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). Fish & Shellfish Immunology, 26: 429-437.
3) Eldridge JH, Hammond CJ, Meulbroek JA, Staas JK, Gilley RM, Tice TR, 1990. Controlled vaccine release in gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches. Journal of Controlled Release, 11: 205–214.
4) Tomlinson E, Rolland AP, 1996. Controllable gene therapy pharmaceutics of non-viral gene delivery systems. Journal of Controlled Release, 1: 357-372.
5) Dutkiewicz J, Kucharska M, 1992. Advances in Chitin and Chitosan (Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP, eds). Elsevier Science, 54–60.
6) Zhou X, Wang Y, Gu Q, Li W, 2009. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (Carassius auratus gibelio). Aquaculture, 291: 78-81.

The Application of Nanobiotechnology in Aquaculture and Fisheries

Ali Khatibi [1 *], Mohammad Hasan Zadeh [2], Jalal Bayati Zadeh [3], Mohsen Ebrahimi Basabi [4]
[1, 2, 3] Shahid Bahonar University of Kerman, [4] University of Tehran
*** Corresponding E-mail address: Khatibi_a@edu.uk.ac.ir**

Abstract
Nanotechnology can be described as an immense potential in creating a revolution in agriculture and related fields, including aquaculture and fisheries, and new tools have been used for aquaculture biotechnology, genetics, breeding and health. Nanobiotechnology tools such as nanomaterials, Nanosensors, DNA Nanovaccination, transfer of genes and drugs and so on. These factors are suitable solutions to many problems related to animal production, reproduction and health, prevention and treatment of diseases. Nanotechnology applications in the aquaculture industry can be used to identify the bacteria in packaging, producing more robust flavors, color quality and safety through increasing inhibitory properties. This article deals with nanotechnology and its applications in aquaculture and fisheries.

Keywords: Fisheries, Nanobiotechnology, Nanomaterials, Nanosensors, DNA Nanovaccination.

بررسی بیان ژن موسین ۲ در ژژونوم جوجه گوشتی

حشمت سپهری مقدم

دانشگاه پیام نور تربت حیدریه

حشمت سپهری مقدم- خراسان رضوی – تربت حیدریه – دانشگاه پیام نور تربت حیدریه – he_sepehri@yahoo.com

چکیده :

احتیاجات ترئونین، مطابق توصیه های(۲۰۰۷) Ross، ۱۴ درصد بیشتر از(۱۹۹۴) NRC است و همچنین احتیاجات ویتامین آ در (۲۰۰۷) Ross برابر آن در (۱۹۹۴) NRCمی باشد. لذا در این آزمایش مقایسه ای بین سطوح مختلف ترئونین و ویتامین آ، از لحاظ تاثیر بر بیان ژن موسین ۲ در ژژونوم روده کوچک جوجه های گوشتی صورت پذیرفت. تیمارهای آزمایشی شامل جیرهٔ حاوی ۰/۹۴ % ترئونین و ۱۱۰۰۰۰IU/kg ویتامین آ در مکمل ویتامینی(مطابق احتیاجات Ross)جیرهٔ حاوی ۰/۸ ٪ ترئونین و ۱۵۰۰IU/kg ویتامین آ در مکمل ویتامینی (مطابق احتیاجات NRC) و جیره حاوی ۰/۸ ٪ ترئونین و فاقد ویتامین آ در مکمل ویتامینی(جیره شاهد) بودند. بیان ژن موسین ۲ در ژژونوم جوجه های تغذیه شده با جیرهٔ حاوی ۰/۹۴ % ترئونین و ۱۱۰۰۰۰IU/kg ویتامین آ نسبت به جیرهٔ شاهد و جیرهٔ تأمین کنندهٔ احتیاجات (۱۹۹۴) NRC بیشتر بود ولی این افزایش معنی دار نشد.

کلمات کلیدی : ترئونین، ویتامین آ، موسین ۲، جوجهٔ گوشتی

مقدمه :

موسین ها گلایکوپروتئین های پلی مریک هستند و جزء مهمی از لایه مخاطی را تشکیل می دهند که اپیتلیوم دستگاه گوارش و سایر دستگاه های بدن را می پوشانند. هسته پروتئین موسین های روده ، حاوی مقدار زیادی ترئونین است (دساین و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین، ویتامین آ برای نگهداری از کلیه مجاری حاوی مخاط در بدن از جمله دستگاه تنفس ، گوارش ، تولیدمثل ، ادرار لازم بوده و متابولیت های فعال ویتامین آ به عنوان فاکتورهای رونوشت بردار فعال شده عمل می کنند و بیان ژن های موسین را کنترل می نمایند (لامپن و همکاران، ۲۰۰۰).

با توجه به اینکه، احتیاجات (۱۹۹۴) NRC پاسخگوی رشد سویه های فعلی نیست (لیسون، ۲۰۰۶)، لذا آزمایش فعلی به منظور مقایسه احتیاجات (۱۹۹۴) NRC با راس (۲۰۰۷) به لحاظ بررسی بیان ژن موسین ۲ در ژژونوم رودهٔ کوچک جوجهٔ گوشتی انجام شد.

مواد و روش ها :

تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه یکروزه گوشتی نر در قالب یک طرح کاملا تصادفی در ۱۲ پن تقسیم شده به طوریکه میانگین وزنی جوجه ها به یکدیگر نزدیک بود. طول دوره آزمایش ۱۴ روز بود. جیره پایه حاوی۲۹۵۲/۹۵ Kcal/kg انرژی، ۲۱/۲۲ %پروتئین، ۰/۸ % ترئونین و۱۸۰۰ IU/kg ویتامین آ بود.

تیمارها عبارت بودند از : جیرهٔ حاوی ۰/۹۴ % ترئونین و ۱۱۰۰۰۰IU/kg ویتامین آدر مکمل ویتامینی(مطابق احتیاجات [۲۰۰۷] Ross جیرهٔ حاوی ۰/۸ % ترئونین و ۱۵۰۰IU/kg ویتامین آ در مکمل ویتامینی(مطابق احتیاجات [۱۹۹۴] NRC) و جیره حاوی ۰/۸ % ترئونین و فاقد ویتامین آ (جیره شاهد). سطح بیان ژن موسین ۲ و 18S rRNA با استفاده از کیت سایبرگرین[1] ABI در دستگاه ABI 7300 (Applied Biosystems) تعیین شد. سطح بیان موسین ۲ بر اساس مدل دلتا دلتا C_T برآورد شد. توالی پرایمر رفت موسین ۲ -5′ TCA CCC TGC ATG GAT ACT TGC TCA-3′ ، پرایمر برگشت موسین ۲ 5′-TGT CCA TCT GCC TGA ATC ACA GGT-3′ (هورن و همکاران، ۲۰۰۹) ، پرایمر رفت 18s : 5′-CGATGCTCTTAACTGAGTGT-3′ و توالی پرایمر برگشت آن 5′CAGCTTTGCAACCATACTC-3′ (اسمیرنو و همکاران،۲۰۰۶) بود. کلیه داده های بدست آمده، با استفاده از رویه های مدل های خطی نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۶) و به صورت یک طرح کاملا تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج و بحث :

تاثیر جیره های مختلف بر بیان ژن موسین ۲ در جدول شماره ۱ نشان داده شده است . همانطور که از جدول استنتاج می شود، افزایش سطح ترئونین از ۰/۸ درصد به ۰/۹۴ درصد و همچنین افزایش سطح ویتامین آ به ۱۱۰۰۰ واحد بین المللی در کیلوگرم ، باعث افزایش سطح بیان ژن موسین ۲ شد ، اگرچه این افزایش معنی دار نبود . این نتایج با نتایج منتشر شده توسط هورن و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد به طوریکه آنها گزارش کردند که در جوجه هایی تغذیه شده با 3/3 و 8/2 گرم ترئونین در کیلوگرم جیره به مدت ۷ روز، فراوانی mRNA موسین ۲ تغییر نکرد و هیچ ارتباطی بین دفع موسین خام و فراوانی mRNA موسین ۲ در جوجه ها وجود نداشت. عکس العمل متقابل بین گیرندهٔ اسیدرتینوئیک و مناطق تنظیم کنندهٔ ژن موسین بر بیان ژن موسین تاثیر داشته باشد، چنانکه تی و همکاران (۲۰۰۰)گزارش کردند که بیان ژن موسین ۵ و موسین ۴ در سلولهای اپیتلیوم چشم، تحت تاثیر سطوح ویتامین آ قرار می گیرند، زیرا متابولیت های فعال ویتامین آ، گیرنده های رتینوئید ها (RARs و RXRs) را فعال می کنند که این متابولیت ها قادر به تنظیم بیان ژن موسین می باشند. همچنین بهاتاچاریا و همکاران،(۱۹۹۴) گزارش کردند که سنتز و ترشح موسین ها در یک محیط کشت بدون سرم و غنی از هورمون، فقط در حضور اسید رتینوئیک، صورت می گیرد و مقدار mRNA موسین این محیط های کشت، بوسیلهٔ اسید رتینوئیک تنظیم می شود. مطابق نتایج حاصله از این آزمایش، افزایش سطح ترئونین و ویتامین آ به بیشتر از سطح توصیه شده توسط (۱۹۹۴) NRC، بیان ژن موسین ۲ را افزایش داد.

منابع

1. Desseyn, J., Aubert, J., Porchet, N., Lain, A. 2000. Evolution of the large secreted gel-forming mucins. Molecular Biology and Evolution. 17(8):1175-1184.
2. Duncan D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11:1-42.
3. Horn N. L., Donkin S. S., Applegate T. J., and Adeola, O. 2009. Intestinal mucin dynamics: Response of broiler chicks and white Pekin ducklings to dietary threonine. Poultry Science. 88:1906-1914.

4. Lampen A., Meyer S., Arnhold T., and Nau H. 2000. Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-transretinoic acid in small intestinal enterocyres. The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics. 295: 979-985.
5. Leeson S. 2006. Defining and predicting changes in nutrient requirements. XII European Poultry Conference, Verona, Italy, September 10-14.
6. Montagne L., piel C., and Lalles J. P. 2004. Effect of diet on mucin kienetics and composition: Nutrition and health implications. Nutrition Review. 62:105-114.
7. NRC. 1994. Nutrient Requirements of poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
8. Ross Broiler Nutrition Specification. 2007. Home page address: http://www.aviagen.com/
9. SAS Institute.2006. SAS/STAT User's Guide. Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.
10. Smirnov A., Tako E., Ferket P. R., and Uni, Z., 2006. Mucin gene expression and mucin content in the chicken intestinal goblet cells are affected by in Ovo feeding of carbohydrates. Poultry Science. 85:669-673.
11. Tei M., Spurr-Micbaud S., Tisdale A. S., and Gipson I. K. 2000. Vitamin A deficiency alters the expression of mucin genes by the rat ocular surface epithelium. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 41:82-88.
12. Uni Z., Platin R., and Sklan D. 1998 a. Cell proliferation in chick intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. Journal of Comparative Physiology. 168: 241-248.
13. Bhattacharyya, S. N., P. Ashbaugh, B. Kaufman, and B. Manna, 1994. Retinoic acid modulation of mucin mRNA in rat tracheal explants: response to actinomycin D, Cycloheximide, signal transduction effectors and antisense oligodeoxynucleotide. Inflammation. 18: 565-573.

جدول ۱. تاثیر سطوح مختلف ترئونین و ویتامین آ بر بیان ژن موسین ۲

ترئونین و ویتامین آ (٪)	میانگین C_T موسین ۲	میانگین C_T 18s rRNA	دلتا C_T (MUC2-18s RNA)[1]	دلتا دلتا C_T $(\Delta C_T-\Delta C_T 0\times 0/8)$[2]	(بیان ژن موسین ۲)[3]
۰× ۰/۸	۲۶/۲۰۳۴	۵/۲۵۸۳	۲۰/۹۴۱	۰	۱
۱۵۰۰× ۰/۸	۲۵/۹۰۷۲۳	۵/۲۱۴۶	۲۰/۶۹۲۶۳	-۰/۲۵۲۴	۱/۱۹۱۲۴۴
۱۱۰۰۰× ۰/۹۴	۲۵/۷۳۱۰۵	۶/۰۱۰۶۰۵	۱۹/۷۲۰۴۴۵	-۱/۲۲۱	۲/۳۳۱۰۸۲
±SEM					۰/۰۷۱
P value					۰/۰۵۶

[1] ΔC_T برای هر ژن موسین ۲، از تفریق مقدار C_T ژن موسین ۲ از مقدار C_T ژن 18S rRNA بدست آمد.

[2] مقدار $\Delta\Delta C_T$ برای هر ژن بوسیله تفریق ΔC_T هر نمونه از یک نمونه کنترل حاصل شد.

[3] بیان ژن موسین ۲ از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_T}$ بدست آم

Mucin 2 gene expression study on jejunum of broiler chicken

Heshmat Sepehri Moghaddam

Payam Noor University of Torbat Heydareyeh

he_sepehri@yahoo.com

Abstract :

Ross (2007) recommended threonine and vitamin A requirements 14% and 9500 IU/kg more than NRC (1994), respectively. This experiment was conducted to determine mucin 2 gene expression in incremental levels of threonine and vitamin A. Treatments were contained 0.94 % Thr and 11000 IU/kg vit A supplement (Ross requirement), 0.8 % Thr and 1500 IU/kg vit A (NRC requirement) and 0.8 % Thr and no vit A supplement. The most mucin 2 gene expression was related to diet containing 0.94 % Thr and 11000 IU/kg vit A in comparison to thers, however it was not significant.

Keywords: threonine, vitamin A, mucin 2 gene, broile

پروتئومیکس و کاربرد آن برای شناسایی بیماری‌های دام‌های اهلی

فرهاد احمدی[۱]، محمد جواد ضمیری[۲]، محمد خوروش[۳]، احسان مقدس[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ۲- استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۳- استادیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان،۴-دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

Farhadahmadi88@gmail.com

Proteomics and Its Application in Detecting Farm Animal Diseases

Farhad Ahmadi[1], Mohammad Javad Zamiri[2], Mohammad khorvash[3], Ehsan Moghadas

1. Post-graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University
2. Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University
3. Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
4. Post-graduate Student, Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

Farhadahmadi88@gmail.c

چکیده:

پروتئومیکس را گام بعدی در شناسایی سیستم‌های بیولوژیکی پس از ژنومیکس محسوب می‌کنند. با کمک این تکنیک می‌توان تعداد زیادی از پروتئین‌ها را به طور گسترده و در یک زمان خاص آشکارسازی و شناسایی کرد (Reinders and Sickmann, 2009). در تکنیک پروتئومیکس ابتدا توسط الکتروفورز ۲ بعدی (در بعد اول جداسازی بر اساس pH ایزو الکتریک پروتئین‌ها و بعد دوم جداسازی بر اساس اندازه و وزن مولکولی) و سپس توسط نرم افزارهای خاص، عکس به دست آمده از ژل 2-DE برای نقاط تغییر یافته در اثر یک بیماری خاص مورد آنالیز قرار می‌گیرد. در مرحله بعد با به کارگیری طیف‌سنج جرمی[۱] و الگوریتم‌های خاص هویت پروتئین مورد نظر شناسایی می‌گردد (Rabilloud *et al.*, 2010). تکنیک پروتئومیکس می‌تواند در شناسایی بیماری‌های دام برای تشخیص بیومارکرهای جدید و پاتوفیزیولوژی بیماری در سطح پروتئین کمک شایانی کند. با شناسایی بیومارکرهای شناسایی شده خاص آن پاتوژن توسط تکنیک پروتئومیکس، می‌توان به درمان تخصصی‌تر و دقیق‌تر دست پیدا کرد (Bendixen *et al.*, 2011).

واژگان کلیدی:پروتئومیکس، الکتروفورز ۲ بعدی، طیف‌سنج جرمی، ورم پستان، بزاق

مقدمه:

طی سال های اخیر تکنیک پروتئومیکس در حیوانات مزرعه به خصوص برای شناسایی مکانیسم‌های بیماری کابرد بسیار گسترده پیدا کرده است که در ادامه به دو نمونه از آنها اشاره می‌گردد (Lippolis and Reinhardt, 2008).

[1] Mass Spectrometer

ورم پستان

مارکرهای خاص که بتوانند به طور مستقیم در مزرعه در شیر شناسایی گردند برای نظارت در فارم بسیار می‌توانند مؤثر باشند که این سیستم‌ها از نظر تجاری برای چند بیومارکر برای تشخیص ورم پستان در حال حاضر وجود دارد (Viguier *et al*., 2009). در یک پژوهش نمونه‌های شیر حاصل از گاوهای مبتلا به ورم پستان و گاوهای سالم با استفاده از تکنیک 2-DE و MALDI-TOF[۱] مورد بررسی قرار گرفت؛ شش پروتئین در شیرهای مبتلا به ورم پستان یافت شد که می‌توانند به عنوان مارکرهای با ارزش در تشخیص ورم پستان در نظر گرفته شوند (Mandanici *et al*., 2010). پروتئین‌های هموگلوبین بتا[۲] (نقطه ۱)، کاپا کازئین[۳] (نقطه ۲)، تریپتوفانیل تی ار.ان.آ سنتاز[۴] (نقطه ۳) در گاوهای سالم بیان‌شان افزایش یافت و سیتوکروم سی اکسیداز[۵] (نقطه ۵)، انکسین ۵[۶] (نقطه ۶) و هموگلوبین بتا (نقطه ۱) تغییر یافته (pH ایزوالکتریک متفاوت) در گاوهای با ورم پستان بیان افزایش یافته داشتند (نگاره ۱).

تعیین پروتئین‌های بزاق توسط پروتئومیکس

بزاق دارای تعدادی پروتئین است که می‌تواند به عنوان بیومارکرهایی سلامتی و یا بیماری مورد استفاده قرار گیرند و در تعداد زیادی از دام‌ها با روشی غیرتهاجمی[۷] و بدون استرس استخراج گردند. با داشتن یک رفرنس از الگوی پروتئوم بزاق توسط تکنیک پروتئومیکس، و شناسایی پروتئین‌های بزاق تغییر یافته در اثر بیماری خاص، می‌توان به راحتی بیماری را تشخیص داد. گرچه بیشتر پروتئین‌های بزاق، از غده‌های بزاقی منشاء می‌گیرند، بزاق همچنین حاوی پروتئین‌های با منشاء سرم هم هست که می‌تواند دارای پتانسیلی به عنوان بیومارکر باشد (Gutiérrez *et al*., 2011). در این مطالعه‌ایی بر روی بزاق خوک، خوک‌ها به Porcine Circovirus Type-2 آلوده شدند و الگوی پروتئینی بزاق خوک‌های سالم و آلوده با تکنیک 2-DE و طیف سنج جرمی شناسایی و مورد مقایسه قرار گرفتند. با استفاده تکنیک MALDI-TOF و De novo Sequencing و سپس الگوریتم MASCOT مشخص گردید که ایمونوگلوبین های μ، α و λ و زنجیره‌های سبک در حیوانات آلوده بیشتر بودند (نگاره ۲).

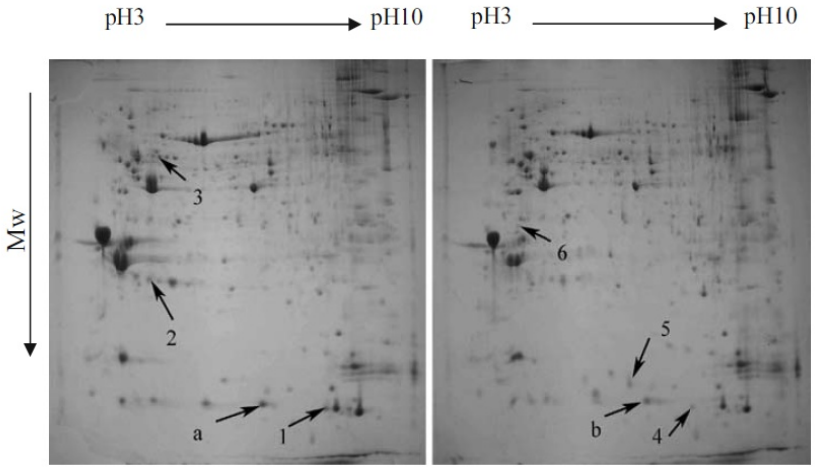
نتیجه‌گیری:

تکنیک پروتئومیکس با استفاده از الکتروفورز دوبعدی که یک تکنیک قدرتمند برای جداسازی مخلوط‌های پروتئین می‌باشد می‌تواند به بررسی پروتئین‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی جرمی بپردازد و در نهایت می‌توان با استفاده از دیتابیس‌های موجود در نرم‌افزارهای خاص مرتبط با این تکنیک به نوع پروتئین نمونه پی برد. هدف تکنیک پروتئومیکس شناسایی تمام پروتئین‌هایی است که

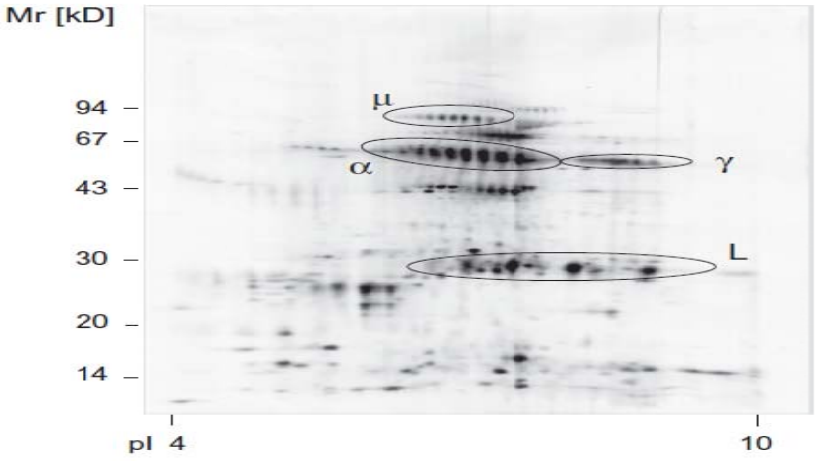
---

[۱] Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
[۲] Hemoglobin Beta
[۳] Kappa-Casein
[۴] Tryptophanyl-tRNA-Synthetase
[۵] Cytochrome COxidase
[۶] Annexin V
[۷] Non-Invasive

در یک نمونه خاص موجود می‌باشند و نیز توانایی آشکارسازی پروتئین هایی که در یک وضعیت بولوژیک خاص مثلا بیماری خاص تغییر یافته‌اند. در نهایت با بررسی یک بیماری با استفاده از این تکنیک در سطح پروتئین می‌توان به بررسی دقیق‌تر پاتوفیزیولوژی آن بیماری دست یافت و درمان‌های موثرتری را پیشنهاد کرد.



نگاره ۱- الف) نمونه پروتئوم بافت پستان در گاو شیری سالم ب) نمونه پروتئوم بافت پستان در گاو شیری دچار ورم پستان



نگاره ۲- پروتئین‌های شناسایی شده بر روی ژل الکتروفورز ۲ بعدی خوک‌های آلوده به Porcine Circovirus Type-2

Abstract

Proteomics is the next step in identifying biological systems after genomics. Proteomics is the study of the proteome, the protein complement of the genome. Separation of proteins is the first step in a proteomics study.The most popular method of separating proteins is 2-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (first dimension based on isoelectric pH and second dimension based on molecularweight and size) and then with the help of specialized image analysis software, the altered protein spots are detected. Now the individual proteins need to be identified, and in many cases comprehensively characterized. This area of proteomics analysis is primarily the domain of mass spectrometry (MS).The peptides are analyzed by mass spectrometer and the data from the mass spectrometer is then used, with the aid of specialized algorithm to identify peptides and peptide sequences from databases that match the data from the analyses.Proteomics may be helpful in understanding mechanism underlying many diseases and can help the identification of pathophysiology of many diseases at protein level. New biomarkers easily detectable by this technique can help achieving more accurate and specific treatment for a particular disease.

Selected References

1. Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., Miller, I., 2011. Farm animal proteomics - a review. J. Proteomics 74**,** 282-293.
2. Gutiérrez, A.M., Miller, I., Hummel, K., Nöbauer, K., Martínez-Subiela, S., Razzazi-Fazeli, E., Gemeiner, M., Cerón, J.J., 2011. Proteomic analysis of porcine saliva. Vet. J. 187 356–362.
3. Lippolis, J.D., Reinhardt, T.A., 2008. Proteomics in animal science. J. Anim. Sci. 86**,** 2430-2441.
4. Mandanici, F., Gómez-Gascón, L., Garibaldi, M., Olaya-Abril, A., Luque, I., Tarradas, C., Mancuso, G., Papasergi, S., Bárcena, J.A., Teti, G., Beninati, C., Rodríguez-Ortega, M.J., 2010. A surface protein of *streptococcus suis* serotype 2 identified by proteomics protects mice against infection. J. Proteomics 73**,** 2365-2369.
5. Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. J. Proteomics 73**,** 2064-2077.
6. Reinders, J., Sickmann, A., 2009. Proteomics: Methods and protocols, 2nd edition, Humana Press, Dordrecht; New York.
7. Viguier, C., Arora, S., Gilmartin, N., Welbeck, K., O'Kennedy, R., 2009. Mastitis detection: Current trends and future perspectives. Trends Biotechnol. 27**,** 486-493.

مطالعه ی اثر ترکیب ژنتیکی و فتوپریود بر روی صفات کمی و کیفی اسپرم ۳ نژاد قوچ دورگ

محمد مصطفی پورسیف[۱]، غلامعلی مقدم[۲] عباس رافت[۳]، جلیل شجاع[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی،دانشگاه تبریز، ۲-عضو هیئت علمی گروه علوم دامی،دانشکده ی کشاورزی،دانشگاه تبریز

۳-عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۴--عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

پیشرفت ژنتیکی گله های اصلاحی نیازمند استفاده از تکنیک هایی چون تلقیح مصنوعی است و در این میان باید تنها از اسپرم های برتر به لحاظ صفات کمی وکیفی استفاده کرد. از آنجا که انتخاب نژاد ممتاز در تسریع روند ارتقاء ژنتیکی گله اهمیت زیادی دارد لذا در اکثر مطالعات بر روی اسپرم دو مطلب مهم مورد توجه خواهد بود. نخست بررسی نژاد های مختلف از نظر صفات تولید مثلی و دوم میزان تاثیر گذاری عوامل مختلف محیطی، ژنتیکی و فیزیولوژیکی بر روی بخش های مختلف دستگاه تولید مثلی بویژه اسپرم آنها است. چرا که انتقال نیمی از صفات وراثتی به عهده ی گامت نر است.

بررسی منابع

مطالعات بر روی اسپرم ترکیب های ژنتیکی مختلف نشان داده نژاد های مختلف در فصول مختلف دارای ویژگی های کمی و کیفی متفاوتی هستند. به طوریکه بررسی های انجام شده بر روی اسپرم قوچ های نژاد چیوس و فریزین، نژاد قره گل ایرانی و نژاد تکسل، سافوک و ایل د فرانس، محدوده ی صفات کمی و کیفی اسپرم متفاوت گزارش شده است(۴، ۵، ۶). همچنین در اکثر این مطالعات اثر تغییرات فصلی شرایط آب و هوایی و فتوپریود برروی ویژگی های اسپرم بررسی شده است و نتیجتا تاثیر شرایط جغرافیایی و آب و هوایی مختلف و نیز فتوپریود بر این صفات گزارش شده است. اثر فاکتور های آب و هوایی روی صفات کیفی منی مهم است(۲).

مواد و روش :

در این مطالعه از ۱۱ قوچ بارور دورگ ۳ تا ۴ ساله با سه ترکیب ژنتیکی(بلوچی-مغانی، قزل-بلوچی، آرخامرینو-قزل) اسپرم گیری انجام شد. نمونه گیری از اوایل فصل پاییز(اواسط فصل تولید مثلی) تا پایان زمستان(فصل غیر تولید مثلی) ادامه یافت. نمونه ها

بلافاصله بعد از اسپرم گیری به آزمایشگاه منتقل شده و از نظر صفات کمی و کیفی ارزیابی شدند. حجم منی بوسیله ی لوله اسپرم گیری مدرج با دقت ۰٫۱ ml ثبت شد. غلظت اسپرم توسط لام توما تعیین شد و برای رقیق کردن نمونه ی تازه از سیترات سدیم دی هیدراته ۲٫۹٪ (۱ به ۲۰۰) استفاده شد. تحرک موجی تحت بزرگنمایی ×۱۰ از ۱ تا ۵ نمره دهی شد. درصد تحرک پیشرونده اسپرم بعد از رقیق کردن نمونه ی تازه (۱ به ۲۰۰) با سیترات سدیم دی هیدراته ۲٫۹٪ و بوسیله ی یک لام قطره ی معلق (۳۷°C) و با عدسی × ۴۰ چند زمینه از لام بررسی شد(این روش برای اولین بار استفاده شده و سبب وضوح بهتر اسپرماتوزوا ها می شود) . برای ارزیابی درصد اسپرم زنده و مرده و درصد اسپرم ناهنجار از رنگ آمیزی ائوزین استفاده شد و با عدسی × ۴۰ تعداد ۳۰۰ اسپرماتوزوا برای درصد زنده و ۲۰۰ اسپرم برای درصد ناهنجاری شمارش شد. داده ها بوسیله ی نرم افزار 9.1 version SAS آنالیز شدند.

نتایج و بحث

ویژگی های منی قوچ های سه نژاد دورگ که در طول ۶ ماه جمع آوری شده اند در جدول ۱ در ارتباط با صفات کمی و در جدول ۲ صفات کیفی آمده است. تغییر طول روز طی پاییز تا زمستان بر روی صفات تحرک موجی منی و غلظت اسپرم اثر معنی داری نداشت اما بر روی صفات حجم انزال($P<۰/۰۰۰۱$)، تحرک پیشرونده($P<۰/۰۱$)، تعداد کل اسپرم/انزال($P=۰/۰۰۰۲$)، درصد اسپرم زنده($P=۰/۰۰۷۹$) و درصد اسپرم ناهنجار($P<۰/۰۰۹۹$) تفاوت بین دو فصل زمستان و پاییز معنی دار شد. همچنین تفاوت های معنی دار در میان قوچ ها در داخل هر نژاد در مورد برخی از ویژگی های منی مشاهده شد که این مطالب با نتایج کاراگیانیدیس و همکاران (۲۰۰۰) و نیز بلند وهمکاران(۱۹۸۵) همخوانی داشت(۱، ۵). اثر ژنوتیپ بر روی صفت حجم انزال معنی دار شد($P<۰/۰۲۸۹$) و در مورد سایر صفات اثر ترکیب ژنتیکی معنی دار نشد. و این مطلب با نتایج کاراگیانیدیس و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت داشت. کیفیت بهتر اسپرم در فصل پاییز با نتایج ابراهیم(۱۹۹۷) که بر روی قوچ های دورگ چیوس انجام داده بود مطابقت نداشت(۳).

جدول-۱. تغییرات ویژگی های کمی اسپرم طی پاییز و زمستان در ۳ ترکیب ژنتیکی قوچ دورگ(میانگین ± انحراف معیار).

ویژگی های منی	فصل	آرخامرینو-قزل	قزل-بلوچی	بلوچی-مغانی
حجم(ml)	پاییز[a]	۱٫۱۷ ± ۰٫۰۸[a]	۱٫۳۵ ± ۰٫۰۸[a]	۰٫۹۶ ± ۰٫۰۹[a]
	زمستان[b]	۱٫۰۷ ± ۰٫۰۸[b]	۱٫۰۸ ± ۰٫۰۸[b]	۰٫۸۴ ± ۰٫۰۹[b]
غلظت($\times۱۰^{۹}$ ml^{-1})	پاییز	۳٫۶۳ ± ۰٫۱۵	۳٫۶۸ ± ۰٫۱۵[a]	۳٫۷۹ ± ۰٫۱۸
	زمستان	۳٫۶۸ ± ۰٫۱۶	۳٫۳۲ ± ۰٫۱۶[b]	۳٫۹۵ ± ۰٫۱۸
تعدادکل اسپرم/انزال($\times۱۰^{۹}$)	پاییز[a]	۴٫۳۲ ± ۰٫۳۶	۵٫۰۷ ± ۰٫۳۶[a]	۳٫۶۴ ± ۰٫۴۱
	زمستان[b]	۳٫۹۷ ± ۰٫۳۶	۳٫۶۷ ± ۰٫۳۶[b]	۳٫۴۰ ± ۰٫۴۲

حروف معنی دار در داخل هر اثر نشانه ی حداقل تفاوت معنی دار($P<۰٫۰۵$)است.

جدول-۲. تغییرات ویژگی های کیفی اسپرم طی پاییز و زمستان در ۳ ترکیب ژنتیکی قوچ دورگ(میانگین ± انحراف معیار).

ویژگی های منی	فصل	آرخامرینو-قزل	قزل-بلوچی	بلوچی-مغانی
اسپرم های ناهنجار(٪)	پاییز[b]	۱۰,۷۷ ± ۱,۰۴	۱۱,۱۳ ± ۱,۰۴	۱۲,۹۳ ± ۱,۲۰[b]
	زمستان[a]	۱۱,۵۴ ± ۱,۰۶	۱۲,۴۸ ± ۱,۰۶	۱۵,۵۰ ± ۱,۲۲[a]
اسپرم های زنده(٪)	پاییز[a]	۷۳,۵۴ ± ۲,۴۲	۷۱,۹۱ ± ۲,۳۶	۶۹,۰۷ ± ۲,۸۳[a]
	زمستان[b]	۷۱,۴۶ ± ۲,۵۰	۶۹,۵۴ ± ۲,۴۸	۶۳,۸۶ ± ۲,۹۰[b]
تحرک موجی(۱-۵)	پاییز	۳,۹۵ ± ۰,۱۳	۳,۷۷ ± ۰,۱۳	۳,۷۲ ± ۰,۱۵
	زمستان	۴,۰۰ ± ۰,۱۳	۳,۸۳ ± ۰,۱۳	۳,۵۹ ±۰,۱۶
تحرک پیشرونده(٪)	پاییز[a]	۶۸,۵۴ ± ۲,۰۴	۶۷,۲۱ ± ۲,۰۵	۶۴,۴۲ ± ۲,۳۶
	زمستان[b]	۶۶,۷۹ ± ۲,۰۸	۶۴,۶۸ ± ۲,۰۸	۵۹,۳۷ ± ۲,۴۰

حروف معنی دار در داخل هر اثر نشانه ی حداقل تفاوت معنی دار($P<0,05$)است.

منابع

1- Boland, M.P., Alkamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B., Howles, C.M., 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. Anim. Reprod. Sci. 9, 241-252.

2- Colas, G., 1983. Factors affecting the quality of ram semen. In: Haresign, W. (Ed.), Sheep Prod. Butterworths, London, pp. 453-465.

3- Ibrahim, S.A., 1997. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. Anim. Reprod. Sci. 49,161-167.

4- Kafi, M., Safdarian, M., Hashemi, M., 2004. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. Small Rum. Res. 53, 133-139.

5- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Alexopoulos, C., Amarantidis, I., 2000. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. Small Rum. Res. 37. 125-130.

6- Mandiki, S.N.M., Deriscke, G., Bister, J.L., Paquay, R., 1998. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk, and Ile-de- France rams. 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. Small Rum. Res. 28. 67-79.

Abstract

This study was conducted on eleven crossbred fertile rams included 3 Balochi-Moghani, 4 Ghezel-Balochi, 4 Ghezel×Merino. Semen of rams was collected by artificial vagina. Immediately after semen collection traits were surveyed. The results showed that the significantly difference was observed in more of semen characteristics among the three breeds especially percentage of abnormal sperm ($P < 0.01$) on Balochi-Moghani and percentage of alive sperm in Ghezel×Merino. In conclusion, the semen characteristics of Balochi-Moghani, Ghezel-Balochi, and Ghezel×Merino rams had show a significant seasonal variation in semen quality and quantity. Thus we need to select the best breed of males so that less has been affected by season. Therefore superior semen will be available throughout non-breeding seasons.

مسائل اخلاقی وبیوتکنولوژی در تولید مثل دام

میرزا پاپی پور*، مبینا استادی،ملک محمد نادری

۱- گروه زیست شناسی،دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی،دانشگاه آزاد تنکابن ،تنکابن ،ایران ۲-گروه زیست شناسی،دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی ،دانشگاه آزاد تنکابن ،تنکابن ،ایران۳-دانشگاه آزاد اسلامی،واحد تنکابن،باشگاه پژوهشگران جوان،تنکابن ایران

***نویسنده مسئول:میرزا پاپی پور،mirza.abadan@yahoo.com**

چکیده:

با افزایش روز افزون جمعیت ومحدودیت سطح زیر کشت،استفاده از بیوتکنولوژی برای ارتقاء کمی وکیفی مواد غذایی حاصل از دام وطیور بشدت مورد توجه قرار گرفته است،اما بااین وجود،دربسیاری از کشورها باچالش هایی از جنبه های اخلاقی ،زیست محیطی،اعتقادی و...مواجه شده است.به همین دلیل توجه به نکات دیگر این فناوری به جز جنبه های علمی امری مهم تلقی میشود.**دراین پژوهش کتابخانه ای- اسنادی با استفاده ازتحقیقات گذشته وحال ،پژوهش های اینترنتی ،کتب،مجلات ومقالات معتبر اطلاعات جمع آوری گردید ومورد ارزیابی و مقایسه واقع شد.**در این مقاله جنبه های کاربردی بیوتکنولوژی در تولید مثل دام وتوان فناوری در اصلاح نژاد دام مورد اشاره ،سپس بحث اخلاقی ورود این فناوری به حوزه دام مورد کنکاش واقع شد.

کلمات کلیدی:اخلاق،بیوتکنولوژی،دخل وتصرف،دام،تولید مثل

مقدمه:

اخلاق در لغت جمع واژه خلق و به معنی خوبی‌ها است. از این رو دانش بررسی و ارزش‌گذاری بر خوی‌ها ورفتارهای آدمی علم اخلاق نامیده می‌شود..بیوتکنولوژی دانشی است که رشد چشمگیری درتمامی عرصه های زندگی آدمی داشته وعلم اخلاق را مسائل پیچیده ایی روبرو کرده است.در این مقاله سعی شده ابتدا با تعریفی از اخلاق وکارکرد بیوتکنولوزی درحوزه تولید مثل دام به بررسی مسائل اخلاقی استفاده از این فناوری پرداخته شود.

مواد وروشها:

این مقاله به روش مروری تهیه شده است.برای جمع آوری منابع موجود در ابتدا با استفاده از موتورهای جستجو سایت هایی همچون Pubmed،ISI،Google،Yahooونیز Madex Iran,وبا استفاده ازکلید واژه هایی چون Ethics،*Biotechnology* ، Manipulation,Livestock,Reproductionدرکتب ومقالات مرتبط از سال ۱۹۹۸به بعد جستجو شدند واز میان آنها مواردی که بیشترین ارتباط را با موضوع داشتند انتخاب وسپس مورد تحلیل ،جمع بندی وارائه گردید.

۱- اخلاق ، ۳ مفهوم: اخلاق در لغت جمع واژه خلق و به معنی خوبی‌ها است. از این رو دانش بررسی و ارزش‌گذاری بر خوی‌ها ورفتارهای آدمی علم اخلاق نامیده می‌شود. مباحث مربوط به اخلاق شامل ۳ مفهوم است.

۱-۱- اخلاق تحلیلی یا فرا اخلاقی: قسمتی از مباحث معناشناسی، معرفت شناسی مفاهیم اخلاقی را می‌کاود.

۱-۲- اخلاق هنجاری: از یک سو، بسا موضاعاتی جدید در حوزه‌های مختلف حیات انسان رخ نماید که در آن خصوص حکم اخلاقی روشن وجود نداشته باشد و از سوی دیگر ممکن است باید و نبایدهای موجود اخلاقی با یکدیگر ناسازگار باشند، بر این اساس، لازم است دستگاهی نظری برای رفع این نقیصه‌ها پیشنهاد شود که این خود دلیل وجود نظریه اخلاقی می‌تواند باشد. به طور معمول این مفهوم دارای یک بخش وظیفه‌گرایی [Deonte logism]، سود انگاری [utilitarianism] و فضیلت گرایی [virtue ethics] را بر عهده دارد.

۱-۳- اخلاق کاربردی: عرصهٔ کاربرد دو مفهوم پیشین در این مفهوم گنجانده شده است و در آن، به موضوع‌ها و مسایلی عملی پرداخته می‌شود که نیازمند احکامی مستقیم و جزئی است. اخلاق کاربردی شامل بخش‌های متعددی چون اخلاق پزشکی، اخلاق مهاجرت افراد، اخلاق حرفه‌ای، اخلاق زیستی [که تاکید این مقاله بر آن است] و... می‌باشد.

۲-کاربرد بیوتکنولوژی درتولید مثل دام:

۱-۲- تلقیح مصنوعی :باردار کردن دام ماده بدون عمل جفت‌گیری بین دام نر و ماده را تلقیح مصنوعی می‌گویند .دانش بیوتکنولوژی با تشخیص نژادها برتر [با استفاده از مارکرهای مولکولی]، حذف صفات مضر، نگهداری اسپرم‌ها و تشخیص زمان فحل شدن دام کمک شایانی در تلقیح مصنوعی انجام می‌دهد.

انتقال جنین:همان‌طور که از نام این فن‌آوری پیداست، فرآیندی است که طی آن جنین‌ها از دام‌دهنده جنین (donor) در مرحله پس از مرولا گرفته و جهت تکام مراحل باروری به رحم دام گیرنده (re ciptent) منتقل می‌شود.

هدف از این بخش از تکنولوژی زیستی را می‌توان افزایش تعداد دام‌هایی با صفات برتر، سهولت در امر تجارت دام جهت برنامه اصلاح، انجام دوقلوزایی در ماده‌ها، کنترل بیماری‌ها، انجام آزمایش‌ها و تحقیق بروی جنین‌ها، انتقال وسیع و نامحدود ژن و ... نام برد.

انجماد جنین: انتقال جنین تازه در مکان و زمان محدود می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد ولی با منجمد شدن جنین دیگر محدودیت زمان و مکان وجود ندارد. سلول منجمد در ازت مایع در سرمایه ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌نمایند. تمام فعالیت‌ها حیاتی موجود زنده در این دما متوقف شده ولی توان حیات آن فقط می‌گردد. . انجماد جنین ابزاری است بسیار کارا هم برای اصلاح نژاد و هم جهت حفظ گونه‌های در خطر انقراض است.

باروری آزمایشگاهی [IVF]:

این روش فن‌آوری است که در آن تخمک گرفته شده از جنس ماده در آزمایشگاه توسط اسپرم گرفته شده از جنس نر تلقیح می‌نماید. پس بارور نمودن تخمک در آزمایشگاه برای اولین بروی تخمک خرگوش در سال ۱۹۵۹ می‌توان باروری آزمایشگاهی بر روی تخمک کلیه دام‌ها در چند سال اخیر دید. کاربرد IVF در دامپروری در جهت اصلاح نژاد، پژوهش‌ها بیولوژیکی و همچنین انتقال ژن دیده می‌شود.

همسانه‌سازی: واژه کلون به موجودی گفته می‌شود که از لحاظ ژنتیکی کاملاً مشابه موجود دیگری باشد به طـوری تجربـی دو روش بـرای انجام همسانه‌سازی به کار گرفته می‌شود.

۱- تقسیم جنین ۲- انتقال هسته از یک سلول به تخم بارور نشده.

در صنعت دام جهت تکثیر حیوانات دارای صفات برتر، کلون کردن حیوانات ترانس ژنیک دارای صفات ویژه [مانند گاوهایی که شـیری بـا خصوصیاتی ویژه تولید می‌کند] کاهش اثرات منفی محیط زیست می‌توان از این فناوری استفاده کرد. البته کلونینـگ هنـوز در ابتـدای رونـد خود می‌باشد و هنوز مباحث اخلاقی در مورد آن جنجال آفرین است.

کیمرا [اختلاط جنین]: در علم پزشکی کیمرا به موجودی گفته می‌شود که بیش از یک جمعیت سلولی مشخص دارد و این جمعیت سـلولی از سلول تخم‌ها متفاوتی منشأ گرفته‌اند. برای بوجود آوردن کیمرا سلول‌های جنین دو یا چند دام متفاوت را با هم مخلوط می‌کنند.

تشخیص جنسیت و جداسازی اسپرم X و Y: جهت تعیین جنسیت جنین روش‌های متفاوتی مانند بررسـی سـرعت رشـد جنـین، سـنجش آنزیم‌های مربوط به کروموزمX، تعیین پادتن اختصاصی جنسیت و استفاده از کاوشگرهای DNA ویژه کروموزوم Y امتحان شده است. که روش آخر نتایج موفقیت‌آمیزتری را تاکنون داشته است.جداکردن اسپرم‌های نرزا Y از ماده‌زا X جهت ایجاد دام دلخـواه بـه طـور گسـترده استفاده می‌شود.

ایجاد حیوانات تراریخته: ترا ریخته یا ترانسژنیک واژه ای است که برای جاندارانی که از نظر ژنتیکی دستکاری شده اند به کـار مـی رود.از کاربرد این روش در پیوند اعضاء،داروخانه زنده ،تولید پروتئین انسان،مدل جهت بررسی بیماری میتوان نام برد.

بحث ونتیجه گیری:

دست‌آوردهای علم ژنتیک در حوزه دام و دامپروری و انسانی، پیامدهای اخلاقی جدی را در پی داشته است. دخل و تصـرف در طبیعـت و پیامدهای گاه غیر قابل پیش‌بینی آن از یک سو و پاسخ کافی به نیاز روز افزون جوامع انسانی از سوی دیگر، فیلسـوفان اخـلاق را در حـوزهٔ مباحث مربوط به مسأله ژنتیک دام و اصلاح دام، با معضل اخلاقی روبرو ساخته است؟ فقر بویژه گرسنگی و کمبود امکانات غـذایی، خـود زمینه‌ساز بسیاری از ناهنجاری‌هایی است که اخلاق فردی و جمعی را تهدید مـی‌کنـد. انسـان گرسـنه خـود، دیگـری و حتـی فرزنـدش را می‌فروشد، دزدی می‌کند، انسان می‌کشد و حتی اگر توانست انسان می‌خورد. برای عالمـان اخلاقـی، بـی‌عـدالتی ناشـی از فقـر وگرسـنگی مسأله‌ای نیست که بتوان به سادگی از کنار آن گذشت. بنابراین اگر پنجره‌ای از امید به روی انسان باز

شود که نوید بخش حل مشکل گرسنگی و یا حداقل کم‌کردن اثرات آن باشد نباید آن را نادیده گرفت. با این حال، آیا به سادگی می‌توان هر نوع تحقیق یا اصلاح ژنتیکی را در حوزهٔ دام با توسل به ضرورت فوق توجیه کرد؟

باید مطمئن شد که اصلاح ژنتیکی، پیامدهای خطر آفرین دیگری برای محیط زیست ندارد. از سوی دیگر نمی‌توان اجازه داد که کشورها و مردم فقیر به آزمایشگاه تولیدات اصلاح شد، دامی کشورهای غنی تبدیل شوند. نمی‌توان گفت چون بخشی از مردم فقیر و گرسنه‌اند باید آنها را با هرچیزی سیر کرد. آیا به راستی زمین از سیر کردن ساکنان خود بدون دخل و تصرف در گونه‌های جانوری طبیعی‌اش ناتوان شده است؟ آیا مدارک علمی کافی برای اثبات این ادعا وجود دارد؟

حقیقت آن است که به دلایل متعدد استفاده از بیوتکنولوژی در تولید مثل دام به خودی خود نه تنها عملی ناموجه و غیر اخلاقی نیست، بلکه با توجه به چشم‌انداز امد بخش آن، عملی است که از نظر اخلاقی پسندیده و حتی در مواردی، ضروری می‌باشد.

منابع:

۱. شهیدی ر.محمود زاده ه.سعادتی د.۱۳۸۴.فن آوری زیستی در تولید مثل دام.مجله علوم کشاورزی.سال ۱۱.شماره ۱.صفحات۱۴۲-۱۳۳.

۲. راسخ م.خداپرست ا.۱۳۸۹.قلمرو اخلاق زیستی.فصلنامه باروری وناباروری.دوره۱۱.شماره چهارم صفحات۲۹۴-۲۷۵.

۳. سید فاطمی م.۱۳۸۱.بیوتکنولوژی در آیینه فلسفه اخلاق. فصلنامه باروری وناباروری.صفحات۷۲-۵۶.

۴. رهنما ح.۱۳۸۷.اخلاق زیستی وتولید محصولات تراریخته.فصلنامه اخلاق در علوم وفناوری.سال سوم.شماره ۱و۲.

5. Ethics and Bioethics 2008 Availableat:http://en. Vikipedia.org/wiki/Ehi.

6. Kling J(1996).could.transgenic supercrops one daybreed super weeds?science 274:181-180

Ethical issues and biotechnology in animal reproduction

mirza popipour*, Mobyna ostadi

Biology Department, Student Biotechnology, Islamic Azad University Tonekabon, Tonekabon, Iran
Biology Department, Student Biotechnology, Islamic Azad University Tonekabon, Tonekabon, Iran
Young Researchers Club,Tonekabon Branch,Islamic Azad University, Tonekabon,Iran

Author Corresponding:mirza.abadan@yahoo.com

Abstract:
With increasing population and limitation of under cultivation area, the use of biotechnology to improve food quality and quantity of livestock and poultry is highly regarded. However, in many countries with challenges of ethical, environmental, belief aspects and ... is faced. Therefore, it is important to pay attention to another aspect of this technology, exception of scientific aspects.The research library - documents using past and present research, internet researches, books, magazines and reliable articles and magazines, information has been gathered and assessment and comparison were located.In this paper, practical aspects of biotechnology in animal reproduction and breeding in strain improvement of pointed animals and then about ethical debate entry of this technology to animal domain is searched.

Key words: Ethics، *Biotechnology*، Manipulation,Livestock,Reproduction

بررسی ارتباط چند شکلی ژن میوستاتین با صفات وزن تولد و افزایش وزن در گوسفندان نژاد ماکوئی

***محمد فرهادیان[۱]، علی هاشمی[۲]، کریم مردانی[۳]، مهدی رنجبری[۴]، شجاع جعفری[۱]، صادق چراغی[۵]**

[۱]دانشجویان کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه ارومیه، [۲]استادیار گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه، [۳]استادیار گروه بهداشت مواد غذائی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، [۴]باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، [۵]دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تبریز

Email: St_m.farhadian@urmia.ac.ir

چکیده:

به منظور بررسی پلی مورفیسم در ژن میوستاتین و ارتباط آنها با وزن تولد و افزایش وزن، از تعداد۱۰۰ راس گوسفند ماکوئی ایستگاه شهرستان ماکو به طور تصادفی خونگیری شد. نمونه های DNA از خون استخراج و واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از یک جفت آغاز گر اختصاصی انجام گرفت. چند شکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) بر روی محصولات PCR انجام شد. روش چند شکلی ساختاری رشته های منفرد به کار رفته منجر به شناسایی چهار ژنوتیپ با فراوانی های ۰/۴۱۳ ، ۰/۲۹۲، ۰/۱۳۰ و ۰/۱۶۳ به ترتیب برای ژنوتیپ های AD , AC , AE و BC شد. ارتباط بین ژنوتیپ ها با صفات وزن تولد و افزایش وزن به وسیله مدلهای مختلط مورد بررسی قرار گرفتند. اثر ژنوتیپ های ژن میوستاتین با وزن تولد معنی دار بود (P<0.05).

کلمات کلیدی : چند شکلی، گوسفند ماکویی، ژن میوستاتین ، PCR-SSCP

مقدمه :

مطالعات برای یافتن ژن های بوجود اورنده عضله مضاعف در گاوهای گوشتی منجر به کشف ژن میوستاتین شد که به عنوان ژن کاندیدا برای صفت تولید گوشت بررسی و نقش ان در نژادهای مختلف دام و طیور و حتی انسان شناخته شده است (صوفی و همکاران،۱۳۸۸) .ژن میوستاتین یا عامل ۸ رشد و تمایز (GDF8) به عنوان عامل ایجاد کننده ماهیچه مضاعف شناخته شده است، که در آن مجموعه ای از جهش های غیر فعال کننده رخ میدهد (مسعودی و همکاران،۱۳۸۴). میوستاتین، یک عضو از خانواده TGF-β است که نقش تنظیم کننده منفی عضلات را هم در دوران جنینی و هم در دوران پس از تولد بازی می کند. میوستاتین برای اولین بار در موشها شناسایی شد و نشان داده شده است که هم در عضلات اسکلتی جنین وهم در عضلات اسکلتی بزرگسالی بیان می شود. ژن میوستاتین دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می باشد. میوستاتین باعث میانجیگری بیان ژن در کنترل شکل فیبری ماهیچه است و با جلوگیری از تکثیر میوبلاست ها ، عملا رشد عضلانی را متوقف میکند. این عمل میوستاتین به طور عمده به رشد ماهیچه ها پیش از تولد یعنی زمان تکثیر و تمایز میوبلاست ها بر می گردد و انتظار می رود چنانچه جهشی بتواند باعث کاهش mRNA میوستاتین گردد، رشد عضلانی بیشتری در حیوان مشاهده می شود(McPherron & Lee, 1997).

مواد و روش ها :

چند شکلی قطعات تکثیر شده ژن میوستاتین با استفاده از روش چند شکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) مـورد بررسـی قـرار گرفتنـد. چند شکلی های ژنوتیپی مشاهده شده به کمک نرم افزار POPGENE32 مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. ارزش های ارثی حیوانات با استفاده از نرم افزار DFRMEL و طبق معادله زیر برآورد شد.

$$Y_{ijklm} = \mu + YR_i + SX_j + BT_k + AD_l + AN_m + E_{ijklm}$$

μ: میانگین جامعه ، YR_i: اثر ثابت i امین سال ۲۱، . . . ، ۲، ۱ = i ، SX_j: اثر ثابت j امین جـنس حیـوان ۲، ۱ = j، BT_k: اثـر ثابـت k امین نحوه تولد ۳، ۲، ۱ =k ، AD_l : اثر ثابت l امین سن مـادر ۷، . . . ، ۲، ۱=l، AN_m: اثـر تصـادفی ژنتیکـی افزایشـی m امـین حیوان تعداد حیوان برای هر صفت = m، E_{ijklm}: اثر تصادفی باقیمانده ijklm امین مشاهده. ارتباط بین ارزش های ارثی حیوانـات بـا ژنوتیپ های مشاهده شده با استفاده نرم افزارSAS و رویه GLM محاسبه گردید

.

نتایج و بحث :

نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آکریلامید منجر به شناسایی پنج آلل شد. این آلل هـا در چهـار ترکیـب ژنـوتیپی AD، AC، AE، و BC دسته بندی شدند.آزمون کای اسکوار نشان داد که جمعیت گوسفندان ماکویی در حالـت تعـادل هـاردی – واینبـرگ قـرار نـدارد (P<0.05). صوفی و همکاران در سال ۱۳۸۸ به ارزیابی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفندان سنجابی پرداختندکه نتیجه آن شناسایی ۲ آلل با فراوانی های ۹۷٪ و ۰۳٪ بود. طبق گزارش مسعودی و همکاران در سال ۱۳۸۴ به جز نواحی اینترون ۱و ۲ که چند شـکل مـی باشد ، بقیه قسمت های ژن میوستاتین درگوسفندان نژاد بلوچی بسیار حفاظت شده می باشد، هم چنین طبق گزارش انها ژنوتیـپ هـای معرفی شده با وزن تولد ارتباط معنی داری داشتند ولی با ورن ۳، ۶، ۹، و ۱۲ ماهگی ارتباط معنی داری نداشتند. Hikford و همکاران در سال ۲۰۰۹ پلی مورفیسم ژن میوستاتین را درگوسفندان نیوزیلند با استفاده از تکنیک PCR-SSCP بررسی و وجود پـنج آلـل را در ناحیه اینترون ۱ این نژاد گزارش کردند، آنها هم چنین گزارش کردند که هیچ کدام از ژنوتیپ هـا بـا وزن تولـد و افـزایش وزن ارتبـاط معنی داری ندارند. در تحقیق حاضر نیز، پنج آلل A، B، C، D و E و چهار نوع ژنوتیپ در کل جمعیت شناسایی شد که این نتـایج تـا حدودی مشابه با نتایجی است کهHickford و همکارانش (2009) برای گوسفندان نژاد رامنی بدست آوردند. با توجه به این که تمام این چند شکلی ها در ناحیه غیر کد کننده DNA واقع شده اند، بحث کردن دربـاره اینکـه ایـن تغییـرات ژنتیکـی چگونـه بـر فعالیـت میوستاتین موثر بودند مشکل است. احتمالا این ها به وسیله mRNA splicing ، یا به وسیله ارتباطاتی که با چند شـکلی هـای دیگـر نواحی های کد کننده و متعاقب آن به وسیله اثر بر توالی آمینو اسیدها، اثر خود را بر فعالیت ژن اعمال مـی کننـد(Hickford et all., 2009). نتایج حاصل از آزمون حداقل مربعات ارزش های اصلاحی وزن تولد، تفاوت معنی داری را از لحاظ آماری بـا ژنوتیـپ هـای مختلف نشان داد($p<0.05$) ولی با صفات دیگر ارتباط معنی داری نداشت(جدول ۱). نتایج ارتباط بـا صـفات در گوسـفندان مـاکوئی مشابه با گزارش مسعودی و همکاران (۱۳۸۸) است و مخالف گزارش Hickford و همکاران (۲۰۰۹) می باشد.

با توجه به این که در این تحقیق از ۵ ژنوتیپ مشاهده شده۳ ژنوتیپ دارای آلل A می باشند و از طرفی ژنوتیپ AD تفاوت معنی داری را از لحاظ آماری با بقیه ژنوتیپ ها نشان داده، می توان نتیجه گرفت که حضور آلل D در این تفاوت تاثیر بیشتری داشته، چون کـه اگـر

آلل A در این تفاوت نقش داشت هیچ تفاوت معنی داری بین ژنوتیپ AD با ژنوتیپ های AC و AE وجود نداشت بنابراین پیشنهاد می شود حضور آلل D در وزن تولد تاثیر داشته است.. در این تحقیق هیچ کدام از ژنوتیپ های مشاهده بر وزن های ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی تاثیری نداشتند، و با توجه به این که ژنوتیپ AD در وزن تولد تفاوت معنی داری را نشان داده بود، انتظار می رفت که حیوانات دارای ژنوتیپ AD در افزایش وزن هم تفاوت قابل ملاحظه ای را با دیگر ژنوتیپ ها نشان دهند.

منابع :

۱-بهاره صوفی، محمد رضا محمد آبادی، کمال شجاعیان، امین باقی زاده، سیروس فراستی، ناهید عسگری و امید دیانی ۱۳۸۸.ارزیابی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفندان نژاد سنجابی با استفاده از روش PCR-RFLP .مجله پژوهش های علوم دامی.

۲-مسعودی ع، عمرانی ح، نجاتی جوار می الف، فرهنگ خ، اسمائیل خانیان س و ضیایی ف ،۱۳۸۴. استفاده ازتکنیک PCR-SSCP جهت بررسی چند شکلی های ژن میوستاتین و ارتباط آن با صفات تولیدی در گوسفند بلوچی. چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

3-J.G.H. Hikford, F.H.Forrest, H.Zhou ,Q.Fang.Han ,C.M.Frampton and A.L.Horrell 2009.Polymorphism in the myostatin gene and their association with carcass traits in New Zealand Romeny sheep. Animal Genetic 64-72.

4-McPherronAC, LeeSJ(1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene .Proc NatlAcadSciUSA94:12457–12461.

جدول۱: جدول حداقل مربعات ارزش های اصلاحی وزن تولد، وزن۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی در گوسفندان نژاد ماکوئی با زنوتیپ های مختلف

صفات	ژنوتیپ				P-Value
	AD	AC	AE	BC	
وزن تولد	۵۲۰.۰۶۸± 0.0	0.011± 0.001	0.026± 0.09	0.046± 0.05	0/05
وزن ۳ ماهگی	0.12± 0.0570	0. 59 ± 0.492	0.084± 0.05	0.068± 0.078	NS
وزن ۶ ماهگی	37۰0.13± 0.	0.121±0.063	0.089± 0.015	0.163± 0.064	NS
وزن ۹ ماهگی	6۰0.172± 0.	0.482±0. 01	0.145± 0.109	0.18± 0. 04	NS
وزن ۱۲ ماهگی	0.88± 0.169	0.598±0. 02	0.380± 0.31	0.668± 0.195	NS

Abstract

In the present study the polymorphism of Myostatin gene in Makoei sheep was investigated by polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism technique (PCR–SSCP). Genomic DNA of 100 sheep was isolated from whole blood, separately. A 417 bp Myostatin intron 1 segment was amplified by standard PCR, using the locus specific primers. Four SSCP patterns, representing four different genotypes, were identified. The frequencies of the observed genotypes were 0.413, 0.293, 0.130, and 0.163 for AD, AC, AE, and BC respectively. The chi-square test showed significant ($P<0.05$) deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for this locus in studied population. The effect of the genotypes was investigated, and it was found that the AD genotype was associated with birth weight, whereas with the other genotype no associations were detected. No associations of myostatin variation with weight were detected. These result suggest that polymorphism in ovine myostatin gene is associated with birth weight, but not weight gain in Iranian Makoei sheep.

Key words: Myostatin gene; PCR; SSCP; SNP; Makoei sheep

کاربرد بیوتکنولوژی در تولیدمثل گاومیش

مصطفی لطفی فرخد*[۱]، رامین صیقلانی[۲]، نفیسه حیسن‌زاده[۳]، علیرضا ترنگ[۴]، سجاد شریفی[۵]

۱ و ۲- کارشناس ارشد رشته ژنتیک واصلاح دام پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور (رشت) ۴ - مدیریت پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه شمال کشور(رشت)

۳ و ۵- دانش آموخته کارشناس ارشد رشته ژنتیک واصلاح دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین-خوزستان

* نویسنده مسئول: **مصطفی لطفی فرخد**، ms.lotfi87@gmail.com

چکیده:

گاومیش یکی از مهمترین دام‌های اهلی برای تولید گوشت وشیر است که تأثیر بسزایی در اقتصاد دنیا بخصوص کشورهای نواحی گرمسیری دارد. مشکلات تولیدمثلی از فاکتورهای مهم در کاهش بازده اقتصادی در پرورش گاومیش است که مهمترین آنها عبارتند از: بلوغ دیررس در گاومیش‌های نر و ماده، تعداد زیاد فحلی خاموش و دوره کوتاه فحلی، در اختیار نبودن نرهای مطلوب نگهداری شده دارای اسپرم با کیفیت، وقوع بیماری‌های آمیزشی که باعث ناباروری و عقیمی شده همچنین علائم ضعیف حرارتی مربوط به فحلی در گاومیش بخصوص در ماه‌های گرم، آنستروس و فحل نشدن گاومیش بعد از زایش، فاصله گوساله‌زایی طولانی و تغذیه ضعیف که باعث نداشتن آمادگی کافی در هنگام گوساله‌زایی شده و بر باروری، فاصله فحلی بعد از زایش و کاهش نرخ آبستنی تاثیرگذار است. امروزه با پیشرفت‌های به وجود آمده در مهندسی ژنتیک و روش‌های مفید فناوری زیستی تلاش‌هایی برای رفع این **مشکلات شده که بعضی از این فعالیت‌ها عبارتند** از: تلقیح مصنوعی (AI)، همزمان‌سازی فحلی، سوپراوولاسیون، انتقال جنین، انجماد جنین، بلوغ درون **آزمایشگاهی** (IVM)، لقاح درون آزمایشگاهی (IVF)، و همسانه سازی سلول‌های سوماتیک. **مقاله حاضر** نگاهی برپژوهش‌های اخیردر تولید مثل گاومیش دارد.

واژگان کلیدی: گاومیش، تولید مثل، بیوتکنولوژی، روش‌های آزمایشگاهی

مقدمه:

گاومیش حیوانی چند منظوره است به طوری که در بسیاری از نواحی دنیا اهمیت این حیوان با گاو برابری می‌کند ولی با این حال تحقیقات انجام شده در مورد فناوری‌های تولید مثلی در این حیوان در مقایسه با گاو محدود می‌باشد. با توجه به کاهش جمعیت این دام و سهم نسبتا بالای آن در تولید محصولات پروتئینی دنیا و نقش چشمگیر آن در اقتصاد مناطق روستایی کمتر توسعه یافته و به کارگیری فناوری‌های نوین در افزایش بازدهی و حفظ دام‌هایی با شایستگی بالا تاثیر قابل توجهی خواهد داشت.

فناورهای تولید مثلی:

انتقال جنین:

تشخیص فحلی، تلقیح مصنوعی و کنترل سیکل فحلی روش‌های پایه‌ای در کمک به فناوری تولید مثل در حیوانات اهلی هستند. این موارد نیازهای اصلی موفقیت روش‌های پیشرفته‌ای مثل انتقال جنین، انتقال جنین منجمد و جنین‌های کلون شده در آزمایشگاه می‌باشند. انتقال جنین فرآیندی جامع و پی‌درپی است که شامل انتخاب دام گیرنده، مراقبت و تیمار دام گیرنده، بدست آوردن جنین، دستکاری جنین و ارزیابی آن، انتقال جنین و مراقبت از گیرنده بعد از دریافت جنین است. فناوری انتقال جنین در گاومیش با موفقیت انجام شده ولی سرعت این فرآیند بسیار کم و نتایج آن بسیار ضعیف بود. اولین انتقال موفقیت‌آمیز جنین سال ۱۹۸۳ در ایالات متحده آمریکا انجام شد. همچنین گزارش‌هایی نیز از انتقال موفقیت آمیز جنین در بلغارستان، هند و تایلند بدست آمده است. موفقیت پایین انتقال جنین در گاومیش نسبت به گاو به علت توانایی ژنتیکی پایین تولید مثل و باروری در گاومیش و کمبود حیوانات پایه و مناسب برای انتخاب است. مشکلاتی از قبیل بلوغ دیررس، فاصله زیاد بین دو زایش، بیماری‌ها و تولید مثل فصلی در گاومیش نیز ممکن است، سرعت فرآیند موفقیت آمیز جمع‌آوری جنین را محدود کند(درُس، ۲۰۰۷).

انجماد اسپرم و رویان:

انجماد گامت و رویان از ضروریات فناوری های تولید مثلی است. این مسئله بخصوص در گاومیش که همزمان سازی فحلی کارایی پایینی دارد یعنی در هر زمان تعداد کمتری از دام(گیرنده) برای انتقال رویان ها در دسترس هستند، اهمیت بیشتری دارد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که نگهداری اووسیت و رویان با استفاده از انجماد و ایجاد بانک رویان امکان پذیر است(سینگ و همکاران، ۲۰۰۹). زنده مانی پایین و یا اختلال در تمایز اووسیت پس از یخ گشایی از جمله نقص‌های این روش می‌باشد. انجماد رویان و اووسیت با روش معمولی و ویتریفیکاسیون[1] در گاومیش با موفقیت و تولد گوساله زنده انجام شده است(منجونتا، ۲۰۰۸).

سوپراولاسیون:

تخمدان گاومیش تعداد کمتری فولیکول نسبت به گاو در یک زمان مشخص آزاد می‌کند. در آغاز تولد تخمدان گاومیش ۱۲۰۰۰ فولیکول اولیه دارد ولی در گاو به طور متوسط ۱۳۳۰۰۰ فولیکول وجود دارد. تشخیص فحلی در گاومیش بسیار مشکل است چون نشانه‌های آشکار بسیار کمی دارد. به همین دلیل میزان اووسیت قابل جمع‌آوری از تخمدان گاومیش بسیار کم است. مشخص کردن زمان دقیق فحلی (روز صفر = فحلی) برای مشخص کردن مرحله تکامل جنین بسیار مهم و حساس است. زیرا اولین فحلی به عنوان یک نقطه مرجع برای تعیین سن جنین و جمع‌آوری آن محسوب می‌شود. تکامل جنین گاومیش در مقایسه با گاو بسیار سریعتر است. لایه زوناپلوسیدا عامل اصلی تشخیص جنین در محیط کشت است. بعد از شکافته شدن این لایه خصوصیات اصلی جنین مشخص می‌شود و بلاستوسیست به سختی قابل شناسایی است زیرا همه سلول‌های بلاستوسل فرو ریخته‌اند. شکافته شدن عموما ۶٫۵ تا ۷ روز بعد از شروع فحلی در گاومیش رخ می‌دهد ولی در گاو این فرایند در روز ۸٫۵ تا ۱۰ بعد از فحلی رخ می‌دهد. بنابراین جمع‌آوری جنین در گاومیش باید بین روزهای ۶-۵ بعد از اولین فحلی (در گاو روز ۷) درست هنگامی که جنین در مرحله مورلا و بلاستوسیست است، انجام می‌شود. نکته مهم در انجام این فرایند

---

[1] Vitrification = روشی برای نگهداری طولانی مدت رویان به شکل یخ زده

این است ه در روز پنجم لایه کارپوس لوتیوم[۱] کامل نشده و بسیار کوچک و نرم است. از این رو تشخیص جنین از طریق لمس رکتوم بسیار دشوار خواهد بود. نکته دیگر در مورد کارپوس لوتیوم این است که این لایه در گاومیش بسیار کوچک است و نسبت به گاو در لایه‌های عمیق‌تر قرار گرفته و به سختی قابل لمس است. این مشکلات باعث می‌شود که ارزیابی دقیق حیوان گیرنده نیز در روز ۵ با مشکل روبه‌رو شود و جنین به همان شاخ رحم که کارپوس لونیوم[۲] در آن قرار دارد، منتقل شود که در این مرحله استفاده از اولتراسونوگرافی واجب و ضروری است(درُس، ۲۰۰۷).

تولید آزمایشگاهی جنین(IVF):

تولید اولین گوساله گاومیش که نتیجه انتقال رویان تولید شده در آزمایشگاه به یک حیوان گیرنده بود، در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است. تولید رویان آزمایشگاهی (خارج رحمی) شامل تکنیک های بلوغ اووسیت در آزمایشگاه و لقاح خارج رحمی است. لقاح درون آزمایشگاهی میزان تولید جنین را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می دهد و فرصت مناسبی برای استفاده از مادران برتر در پیشرفت ژنتیکی می‌باشد. تفاوت در میزان اووسیت جمع‌آوری شده می‌تواند به دلایل ژنتیکی، تغذیه‌ای، محیطی و یا شرایط استرس‌زا باشد. این تغییرات اساسی می‌تواند در پتانسیل لقاح درون آزمایشگاهی تاثیر گذار باشد(درُس، ۲۰۰۷). به طور کلی نتیجه انتقال جنین‌های تولید شده در آزمایشگاه شامل میزان زیاد اووسیت بالغ، لقاح مناسب، گوساله‌زایی بالا همرا با میزان پایین بلاستوسیست و گوساله‌زایی بعد از انتقال جنین است. از معایب این تکنیک نرخ آبستنی پایین آن است. به طور کلی کارایی IVF در گاومیش بسیار کمتر از گاو است و نیاز است که مشکلات زیادی قبل استفاده از IVF در گاومیش حل شود تا با این کار بتوان به صورت اقتصادی یک نسل مفید از گاومیش را بدست آورد(تی اگاراجن، ۲۰۰۹).

امکان لقاح بین گونه‌ای:

امکان انتقال جنین بین گونه‌های مختلف گاو و گاومیش مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیقی ۸ گاومیش ماده بالغ سوپراوولاسیون به صورت طبیعی جفت گیری کردند. ۱۶ جنین گاومیش به روش غیر جراحی در ۵/۵، ۶، ۷ و ۷/۵ روز بعد از اولین جفتگیری طبیعی بدست آمد. ۳ مورلا در روز ۵/۵ ، ۶بلاستوسیت در روز۶، و ۶عدد بلاستوسیست شکافته شده در روز ۷/۵ بدست آمد. قطرجنین گاومیش در مقایسه با گاو مساوی بود ولی رنگ لایه‌های داخلی آن تیره‌تر به نظر می‌رسید. مرحله تکامل ۲۴ تا ۳۶ ساعت بود که پیشرفت بهتری نسبت به شرایط مشابه در گاو نشان داد. بعد از انتقال این جنین‌ها به گاوهای هلشتاین که همزمان‌سازی فحلی در آنها انجام شده بود هیچ‌گونه آبستنی مشاهده نشد. برای انتقال جنین بین گونه‌های مختلف حیوان گیرنده باید استعداد هیبرید شدن با حیوان دهنده جنین را داشته باشد. که این شانس موفقیت در حیواناتی که از یک گونه مشخص هستند، را بالا می‌برد. در حال حاضر هیچگونه آمیخته‌گری بین گاو و گاومیش

---

[۱] Carpus Luteum
[۲] Carpus Lunium

گزارش نشده است. باید توجه داشت که در این گونه‌ها عدد کروموزومی برای گاومیش باتلاقی، گاومیش رودخانه و گاو به ترتیب ۴۸، ۵۰ و ۶۰ است. امکان ایجاد جنین‌های آمیخته بین گاو و گاومیش را می‌توان با مجاور کردن اووسیت گاو با اسپرم گاومیش یا برعکس آزمایش کرد. تحقیقات نشان داده است زمانی که اووسیت گاو در مجاورت اسپرم گاومیش قرار می‌گیرد نتایج مراحل تکامل جنین بهتر و بیشتر می باشد(درُس، ۲۰۰۷).

همانند سازی:

مهمترین علل کاربردهای شبیه سازی در گاومیش، افزایش پیشرفت ژنتیکی، احیا نژادهای در حال انقراض، ایجاد حیوانات مشابه برای اهداف تحقیقاتی و ایمونولوژیکی و تغذیه‌ای و تکثیر افراد تراریخت می‌باشد. اولین گوساله شبیه سازی با روش انتقال هسته گاومیش در سال ۲۰۰۷ متولد شد اما درصد موفقیت پایین بود (شی و همکاران، ۲۰۰۷). به علت کارایی پایین شبیه سازی از طریق انتقال هسته سلولهای سوماتیک در گاومیش، شه و همکاران، (۲۰۰۹) برای شبیه سازی در گاومیش از روش HMC[1] که نیاز به ریز دستکاری لایه زوناپلاسیدا ندارد استفاده کرده و نتایج متفاوتی از انتقال هسته بین گاو و گاومیش بدست آوردند. در این فرایند اووسیت گاو و گاومیش در شرایط آزمایشگاهی در مدت ۲۲ ساعت به مرحله بلوغ می‌رسند. سپس یک سلول جدا شده فیبروبلاست از گوش حیوان به یک اووسیت بدون هسته (سیتوپلاست) تزریق می‌شود. تمام محققین به این نتیجه رسیده‌اند که میزان جنین‌هایی که به بلاستوسیت می‌رسند در بلاستوسیست گاو- بدون توجه به جنس حیوانی که هسته را می‌دهد- بیشتر از گاومیش است و بالعکس نتایج استفاده از فیبروبلاست گاومیش نسبت به گاو بهتر و موفقیت آمیزتر بوده است. موفقیت‌های دیگری نیز از انتقال هسته جنین گاومیش و هسته سلول‌های سوماتیک بالغ گاو به سیتوپلاست گاو گزارش شده که این جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند(درُس، ۲۰۰۷). راندمان سقط جنین و مرگ‌های دوره نوزادی در حیوانات تولید شده با انتقال هسته بالاتر از روش IVF و تلقیح مصنوعی می‌باشد. گمان می‌شود تنظیم اپی ژنتیکی ناکامل، علت ناهنجاری‌ها و راندمان پایین در روش انتقال هسته باشد. برای بهبود راندمان دراین تکنیک باید قبل از انتقال هسته، سلول‌های سوماتیک را با استفاده از راهکارهایی مثل تغییر شرایط محیط کشت، تغییرات اپی ژنتیکی (بخصوص در متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون) و مشاهده میزان بیان ژنهای مربوط به برنامه ریزی مجدد سلول مورد بررسی قرار داد(ساتیوان و همکاران، ۲۰۰۶).

جمع بندی:

بدلیل باروری ژنتیکی پایین در گاومیش فرآیند استفاده از تکنولوژی‌های نوین تولیدمثلی در این گونه به کندی صورت می‌گیرد. مسائل ومشکلاتی مثل رفتارهای فحلی، خصوصیات تخمدان و تکامل جنین در گاومیش باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد. با این حال تلقیح مصنوعی به صورت اقتصادی مورد استفاده قرار گرفته است و انتقال جنین، تولید آزمایشگاهی جنین و انتقال هسته در مرحله آزمایشگاهی و تحقیقاتی باقیمانده است.

---

[1] Hand-made Cloned

منابع:

1. Drost, M. 2007. Advanced reproductive technology in the water buffalo. Theriogenology, 68:450-453.

2. Manjunatha, B. M., P. S. P. Gupta, J. P. Ravindra, M. Devaraj and S. Nandi. 2008. In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. Anim. Reprod. Sci, 104:419-426.

3. Shah, R. A., A. George, M. K. Singh, D. Kumar, T. Anand, M. S. Chauhan, R .S. Manik, P. Palta, S. K. Singla. 2009. Pregnancies established from handmade cloned blastocysts reconstructed using skin fibroblasts in buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology, 71:1215-1219.

4. Shi, D., F. Lu, Y. Wei, K. Cui, S.Yang,, J. Wei, and Q. Liu. 2007. Buffalos (Bubalus bubalis) cloned by nuclear transfer of somatic cells. Biol. Reprod, 77:285-291.

5. Singh, B., M. S. Chauhan, S. K. Singla, S. K. Gautam, V. VermaD, R. S. Manik, A. K. Singh, M. Sodhi and M. Mukesh. 2009. Reproductive biotechniques in buffaloes (Bubalus bubalis): status, prospects and challenges. Rep. Fert. Dev, 21:499-510.

6. Suteevun, T. Smith, S.L. Muenthaisong, S. Yang, X. Parnpai, R. Tian, X.C. 2006. Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (Bubalus bubalis) cloned embryos. Theriogenology, 65:1704-1715.

7. Thiyagarajan. B. and Valivittan. K. 2009. Ameliorating effect of vitamin E on in vitro evelopmentofpreimplantation buffalo embryos. J Assist Reprod Genet, 26:217-225.

Application of biotechnology in Reproduction Buffalo

Mostafa Lotfi Farokhad[*1], Ramin Sayghalani[2], Nafise Hosseizadeh[3], Alireza Tarang[4], Sajjad Sharifi[5]
*** Corresponding E-mail address: ms.lotfi87@gmail.com**

Abstract

Buffalo, as a major livestock species for milk and meat production, contribute significantly to the economy of many countries; particularly, countries with tropical climate. The major factors limiting the efficient nurture of buffaloes in countries with a tropical climate are: late maturity; poor estrus expressivities, particularly in summer months; long postpartum calving intervals; low reproductive efficiencies and fertility rates which are closely linked with environmental stress; as well as managerial problems. As good reproductive performance is essential for efficient livestock production, the female buffalo calves must grow rapidly to attain sexual maturity, initiate estrous cycles, ovulate and be mated by fertile males or inseminated with quality semen to optimize conception and production. In the last two decades, considerable attention has been focused on understanding some of the causes for the inherent limitations in reproduction among buffaloes by genetic engineer and developing biotechniques for augmenting their reproductive efficiency. Efforts done for solve this problems that some of this activities include: artificial insemination (AI), synchronizing estrus, super ovulation, embryo transfer ,frizzed embryo, in vitro maturity(IVM), in vitro fertilization(IVF), cloned somatic cell nuclear. This review discusses recent researches about reproductive techniques in buffaloes

Keywords: buffalo, Reproductive, Biotechnology, Invitro method

بررسی بیان کمی برخی از ژن‌های مرتبط با تنش در اووسیت‌های بالغ شده گوسفندی در شرایط شوک گرمایی

زهرا غریب زاده[۱]، احمد ریاسی[۱]، سمیه استادحسینی[۲] مهدی حاجیان[۲]، محسن فروزانفر[۲]، سید مرتضی حسینی[۲] و محمد حسین نصر اصفهانی[۲]

۱- گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲- پژوهشکده رویان اصفهان

* نویسنده مسئول: محمدحسین نصر اصفهانی، اصفهان، ایران،-۴۶۴۴-۱۹۳۹۵،پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه تولیدمثل و تکوین.

پست الکترونیک:Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

چکیده

هدف از اجرای این آزمایش بررسی الگوی بیان ژن‌های Heat shock protein90، Na/k ATPase(ATP1A1) و Cyclin B (CCNB1)، در اووسیت‌های بالغ شده ی گوسفند در شرایط شوک گرمایی بود. برای این منظور یک گروه از اووسیت‌های نابالغ گوسفندی ابتدا به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴۱ درجه سانتی گراد و سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد (HS) و گروه دوم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد (NHS) در محیط TCM-199 کشت داده شدند و سپس بیان کمی ژن‌های مورد مطالعه با روش real-time RT-PCR انجام شد. مشاهدات نشان داد که تنها بیان رونوشت ژن Na/K ATPase بطور معنی داری ($P<0.05$) تحت تاثیر شوک گرمایی قرار گرفت.

واژگان کلیدی: بیان ژن، اووسیت، بلوغ آزمایشگاهی، شوک گرمایی.

مقدمه

تنش گرمایی در فصل تابستان یکی از مهمترین عوامل موثر بر کاهش باروری در حیوانات مزرعه‌ای است و معتقدند که این تنش بر چرخه‌ی استروس اثرات مخربی دارد (تسنگ و جو، ۲۰۰۸). اثرات تنش گرمایی بیشتر در زمانی اتفاق می افتد که اووسیت ها در مرحله شروع فرایند تقسیم میوز تا مرحله متافاز II هستند (پایتون و همکاران، ۲۰۱۱). گزارش شده است که قرار گرفتن کمپلکس کومولوس- اووسیت (COCs) در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد در زمان بلوغ میوزی می تواند موجب کاهش درصد اووسیت‌هایی می شود که تا مرحله MII پیشرفت می‌کنند (پایتون و همکاران، ۲۰۱۱). حساسیت بالای اووسیت‌ها در روند بلوغ میوز ممکن است با کاهش سنتز HSP (مولکولی کلیدی در محافظت سلول‌ها در برابر تنش گرمایی) همراه باشد. افزایش بیان HSPها در پاسخ سلول به تنش‌های محیطی و شرایط نامطلوب محیط کشت، PH کم و کمبود اکسیژن اتفاق می افتد. در بین انواع HSPها پروتئین HSP90 جزء دسته‌ی chaperones (محافظ) است و در تاخوردگی سایر پروتئین‌ها و عملکرد مناسب آن‌ها نقش مهمی دارد (اولیویرا و همکاران، ۲۰۰۵). چندین پروتئین دیگر نیز در از سرگیری فرآیند میوز نقش دارند که از آن جمله می توان به Cyclin B و Na/k ATPase اشاره کرد (سوکو و همکاران، ۲۰۰۸). هدف از اجرای این آزمایش بررسی الگوی بیان برخی از ژن پروتئین های مهم و درگیر در متابولیسم و نمو اووسیت ها در شرایط شوک گرمایی طی مراحل بلوغ آزمایشگاهی (IVM) بود.

مواد و روش‌ها

تعداد کافی تخمدان‌های گوسفند در فلاسک‌های گرمایشی در شرایط استاندارد از کشتارگاه‌های اطراف اصفهان جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس کمپلکس کومولوس- اووسیت (COCs) از تمام فولیکول‌های شفاف، غیرچرکی و غیرخونی با سایز حدود ۶-۲ میلی متر موجود در ناحیه قشری تخمدان‌ها، به آرامی آسپیره شدند. محیط آسپیراسیون شامل H-TCM + ۱۰ درصد FCS غنی‌سازی شده با ۲۰۰ واحد بین‌المللی هپارین بود. آنگاه کمپلکس‌های کومولوس- اووسیت که از نظر سیتوپلاسمی یکنواخت و حداقل دارای سه لایه از سلول-های کومولوس بودند، جدا شده و در مدیوم ویژه (H-TCM + ۱۰ درصد FCS) شستشو داده شدند. سپس COCها در محیط کشت بلوغ MM: TCM + 10% FBS + 0.01 IU/ml + 0.01 IU/ml LH + 0.1mM Cysteamine + 1µg/ml Estradiol + 100 (MM) ng/ml EGF به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. دمای انکوباتور برای یک گروه از COCها ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد (گروه HS) و برای گروه دیگر به مدت ۱۲ ساعت ۴۱ درجه و ۱۲ ساعت آخر ۳۸/۵ درجه سانتی گراد (گروه NHS) بود. محیط کشت بلوغ حاوی ۵ درصد گاز CO_2 و رطوبت حداکثر بود. پس از ۲۰ تا ۲۴ ساعت، سلول‌های کومولوسی اووسیت‌ها با استفاده از آنزیم هیالورونیداز از اطراف آن‌ها جدا شدند. آنگاه تعداد ۱۱۰ تا ۱۲۰ اووسیت در هر گروه در سه تکرار مستقل آزمایشی پس از شستشو در PBS-PVA [1] به ۲۰ میکرولیتر بافر RLT حاوی ۰/۲ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول منتقل شدند و استخراج کل RNA از اووسیت‌ها توسط RNeasy micro kit انجام شد. سنتز cDNA از روی mRNA استخراج شده در مرحله قبل انجام شد. واکنش PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر cDNA اووسیت، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR buffer (cinaclone، ایران)، ۰/۷۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (1.5mM/l ، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (0.2 Mm)، ۱ میکرولیتر پرایمر (5pm)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase (Cinaclon، ایران) (1.25U/µl) و ۱۷ میکرولیتر از DDW، انجام گرفت. پس از واسرشت الگو که در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ دقیقه انجام شد، ۳۵ سیکل

واکنش به ترتیب با دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال مناسب برای هر پرایمر به مدت ۴۵ ثانیه و دمای طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد و در انتها نیز جهت طویل سازی انتهایی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به دستگاه برنامه داده شد. جهت بررسی کیفیتcDNA سنتز شده، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ (Invitrogen، آمریکا) حاوی اتیدیوم برماید، به مدت ۳۵ دقیقه با ولتاژ ۹۵ تحت الکتروفورز قرار گرفت و سپس تحت تابش اشعه UV محل باندها آشکار شد. جهت انجام واکنش‌های Real-time PCR از دستگاه corbett مدل RG-6000 استفاده شد. واکنش PCR با ۲ میکرولیتر از cDNA سنتز شده، 0.25 pm پرایمرهای اختصاصی ارائه شده در جدول ۱ و Takara SYBER Green در حجم کلی ۱۰ میکرولیتر انجام شده و بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن خانه‌دار GAPDH نرمالایز شد. نتایج حاصل شده با استفاده از آزمون t-student و در سطح معنی داری 0.05 مورد بررسی قرار گرفت.

[1] Phosphate Buffered Saline- Polyvinyl Alcohol

نتایج و بحث

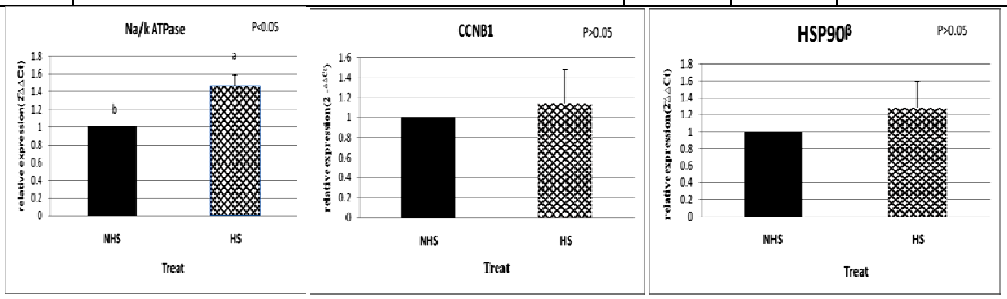
نتایج نشان داد که رونوشت ژن‌های هدف در اووسیت‌های بالغ وجود داشت و میزان بیان رونوشت هر سه ژن مورد بررسی در اووسیت‌های گروه HS نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. میزان بیان رونوشت ژن ATP1A1 در گروه HS بطور معنی‌داری ($P<0.05$) نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (شکل ۱). در حالی که افزایش فراوانی رونوشت‌های HSP90 و Cyclin B نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ($P>0.05$). در تایید این نتیجه گزارش شده است که تنش گرمایی در طول بلوغ میوزی موجب افزایش فعالیت متابولیکی و افزایش میزان ATP درون سلولی می شود (پایتون و همکاران، ۲۰۱۱). نشان داده شده است که فراوانی رونوشت HSP90AB1 در سلول‌های کومولوس COCهای IVM در مقایسه با شرایط in vivo آن، بالاتر بود و می‌تواند به دلیل شرایط نامطلوب محیط کشت آزمایشگاهی باشد که منجر به افزایش بروز آپوپتوز، بیان HSPها، کاهش کیفیت و توان تکاملی اووسیت می‌شود (تزفای و همکاران، ۲۰۰۹).

منابع

1. Payton, R., A. Louisa, A. M. Saxton, and J. L. Edwards. 2011. Impact of heat stress expousure during meiotic maturation on oocyte, surrounding cumulus cell, and embryo RNA populations. Journal of Reproduction and development. On Line ISSN: 1348-4400.
2. Oliveira, A. T. D., R. F. F. Lopes and J. L. Rodrigues. 2005. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced in vitro under varying embryo density conditions. 64:1559-1572.
3. Succu, S., D. Bebbere, L. Bogliolo, F. Ariu, S. Fois, G. G. Leoni, F. Berlinguer, S. Naitana and S. Ledda. 2008. Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and mRNA abundance. Molecular Reproduction and Development. 75:538-546.
4. Tesfaye, T., N. Ghanem, F. Carter, T. Fair, M. A. Sirard, M. Hoelker, K. Schellander and P. Lonergan. 2009. Gene expression profile of cumulus cells derived from cumulus–oocyte complexes matured either in vivo or in vitro. Journal of reproduction Fertility and Development. 21:451-461.
5. Tseng, J. K., J. C. Ju. 2008. Calcium release of heat-shocked porcine oocytes induced by thimerosal or inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). Animal Reproduction Science,111:41-53.

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در روش Real-Time RT-PCR

Gene Name	Primer Sequence(5'- 3')	Length (bp)	Ta (□c)	Accession number
Cyclin B	F:5`-GATTGGAGAGGTTGATGTTGAG-3` R:5`-AGGTAATGCTGTAGAGTTGGTG-3`	174	62	NM_001045872.1
Hsp90	F:5`-GCATTCTCAGTTCATTGGCTATCC-3` R:5`-TTCTATCTCGGGCTTGTCATCAG-3`	152	61	NM_001012670.2
NaKATPase	F:5`-GCTGACTTGGTCATCTGCAA-3` R:5`-CATTCCAGGGCAGTAGGAAA-3`	129	58	NM_001076798.1



شکل۱- میزان نسبی بیان رونوشت ژن‌های HSP90، CCNB1 و ATP1A1 در اووسیت‌های بالغ شده گوسفندی تا مرحله MII

Evaluation of quantitative expression of some stress related genes in matured ovine oocytes during heat shock condition

Z. Gharibzadeh[1], A. Riasi[1], S. Ostadhosseini[2], M. Hajian[2], M.[2], S. M. Hosseini[2] and M. H. Nasr esfahani*[2]
1- Department of Animal Sciences, Isfahan university of Technology, Isfahan, Iran, 2- Department of Reproduction and Development, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Esfahan, Iran.
* Corresponding E-mail address: mh.nasr-esfahani@royaninstitue.org

Abstract

The aim of this study was to evaluatation the quantitave expression of HSP90, ATP1A1 and CCNB1 genes in matured ovine oocytes under heat shock condition. For this porpose one group of oocytes at GV stage was assigned to in vitro maturation 12h at 41◦C and then 12h at 38.5 ◦C (heat shock; HS), the other group was appropriated for 24h at 38.5 (non heat shock or control group; NHS). The oocytes were cultured in TCM-199 medium under 5% CO_2. The real time RT-PCR was used to analyse of quantitative expression of the genes. Results showed the amount of HSP90 and Cyclin B transcripts were higher in HS group than NHS, but the difference was not significant. The transcription of Na/k ATPase gene was significantly (P<0.05) high in Hs group.

Keywords gene expression, oocyte, in vitro maturation, heat shock.

بررسی سطوح تستوسترون پلاسما و ارتباط آن ویژگی های اسپرم قوچ های دورگ

محمد مصطفی پورسیف[۱] غلامعلی مقدم[۲]، عباس رافت[۳]، رضی اله جعفری[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی،دانشگاه تبریز،۲-عضو هیئت علمی گروه علوم دامی،دانشکده ی کشاورزی،دانشگاه تبریز

۳-عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۴-عضو هیئت علمی گروه علوم درمانگاهی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تبریز

مقدمه

اهمیت این موضوع در ضرورت شناخت بیشتر ویژگی های تولید مثلی حیوانات مزرعه ای به خصوص فیزیولوژی تولید مثل حیوانات پلی استروس فصلی مثل بز و گوسفند است. بررسی فاکتورهای موثر بر روی صفات اسپرم در اجرای بهینه ی تکنیک تلقیح مصنوعی در برنامه های اصلاحی ضروری است. مطالعه ی همزمان ویژگی های اسپرم و نیز تستوسترون پلاسمایی می تواند میزان همبستگی بین این صفات و نیز میزان تاثیر گذاری تستوسترون خون بر روی کیفیت و کمیت اسپرم را مشخص کند. هدف در این مطالعه بررسی ارتباط بین هورمون تستوسترون و صفات منی و میزان تاثیر آن بر اسپرم قوچ های دورگ می باشد.

بررسی منابع

تستوسترون مهمترین هورمون کنترل کننده ی صفات نرینه است. ویژگی های منی و نیز ویژگی های مایع سمینال در ماهها ی مختلف سال و نژاد های مختلف متفاوت هستند[۳، ۵، ۸]. سطوح تستوسترون خون بر اساس نژاد، سطح تغذیه، فصل و سن متغیر است[۸،۱]. ترشح تستوسترون با تحریکات خارجی از قبیل رفتار میش، بوی میش ها و نشان دادن میش فحل همبستگی دارد[۷]. در بسیاری از مطالعات به دنبال افزایش کمی و کیفی صفات اسپرم ترشح هورمون تستوسترون افزایش یافته است[۳، ۶]. فوت و همکاران (۱۹۷۶) گزارش کردند بین سطوح تستوسترون در گردش خون و کیفیت اسپرم در گاو ها ارتباط معنی داری وجود ندارد[۲].

مواد و روش ها

از ابتدای پاییز تا بهمن ماه از ۱۵ قوچ بارور دورگ ۲ تا ۵ ساله با چهار ترکیب ژنتیکی(بلوچی-مغانی، قزل-بلوچی، آرخامرینو-مغانی، آرخامرینو-قزل) و وزن زنده ی ۶۵ تا ۸۰ کیلوگرم اسپرم گیری انجام شد. نمونه ها بلافاصله بعد از اسپرم گیری به آزمایشگاه منتقل شده

و از نظر صفات کمی و کیفی ارزیابی شدند. حجم منی بوسیله ی لوله اسپرم گیری مدرج با دقت ۰/۱ ml ثبت شد. غلظت اسپرم توسط لام توما تعیین شد و برای رقیق کردن نمونه ی خام از سیترات سدیم دی هیدراته ۲/۹٪ (۱ به ۲۰۰) استفاده شد. درصد تحرک پیشرونده بعد از رقیق کردن نمونه ی خام (۱ به ۲۰۰) با سیترات سدیم دی هیدراته ۲,۹٪ و بوسیله ی یک لام قطره ی معلق گرم (۳۷°C) و با عدسی × ۴۰ چند زمینه از لام بررسی شد(این روش برای اولین بار اجرا شده و سبب وضوح بیشتر اسپرماتوزوا ها زیر میکروسکوپ می شود) . برای ارزیابی درصد اسپرم زنده و مرده از رنگ آمیزی ائوزین استفاده شد و با عدسی × ۴۰ تعداد ۳۰۰ اسپرماتوزوا شمارش شد. pH نمونه ها بوسیله ی استریپ های pH متر شرکت مرک آلمان و نیز pH متر قلمی (مدل ۸۶۸۵ – ساخت مالزی) تعیین شدند. میزان فعالیت متابولیکی اسپرم(MBR-T) بوسیله رنگ بلو دو متیلن بر حسب مدت زمان(ثانیه) تغییر رنگ نمونه ی خام بعد از ترکیب ۱ به ۱ نمونه و رنگ محاسبه گردید. بعد ازخونگیری، نمونه ها سانتریفیوژ(۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) شده پلاسمای حاصل تا زمان آزمایش در دمای ۲۰°C– نگهداری شدند. غلظت پلاسمایی تستوسترون بوسیله ی آزمایش آنزیمی و مطابق رویه توصیه شده ی شرکت سازنده(کیت تشخیص ایمونواسی آنزیم تستوسترون[1]، Medix Biotech Inc., CA) اندازه گیری شده است. داده ها بوسیله ی نرم افزار SAS 9.1 version آنالیز شدند.

نتایج و بحث

همانطور که در جدول ۱ دیده می شود از نظر درصد اسپرم زنده و درصد تحرک پیشرونده فقط بین بلوچی–مغانی با آرخامرینو–مغانی تفاوت معنی دار(P<۰/۰۵) وجود دارد. از نظرغلظت اسپرم و میزان فعالیت متابولیکی(MBR-T) تفاوت معنی داری بین نژاد ها مشاهده نشد. از نظر pH بین بلوچی–مغانی با قزل–بلوچی، بلوچی–مغانی با آرخامرینو–مغانی و قزل–بلوچی با آرخامرینو–قزل (در سطح P<۰/۰۱) و بین آرخامرینو–قزل با آرخامرینو–مغانی (در سطح P< ۰/۰۵) تفاوت معنی دار مشاهده شد. در صفت حجم انزال به جز آرخامرینو–قزل با آرخامرینو–مغانی، بین بقیه نژاد ها تفاوت معنی دار(P<۰/۰۱) مشاهده شد. بالاترین غلظت پلاسمایی تستوسترون درنژاد قزل–بلوچی و کمترین در آرخامرینو–مغانی ثبت شده بود(به ترتیب ۱/۰۱ ± ۷/۱۷ و ۰/۶۸ ± **۳/۸۶** ng/ml) با این حال تفاوت معنی داری از نظر غلظت پلاسمایی بین قوچ ها مشاهده نشد. ضرایب همبستگی برای تستوسترون پلاسمایی با ویژگی های اسپرم در جدول ۲ نشان داده شده است. همبستگی بین سطح تستوسترون پلاسمایی با غلظت اسپرم، درصد اسپرم زنده، درصد تحرک پیشرونده و MBR-T با نتایج مطالعات قبلی نیز مطابقت داشت[۴].

فهرست منابع

1- Boland, M.P., Alkamali, A.A., Crosby, T.F., Haynes, N.B., Howles, C.M., 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentration in rams. Anim. Reprod. Sci. 9, 241-252.

2- Foote, R.H., Munkenbeck, N., Greene, W.A., 1976. Testosterone and libido in Holstein bulls of various ages. J. Dairy Sci. 59, 2011-2013.

1- Testosterone Enzyme Immunoassay Test Kit

3- Kafi, M., Safdarian, M., Hashemi, M., 2004. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. Small Rum. Res. 53, 133-139.

4- Kishk, W.H., 2008. Interrelationship between ram plasma testosterone level and some semen characteristics. Slovak. J. Anim. Sci. 41, 67-71.

5- Langford, G.A., Sanford, L.M., Maqrcus, G.J., Shrestha, J.N.B., 1999. Seasonal cyclic pituitary and testicular activities in rams. Small Rumin. Res. 33, 43-53.

6- Rhim, T.J., Kuehl, D., Jackson, G.I., 1993. Seasonal changes in the relationships between secretion of gonadotrophin-releasing hormone, luteinizing hormone, and testosterone in the ram. Biol. Reprod. 48, 197-204.

7- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Restall, B.J. 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goat. J. Reprod. Fertil. Suppl. 52, 243-257.

8- Zamiri, M.J., Khodaei, H.R., 2005. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat- tailed rams. Anim. Reprod. Sci. 88, 245-255.

جدول-۱. ویژگی های منی و سطوح تستوسترون پلاسمایی در چهار نژاد دورگ(میانگین ± انحراف معیار)

پارامتر ها	بلوچی- مغانی	قزل- بلوچی	آرخامرینو - قزل	آرخامرینو- مغانی
درصد اسپرم زنده	۶۹,۰ ± ۱,۰^{b}	۷۲,۰ ± ۱,۰^{ab}	۷۳,۰ ± ۱,۰^{a}	۷۲,۰ ± ۱,۰^{ab}
درصد تحرک پیشرونده	۶۵,۰ ± ۱,۰^{b}	۶۷,۰ ± ۱,۰^{ab}	۶۸,۰ ± ۱,۰^{a}	۶۷,۰ ± ۱,۰^{ab}
غلظت اسپرم($\times 10^{9}$)	۳,۸۰ ± ۰,۱۳^{a}	۳,۶۸ ± ۰,۱۱^{a}	۳,۶۳ ± ۰,۱۱^{a}	۳,۶۰ ± ۰,۱۱^{a}
حجم منی(ml)	۰,۹۶ ± ۰,۰۵^{c}	۱,۳۶ ± ۰,۰۴^{a}	۱,۱۸ ± ۰,۰۴^{b}	۱,۱۷ ± ۰,۰۴^{b}
pH	۶,۳۸ ± ۰,۰۴^{b}	۶,۵۹ ± ۰,۰۴^{a}	۶,۴۴ ± ۰,۱۰^{b}	۶,۵۶ ± ۰,۰۴^{a}
(sec) MBR-T	۱۱۶,۱۵ ± ۴,۸۵^{a}	۱۱۱,۵۸ ± ۴,۲۰^{a}	۱۰۹,۳۶ ± ۴,۲۰^{a}	۱۱۵,۱۷ ± ۴,۲۳^{a}
تستوسترون(ng/ml)	۴,۱۶ ± ۱,۰۸^{a}	۷,۱۷ ± ۱,۰۱^{a}	۴,۸ ± ۱,۵۳^{a}	۳,۸۶ ± ۰,۶۸^{a}

جدول-۲. ضریب همبستگی بین تستوسترون پلاسمایی و ویژگی های مختلف اسپرم

پارامتر	درصد اسپرم زنده	درصد تحرک پیشرونده	غلظت اسپرم	pH	حجم منی	MBR-T
تستوسترون(ng/ml)	۰,۶۶۴ **	۰,۶۵۰ **	۰,۸۰۶ **	-۰,۳۱۷*	۰,۴۶۸ **	-۰,۸۴۹ **

** : P < ۰,۰۱ ، * : P < ۰,۰۵

Abstract:

This study was conducted on fifteen crossbred fertile rams included by 3 Balochi-Moghani, 4 Ghezel-Balochi, 4 Ghezel×Merino and 4 Merino × Moghani were used in this examination. Semen of rams was collected by artificial vagina short form and blood samples were obtained via jugular vein. Soon after semen collection traits were surveyed. The results showed that the significantly difference was observed in more of semen characteristics between the four breeds especially ejaculate volume (P<0.01). Testosterone plasma was correlated with pH of semen (P<0.05), sperm density, semen volume, progressive motility, MBR-T and viable sperm percentage (P <0.01). It could be concluded that testosterone levels are good markers for semen quality and quantity.

بررسی تاثیر همزمان فاکتورهای رشد EGF، bFGF و هورمون FSH بر روی تکوین آزمایشگاهی فولیکول های پرآنترال تخمدان گوسفند

مهندس فروزان اسمعیل زاده[۱]، دکتر سید مرتضی حسینی[۲]،زهرا نصیری[۲]، مهدی حاجیان[۲]، دکتر محمد چمنی[۱]، دکتر مهدی امین افشار[۱]، دکتر محمد حسین نصر[2,3]★

۱- گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران

۲- پژوهشگاه رویان ، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلول جنسی، اصفهان، ایران.

۲-پژوهشگاه رویان، پژوهشکده علوم تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، جهاددانشگاهی، گروه جنین شناسی، تهران، ایران.

★نویسنده مسئول: پژوهشگاه رویان ، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلول جنسی، اصفهان، ایران ، صندوق پستی 8433-815896، اصفهان، ایران، تلفن: ;3-2612900 311 98، نابر; 2602555 311 98.

Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

چکیده

فرآیند رشد و تکوین آزمایشگاهی فولیکول های پرآنترال بافت تخمدان تحت تاثیر عوامل رشد و هورمونی ناشناخته متعددی است، شناسایی این عوامل باعث بهبود تکنولوژی رشد و تکوین آزمایشگاهی اووسیت های نابالغ و تبدیل آنها از فولیکول بدوی به بالغ می گردد که برای توسعه ی تکنولوژی های تولیدمثلی، حفظ گونه های کمیاب و باارزش و درمان بیماری های تولیدمثلی مانند ناباروری تخمدان ها و یا پیشگیری از یائسگی از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر همزمان فاکتورهای رشد EGF، bFGF و هورمون FSH بر روی تکوین آزمایشگاهی فولیکول های پرآنترال تخمدان گوسفند است. قطعات قشری بافت تخمدان در سه گروه کنترل کشت نشده، کشت شده و آزمایشی.مورد ارزیابی مورفولوژیکی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بالاترین درصد و افزایش قطر اووسیت و فولیکول های نرمال پرآنترال در گروه آزمایشی دارای هر سه عامل EGF، bFGF و FSH ملاحظه شد. بنابراین سه عامل فوق در روند تکوین، تداوم رشد و بقای فولیکول های پرآنترال تخمدان گوسفند نقش موثری دارند.

واژگان کلیدی: EGF. bFGF. FSH. فولیکول های پرآنترال. گوسفند.

مقدمه

از آنجا که تکنیک های رشد و تکوین آزمایشگاهی[۱۱] فولیکول های پرآنترال در مقایسه با روش های متداول، قادر به جمع آوری تعداد قابل توجهی اووسیت بالغ بوده و فرآیند رشد و تکوین نیز تحت تاثیر مکانیسم و عوامل ناشناخته متعددی است، بنابراین با IVG علاوه بر حفظ ذخیره ی فولیکولی گونه های باارزش و بیماران سرطانی، بر دانش مولکولی ما درباره ی روند تکوین اووسیت افزوده می شود (Picton,

1- In Vitro Growth (IVG)

(2008. به نظر می رسد که فاکتورهای رشد EGF، bFGF و هورمون FSH در مهار اپوپتوز، تحریک میتوز، رشد تمایز سلولی نقش مهمی دارند (Adriaens 2004; Silva, 2004; Matos, 2007a,b; Peng, 2010).

هدف از این مطالعه بررسی تاثیر همزمان فاکتورهای رشد EGF، bFGF و هورمون FSH بر روی تکوین آزمایشگاهی فولیکول های پرآنترال تخمدان گوسفند است.

مواد و روش ها

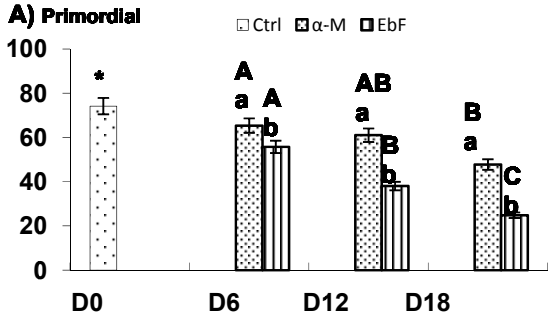
بخش قشری ۲۰ نمونه ی تصادفی تخمدان گوسفند (۱۰ تا ۱۲ ماهه) به قطعات نواری با ابعاد۰/۵× ۳× ۳ میلیمتر تقسیم، ۴ نمونه به عنوان گروه کنترل کشت نشده ارزیابی و باقیمانده قطعات نیز در پلیت ۴ چاهکی و درون انکوباتور دارای ۵٪ O2، ۵٪ CO2، ۹۰٪ N2 و دمای ۳۸,۵°c به مدت ۱۸ روز کشت داده شدند. در این مطالعه از دو گروه تیماری کنترل کشت شده(α-MEM) و آزمایشی EbF ((EGF α-MEM(75 ng/ml), bFGF (10۰ ng/ml), FSH (۵۰ng/ml ,) با سه تکرار برای هر تیمار استفاده و تعویض محیط کشت ها نیز هر دو تا سه روز انجام شد. پس از تهیه برش های سریالی با ضخامت ۵ µm از نمونه های تازه و کشت شده و رنگ آمیزی آنها به روش هماتوکسیلین-ائوزین (H & E) ارزیابی مورفولوژیکی (شامل تعیین درصد و قطر اووسیت و فولیکول های پرآنترال نرمال) انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها نیز در صورت نرمال بودن توزیع و برابری واریانس گروه ها، به روش آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA) انجام و برای بررسی تفاوت‌های بین گروه‌های مختلف از روش توکی (TUKEY) استفاده شد.

نتایج و بحث:

نتایج نشان داد که درصد فولیکول های بدوی دو گروه کنترل (α-M) و آزمایشی کشت شده (EbF) در مقایسه با کنترل کشت نشده (Ctrl) و پس از گذشت ۶، ۱۲ و ۱۸ روز از کشت، به صورت معنی داری (P<0 05) کاهش و برعکس درصد فولیکول های پرآنترال افزایش یافت. به نظر می رسید که این تغییرات به زمان وابسته است. در مقایسه بین دو گروه کشت شده در زمان های مختلف کشت نیزتفاوت ها معنی دار دیده شد و به ترتیب کمترین و بیشترین درصد این دو نوع فولیکول در گروه EbF ملاحظه گردید(نمودار B و A-1). همچنین افزایش معنی داری(P<0 05) در قطر اووسیت و فولیکول های پرایمری دو گروه کشت شده درمقایسه با کشت نشده و در زمان های مختلف کشت ملاحظه شد که با گذشت زمان تداوم داشت. بیشترین این تغییرات در زمان های مختلف کشت، در گروه آزمایشی EbF و در مقایسه با گروه کنترل (α-M) دیده شد. افزایش معنی داری نیز در قطر اووسیت و فولیکول های ثانویه گروه کنترل (α-M) در مقایسه با کشت نشده (Ctrl) و با گذشت زمان روئیت نشد، در حالیکه در گروه آزمایشی EbF، بیشترین افزایش معنی دار در این دو پارامتر ودر مقایسه با کنترل های کشت نشده و کشت شده دیده شد که به زمان وابسته بود (جدول ۱). برخی مطالعات نشان می دهند که هورمون FSH (Adriaens, 2004; Matos, ۲۰۰۷a) و فاکتورهای رشدEGF، bFGF (Silva, 2004; Matos, 2007b; Peng, 2010) بر مهار اپوپتوز، تحریک میتوز،رشد، تمایز سلولی و تکوین فولیکول ها موثرند که نتایج مطالعه حاضر نیز آن را تایید می کند. با توجه به ملاحظه بالاترین درصد و افزایش قطر اووسیت و فولیکول های نرمال پرآنترال در گروه آزمایشی دارای هر سه عامل EGF، bFGF و FSH، می توان چنین نتیجه گیری نمود که سه عامل فوق در روند تکوین، تداوم رشد و بقای فولیکول های پرآنترال تخمدان گوسفند نقش موثری دارند. همچنین پیشنهاد می گردد که با استفاده از مطالعات مولکولی، نقش تنظیمی این عوامل در مراحل اولیه و بعدی رشد و تکامل فولیکولی بررسی شود.

منابع

[1] Peng, X., Yang, M., Wang, L., Tong, C., Z. Guo. 2010. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. J Assist Reprod Genet, 101:30–41.
[2] Picton, H.M., Harris, S.E., Muruvi, W., E.L. Chambers. 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction, 136:703–15.
[3] Adriaens, I., Cortvrindt, R., J. Smitz. 2004. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. Hum Reprod, 19:398–408.
[4] Silva, J.R.V., Van den Hurk, R., Matos, M.H.T., Santos, R.R., Pessoa, C., Moraes, M.O., J.R. Figueiredo. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. Theriogenology, 61:1691–704.
[5] Matos, M.H., Lima-Verde, I.B., Luque, M.C., Maia, J.E. Jr., Silva, J.R., Celestino, J.J., Martins, F.S., Báo, S.N., Lucci, C.M., J.R. Figueiredo. 2007a. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. Zygote, 15(2):173–82.
[6] Matos, M.H., Lima-Verde, I.B., Bruno, J.B., Lopes, C.A., Martins, F.S., Santos, K.D., Rocha, R.M., Silva, J.R., Báo, S.N., JR. Figueiredo. 2007b. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. Reprod Fertil Dev, 19(5):677–84.



نمودار ۱- درصد فولیکول های بدوی (A) و پرآنترال (B) در ۰، ۶، ۱۲ و ۱۸ روز پس از کشت بافت تخمدان گوسفند. حروف بزرگ (A و B) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات بین روزهای مختلف ($P< 0.05$) در همان گروه، حروف کوچک (a و b) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات بین گروه های مختلف.($P< 0.05$) در همان روز، و علامت ستاره (*) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات با گروه کشت نشده ($P< 0.05$) استفاده شده است.

جدول ۱- میانگین قطر اووسیت و فولیکول های بدوی، او.لیه و ثانویه در ۰، ۶، ۱۲ و ۱۸ روز پس از کشت بافت تخمدان گوسفند. حروف بزرگ (A و B) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات بین روزهای مختلف ($P< 0.05$) در همان گروه، حروف کوچک (a و b) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات بین گروه های مختلف.($P< 0.05$) در همان روز، و علامت ستاره (*) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات با گروه کشت نشده ($P< 0.05$) استفاده شده است.

روز وگروه کشت	میانگین قطر اووسیت و فولیکول ها		
	بدوی (n=60)	اولیه(n=60)	ثانویه(n=20)
	اووسیت فولیکول	اووسیت فولیکول	اووسیت فولیکول
کنترل کشت نشده	41.86±0.68 40.00±0.82	50.92±1.14 40.90±0.97	80.83±1.37 58.70±1.16
پس از ۶ روز کشت			
کنترل کشت شده	42.08±1.23Aa 39.35±0.93Aa	53.76±1.11Aa* 43.6±1.07Aa*	79.44±4.32Aa 59.93±2.71Aab
کشت شده آزمایشی	41.73±1.64Aa 38.70±1.01Aa	55.90±2.44Ab* 46.91±1.98Abc*	78.75±4.31Aa 59.60±3.52Aab
پس از ۱۲ روز کشت			
کنترل کشت شده	42.22±1.78Aab 39.10±1.35Aa	53.76±4.48Aa* 43.05±3.91Aa*	82.53±7.33Ba 60.32±5.12Aa
کشت شده آزمایشی	45.78±1.33Aabc42.98±1.53Abc	59.23±5.72Bb* 48.82±4.52Ab*	87.36±6.47Bbc*64.95±4.63Bb*
پس از ۱۸ روز کشت			
کنترل کشت شده	41.20±1.63Aa 37.05±1.29Aa	56.70±5.39Ba* 45.84±4.17Ba*	82.97±8.16Ba 61.12±6.27Aa
کشت شده آزمایشی	45.68±1.79Aab 42.40±0.98Abc	59.90±4.29Bb* 50.10±3.22Ab*	91.00±7.49Bb* 70.42±5.14Cb*

منابع

۱- مرادبند، ف. ۱۳۸۵. تعیین چند شکلی‌های موجود در ژنهایFecB، BMP15 و GDF9 در گوسفندان نژاد بلوچی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دامی و شیلات. مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه مازندران.

2- Davis, G. H., J. C. McEwan, P. F. Fennessy, K. G. Dodds and P. A. Farquhar. 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. Biol Reprod. 44: 620-624.

3- Galloway, S. M., S. M. Gregan, T. Wilson, K. P. McNatty, J. L. Jungel, O. Ritvos, and G. H. Daivis. 2002. Bmp15 mutations and ovarian function. Mol. Cell Endocrinol. 191: 15-18.

4- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H. Davis, R. Powell and S. M .Galloway. 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). Biol Reprod. 70: 900-909.

6- Hanrahan, J. P. and M. Mullen. 2007. Lleyn breed is likely source of BMP15 and GDF9 mutations, that have large effects on ovulation rate, discovered in Cambridge and Belclare breeds. Biol. Reprod. 70: 809-821.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر جایگاه **GDF9** روی صفت دو قلوزایی در روش **RFLP**

صفات	درجه آزادی	آماره **Wald**
جنسیت	۱	۰/۸۵۷۰^{ns}
الگوی آللی	۲	۹/۶۴۹۷**

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

روسکوویتین و اثر آن روی اکسپند سلول‌های کومولوس اووسیت میش

سلمان نصرالهی[۱]، احمد زارع شحنه[۲]، حمید کهرام[۲]، عباس ابویسانی،[۳]علی هاتفی[۱]، رضا مسعودی[۱]

۱. دانشجویان کارشناسی ارشد فیزیولوژی و تولیدمثل دانشگاه تهران، ۲- احمد زارع شحنه استاد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳. هیئت علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
Nasrolahisalman@ut.ac.ir

چکیده

در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف روسکویتین (۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکرومولار)(یک مهار کننده روی پیشرفت چرخه سلولی پستانداران در نقطه G2-M وG1-S) بر میزان پراکندگی کومولوس اووسیت‌های گوسفند مورد ارزیابی قرار گرفت.. نتایج حاصله نشان داد که تیمار ۱ (۸۶/۵۴ ، ۸/۶۵ ، ۴/۸) تیمار ۲ (۸۷/۰۳ ، ۷/۴ ، ۵/۵۵) تیمار ۳ (۸۰/۹۵ ، ۱۱/۱۱ ، ۷/۹۷) تیمار ۴ (۸۳/۶۲ ، ۹/۴۸ ، ۶/۹) و گروه کنترل (۸۷ ، ۷/۴۱ ، ۵/۵۹) و تعداد اوسیت ها به ترتیب ۱۰۴ ، ۱۰۸ ، ۱۲۶، ۱۱۶ و ۱۰۹ عدد می‌باشد. به نظر می‌رسد که این ترکیب نتوانسته است اثر معنی داری بر پراکندگی سلول‌های کومولوس اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشته باشد.

کلید واژه: اووسیت گوسفند، پراکندگی کومولوس . روسکویتین.

مقدمه

بطور کلی تخمدان‌های جمع‌آوری شده از کشتارگاه مهمترین منبع تولید جنین‌های آزمایشگاهی برای گوسفندان است. نگهداری تخمدان‌ها خارج از بدن و بدون تامین خون‌رسانی، ممکن است با تاثیر بر محیط خارج سلولی احاطه کننده اووسیت‌ها بر کیفیت آن‌ها تاثیر بگذارد. IVMو IVF باعث ایجاد یک پتانسیل ویژه برای تولید تعداد زیادی جنین برای تحقیقات و کاربرد در سایر تکنولوژی‌ها می‌شود. روسکویتین (ROS) *۱ یک مهار کننده فعالیت کیناز به وسیله رقابت با ATP در اتصال به کیناز است و در سطوح میکرومولار مانع پیشرفت چرخه سلولی پستانداران در نقطه G1-S و G2-M به وسیله مهار سنتز DNA می‌شود (Meijer et al., 1997). همین‌طور روسکویتین یک پورین شناخته شده است که باعث مهار پروتئین وابسته به سایکلین شده و از فسفریلاسیون P34cdc2 جلوگیری می‌کند و بازدارنده فعالیت MAPK است (Anonymous: alomone.com). اما غلظت‌های بالای روسکویتین باعث تحریک فعالیت MAPK می‌شود (Marques et al., 2007). میتوان گفت بلوغ آزمایشگاهی اووسیت (IVM) شامل تغییرات کاملاً شناخته شده در کومولوسهای احاطه کننده اطراف آن است. سلول‌های کومولوس جهت تشکیل یک توده کره‌ای شکل در حالت سه بعدی پراکنده می‌شوند. در مطالعه ای مشاهده شد که موکوسی‌شدن کمپلکس کومولوس–اووسیت در شرایط درون‌تنی، خیلی مشخص‌تر و آشکارتر از حالتی است که در شرایط برون تنی رخ میدهد. برخی معتقدند که FSH و فاکتور رشدِ EGF، سلول‌های کومولوس را برای تولید و ترشح اسیدهیالورونیک تحریک

Roscovitin*
cytoplasmic [۱] intra sperm injection

می‌کنندکه منجر به پراکندگی سلول‌های کومولوس می‌شود. در ارزیابی بلوغ اووسیت، با درجه‌ی پراکندگی کومولوس‌ها، اعتقاد بر این است که این امر انعکاسی از فرایند طبیعی فیزیولوژیکی است. برخی ترکیبات خاص در محیط‌کشت بلوغ، ممکن است سلول‌های کومولوس را تحت تاثیر قرار دهند. گلوتامین یکی از این ترکیبات محیط‌کشت تجاری TCM-199 است (Gordon2003). علاوه بر آن، ماکرومولکول-های مورد استفاده در محیط‌کشت بلوغ برون‌تنی اووسیت، بلوغ اووسیت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. سرمی که در محیط‌کشت وجود دارد بلوغ اووسیت را بهبود بخشیده و رشد و نمو آتی جنین را تضمین می‌کند. سرم حاوی ترکیبات مختلفی از قبیل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، امینواسیدها و پروتئین‌های اتصال یابنده می‌باشد. سلول‌های کومولوس پراکنده می‌شود تا تشکیل یک توده کروی شکل سه بعدی بدهند. گویی کمپلکس کومولوس–اووسیت، درون محیط کشت شناور است. در حیوان زنده چنین تغییراتی، بخشی از فرایندی است که توسط آن کمپلکس کومولوس–اووسیت خود را از دیواره فولیکول، درست قبل از تخمک‌ریزی جدا می‌کند. این چسبندگی ممکن است جهت اطمینان از چیده شدن کمپلکس کومکولوس– اووسیت توسط اپیتلیوم مژکدار قسمت شیپوری اویدوکت مهم باشد. در مطالعه‌ای مشاهده شد که موکوسی شدن کمپلکس کومکولوس–اووسیت در شرایط درون‌تنی، خیلی مشخص‌تر و آشکارتر از حالتی است که در شرایط برون‌تنی رخ می‌دهد. اسید هیالورونیک، که یک گلیکوزآمین‌گلیکان بدون گوگرد است، توسط پروتئین‌های متصل شونده۱، به سلول‌های کومولوس می‌چسبد. هنگامی که اسید هیالورونیک هیدراته می‌شود، فضایی بین سلول‌های کومولوس باز می‌شود و سلول‌ها در داخل ماتریکس موکوسی تثبیت می‌شوند. به این فرایند پراکنده شدن کومولوس‌ها یا موکوسی‌شدن گفته می‌شود(Gordon2003). در این آزمایش جهت بررسی میزان پراکندگی سلول‌های کومولوس پس از یک دوره بلوغ ۲۴ ساعته که از اووسیت‌هایی با حداقل سه لایه سلول کومولوس فشرده استفاده شده بود، سلول‌های کومولوسی که متورم و پراکنده می‌شد، بصورت چشمی در زیر لوپ در همه تیمارها توسط یک نفر انجام شد و معیار ارزیابی به طوری بود که هنگام جابه‌جایی توسط پیپت پاستور، سلول‌های کومولوس به ته پتری‌دیش و هم‌چنین به نوک پیپت می‌چسبیدند و از خود حالت موکوسی نشان می‌دادند و اووسیت‌هایی که پراکندگی از خود نشان نداده بودند چنین رفتاری نداشتند. اووسیت‌هایی که سلول‌های کومولوس اطراف آن‌ها پراکنده شده بودند ملاک ارزیابی برای پراکندگی، قرار داده شد بدین منظور اووسیت‌ها از لحاظ پراکندگی سلول‌های کومولوس به ۳دسته بدون پراکندگی سلول‌هی کومولوس، پراکندگی جزئی سلول‌های کومولوس و پراکندگی کامل سلولهای کومولوس تقسیم شدند.

نحوه‌ی انجام آزمایش

جهت مطالعه اثر افزودن روسکویتین بر اووسیت‌های نابالغ گوسفند در یک کشت ۵ تیمار روسکویتین شامل دوزهای صفر، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ مورد استفاده قرار می‌گیرد (Macedo et al., 2006). بدین منظور از کشتارگاه تخمدان‌ها با ترموفلاسک در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شده و فولیکول‌های بین ۴-۱ میلی‌متری توسط دستگاه مکنده1 با سوزن در اندازه g۲۰ آسپیره2 شدند. اووسیت‌های جمع‌آوری شده در زیر میکروسکوپ از لحاظ یک‌نواختی سیتوپلاسم و کیفیت لایه کومولوس اووفوروس مورد ارزیابی قرار

۱- Linker Proteins

[1] suction

[2] oocyte aspiration

می‌گیرند. سپس اووسیت‌های با کیفیت مناسب در ۵ قسمت مساوی تقسیم و در محیط کشت استاندارد TCM 199 برای بلوغ اووسیت قرار داده می‌شوند (زارع‌شحنه و همکاران ۱۳۸۶). لازم به ذکر است آب مورد نیاز محیط کشت از Milli-Q استفاده شد.پس از آن تیمار ROS به اووسیت‌های موجود در محیط اضافه شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد در هوای ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۲۰٪ اکسیژن و حداکثر رطوبت هوا انکوبه گردید (Macedo et al., 2006). در مرحله دوم با استفاده از لوپ میزان پراکندگی سلول‌های کومولوس ارزیابی شد.

نتایج و بحث

نتایج پراکندگی سلول‌های کومولوس

اووسیت نابالغ و دارای حداقل سه لایه‌ی فشرده سلول کومولوس، به گروه‌های شاهد، رقیق کننده و تیمارها، اختصاص یافت. پس از ۲۴ ساعت کشت، سلول‌های کومولوس در بیش از ۸۰ درصد اووسیت‌ها، پراکندگی کامل نشان داد اما تفاوت معنی‌داری بین تیمارها و بین گروه کنترل و گروه رقیق کننده وجود نداشت میزان پراکندگی کومولوس بر ۳ معیار بدون اکسپندشن، اکسپندشن جزئی و اکسپندشن کامل بررسی شد قابل ذکر است پس از برداشتن اثر مهاری و کشت برای ۲۴ ساعت دیگر نیز تفاوت معنی داری بین تیمارها وجود نداشت(جدول*).

بحث

برای تولید جنین که برای تولید کلون‌ها، حیوانات تراریخت، جنین‌های تعیین جنسیت شده و تشخیص نقص‌های ژنتیکی اولیه حاصل می-شود باید از این دو مرحله مهم عبور کرد. تحقیقاتی که در زمینه روش‌های آزمایشگاهی برای بلوغ اووسیت، ظرفیت‌دار کردن اسپرم و باروری آزمایشگاهی انجام می‌شود روش به نسبت مطمئنی برای رسیدن به مراحل بعدی است. در این روش‌ها برای به دست آوردن گامت حتی می‌توان از حیواناتی که مدت‌ها از زمان مرگشان گذشته است، استفاده کرد و تکنیک IVF باعث تامین تعداد زیادی جنین از حیوانات ارزشمند را فراهم می‌کند و روشی ارزانتر نسبت به سوپراوولاسیون و تکنیک‌های دستکاری تولید مثلی است (Wani et al., 2002). تاثیر رسکویتین در این آزمایش به عنوان یک معیار و پیش بینی جهت میزان بلوغ اووسیت‌ها در نظر گرفته شد در این آزمایش همچنان که در جدول فوق قابل ملاحظه است رسکویتین نتوانست در هیچ یک از دوزهای استفاده شده باعث محدودیت اکسپند شدن سلول‌های کومولوس گردد همین‌طور رسکویتین در هیچ‌یک از تیمارها نتوانست نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری پیدا کند ($P > ۰/۰۵$).

منابع

۱. زارع‌شحنه، احمد.، شورنگ، پروین.، صادقی، علی اصغر.، ۱۳۸۶. بیوتکنولوژی در علوم دامی (تألیف). انتشارات آییژ. چاپ اول.

2.Gordon I. laboratory production of cattle embryos. 2nd edition. CAB International publishing, Wallingford, 2003; 127pp

3. Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Urdaneta A, Anguita B, Paramio MT, 2006. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. Theriogenology 65: 1769-1782.
4. Marques, MG, Nicacio AC, De Oliviera VP, Nascimento AB, Caetano HVA, Mendes CM, Mello MRB, Milazzotto MP, Assumpcao MEOD, Visintin JA, 2007. In vitro maturation of pig oocyte with different media, hormone and meiosis inhibitors. Animal Reproduction Science 97: 375-381.
5. Meijer L, Kim SH, 1997. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. Methods Enzymol 283: 113-28.
6. Wani, N.A., 2002. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. Small Rumin. Res. 44: 89-95
7.www.alomone.com/p_postcards/database/367.htm - 8k - Similar pages Roscovitine is an olomoucine-related purine flavopiridol, and is a highly potent inhibitor for the kinase activity of CDK1, CDK2, CDK5, and CDK7.

جدول ۱: میزان پراکندگی سلول‌های کومولوس در اووسیت‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف روسکویتین در مقایسه با گروه کنترل و رقیق کننده پس از ۲۴ ساعت کشت

گروه‌ها	تعداد اووسیت های نابالغ	دوز مصرفی روسکویتین (µM)	بدون پراکندگی تعداد(٪)	پراکندگی جزئی تعداد(٪)	پراکندگی کامل تعداد(٪)
کنترل	۱۰۴	۰	۶(۵/۵۹±۰/۳۳)a	۱۶(۷/۴۱±۰/۱۹)a	۸۲(۸۷±۰/۱۶)a
تیمار۱	۱۰۸	۶/۲۵	۵(۴/۸±۰/۳۲)a	۹(۸/۶۵±۰/۲)a	۹۴(۸۶/۵۴±۰/۱۵)a
تیمار۲	۱۲۶	۱۲/۵	۷(۵/۵۵±۰/۳۳)a	۱۰(۷/۴±۰/۲۱)a	۱۰۹(۸۷/۰۳±۰/۱۳)a
تیمار۳	۱۱۶	۲۵	۹(۷/۹۷±۰/۲۹)a	۱۳(۱۱/۱۱±۰/۱۸)a	۹۴(۸۰/۹۵±۰/۱۵)a
تیمار۴	۱۰۹	۵۰	۸(۶/۹±۰/۳۵)a	۱۰(۹/۴۸±۰/۲۳)a	۹۱(۸۳/۶۲±۰/۱۴)a

معنی‌دار در سطح ۵ درصد (α=۰/۰۵). حروف مشابه در ستون عدم معنی‌داری را نشان می‌دهد.

نتایج به صورت **means±S.E** در داخل پرانتز گزارش شده است.

اعداد درج شده تا دو رقم اعشار تصحیح شده است.

Abstract

In this trial, effect of different concentration of Roscovitine (6.25, 12.5, 25 and 50 µM) (as an inhibitor on cellular circle in mammalian) evaluated on cumulus expansion rate in ovine oocyte. Results indicated threatment 1 (5.59, 7.41, 87) treatment 2 (5.55, 7.4, 87.03), treatment 3 (7.79, 11.11, 80.95), treatment 4 (6.9, 9.48, 83.62) and control (5.59, 7.41, 87) and oocyte numbers were 104, 108, 126, 116 and 109 respectively. Its seem that Roscovitine has not been able to have significant effect on cumulus expansion rate than control in ovine.

Key words: ovine oocyte, Roscovitine, cumulus expansion

eCGارزیابی عملکرد تولیدمثلی میش در همزمانی فحلی با استفاده از نورجستومت، اسفنج و سیدر به‌همراه دوزهای مختلف هورمون

صادق چراغی‌سرای* [۱]، فرهاد فرخی[۲]، افسون قدرتی[۳]، محمد فرهادیان[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی دانشگاه تبریز ۲و۳- بترتیب عضو هیئت علمی و دانشجویان کارشناسی‌ارشد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه
* نویسنده مسئول: صادق چراغی‌سرای(s_cheraghi89@yahoo.com)

چکیده

به منظور مقایسه اثر سه روش همزمانی فحلی در گوسفند در فصل تولید مثل (اواخر شهریور) با استفاده از نورجستومت، اسفنج و سیدر به همراه دوزهای مختلف هورمون eCG آزمایشی صورت گرفت که طی آن ۷۲ راس میش نژاد قزل با شرایط سنی ۲ تا ۵ سال به طور تصادفی و با میانگین وزنی ۶±۵۴ کیلوگرم به سه گروه تقسیم شدند که به منظور انجام سه آزمایش، در هر مورد ۲۴ راس میش به چهار دسته ۶ راسی تقسیم شدند. برای همزمانی فحلی میش‌ها، تیمارهای پروژسترون (سیدر، نورجستومت واسفنج)به مدت ۱۴ روز اعمال گردیدند. در هنگام خروج هر یک از تیمارهای پروژسترونی به گروه اول صفر میلی‌لیتر سرم نمکی، گروه دوم ۲۰۰، گروه سوم ۳۰۰ و گروه چهارم ۴۰۰ واحد بین المللی eCG تزریق شد. بعد از گذشت ۵۲ ساعت از تزریق هورمون eCG، ۵ راس قوچ وارد گله کردیم. نتایج حاصل در هر سه آزمایش نشان داد که در همزمان‌سازی فحلی سه گروه آزمایشی تفاوت معنی‌داری نداشتند و نرخ دوقلوزائی در میش‌های تیمار شده توسط نورجستومت، اسفنج و سیدر اختلاف معنی داری ندارند (p<0/05). میانگین نرخ دوقلوزایی در کل گله تحت‌تیمار با پروژسترون و eCG در مقایسه با نرخ دوقلوزایی متعارف بالاتر می باشد (p<0/05). همچنین میزان چندقلوزایی، نرخ دوقلوزایی و نرخ بره زایی در گروههایی که ۴۰۰ واحد eCG دریافت کرده بودند نسبت به بقیه گروه‌ها بالاتر بود (p<0/05).

واژگان کلیدی: همزمان سازی فحلی، نورجستومت، سیدر، اسفنج، عملکرد تولید مثلی، eCG

مقدمه

استفاده از گنادوتروپین‌ها همراه با تیمارهای پروژسترونی ایجادکننده همزمانی‌فحلی در میش‌ها و بزهای ماده که درمرحله جسم‌زرد یا فولیکولی چرخه فحلی صورت می‌گیرد برای تحریک تخمک‌ریزی لازم می‌باشد. معمول‌ترین فرآورده‌ای که مورد استفاده قرار می‌گیرد PMSG یا eCG می‌باشد (آرمسترانگ و همکاران، ۱۹۸۳). eCG به عنوان جایگزین FSH عمل کرده و باعث افزایش تعداد تخمک‌گذاری در نشخوارکنندگان می‌گردد .به‌منظور همزمان‌سازی فحلی روش‌هایی را می‌توان بکار برد که موجب طولانی کردن فاز لوتئال توسط استروژن با منشاءخارجی یا کوتاه کردن این فاز با تحلیل پیش از موقع جسم زرد موجود گردد و معمولا در پایان همزمان‌سازی فحلی eCG تزریق می‌شود (قودفرو و همکاران، ۱۹۹۷)و(سیمونتی و همکاران، ۲۰۰۲). البته فاکتورهایی مانند دوز پروژسترون، شیوه تزریق، فصل مورد استفاده، عوامل مدیریتی و استفاده مکرر از این هورمون در پاسخ‌گویی آن اثر دارند. (سفرانسکی

و همکاران، ۱۹۹۲). هدف از این تحقیق بررسی سه روش همزمانی فحلی با استفاده از نورجستومت، اسفنج و سیدر در فصل تولیدمثل و تعیین بهترین دوز eCG جهت ایجاد سوپراولاسیون و ایجاد چندقلوزایی در گوسفند قزل بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۷۲ راس میش از نژاد قزل با شرایط سنی ۲تا ۵ سال و میانگین وزنی ۶±۵۴ کیلوگرم که تحت شرایط تغذیه‌ای مطلوب و در جایگاه بسته نگه‌داری می‌شدند در فصل جفت‌گیری انتخاب و با تعیین حدود وزن و سن میش‌ها آنها را به‌طور تصادفی به سه گروه تقسیم کردیم تا میش‌ها با سنین و اوزان مختلف به‌طور یکنواخت بین این سه گروه قرار بگیرند. درگروه اول تعداد ۲۴ راس میش بطور تصادفی به ۴ دسته ۶ راسی تقسیم شدند. در میش‌های گروه اول ۱/۵ میلی‌گرم نورجستومت در زیر جلد خارجی ناحیه گوش میش‌ها به مدت ۱۴ روز کاشته شد. درهنگام خروج نورجستومت به تمام میش‌ها به صورت عضلانی eCG تزریق شد. به دسته اول صفر میلی‌لیتر سرم نمکی، به دسته دوم ۲۰۰، دسته سوم ۳۰۰ و به دسته چهارم ۴۰۰ واحد بین المللی eCG تزریق شد. در میش‌های گروه دوم از سیدر حاوی ۰/۳ گرم پروژسترون و در میش‌های گروه سوم اسفنج واژینال آغشته به پروژسترون سنتتیک (۰/۴گرم فلوجستون استات) استفاده شد. در گروه‌های دوم و سوم نیز بعد از خارج کردن سیدر و اسفنج بقیه مراحل مانند آزمایش اول بود. ۵۲ ساعت پس از خروج تیمارهای پروژسترونی و تزریق eCG، ۵ راس قوچ وارد گله شدند. از لحظه ورود قوچ‌ها به گله تا ۷۲ ساعت بعد از آن جهت ثبت زمان بروز فحلی و جفت‌گیری، گله تحت نظر بود. نرخ دوقلوزایی، نرخ چندقلوزایی، نرخ بره‌زایی و بازدهی زایمان در هر گروه محاسبه شدند. داده‌ها با استفاده از مدل یک‌طرفه و دوطرفه آزمون کای‌اسکور در سطح احتمال ۵درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

تمامی میش‌هایی که در آزمایش اول و دوم که علاوه بر نورجستومت، اسفنج و سیدر از eCG استفاده کرده بودند بین ۴۰-۲۴ ساعت(جدول۱) پس از خروج نورجستومت، سیدر واسفنج فحل شدند که در مقایسه با دسته‌هایی که eCG دریافت نکرده بودند تفاوت معنی‌داری داشتند($p<0/05$). اما اختلاف معنی‌داری در مقایسه میانگین زمان فحلی، بین دسته‌های دوم، سوم و چهارم مشاهده نشد (جدول ۱). نتایج حاصله نشان داد که در فاصله زمانی ۴۰-۲۴ ساعت پس از برداشت نورجستومت، سیدر و اسفنج علائم فحلی به ترتیب ۷۹، ۸۳و ۷۹ درصد دامها مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری نداشتند.در (جدول ۲) نرخ دوقلوزایی، چندقلوزایی و نرخ بره‌زایی در سه گروهی که ۴۰۰ واحد eCG دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p<0/05$). میانگین نرخ دوقلوزایی در کل گله تحت تیمار با پروژسترون و eCG در مقایسه با نرخ دوقلوزایی متعارف بالاتر می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که برای القاء وهمزمان‌سازی فحلی بین دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰و ۴۰۰ واحد بین المللی از eCG اختلاف معنی‌داری وجودندارد ولی بهترین دوزeCG برای بهبود عملکرد تولیدمثلی وایجاد دوقلوزایی ۴۰۰ واحد است و همچنین بین همزمان‌سازی فحلی با نورجستومت، اسفنج و سیدر اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p<0/05$).

منابع

1- Armstrong, D. T., Pfitzner, A. P., Warnes, G. M., Raph, M. M., & Seamark, R. F. 1983. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. J. Reprod. Fertil. 67:395-401.
2- Godfery, R. R., M. L. Gary, and J. R. Collins .1997. A comparison of two methods of estrous synchronization of hair sheep in the tropics. Anim. Reprod. Sci., 47: 99 – 106.
3- Safranski, T. J., W. R. Lamberson, and D. H. Keisler. 1992. Use of melengestrol acetate and gonadotropins to induce fertile estrus in seasonally anestrous ewes. J. Anim. Sci. 70:2935-2941
4- Simonetti, L., G. Ramos, and J. C. Gardon .2002. Effect of estrus synchronization and artificial insemination on reproductive performance of Merino sheep. Braz. J.Vet.Res.Anim.Sci. 9(3):143-146.

جدول ۱- میانگین همزمان سازی فحلی به وسیله نورجستومت، اسفنج و سیدر

گروه	۴۰- ۲۴ (ساعت) تعداد راس میش	۵۶-۴۰ (ساعت) تعداد راس میش	۷۲-۵۶ (ساعت) تعداد راس میش	درصد میانگین مدت فحلی(ساعت)
نورجستومت + ۰eCG	۱	۴	۱	۴۹*
نورجستومت + ۲۰۰ eCG	۶	–	–	۳۲[a]
نورجستومت + ۳۰۰ eCG	۶	–	–	۳۴[a]
نورجستومت + ۴۰۰ eCG	۶	–	–	۳۱[a]
اسفنج + ۰ eCG	۱	۲	۳	۶۱*
اسفنج + ۲۰۰ eCG	۶	–	–	۳۷[a]
اسفنج + ۳۰۰ eCG	۶	–	–	۳۴[a]
اسفنج + ۴۰۰ eCG	۶	–	–	۳۵[a]
سیدر+ ۰ eCG	۲	۳	۱	۵۴*
سیدر+ ۲۰۰ eCG	۶	–	–	۳۸[a]
سیدر+ ۳۰۰ eCG	۶	–	–	۳۵[a]
سیدر+ ۴۰۰ eCG	۶	–	–	۳۶[a]

میانگین‌هایی که حروف غیر مشابه دارند، دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند($p<0.05$) .(*= معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد)

جدول ۲- ارزیابی عملکرد تولیدمثلی حاصل از درمان نورجستومت، اسفنج و سیدر با دوزهای مختلفeCG

گروه	میش جفتگیری کرده	تعدادزایمان	درصد زایمان	درصد چند قلوزایی	درصد دوقلوزایی	درصد بره زایی
نورجستومت + ۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۰^{a}	۱۰۰^{a}
نورجستومت + ۲۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۰^{a}	۱۰۰^{a}
نورجستومت + ۳۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۰^{a}	۱۰۰^{a}
نورجستومت + ۴۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۴۰*	۳۲*	۱۴۰*
اسفنج + ۰ eCG	۶	۵	۸۳^{a}	۸۳^{a}	۰^{a}	۸۳^{a}
اسفنج + ۲۰۰ eCG	۶	۵	۸۳	۸۳^{a}	۰^{a}	۸۳^{a}
اسفنج + ۳۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۰۰	۰^{a}	۱۰۰^{a}
اسفنج + ۴۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰*	۱۲۴*	۲۲*	۱۲۴*
سیدر+ ۰ eCG	۶	۵	۸۳^{a}	۸۳^{a}	۰^{a}	۸۳^{a}
سیدر+ ۲۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۰^{a}	۱۰۰^{a}
سیدر+ ۳۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰^{a}	۱۰۰^{a}	۰^{a}	۱۰۰^{a}
سیدر+ ۴۰۰ eCG	۶	۶	۱۰۰*	۱۳۰*	۲۷*	۱۳۰*

میانگین‌هایی که حروف غیر مشابه دارند، دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند($p<0/05$).(*= معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد)

The evaluation of breeding operation of ewe in estrus synchronization by using norgestomet, spong & CIDR with different doses of eCG

Sadeq cheraghi saray[1*], farhad farokhi[2] , afsun ghodrati[3] , mohamad farhadian[3]

*** Corresponding E-mail address: s_cheraghi89@yahoo.com**

Abstract

An experiment was perrfomed to compare the effect of 3ways for estrus synchronization in sheep in breeding season by using norgestomet ,sponge and CIDR with different eCG doses, during which 72 head kizil ewes at the age of 2-5 and in the average weight of 54±6 kilogram were devided into 3 groups randomly. Each group has 24 heads devided into 4 groups of 6. It was performed for 14 days. We entered 0IU of eCG to group 1, 200 to group 2, 300 to group3 and 400 to group4. 52 hours after injecting eCG we entered 5head gooch to the herd. The results showed that the 3groups had no prominent difference. The proficacy rate in ewes under progesterone treatment had no meaningful difference as well.

Keywords: estrus synchronization, norgestomet, CIDR, sponge, breeding operation, eCG

تاثیر پروستاگلاندین F2α بر خصوصیات کمی و کیفی منی ۴ نژاد قوچ دورگ

علی الفتی چغاگلانی[۱]، غلامعلی مقدم[۲]، محمد مصطفی پورسیف[۳]، بهزاد حبیبی[۴]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۲-عضو هئیت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳-دانشجوی کارشناسی ارشد، فیزیولوژی دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ۴-دانشجوی کارشناسی، علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

گسترش تکنیک تلقیح مصنوعی در مراکز تحقیقاتی وپرورشی به ویژه درگوسفند با چالش های زیادی مواجه است. یکی ازاین مشکلات، حجم کم انزال و به دنبال آن غلظت بسیار بالای اسپرم قوچ در مقایسه با سایرگونه های اهلی است که این کمی حجم انزال می تواند تولید دوزهای متعدد اسپرم برای تلقیح و نیز استفاده ی بیشتر از نژاد های با پتانسیل ژنتیکی بالارا محدود کند. در مطالعات مختلف PGF2α موجود در مایع منی و افزودن مکمل خارجی آن بر روی صفات منی بررسی شده است اما تزریق عضلانی و میزان تاثیر گذاری آن بر روی ویژگی های اسپرم تاکنون در ایران بررسی نشده است. هدف ما در این مطالعه بررسی میزان تاثیرهورمون PGF2α تزریقی بر روی صفات کمی وکیفی اسپرم قوچ های دورگ بود.

بررسی منابع

هر چند که سمینال پلاسما سرشار از پروستاگلاندین می باشد، اما به نقش این هورمون بر فیزیولوژی تولید مثل توجه کمی شده است[۶].مطالعات قبلی نقش پروستاگلاندین را بر عملکرد طبیعی بیضه ثابت کرده اند[۲] و همچنین تاثیر مثبت آن نیز بر عملکرد غدد ضمیمه جنسی گزارش شده است[۴].در مطالعات مختلف تاثیر PGF2α بر روی درصد زنده مانی، یکپارچگی غشای اسپرم و نیز قابلیت انجماد منی گونه های مختلف بررسی شده است[۵].افزودن PGF2α به منی قوچ و خوک و تلقیح این نمونه ها به دام های ماده، باعث افزایش نرخ باروری در آنها شده است[۴، ۵].در مطالعه دیگر وقتی PGF2α به منی گاو افزوده شد، کاهش معنی داری در تحرک منی پس از یخ گشایی مشاهده شد و برای تلقیح گاوهای ماده مناسب نبود[۱]. افزودنPGF2αقبل از منجمدسازی منی، تاثیری بر تحرک اسپرماتوزوا نداشت، باعث بهبود لقاح های بعدی در میش شد، در مقابل افزودن PGF2α به منی گاو در طی منجمدسازی، باعث کاهش تحرک اسپرماتوزوا بعد از یخ گشایی شد[۱، ۳].

مواد و روش ها

در تیر ماه سال جاری در هر هفته دو بار از ۱۵ قوچ بارور دورگ(بلوچی-مغانی، قزل-بلوچی، آرخامرینو-قزل، آرخامرینو-مغانی) با سنین۳ تا ۵ ساله اسپرم گیری انجام گرفت.نحوه ی اجرای تیمار بر روی مواد آزمایشی بدین صورت بود که، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق عضلانی ۰/۵ml پروستاگلاندین F2α از هر قوچ اسپرم گیری صورت گرفته ونمونه ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و از نظر صفات کمی و

کیفی ارزیابی شدند. صفات اسپرم گروه شاهد نیز ۲ روز بعد از تزریق بررسی شدند. حجم منی بوسیله ی لوله اسپرم گیری مدرج با دقت ml۰/۱ ثبت شد. غلظت اسپرم توسط لام توما تعیین شد و برای رقیق کردن نمونه ی خام از سیترات سدیم دی هیدراته ۲/۹٪ (۱ به ۲۰۰) استفاده گردید. تحرک موجی اسپرم تحت بزرگنمایی ×۱۰ از ۱ تا ۵ نمره دهی شد. درصد تحرک پیشرونده اسپرم بعد از رقیق کردن نمونه ی خام (۱ به ۲۰۰) با سیترات سدیم دی هیدراته ۲/۹٪ و بوسیله ی لام قطره ی معلق (C°۳۷) و با عدسی × ۴۰ چند زمینه از لام بررسی شد(این روش برای اولین بار اجرا شده و سبب وضوح بیشتر اسپرماتوزوا ها زیر میکروسکوپ می شود). برای ارزیابی درصد اسپرم زنده و مرده و درصد اسپرم ناهنجار از رنگ آمیزی ائوزین استفاده شده و با عدسی × ۴۰ تعداد ۳۰۰ اسپرماتوزوا برای درصد زنده و ۲۰۰ اسپرم برای درصد ناهنجاری شکل شمارش گردید. میزان فعالیت متابولیکی اسپرم(MBR-T) بوسیله رنگ متیلن بلو بر حسب مدت زمان(ثانیه) تغییر رنگ نمونه ی خام بعد از ترکیب ۱ به ۱ منی تازه و رنگ محاسبه گردید. داده ها بوسیله ی نرم افزار SAS version9.1 آنالیز شدند.

نتایج و بحث

در نژاد بلوچی–مغانی در مورد صفات کمی تفاوت معنی داری بین تیمار و گروه کنترل مشاهده نشد، اما در صفات کیفی درصد اسپرم ناهنجار بعد از تزریق PGF2α ۵/۴۵ درصد کاهش پیدا کرد(P=۰/۰۲۶۶).صفات تحرک موجی(P=۰/۰۱۴۷) وتحرک پیشرونده(P=۰/۰۳۵) نیز بعد از تزریق افزایش یافت. در نژاد های آرخامرینو–مغانی، آرخامرینو–قزل و قزل–بلوچی بین گروه کنترل و تیمار در مورد صفات کیفی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در نژاد آرخامرینو–قزل بین گروه کنترل و تیمار در مورد صفات کمی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در دو نژاد قزل–بلوچی و آرخامرینو–مغانی بعد از تزریق ml۰,۵ پروستاگلاندین F2α حجم انزال به طور معنی داری افزایش پیدا کرد(به ترتیب P=۰/۰۰۲۱ ، P=۰/۰۲۴).در مورد همبستگی بین تزریق پروستاگلاندین و صفات اسپرم، فقط بین حجم انزال و تزریق همبستگی دیده شد(P=۰/۰۱۵، r = ۰/۲۵۳). در مطالعه ای که توسط مکونن و همکاران(۱۹۸۹) بر روی بوفالو، اسب، گاو و گوسفند صورت گرفت تزریق پروستاگلاندین باعث افزایش حجم انزال و تعداد کل اسپرم به ازای هر انزال شد(۷).

منابع

1. Abbitt, B., G.E. Seidel, Jr., and W.E. Berndtson., 1977. Effect of tris (hydroxymethyl) aminomethane salt of prostaglandin F2α on post-thaw motility of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci. 60:1991-1993.
2. Ellis, LC, Groesbeck MD, Farr CH, Tesi, R.J., 1981. Contractility of seminiferous tubules as related of sperm transport in the male. Arch Androl. 6:283-294.
3. Gustafsson, B., S. Edqvist, and S. Einarsson., 1975. The fertility of deep-frozen ram semensupplemented with PGF2α. Acta Vet. Scand. 16:468-470.
4. Hawkins, D. F. and A. H. Labrum., 1956. Functions of the prostate. Brit. Med. J. 2:1236.
5. Horvat, G., and G. Bilkei., 2003. Exogenous prostaglandin F2α at time of ovulation improves reproductive efficiency in repeat breeder sows. Theriogenology. 59:1479-1484.

6. Mekonnen, G., Boland, M. and Gordon, I. 1989. Effect of prostaglandin on semen production and libido in the ram. Irish Veterinary Journal 42: 56-59
7. Thomas Pento, J., Richard, J., Cenedella and E. K. Inskeep., 1970. Effects of Prostaglandins E_1 and $F_1\alpha$ upon Carbohydrate Metabolism of Ejaculated and Epididymal Ram Spermatozoa In Vitro. J. Anim. Sci. 30:409-411.

جدول-۱.تفاوت بین تیمارکنترل و تزریق دوز PGF2α ۰,۵ml بر روی صفات کمی اسپرم.

ترکیب ژنتیکی	تیمار	حجم انزال	غلظت اسپرم	تعداد کل اسپرم/ انزال
بلوچی-مغانی	کنترل	۰,۷۵±۰,۰۸	۴,۵۱۵±۰,۳۹	۳,۲۹±۰,۴۵
	۰,۵	۰,۶۸±۰,۰۸	۴,۵۷۵±۰,۳۹	۲,۹۴±۰,۴۵
قزل- بلوچی	کنترل	۱,۱۸±۰,۰۷[a]	۴,۰۱±۰,۳۴[a]	۴,۶۳±۰,۳۹
	۰,۵	۱,۵۱±۰,۰۷[b]	۲,۹۱±۰,۳۴[b]	۴,۱۴±۰,۳۹
آرخامرینو-قزل	کنترل	۰,۷۷±۰,۰۷	۳,۶۳±۰,۳۴	۲,۷۳±۰,۳۹
	۰,۵	۰,۹۵±۰,۰۷	۳,۶±۰,۳۴	۳,۵۶±۰,۳۹
آرخامرینو-مغانی	کنترل	۰,۶۸±۰,۰۷[b]	۳,۱۸±۰,۳۴	۲,۰۸±۰,۳۹[b]
	۰,۵	۰,۹۳±۰,۰۷[a]	۳,۶۲±۰,۳۴	۳,۴۵±۰,۳۹[a]

جدول-۲.تفاوت بین گروه کنترل و تزریق دوز PGF2α ۰,۵ml بر روی صفات کیفی اسپرم.

ترکیب ژنتیکی	تیمار	اسپرم زنده(٪)	اسپرم ناهنجار(٪)	حرکت پیش رونده(٪)	حرکت موجی	نرخ فعالیت متابولیکی(ثانیه)
بلوچی-مغانی	کنترل	۶۶,۱۶±۲,۷۹	۱۵,۲۲±۱,۷[a]	۶۰,۸۳±۳,۲۹[b]	۳,۹۱±۰,۱۹[b]	۱۱۲,۵±۱۰,۵۱[a]
	۰,۵	۷۴,۵±۳,۲۲	۹,۷۷±۱,۷[b]	۷۰,۸۳±۳,۲۹[a]	۴,۵۸±۰,۱۹[a]	۹۱,۱۶±۱۰,۵۱[a]
قزل- بلوچی	کنترل	۶۴,۲۵±۲,۷۹	۱۴,۸۳±۱,۴۷	۶۱,۲۵±۲,۸۵	۴,۰۶±۰,۱۶	۱۲۱,۵±۹,۱۱
	۰,۵	۶۷±۲,۷۹	۱۳,۴۱±۱,۴۷	۶۴,۳۷±۲,۸۵	۳,۹۳±۰,۱۶	۱۴۱±۹,۱۱
آرخامرینو-قزل	کنترل	۷۱±۲,۷۹	۱۱,۰۸±۱,۴۷	۶۸,۷۵±۲,۸۵	۴,۱۸±۰,۱۶	۱۱۱,۵±۹,۱۱
	۰,۵	۷۲,۱۲±۲,۷۹	۱۱,۰۸±۱,۴۷	۷۰,۶۵±۲,۸۵	۴,۱۸±۰,۱۶	۱۱۸,۵±۹,۱۱
آرخامرینو-مغانی	کنترل	۷۰,۵±۲,۷۹	۱۱,۶۶±۱,۴۷	۶۷,۵±۲,۸۵	۳,۷۸±۰,۱۶	۱۲۷,۸±۹,۱۱
	۰,۵	۶۵,۶۲±۲,۷۹	۱۴,۱±۱,۴۷	۶۳,۷۵±۲,۸۵	۴±۰,۱۶	۱۲۱,۳±۹,۱۱

Influence of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on sperm characteristics of the Persian cross breed rams

Abstract

sperm were collected from fifteen mature rams of crossbred using artificial vagina, four crossbred rams, consist of Merino×Ghezel, Ghezel×Balochi, Baloch×Moghani, Merino×Moghani, 30 minute after muscular injection of prostaglandin (EstroPLAN), Immediately, the ejaculates were immersed in a warm water bath at (37°C) until assessment. Administration of prostaglandin injection increased semen volume and observed only correlation between semen volume and prostaglandin injection(r= 0.253 , P= 0.015).

بررسی اثر هم کشتی سلولهای اسپرماتوگونی نابالغ گاوی با فیدر های سرتولی و STO

زهرا نصیری[۱]، سید مرتضی حسینی[۱]، مهدی حاجیان[۱]، محمد حسین نصراصفهانی [۱،۲]*

۱-پژوهشگاه رویان ، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلول جنسی، اصفهان، ایران.

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده علوم تولید مثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، جهاددانشگاهی، گروه جنین شناسی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: پژوهشگاه رویان ، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، جهاددانشگاهی، گروه زیست شناسی سلول جنسی، اصفهان، ایران
، صندوق پستی 8433-815896، تلفن: ;3-2612900 311 98، نمابر; 2602555 311 98.
Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

چکیده:

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه تاثیر فیدرهای مختلف سلولی بر کشت کوتاه مدت سلولهای نابالغ اسپرماتوگونی گاوی می باشد. سلولهای سوسپانسیون جدا شده که شامل سلولهای اسپرماتوگونی نیز می باشد به منظور خالص سازی بر روی دیشهای پوشش داده شده با BSA کشت داده و تحت تیمار فاکتورهای رشد (GDNF, EGF and bFGF) کشت داده و پس از پدیدار شدن کلونها در ۷ روز پس از کشت، بر روی ۲ فیدر سرتولی و STO کشت داده و مساحت کلونیها در ۱۱و۱۴ روز پس از کشت بررسی گردید و بیان نشانگرهای اختصاصی اسپرماتوگونی (α6-Integrin, β1-Integrin, DBA) توسط آنالیز ایمونوفلورسنس و بیان کمی ژن Thy-1 با Real time PCR در هر دو گروه بررسی گردید. نتایج نشان می دهد سلولهای اسپرماتوگونی نشانگرهای اختصاصی را بیان نموده و مساحت کلونیها در گروه STO به صورت معناداری از گروه دیگر بالاتر می باشد همچنین میزان بیان ژن Thy-1 نیز در گروه STO در مقایسه با گروه سرتولی و روز ابتداو ۷ روز پس از کشت اولیه افزایش معناداری را نشان می دهد. مقایسه داده ها نشان می دهد که فیدر سلولی STO ممکن است فیدر مناسبی به منظور کشت و گسترش سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی گاوی باشد که موجب افزایش مساحت و بیان ژن اختصاصی سلولهای اسپرماتوگونی می گردد.

واژگان کلیدی: سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی، فیدر STO ، ژن Thy-1

مقدمه :

اسپرم زایی فرآیند تکثیر و تمایز سلول ژرم نر است که از بلوغ آغاز شده و در کل حیات جریان دارد(Ogawa et al ,2001) فرآیند اسپرم زایی با تمایز سلول های بنیادی اسپرماتوگونیا آغاز و با تقسیمات سلولی اسپرماتوگونی، تقسیم میوز اسپرماتوسیت ها و تغییرات مورفولوژیکی در اسپرماتیدها دنبال می شود که نهایتا" منجر به تولید اسپرماتوزا می گردد (van pelt et al, 2002). سلول های بنیادی اسپرماتوگونی منحصر به فرد بوده چون تنها سلول بدن است که با تقسیم خود می تواند ژن ها را به سلول های نسل بعد از خود منتقل نماید در نتیجه منبع ارزشمند جهت آزمایشات بیولوژیکی, تحقیقات پزشکی, تکنولوژی کشاورزی و اصلاح ژنتیکی از طریق دستورزی سلول ژرم نر می باشد. امروزه این سلولها نه تنها کانون توجه محققان جهت تولید نسل های پستانداران تراریخت می باشد، بلکه افق جدیدی را در درمان ناباروری انسان نیز گشوده است. تاکنون تلاشهای زیادی جهت بهبود شرایط محیط کشت به منظور افزایش بقا سلول

ها و تکثیر آنها صورت گرفته است ولی بدلیل عدم آگاهی از نیازهای تغذیه ایی این سلول ها موفقیت چشمگیری مشاهده نشده است، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر لایه مغذی سلولی یا فیدر سرتولی و لاین سلولی (SIM: mouse embryo-derived thioguanine and ouabain resistant) STO می باشد .

مواد و روشها:

سلولهای اسپرماتوگونی از لوله های سمی نیفروس گاو نابالغ (۱-۲ ماهه) طی دو مرحله هضم آنزیمی جدا شدند. (Honaramooz et al,2003, Oatley et al 2004) و به منظور خالص سازی اولیه و حذف سلولهای سوماتیکی به مدت یک ساعت بر روی پتری دیشهای پوشیده شده با BSA (0.5 mg/ml) کشت داده (Herrid et al ,2009) و سلولهای رویی به مدت یک هفته تحت تیمار محیط اختصاصی اسپرماتوگونی DMEM و (GDNF و EGF وbFGF) کشت دا ده شده و پس از پدیدار شدن کلونهای اسپرماتوگونی بر روی فیدر سرتولی گاوی و لایه سلولی STO متوقف شده با میتومایسین کشت داده و کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۷ و ۱۰ پس از کشت از نظر تعداد و مساحت کلونی‌ها و تعداد سلول به ازای هر کلونی مورد ارزیابی قرار گرفت و آنالیز ایمونوسیتوشیمی برای مارکرهای α6-integrin و Thy-1 و β-1integrin و Real time PCR انجام شد.

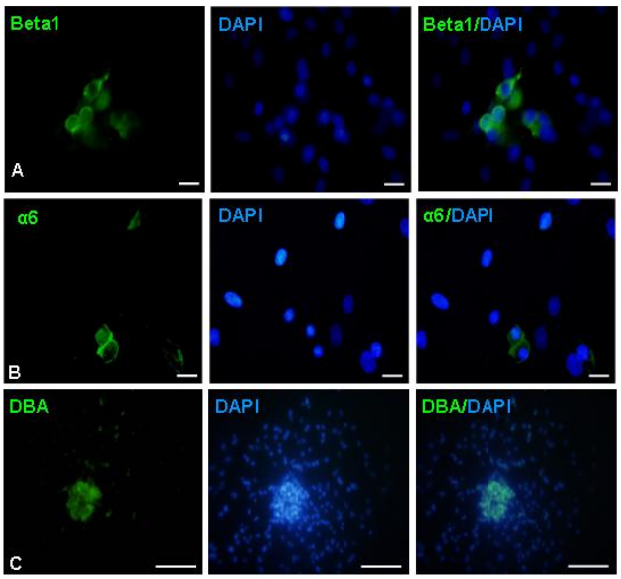
تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SPSS به روش آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA) انجام و برای بررسی تفاوت‌های بین گروه‌های مختلف از روش توکی (TUKEY) استفاده شد. معنی‌داری آن‌ها در سطوح P≤۰.۰۱ p≤0.05 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث:

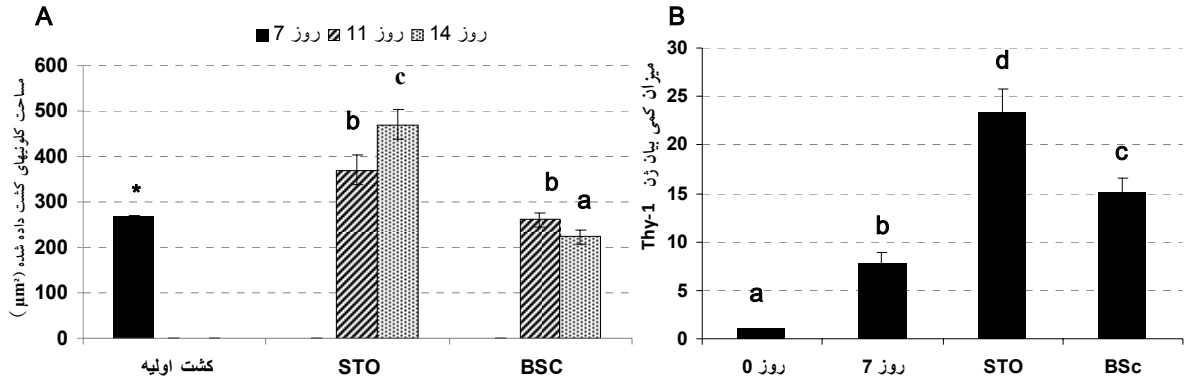
ارزیابی کلونی‌های مشتق شده از سلول‌های اسپرماتوگونی در روزهای ۴ و ۱۱ و ۱۴پس از کشت از نظر تعداد و مساحت کلونی‌ها و تعداد سلول به ازای هر کلونی مورد ارزیابی قرار گرفت، که مدل بکار رفته در آزمایش معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشد و بیانگرآن است که تعداد کلونی‌ها در گروه STO مساحت و تعداد کلونیها از گروه سرتولی با گذشت زمان افزایش می یابد، هم چنین این سلولها مارکهای اختصاصی SSC را بیان نمودند و این نتایج توسط آزمونReal time PCR نیز تایید گردیدو از سوی دیگر مارکر Thy-1 که نشانگر اختصاصی سلولهای اسپرماتوگونی تمایز نیافته می باشد در گروه STO به طور معناداری نسبت به گروه سرتولی افزایش را نشان می دهد(P<۰/۰۵). با توجه به تعداد بسیار کم سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی (۰,۰۳ ٪ سلولهای زایای بیضه)، انتخاب محیط و فاکتورهای رشد درمطالعه حاضربا توجه به اهمیت آن در تحقیات مربوط به کشت سلول‌های اسپرماتوگونی بوده است. شواهد نشان می‌دهد که اکثر فاکتورهای رشد و فیدر های سلولی دارای اثرات طبیعی و حتی کاهنده تعداد سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونی است. افزایش تعداد، احتمالا خودنوسازی را نشان می‌دهد و حالت کاهش تعداد احتمالا نشان‌دهنده مرگ سلول‌های بنیادی و تمایز آن‌ها است(Mclean et al. 2005) ، لذا تحقیق حاضر حاکی از آن است که فیدر سلولی STO در جهت خودنوسازی و حفظ حالت تمایز نیافتگی سلولهای اسپرماتوگونی گاوی نابالغ مفید می باشد. لذا می‌توان این انتظار را داشت که عملکرد سلول‌های SSC بهتر باشد و به منظور مطالعات بعدی به خصوص در زمینه ایجاد جانوران تراریخت ایجاد شرایط مناسب و کشت طولانی مدت سلولهای اسپرماتوگونی دارای اهمیت می باشد.

منابع :

1. Ogawa T. 2001, Spermatogonial transplantation: the principle and possible applications, J. Mol. Med; 79: 368-374.
2. van Pelt AMM. 2002, Establishment of lines with rat spermatogonial stem cell characteristics, Endocrinology 143(5): 1845-1850.
3. Honaramooz A, Behboodi E, Blash S, Megee SO, Dobrinski I, 2003. Germ cell transplantation in goats. Mol Reprod Dev 64:422-8.
4. Oatley JM, Reeves JJ, McLean DJ. 2004, Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. Biol Reprod 71:942-47.
5. Herrid M, Davey RJ, Hutton K, Colditz IG, Hill JR 2009. A comparison of methods for preparing enriched populations of bovine spermatogonia. Reprod Fertil Dev 21:393–99.
6. McLean, D. J. 2005, "Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. Cell Tissue Res 322(1): 21-31.



شکل ۱: آنالیز و میزان بیان نشانگرهای اختصاصی سلولهای بنیادی اسپرماتوگونی گاو در ستون چپ سلولهای منفرد در ۷ روز پس از کشت اسپرماتوگونی با A- (Integrin α6), B (Integrin β1), C (DBA) در ستون وسط هسته سلولها با رنگ DAPI و ستون سمت راست ادغام رنگ آمیزی مشاهده می گردد . (scale bar :500 µm)



نمودار ۲ : A- اندازه گیری مساحت کلونیهای کشت داده شده در روزهای مختلف کشت اولیه (۷روز پس از کشت)و در روزهای ۱۱و ۱۴ روز در گروههای مختلف، که تفاوت معناداری **(P< 0.05).** را نشان می دهد .

B- آنالیز میزان کمی بیان ن **Thy-1** در گروههای مختلف ، حروف کوچک (**a** و **b**) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات بین گروه های مختلف و و علامت ستاره (*) برای نمایش معنی دار بودن مقایسات با گروه کشت شده اولیه (P< 0.05) استفاده شده است.

The effect of co culture of Bovine spermatogonial stem cell with STO and Sertoli cell

Z. Nasiri [1], S. M. Hosseini [1], M. Hajian [1], M. H. Nasr-Esfahani [1, 2, *]

1.Department of Reproduction and Development, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.
2.Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

*** Correspondence to:**
Mohammad Hossein Nasr-Esfahani: Department of Reproduction and Development, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran. P.O. Box: 815896-8433, Esfahan, Iran. Tel: +98 311 2612900-3; Fax: +98 311 2602555
Email: mh.nasr-esfahani@Royaninstitute.org

Abstract
The objective of this study were evaluation and compare the effect of different feeders on in vitro short-term culture of prepubertal bovine spermatogonial stem cells . The isolated cell suspension containing SSCs were enriched by BSA and were cultured in the presence of (GDNF, EGF and bFGF), after 7days colonies were harvested and cultured on two different feeder such as STO, BSC. Area of colonies were measured in 7th, 11th and 14th days after culturing . The expression of SSC markers (α6-Integrin, β1-Integrin, DBA) were detected by immunofluorescence assay and Quantitative Real time PCR in four group at 14 day after culture. Immuno cytochemical staining revealed that SSC colonies were positive for DBA, Integrin- α6, Integrin-β1. In addition the area of colonies those were formed on STO feeder were significantly higher in comparison with those of other group . Relative expression of Thy-1 , revealed in the STO were higher than BSC groups and Day zero and primary culture. Comparing different feeder layer showed that STO might be suitable a feeder layer for propagation of bovine SCC and increase that area of them of prepubertal bovine spermatogonial colonies .

Keywords: Bovine Spermatogonial stem cell, STO, Thy-1

بررسی وضعیت هسته و میکروتوبول در طی فرآیند بلوغ درتخمک‌های گاو، گوسفند و بز

مریم کیانی[۲و۱]، مهدی حاجیان[۲]، سید مرتضی حسینی[۲]،سمیه استاد حسینی[۲]، محسن فروزانفر[۲]، محمد حسین شهیر[۱]، محمد حسین نصر اصفهانی[*۲]

۱-دانشگاه زنجان، گروه علوم دامی ، زنجان ، ایران، ۲-پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات علوم سلولی، جهاد دانشگاهی، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول: محمد حسین نصر اصفهانی[۱]، پژوهشکده زیست فناوری، اصفهان، ایران تلفن: ۳-۰۳۱۱۲۶۱۲۹۰۰. فاکس: ۰۳۱۱۲۶۰۵۵۲۵
Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

چکیده:

اووسیت های پستانداران در طی روند بلوغ میوزی جهت کسب توانایی لقاح و تکامل تکوین،دستخوش تغییراتی در وضعیت هسته و میکروتوبول می شوند.میکروتوبول ها یکی از مهمترین ساختارهای اسکلت سلولی می باشند که در تنظیم حرکات کرومزوم ها در اووسیت پستانداران نقش مهمی ایفا می کنند. در بیشتر پستانداران اووسیت ها در زمان تخمک گذاری در مرحله متافاز تقسیم دوم میوز متوقف شده و تا زمان انجام لقاح و یا اکتیواسیون مصنوعی در این مرحله می مانند. در این مطالعه اثر زمان بر وضعیت هسته و ساختار میکروتوبول در طی فرآیند بلوغ اووسیت بررسی شد و مناسب ترین زمان برای اکتیواسیون پارتنوژنیک اووسیت گاو،گوسفند وبز بدست آمد. اووسیت ها به مدت ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۰ ،۲۲، ۲۴، ۲۶، ۲۸، ۳۰ و ۳۲ ساعت در محیط بلوغ کشت داده شدند. اووسیت‌های بالغ شده فیکس و با استفاده از انتی بادی بتا-توبولین وHoechst جهت بررسی وضعیت میکروتوبول ها و هسته رنگ آمیزی شدند. در این مطالعه مشاهده شد که درصد اووسیت ها یی که در مرحله متافاز میوز یک قرار دارند در مدت ۱۴ تا ۱۸ ساعت پس از بلوغ افزایش یافت،در حالی که ۱۸ تا ۳۲ ساعت بعد از کشت در هر سه گونه کاهش پیدا کرد.درصد اووسیت ها در مرحله متافاز میوزII از ۱۴ تا ۲۰ ساعت (14 hr:7.9,16hr: 19.4,18hr: 27.8 ,2hr :64.9%)، 14-22 (14hr: 19.2, 16hr: 29, 18hr: 59, و 14-22hr(14hr: 24.1, 16hr: 28.1, 18hr: 27.6 hr, 20hr: 74.3, 22hr: 87%) 20hr: 80, 22hr: 88.9%) به ترتیب در بز، گاو و گوسفند افزایش نشان داد.اووسیت ها در ۲۰-۲۲ ساعت بعد از بلوغ تا ساعت ۳۲ کشت در مرحله متافاز میوز دو توقف کردند.نتایج این مطالعه نشان داد که ۲۰ ساعت پس از کشت در بز و ۲۲ساعت پس از کشت در گوسفند وگاو مناسب ترین زمان برای اکتیواسیون اووسیت می باشد، زیرا بالاترین درصد اووسیت ها در این زمان در مرحله متافاز میوز دو قرار دارند.

واژگان کلیدی : میکروتوبول ،هسته ،بلوغ

مقدمه:

بعد از تولد اولین پستاندار شبیه‌سازی شده (گوسفند دالی) با استفاده از تکنیک SCNT شبیه‌سازی بسیاری از گونه‌ها از جمله گوسفند، گاو، موش، بز، خوک، گربه، خرگوش و اسب با استفاده از این روش با موفقیت انجام شده است، با این حال در صد موفقیت در این روش بسیار پایین است به‌طوری که کمتر از یک درصد جنین‌های ساختار مجدد پس از انتقال به رحم حیوانات گیرنده منجر به تولد زنده شده‌اند. این امر باعث شده که در حال حاضر کاربردهای بالقوه SCNT به وسیله کارایی نسبتا پایین آن محدود شود. فاکتورهای متعددی موفقیت یا شکست هر یک از مراحل مختلف SCNT را تحت تاثیر قرار می‌دهند که شامل کیفیتاووسیت گیرنده هسته، رشد و بلوغ اووسیت، روش انجام الحاق سلولی (Fusion) سلول دهنده هسته به اووسیت، روش فعالسازی مصنوعی، روش کشت جنین و ..... است.

فعالسازی مصنوعی یکی از بخش های مهم پروتوکل های شبیه سازی بوده و به عنوان یک ابزار مهم برای بررسی و مقایسه نقش ژنوم های پدری و مادری در تکوین اولیه جنین محسوب می شود،بنابراین تلاش برای بهبود راندمان اکتیواسیون پارتنوژنیک اووسیت ها باعث بهبود توان تکاملی جنین های ساختار مجدد شده و این امر به نوبه خودشانس موفقیت در SCNT را افزایش می دهد.(فروزان فر و همکاران).اگر چه تا کنون پیشرفت های زیادی در زمینه بلوغ آزمایشگاهی اووسیت، لقاح آزمایشگاهی و کشت اووسیت حاصل شده، اما همچنان درصد جنین ها دارای تکوین مناسب حاصل از بلوغ آزمایشگاهی پایین تر از شرایط طبیعی است و کسب آگاهی از تغییرات واقعی در طی روند بلوغ آزمایشگاهی می تواند حائز اهمیت باشد.بلوغ آزمایشگاهی یک فرآیند پیچیده است که در طی آن اووسیت متحمل تغییرات هماهنگی در هسته و سیتوپلاسم می شود تا توانایی لقاح و تکامل تکوین را به دست آورد.در بیشتر پستانداران اووسیت ها در مرحله دیپلوتن پروفاز میوز I تا زمان سرژ گنادوتروپین (هورمون لوتئینه کننده LH) از غده هیپوفیز متوقف می شوند. از نظر مورفولوژیکی از سرگیری میوز با ناپدید شدن غشای هسته اووسیت که مرحله GVBD نام دارد مشخص می شود. از سرگیری اولین تقسیم میوز با تشکیل اولین جسم قطبی مشخص شده و مجددا در مرحله متافاز میوز II متوقف می گردد. در کنترل بلوغ هسته از مرحله Germinal vesicle (GV) به متافاز(IIMII)،دو پروتئین کیناز سیتوپلاسمی MPF (Maturation promoting factor) و MAPK (Mitogen activated protein kinase) نقش مهمی ایفا می کنند. فعالیت هر دو کیناز در مرحله ناپدید شدن وزیکول های زایا(Germinal GVBD: Vesicle Break Down) آغاز شده و روند بلوغ اووسیت در مرحله متافاز II با حداکثر فعالیت هر دو کیناز متوقف می شود که این توقف اووسیت را برای فرایند لقاح آماده می سازد(کمپل و همکاران). یک بلوغ میوزی کامل شامل خروج اولین جسم قطبی و تشکیل دوک میوزی است که این تغییرات همراه با سازماندهی مجدد میکروتوبول ها و میکروفیلامنت ها که از مهم ترین اجزای اسکلت سلولی در اووسیت بوده و چارچوبی برای حرکات کرومزوم ها و تقسیم سلول فراهم می کنند، می باشد.میکروتوبول ها نقش مهمی در حرکت کرومزوم ها، بخش بزرگی از وقایع سلولی از جمله تغییر شکل سلول،نقل و انتقالات درون سلولی،ترشح، تغییر درسیالیت غشا و همچنین ساخت دوک های میوزی دارند، که با پلیمریزه شدن آلفا توبولین و بتا توبولین حاصل می شوند.در مراحل ابتدایی بلوغ اووسیت کروماتین اووسیت تراکم بسیار ضعیفی دارد و میکروتوبول ها و میکروفیلامنت ها در سراسر سیتوپلاسم توزیع شده اند، بعد از مرحله GVBD میکروتوبول ها در اطراف کرومزوم های متراکم، تجمع می یابند، در طی متافاز میوز I میکروتوبول‌ها فقط در دوک میوزی قابل مشاهده بوده و در اطراف کرومزوم ها که به صورت ردیفی قرار دارند، کشیده می شوند، در مرحله آنافاز و متافاز میوز I دوک از موقعیت مرکزی خود دور شده و به تدریج حول محور خود چرخیده و در جدا شدن کرومزوم های همولوگ نقش ایفا می کند و به دنبال آن اولین جسم قطبی تشکیل می شود. در طی متافاز میوز II دوک میوزی ساختاری متقارن یافته و کرومزوم ها در وسط آن ردیف می شوند.این مطالعه به منظور بررسی اثر زمان بر وضعیت هسته و ساختار میکروتوبول در طی فرآیند بلوغ اووسیت انجام شدتا مناسب ترین زمان برای اکتیواسیون پارتنوژنیک اووسیت گاو، گوسفند وبز به دست آید.

مواد و روش ها :

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در مطالعه از شرکت sigma(St. Louis, Mo, USA) و Gibco(Life Technologies, Rockville, MD, USA) خریداری شد.

تهیه اووسیت و بلوغ آزمایشگاهی :در آزمایشگاه کمپلکس اووسیت–سلولهای کومولوس با استفاده از پمپ خلاء از درون فولیکولهای روشن و فاقد خون با قطر mm ۸-۲ در تخمدان های گاو و فولیکول ها با قطر mm ۴-۶ در تخمدان های گوسفند و بز آسپیره می‌شدند. سپس در زیر میکروسکوپ استریو محتویات فولیکولی رقیق شده از لحاظ وجود COC های مناسب بررسی شده و COC های مذکور به محیط بلوغ TCM 199 انتقال داده می‌شدند، سپس در ساعات ۱۴،۱۶،۱۸،۲۰،۲۲،۲۴،۲۶،۲۸،۳۰ و ۳۲ پس از کشت اووسیت ها برهنه و در پارا فرم آلدئید ۴٪ جهت رنگ آمیزی فیکس شدند.

رنگ آمیزی میکروتوبول و هسته :برای ارزیابی وضعیت هسته و میکروتوبول اووسیت های فیکس شده با استفاده از رنگ hoechst و آنتی بادی اولیه بتا توبولین (Antiβtubulin) و آنتی بادی ثانویه (FITC) رنگ آمیزی شدند.

نتایج و بحث

تاثیر مدت زمان های مختلف کشت تخمک بر توزیع مراحل مختلف پیشرفت میوزی در سه گونه حیوانات مزرعه ای:

الف – بز :نتایج نشان داد که با گذر زمان از ۱۴ تا ۳۰ ساعت پس از کشت تخمک های بز، پیشرفت میوزی تا مرحله MII از ۱۸ تا ۲۰ ساعت پس از کشت به میزان معنی داری(۲۷,۸در مقابل ۶۴,۹)، (P□ ۰,۰۵) افزایش می یابد، و تا گذشت ۳۰ ساعت تقریبا در همین حد باقی می ماند. آنالیز توزیع تخمک های واقع در مرحله MIنیز کاهش ناگهانی از ۱۸ تا ۲۰ ساعت پس از کشت (۵۰ در مقابل ۵,۴)را نشان داد که تایید می کند ۲۰ ساعت کشت تخمک می تواند زمان کافی برای حصول درصد مناسب تخمک های بالغ باشد. نمودار ۱ توزیع تخمک های MII را در مدت های مختلف کشت در تخمک های بز نشان می دهد.

ب- گوسفند :مقایسه درصد تخمک های بالغ (MII) در زمان های مختلف کشت آزمایشگاهی، نشان دهنده افزایش معنی داری از ۱۸ تا ۲۰ ساعت پس از کشت (۵۹,۳ در مقابل ۸۰) (P□ ۰,۰۵) بود، توزیع درصد MI نیز کاهش در همین زمان را نشان داد. مقایسه نتایج در گذر زمان نشان داد که ۲۲ ساعت پس از کشت بالاترین درصد تخمک های واقع در مرحله MII بدست آمد و این مدت زمان مناسبترین زمان برای کشت تخمک های گوسفند می باشد.

ج- گاو:آنالیز آماری درصد تخمک های MII در ده رمان مختلف کشت آزمایشگاهی تخمک گاو نیز افزایش معنی داری از ۱۸ تا ۲۰ ساعت کشت (۵۹,۳ در مقابل ۸۰) (P□ ۰,۰۵) نشان داد، با این حال درصد تخمک های بالغ ۲۲ ساعت پس از کشت، به بالاترین میزان خود (۸۷) رسید. به همین ترتیب کاهش معنی دار تخمک های واقع در مرحله MI از ۱۸ به ۲۰ ساعت (۶۵,۵ در مقابل ۲۰) مشاهده شد.

بنابر نتایج مطالعه حاضر ۲۰ ساعت پس از کشت آزمایشگاهی در بز و ۲۲ ساعت پس از کشت در گوسفند و گاو مناسب ترین زمان برای اکتیواسیون اووسیت می باشد.

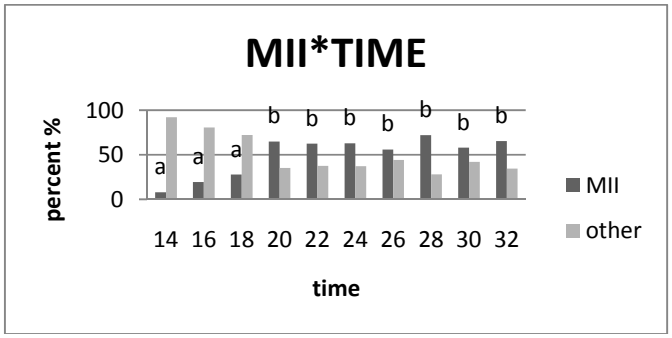
منابع:

1.Frozanfar M., Nasr Esfahani M.H., Ph.D., Rezazadeh M., Ph.D., Molavi F., Hosseini M., Hajian M.(2007.)Efficiency of Ovine Fibroblast or Cumulus Cells for Somatic Cell Nuclear Transfer in Sheep. Journal of Iranian Anatomical Sciences, Vol. 5, No. 19 & 20, Summer & Autumn, Pages: 125-135

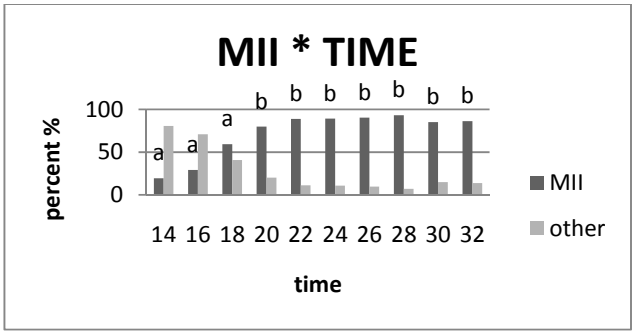
2.J.H. Lee, K.H.S(.2006)Campbell. Effect of Enucleation and caffeine on MaturationPromoting Factor (MPF) and Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Activities in ovine oocytes Used as Recipient Cytoplasts for Nuclear Transfer,. Biology of Reproduction.;74:691-698.

3.Campbel,K.H.S, LOI, P., Cappai,P. and Wilmut, I.(1994). Improved Development to Blastocyst of Ovine Nuclear Transfer Embryos Reconstructedduring the Presumptive S-Phase of Enucleated Activated Oocytes. biology of reproduction 50, 1385-1393

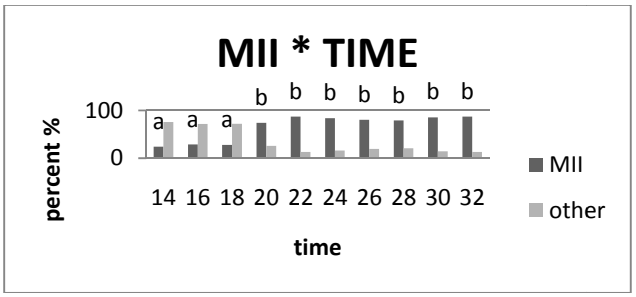
4.S.M. Hosseini, M. Hajian, F. Moulavi, A.H. Shahverdi, M.H. Nasr-Esfahani. (2007)Optimized combined electrical–chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. Animal Reproduction Science.



نمودار ۱



نمودار ۲



نمودار ۳

Assessment of microtubule and nuclear status in different maturation time point in bovine, caprine and ovine oocyte

Maryam kiani[1], Madi Hajian[2],somayyeh ostadhossaini, Frozanfar M, **Sayed Morteza hosseini[2], mohammad hossein Shahir**
Mohammad hossein Nasr- Esfahani*[2]
1- Zanjan University ,Department of animal Scinces, zanjan, Iran.
2- Department of Reproduction and Development, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Tehran, Iran
Correspondence: Mohammad H. Nasr-Esfahani⋆
Department of Reproduction and Development, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Esfahan, Iran. Tel. (+) 98311 2612900-3; Fax. (+) 98311 2605525

Abstract:
In mammalians oocyte must undergo a series of nuclear and microtubular changes through a meiotic maturation in order to become fertilizable and developmentally competent.Microtubules are one of the major cytoskeleton components and important modulators for chromosomal movement in mammalian oocytes.In the majority of mammals, oocytes are ovulated in metaphase II (MII) and remain in this stage until activated by the fertilizing spermatozoon (fertilization) or by an artificial stimulus (parthenogenetic activation).In this study we investigated the effect of various maturation time point on nuclear status and microtubular organization in order to introduce the best time of maturation for parthenogenetic activation.Oocytes were cultured in maturation medium for 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, and 32 hr. Matured oocytes were fixed and immunostained using a monoclonal anti-β-tubulin antibody to investigate the microtubular organization. Along with this immunostaining the nucleus of matured oocyte were stained with Hoechst to determine the nuclear status.In this study we observed that the percentages of MI oocytes were increased during 14 to 18 hours after maturation, which were decreased during 18-32 hr after maturation in all three species. The percentage of MII oocytes from 14 to 20 h (14 hr: 7.9, 16 hr: 19.4, 18 hr: 27.8 and 20 hr: 64.9 %), 14-22 h (14 hr: 24.1, 16 hr: 28.1, 18 hr: 27.6, 20 hr: 74.3,22hr: 87 %) and 14-22 h (14 hr:19.2, 16 hr: 29, 18 hr:59, 20 hr: 80, 22hr:88.9 %) increased in goat, bovine and ovine respectively. The oocytes were arrested at 20-22 hr after maturation until 32 hr in MII stage.Our results demonstrated that, the best time for oocyte activation is 20 for goat, and 22 for bovine and ovine hr after maturation, which had the highest rate of MII stage oocytes.

Keywords: microtubule, ovine oocyte, nuclear status

ایجاد یک روش بهینه فاقد زونا جهت انتقال هسته سلول سوماتیک در بز

سید مرتضی حسینی[۱]، مهدی حاجیان[۱]، محسن فروزانفر[۱]، سمیه استاد حسینی[۱]، پروانه عابدی[۱]، محمد حسین نصر اصفهانی[۱]*

۱- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات علوم سلولی، جهاد دانشگاهی گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول: محمد حسین نصر اصفهانی، پژوهشکده زیست فناوری، اصفهان، ایران. -تلفن: ۳-۰۳۱۱۲۶۱۲۹۰۰. فاکس: ۰۳۱۱۲۶۰۵۵۲۵

Email: mh_nasr@med.mui.ac.ir

چکیده

هدف این مطالعه ایجاد یک روش بهینه فاقد زونا جهت انتقال هسته سلول سوماتیک در بز بود که هم سهولت انجام و هم کارآمدی را به همراه داشته باشد. مهمترین مراحل این امر شامل : ۱) بهینه سازی بلوغ آزمایشگاهی ، ۲) فعال سازی پارتنوژنیک تخمک های فاقد زونا ، ۳) انتقال هسته به تخمک های آنافاز ۲ تلوفاز ۲ که باعث رفع نیاز به مواجهه طولانی مدت تخمک ها به اشعه ماورای بنفش شد و ۴) کشت گروهی رویان های کلون شده در چاهک ها در یک محیط کشت رویان بسیار کارآمد فاقد سرم تا مرحله بلاستوسیست قبل از انتقال به گیرنده ها بود. درصد تولید رویان تراریخت به ترتیب ۲۲/۳٪ و ۳۳/۱٪ برای لاین های سلولی بالغ و جنینی بود. بعد از انتقال بلاستوسیست های کلون و تراریخت به ترتیب ۲۸/۶٪ و ۲۶/۴٪ از گیرنده ها آبستن شدند و ۷۵٪ و۳۳/۳٪ از آبستنی ها منجر به تولد نتاج زنده شد. بر اساس اطلاعات موجود، این اولین گزارش موفق تولید زنده و مانا از نتاج کلون و تراریخت از طریق یک فرآیند کامل از بلوغ تخمک و تکوین رویان تا مرحله بلاستوسیست می باشد و در این مطالعه کفایت آزمایشگاهی تولید رویان کلون و تراریخت بالاتر از گزارش های موجود می باشد.

واژگان کلیدی: گونه بز، انتقال هسته سلول سوماتیک به روش فاقد زونا، بلاستوسیست کلون

Development of an Optimized Zona-Free Method of Somatic Cell Nuclear Transfer in the Goat

S. M. Hosseini[1], M. Hajian[1], M. Forouzanfar[2], S. Ostadhosseini[1], P. Abedi[1], M. H. Nasr-Esfahani[1]*

1- Department of Reproduction and Development, Cell Sciences Research Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Esfahan, Iran.

2- Department of Basic Science, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

*Correspondence:

Mohammad H. Nasr-Esfahani, Department of Reproduction and Development, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Esfahan, Iran.

*** Corresponding E-mail address: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org**

Abstract

The purpose of this study was to develop an improved zona-free method of goat somatic cell nuclear transfer (SCNT) that has both ease of operation and efficiency. The main steps involved were: 1) optimization of in vitro oocyte maturation, 2) parthenogenetic activation of zona-free oocytes, 3) SCNT of zona-free anaphase II-telophase II (AII-TII) oocytes which subverted the need for long term UV-exposure of the oocytes, and 4) in vitro culture of groups of cloned embryos in wells in a highly efficient continuous serum-free embryo medium to the blastocyst stage before transfer to the recipients. Percentages of transgenic blastocyst production were 22.3% and 33.1% for adult and fetal cell lines, respectively. After transfer of cloned and transgenic blastocysts, 28.6% and 36.4% of the recipients were confirmed pregnant and 75% and 33.3% of the pregnancies resulted in the delivery of viable offspring, respectively. To our knowledge, this is the first report of successful live and survived birth of cloned and transgenic offspring through a whole procedure of in vitro oocyte maturation and
embryo development to the blastocyst stage, and in this study the in vitro efficiencies of cloned and transgenic embryo production were higher than the available reports.

Key words: Goat species, zona-free SCNT, Cloned blastocyst.

Introduction

Several lines of evidence indicate that the goat (*Capra hircus*) is the ideal species for transgenic production of recombinant proteins due to its unique advantages over cattle and sheep (Nasr-Esfahani et al., 2011). While the first successful report of goat cloning turns back to 1999 (Baguisi et al., 1999), there have been some obstacles in the field of goat in vitro cloning and embryo culture which have hampered the broad application of this valuable species for transgenic purposes: 1) goat SCNT still practiced with the labor intensive and time consuming zona-intact method, 2) the majority of goat SCNT studies have used ovulated or OPU-derived oocytes which make goat cloning expensive and demanding, and 3) in most reports, reconstructed goat embryos have been either cultured in vitro as short as possible (up to the 8-cell stage or temporarily incubated in an intermediate oviduct. to avoid the abnormal/poor embryo development that has been associated with in vitro culture of goat embryos (for review see Nasr-Esfahani et al., 2011). Of note, the two teams who transferred in vitro developed morulae-blastocyst have experienced disappointing results. In a study by Behboodi, et al., (2004) no pregnancy occurred with the transfer of in vitro developed morula/blastocyst clones, however they achieved 30% established pregnancy after the transfer of in vivo developed clones. In another study, Ohkoshi, et al., (2003) produced a male clone from an in vitro blastocyst which died 16 days after birth. Therefore, it seems that the technical difficulties of the conventional SCNT method, along with the lack of an efficient in vitro goat embryo culture system are areas of further research with the goat to improve the success rate of goat NT profoundly impacting agriculture and biomedicine. Therefore, this study was carried out to develop a simple, fast and efficient production of transgenic goat offspring.

Materials and Methods

Parthenogenetic activation

Abattoir-derived goat ovaries were used as the source of immature oocytes. Zona free oocytes were first exposed to electrical pulses for 10 sec followed by two direct currents in 290 mOsm fusion buffer free of Ca^{2+} and Mg^{2+}. Oocytes were then incubated with three concentrations (5, 2.5 and 1 µg/ml) and three durations (5, 2.5 and 1 mins) of ionomycin followed by incubation with 2 mM DMAP for 4 or 2 h (Figure 1).

Zona-free enucleation and nuclear transfer

For enucleation, zona free oocytes were incubated in HSOF containing 3 mg/ml poly vinyl alcohol (PVA) and 5 mg/ml H33342 and then washed and transferred into HSOF/PVA/10%GS droplets on the microscope stage (Olympus; IX71) equipped with Narishige micromanipulators (Olympus). As soon as the chromosome mass (under UV light) or the whole protrusion cone (under normal light) was suckled into the enucleation pipette (10-15 µm outer diameter, perpendicular break), the cytoplast and karyoplast were separated with a brief kick by hand on the warm stage (Figure 2). For nuclear transfer, oocytes were individually picked up and gently pushed over a single cell as the oocyte rolled upon the cell (Figure 2).

Embryo transfer, pregnancy monitoring and parturition

Two to five grades 1 to 2 IVF, cloned and transgenic blastocysts developed in each group were transferred via embryo transfer (ET) catheter (Labotect, D-37079 Göttingen, Germany) into the uterine horn of the synchronized does, ipsilateral to the ovary containing a current coronate corpus luteum. Pregnancies were tested at days 35-40 post ET with ultrasonography (Aloka 500-V; Aloka, Tokyo, Japan) and all the pregnancies (including IVF, clone, and transgenic) were followed at days 60, 90, 120 before elective C-section at days 145-50 post ET.

Statistical analysis

All experiments at this study were repeated at least three times. Percentages data were modeled to the binomial model of parameters by ArcSin transformation and the transformed data were analyzed by one way ANOVA model of SPSS 17. Differences were compared by Tukey multiple comparison post hoc test. All data were presented as means ± S.E.M. and differences considered as significant at $P<0.05$.

Results

- Parthenogenetic activation

Figure 1 shows in vitro development of zona-free oocytes artificially activated with different parthenogenetic activation protocols. As shown: 1) there was no overall important influence of the activation protocol on cleavage rate, 2) the highest blastocyst rates were observed when zona free oocytes were first activated with EP + 5 µM ionomycin for 1 min, and then incubated with DMAP for either 2 h (45.1±2.3%) or 4 h (44.3±2.7%). These rates of blastocyst production were significantly greater than the related rates of all oocytes activated with 1 µM ionomycin, irrespective of ionomycin duration and/or DMAP duration, 3) the lowest blastocyst rate was observed in EP + 1 µM ionomycin for 2.5 min + DMAP for the 4 h activation protocol (17.4±1.7%) which was significantly lower than the related rates of all oocytes activated with 5 or 2.5 µM ionomycin, irrespective of ionomycin duration and/or DMAP duration. Therefore the activation protocol of EP followed by 5 µM ionomycin for 1 min and then 2 h incubation with DMAP was selected for the SCNT trials.

Embryo transferand parturition

A total of 58 cloned, 43 transgenic (developed form adult cell line) and 15 IVF blastocysts were transferred into 14, 11 and 6 recipient does, respectively. Sonographical examination detected pregnancies in 28.6% of cloned (n=4), 36.4% of transgenic (n=4) and 50% of IVF recipients (n=3). However, while all IVF pregnancies (100%) persisted to term, one clone (25%), and one transgenic (25%) pregnancy were missed at the day 60 assessment and one transgenic pregnancy aborted at day 90 (25%). One transgenic pregnancy at day 60 was intentionally induced to obtain a fetal cell line (Figure 3-D) for supporting further transgenic experiments. At C-section, the three clone pregnant does delivered four kids (Figure 3-E). One of the twin kids died at day four postpartum possibly from gastrointestinal problems. One transgenic pregnancy aborted at day 120 of pregnancy with unknown reason. The remained transgenic pregnancy resulted in the delivery of two identical offspring which were both healthy at birth (Figure 2-G), however, one died three days after birth, apparently due to gastrointestinal problems. Genotyping analysis confirmed that all the cloned kids were identical (Figure 3-F) and the aborted and induced aborted transgenic fetuses were both positive for the htPA gene. Also both kids that were cloned from the transgenic adult cell line were identical and harbored the htPA gene in their genome (Figure 3-H).

Discussion

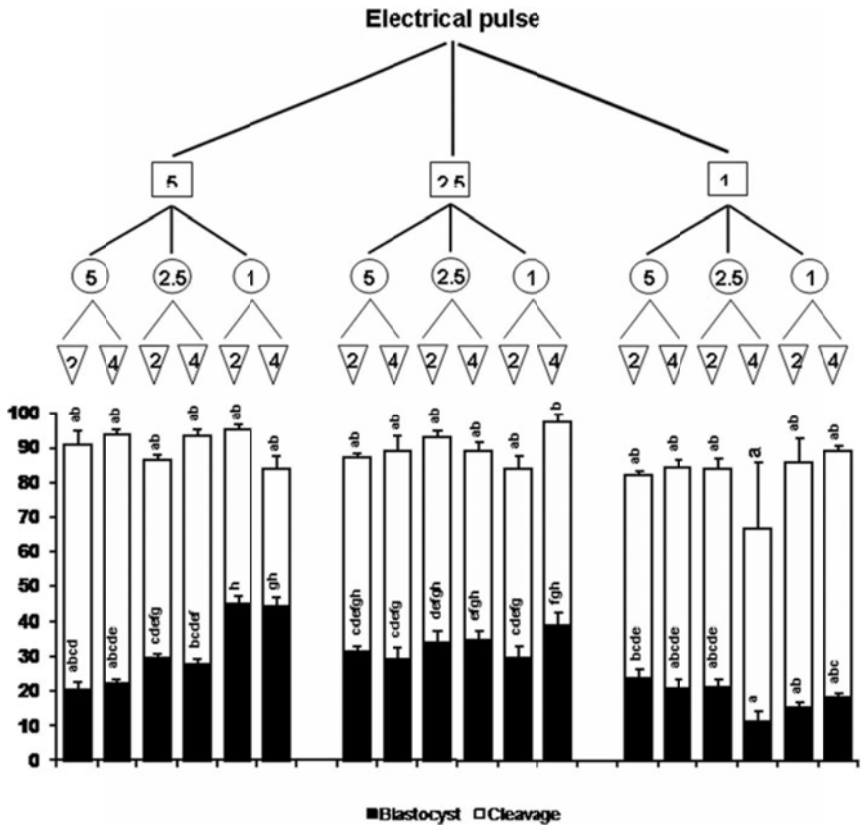
To our knowledge, this is the first report of a successful birth of cloned and transgenic offspring through a whole procedure of in vitro oocyte maturation and embryo development up to the blastocyst stage. Also, this study is the first to provide particular methods of in vitro oocyte maturation, zona removal, oocyte enucleation, parthenogentic activation, and embryo culture in the goat. These modifications increased the efficiency of in vitro embryo development and artificial activation of goat oocytes when compared with available reports. Also the established method of zona-free SCNT of AII-TII oocytes not only subvert the need of cytochalasin B treatment and long term UV-exposure of oocytes, but also greatly increases the speed and feasibility of nuclear transfer and bulk fusion.

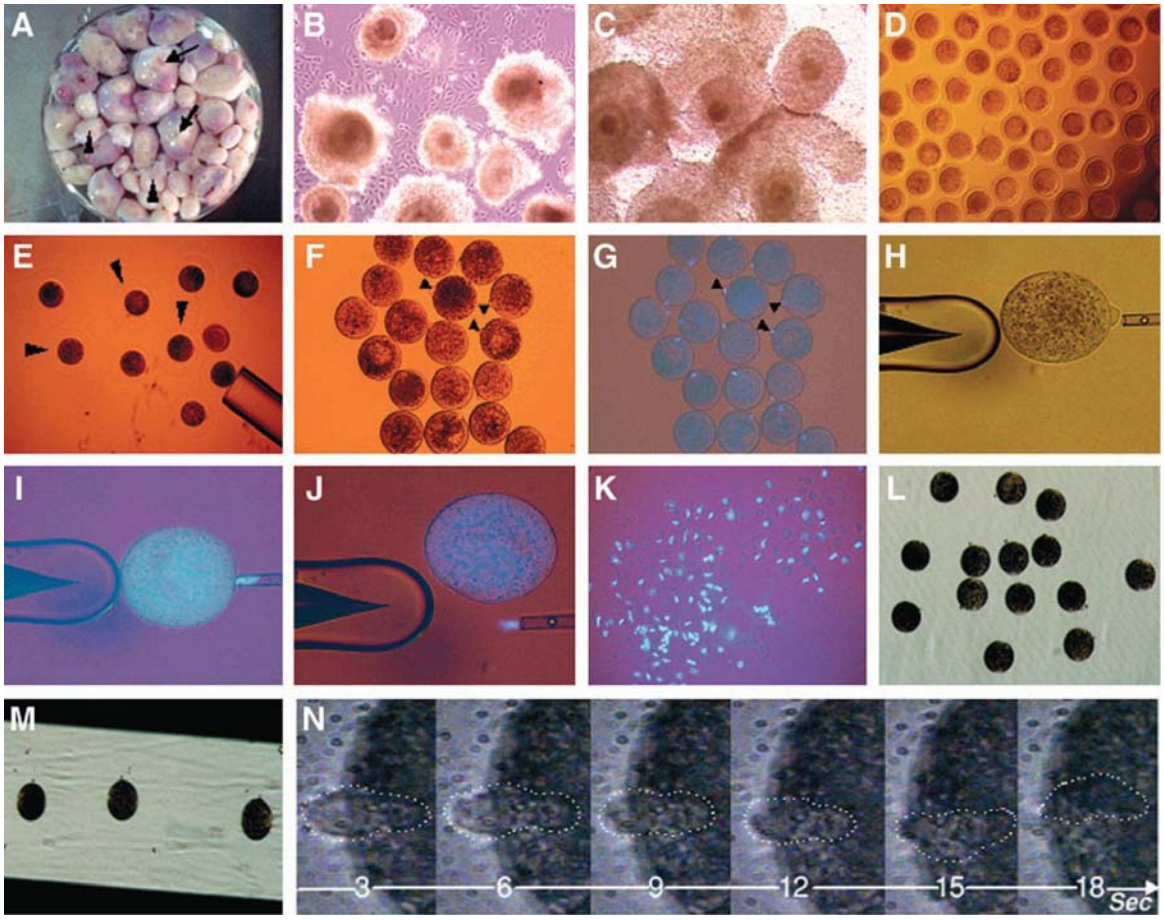
The results of this study can be regarded as proof of the principle for the central problem of selecting the best farm animal species that contains all the benefits for commercial production of transgenic animals.

References

1-Nasr-Esfahani MH, Hosseini SM, Hajian M, Forouzanfar M, Ostadhosseini S, Abedi P, Khazaie Y, Dormiani K, Ghaedi K, Forozanfar M, Gourabi H, Shahverdi AH, Vosough AD, Vojgani H. Cell Reprogram. 2011, 13(2):157-70. Development of an optimized zona-free method of somatic cell nuclear transfer in the goat.
2-Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T. et al. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. Nat. Biotechnol. 17, 456–461.
3-Ohkoshi, K., Takahashi, S., Koyama, S. et al. (2003). In vitro oocyte culture and somatic cell nuclear transfer used to produce a live-born cloned goat. Cloning Stem Cells 5, 109–115.

Figure 1. Experimental design of the parthenogenetic activation treatments used for zona-free oo-cytes and the results of in vitro embryo development. G Ionomy-cin concentration (mM). X Ionomy-cin duration (min). K DMAP duration (h). Between white and black bars, values with at least one common letter are not significantly different ($p < 0.05$).





ovaries, (B) immature, and (C) matured goat oocytes cultured over Vero cells, (D) denuded matured oocytes, (E) partially zona-free oocytes after pronase treatment (arrows indicate zona pellucida), (F) a pool of completely zona-free oocytes with evident protrusion (arrow heads), and (G) the same oocytes exposed to UV light after H33342 staining (arrows dead indicate maternal chromosomes). (H–O) the procedure of zona-free SCNT: (H) the perpendicular enucleation pipettes at the left and the blind holding pipettes at the right side of the oocyte, (I) adjustment of the enucleation pipettes in close vicinity of the oocyte maternal spindle as the same level as enucleation tip, and (J) withdrawal whole metaphase chromosome into the enucleation pipettes with minimal amount of cytoplasm, and (K) separation of maternal genome by a brief kick of finger on the warm stage, (L) attachment of cells to the oocytes in the lectin containing medium, (M) bulk fusion of oocyte-cell couplets using fusion chamber, and (N) stepwise fusion of donor cell into the oocyte within 18sec (dash lines represent the periphery of the donor cell which is penetrating into the oocytes and the numbers in each frame indicate time line (second) of fusion completion).

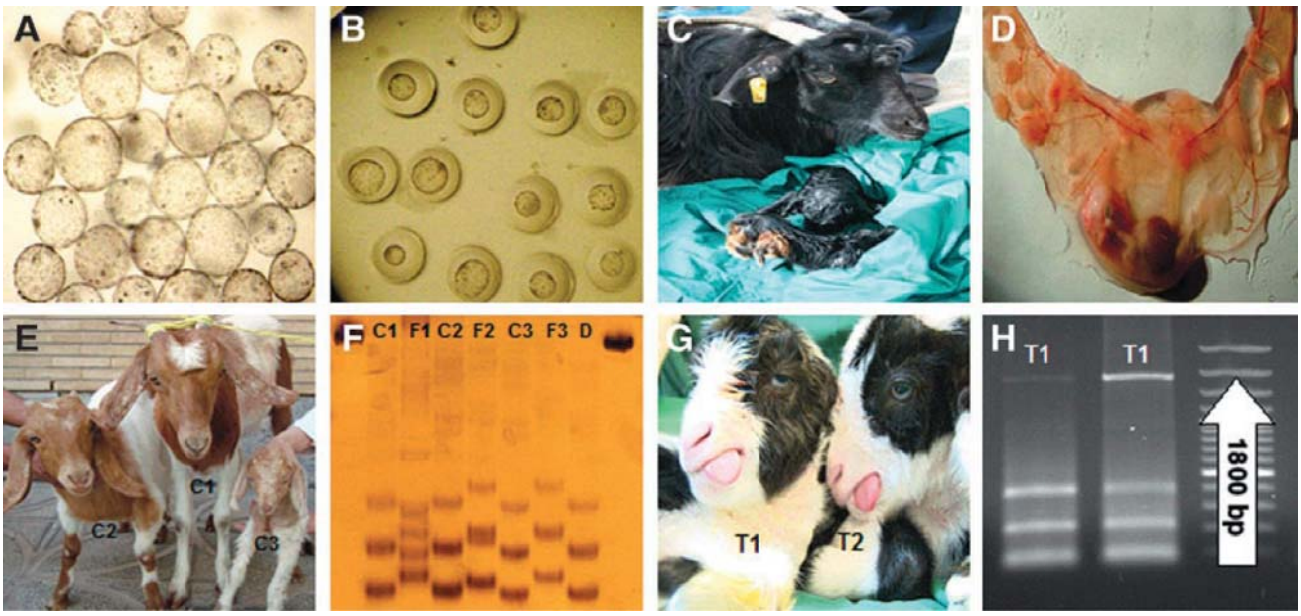


Figure 3. From in vitro developed blastocysts to the offspring: (A) IVF-derived hatched blastocysts, (B) SCNT blastocysts cultured in WOWs system, (C) IVF kids, (D) transgenic fetus at day 60 of pregnancy, (E) cloned kids (C1, 2, and 3: clone 1, 2, and 3), and (F) their microsatellite analysis (primer BM6526: C1, 2, and 3: clone kids 1, 2, and 3, F1, 2, and 3: foster mothers 1, 2, and 3, (D) nuclei donor cells), (G) transgenic twin kids (T1 and T2), and (H) their PCR analysis for the presence of transgene (htPA:1800 bp).

بررسی اثر تغییرات اپی ژنتیکی سلولهای سوماتیک دهنده هسته (هیپومتیلاسیون) بر روی کفایت رویانهای شبیه سازی شده در گاو

فرنوش جعفرپور[۱]، سید مرتضی حسینی[۱]، مهدی حاجیان[۱]، محسن فروزانفر[۱]، پروانه عابدی[۱]، سمیه استاد حسینی[۱]، محمد حسین نصر اصفهانی*[۱]

۱- پژوهشگاه رویان ، پژوهشکده زیست فناوری، مرکز تحقیقات علوم سلولی، جهاددانشگاهی، گروه زیست فناوری جانوری، اصفهان، ایران

* نویسنده مسئول: محمد حسین نصر اصفهانی ، پژوهشکده زیست فناوری، اصفهان، ایران

چکیده:

جنین‌های شبیه‌سازی شده از سلولهای سوماتیک کاملاً تمایز یافته سطوح بالاتری از متیلاسیون DNA را در مقایسه با جنین‌های حاصل از لقاح نشان می‌دهند. این الگوی نابجا احتمالاً مسئول ناهنجاریهای متعدد در طی تکوین جنین‌های شبیه‌سازی شده می‌باشد. ایجاد تغییراتی در سطوح اپی‌ژنتیکی سلولهای سوماتیک دهنده هسته ممکن است سبب بهبود تکوین این جنین‌ها گردد. هدف از انجام این تحقیق درمان سلولهای فیبروبلاستی پاساژ ۵ با ترکیب 5-aza-2'-dc به مدت ۷۲ ساعت با غلظتهای ۰- ۰/۰۱- ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار به منظور بررسی تاثیر آن بر تکوین آزمایشگاهی جنین‌های شبیه‌سازی شده می‌باشد. همچنین تاثیر ترکیب 5-aza-2'-dc به مدت ۷۲ ساعت با غلظتهای ۰- ۰/۰۱- ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار بر خصوصیات متعدد سلولی در سلولهای سوماتیک دهنده هسته نیز بررسی می‌گردد. غلظتهای پایین ترکیب 5-aza-2'-dc تاثیر اندکی را بر روی سیکل سلولی نشان می‌دهد. در حالیکه بالاترین غلظت این ترکیب سبب افزایش معنی‌دار درصد سلولهای فاز G0/G1 در مقایسه با سایر گروهها می‌گردد. با افزایش غلظت ترکیب 5-aza-2'-dc سطوح استیلاسیون H3K9 افزایش و سطوح متیلاسیون DNA کاهش یافت. درمان سلولهای فیبروبلاستی با غلظتهای ۰/۰۱ و ۰/۰۸ میکرومولار از ترکیب 5-aza-2'-dc سبب کاهش غیر معنی‌دار (٪۵/۳± ۲۸/۶ و ٪۱/۲± ۲۷/۲ در مقابل ٪۴/۳±۳۲/۱) درصد بلاستوسیست در مقایسه با گروه کنترل و کاهش معنی‌دار (٪۱/۵ ± ۶/۵) در گروه درمانی ۰/۳ میکرومولار گردید. کیفیت جنین‌ها با افزایش غلظت ترکیب 5-aza-2'-dc کاهش یافت. نتایج این تحقیق نشان دهنده این است که ترکیب 5-aza-2'-dc ترکیب مناسبی جهت تصحیح برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای نمی‌باشد.

واژگان کلیدی: اپی‌ژنتیک، شبیه‌سازی، ۵-آزا- دئوکسی سایتیدین، برنامه‌ریزی مجدد هسته‌ای

مقدمه

تا یک دهه قبل تصور عموم دانشمندان علوم سلولی براین بود که سلولهای سوماتیک پستانداران به هیچ نحوی قابلیت برنامه‌ریزی مجدد ژنومی به گونه‌ای مشابه سلولهای بنیادی رویانی را نخواهند داشت، اما تولد گوسفند دالی در سال ۱۹۹۷ با استفاده از انتقال هسته سلولهای سوماتیک (SCNT) برای اولین بار نشان داد که هسته سلولهای سوماتیک تمایز یافته پستانداران با انتقال به درون یک اووسیت بدون هسته، در طی یک پروسه که در اصطلاح برنامه ریزی مجدد هسته ای(Nuclear Reprogramming) نامیده می شود می‌تواند تبدیل به یک سلول همه‌توانی (totipotency) گردد و این پدیده تاکنون در گونه های مختلف نشان داده شده است

(ویلموت و همکاران). بدین ترتیب SCNT به عنوان یک ابزار بسیار مهم و کلیدی در تحقیقات مهندسی ژنتیک و سلولهای بنیادی می‌باشد. به نظر می‌رسد که یکی از علل مهم کارایی بسیار پایین SCNT به دلیل برنامه ریزی مجدد(Reprogramming) ناقص ژنوم سلول دهنده (Donor Cell) می باشد(دین و همکاران).

اگر چه سلولهای تمایز یافته حاوی اطلاعات کامل ژنتیکی می باشند، اما هر سلول با توجه به خصوصیات هر بافت، از نظر اپی ژنتیکی(Epigenetic)، با متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستونها اصلاح شده است. تاکنون تحقیقات مختلفی در رابطه با سطح عمومی متیلاسیون و استیلاسیون در گامتهای نر و ماده و نیز در جنینهای تولید شده با روش طبیعی و در جنینهای شبیه سازی شده انجام گرفته است. در ارتباط با سطح عمومی متیلاسیون، در تولید مثل طبیعی سطوح بالایی از متیلاسیون در DNA گامتهای نر و ماده وجود دارد که پس از لقاح در طی مراحل اولیه تکامل جنینی دمتیلاسیون انجام می گیرد (۳۲و۲۲). نتایج حاصل از تحقیقات مختلف مبین این مساله است که در جنینهای گاوی با گذشت زمان، متیلاسیون در طی مراحل تقسیم سلولی(cleavage) تا مرحله ۸ سلولی کاهش یافته و سپس متیلاسیون در مرحله ۱۶ سلولی با متیلاسیون طرح جدید (Denovo) ادامه می یابد. تحقیقات نشان می دهد که مورولای شبیه سازی شده غیر نرمال، در تمام بلاستومرها هسته های متیله شده زیادی را دارند که شبیه به هسته سلولهای دهنده فیبروبلاستی می باشد. همچنین جنینهای شبیه سازی شده سطوح بالاتری از متیلاسیون DNA را نسبت به جنینهای طبیعی دارند(بورکیس و همکاران، کنگ و همکاران، اهگین و همکاران). گزارشات متعدد مبنی بر آن است که در شبیه سازی با سلولهای سوماتیک، سلولهای دهنده با سطح پایین متیلاسیون DNA و یا سطح بالای استیلاسیون هیستون، آسانتر و کاملتر برنامه ریزی مجدد می شوند و بنابراین سبب افزایش کارایی شبیه سازی می گردند (انرایت و همکاران).

مواد و روش‌ها

الف- آماده سازی سلولهای دهنده هسته(donor cells) و تیمار سلولهای دهنده با ماده 5-Aza – 2' – deoxycytidine:

در این مطالعه سلولهای فیبروبلاست واقع در پاساژ ۵ به عنوان دهنده هسته مورد استفاده قرار می گیرند. جهت این امر سلولهای مذکور درون دیشهای کشت تا زمان تراکم سلولی کشت داده شده و سپس سلولها در محیط DMEM همراه با ۱۰٪FCS حاوی ۰(کنترل) و۰/۰۱و ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار (µM) ماده 5-Aza – 2' – deoxycytidine به مدت سه روز کشت داده می شدند. بلافاصله قبل از انجام روند انتقال هسته، سلولهای دهنده با استفاده از تریپسیناسیون به حالت سوسپانسیون در آمده و در محیط H-TCM نگهداری می شدند.

ب- آنالیز سیکل سلولی سلولهای فیبروبلاستی دهنده هسته تیمار شده با دستگاه فلوسیتومتری(Flow Cytometry):

به منظور بررسی اثر ترکیبات مختلف بر سیکل سلولی سلولهای کشت داده شده در محیطهای مختلف، تریپسینه شده و سلولها در لوله های سانترفیوژ ml ۱۵ توزیع شده و با محیط DMEM همراه با ۱۰٪FCS شستشو داده شده و سانتریفیوژ می گردند. سپس پلت سلولی تشکیل شده در محیط سالین GM سرد به حالت سوسپانسه در می آید. در مرحله بعد به منظور فیکس سلولها در حدود 3ml الکل اتانول ۱۰۰ درصد ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت به سوسپانسیون سلولی اضافه می گردد. سپس سلولها در PBS سرد شستشو و سانترفیوژ داده شده و به منظور رنگ آمیزی هسته پلت سلولی در PBS حاوی 30µg/ml پروپیدیوم یدید(PI) و RNase A 0.3mg/ml و 0.5% Triton-X-100 به حالت سوسپانسه درآمده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری می شود و سپس سوسپانسیون سلولی با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز می گردد.

ج- تعیین سطح کلی متیلاسیون و استیلاسیون در سلولهای فیبروبلاستی دهنده هسته تیمار شده با دستگاه فلوسیتومتری:

سطح کلی متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون سه بر روی لیزین ۹ با روش فلوسیتومتری از طریق اندازه گیری سطح فلورسانتی سلولها پس از آنکوبه شدن با آنتی بادی اولیه آنتی ۵-متیل سایتوزین (anti 5-methyl cytosine) و آنتی استیل هیستون H3 بر روی لیزین ۹ ,آنتی بادی ثانویه فلورسنت کانجوگه شده (Fluorescein Isothiocyanate Conjugated or FITC) تعیین می گردد.

د- تهیه اووسیت و بلوغ آزمایشگاهی :

در آزمایشگاه کمپلکس اووسیت–سلولهای کومولوس با استفاده از سوزن گاژ (gage) ۱۸ متصل به پمپ خلاء از درون فولیکولهای روشن و فاقد خون با قطر mm ۸-۲ آسپیره می‌شدند. سپس در زیر میکروسکوپ استریو محتویات فولیکولی رقیق شده از لحاظ وجود COC های مناسب بررسی شده و COC های مذکور به محیط بلوغ TCM 199 انتقال داده می‌شدند.

ه- بی هسته سازی، انتقال هسته ، فیوژن و اکتیواسیون:

پس از انجام عمل بی‌هسته سازی ، اووسیتهایی که به طور موفق فاقد هسته گردیده‌اند از محیط بلوغ خارج سازی شده و سپس یک سلول کاملا گرد از سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده با ماده 5-Aza-2´-deoxycytidine در تماس نزدیک با غشای سیتوپلاسمی اووسیت فاقد هسته قرار می‌گیرد. جهت انجام فیوژن ، اووسیت های ساختار مجدد حاصله (reconstructed)ابتدا در محیط فیوژن 0.3M) (Mannitol , 0.1mM MgS04 شستشو داده شده و سپس به درون مایع فیوژن واقع در محفظه فیوژن ما بین دو الکترود (با فاصله ۰/۵ mm) انتقال داده می شوند. فعال سازی اووسیت های مذکور با استفاده از مواجهه ابتدایی با Ionomycin (μM ۵ به مدت ۵ دقیقه) ، سپس فعال سازی مجدد در محیط 6-DMAP به مدت ۴ ساعت انجام می‌پذیرد.

و- بررسی تکامل و تکوین جنینهای شبیه سازی شده

رویانهای شبیه سازی شده با سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده‌از نظر تکوین مراحل رویانی و رسیدن به مراحل کلیویج و بلاستوسیست مورد بررسی و ارزیابی قرار می گیرند.

ز- آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS انجام می‌گیرد. بررسی تکامل و تکوین جنینهای شبیه‌سازی شده با استفاده از آنالیز Chi-Squareو آنالیز نتایج سطوح استیلاسیون و متیلاسیون حاصل از فلوسایتومتری و بیان Oct-4 با آنالیز One Way Anova انجام می گیرد. در صورت معنی دار شدن اختلاف بین گروهها از آزمون تعقیبی توکی استفاده می‌گردد.

نتایج و بحث

۱- تأثیر تیمار ترکیب 5-aza-2'-dc با غلظتهای مختلف بر توزیع سیکل سلولی در مراحل مختلف در سلولهای فیبروبلاست گاوی

درصد توزیع سلولهای فیبروبلاستی گاوی که در پاساژ ۵ کشت سلولی می‌باشند، در مرحله G0/G1 ۷۲ ساعت پس از درمان با غلظتهای ۰، ۰/۰۱، ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار ترکیب 5-aza-2'-dc به ترتیب ۱/۶± ۷۵/۶، ۰/۵ ± ۷۶/۲، ۰/۵± ۸۰/۹ و ۱/۴±۸۶/۵ می باشد. آنالیزهای آماری نشان دهنده افزایش معنی‌دار درصد سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده با غلظت ۰/۳ میکرومولار 5-aza-2'-dc در فاز G0/G1 در مقایسه با گروههای کنترل و ۰/۰۱ میکرومولار 5-aza-2'-dc می باشد (P <۰/۰۵). آنالیزهای آماری نشان دهنده کاهش معنی دار درصد سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده با غلظت ۰/۳ میکرومولار5-aza-2'-dc در فاز S در مقایسه با گروههای کنترل و ۰/۰۱ و ۰/۰۸ میکرومولار 5-aza-2'-dc می باشد (P <۰/۰۵). درصد توزیع سلولهای فیبروبلاستی گاوی در مرحله G2/M پس از ۷۲ ساعت درمان با غلظت های ۰ ، ۰/۰۱، ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار ترکیب 5-aza-2'-dc به ترتیب ۱/۴± ۱۸/۷، ۰/۲ ± ۱۸/۲ ، ۰/۳ ± ۱۴/۳ و ۰/۱۵ ± ۱۰/۲ می باشد. آنالیزهای آماری نشان دهنده کاهش معنی‌دار درصد سلولهای فیبروبلاستی تیمار شده با غلظت ۰/۳ میکرومولار 5-aza-2'-dc در فاز G2/M در مقایسه با گروه کنترل و گروه تیماری ۰/۰۱ میکرومولار 5-aza-2'-dc می باشد (P <۰/۰۵) (نمودار ۱).

۲- تأثیر تیمار ترکیب 5-aza-2'-dc با غلظت های مختلف بر خصوصیات اپی ژنتیکی سلولهای فیبروبلاست گاوی

- متیلاسیون DNA

نمودار ۲ نشان دهنده تأثیر غلضتهای مختلف ترکیب 5-aza-2'-dc بر سطوح متیلاسیون DNA سلولهای فیبروبلاستی گاوی می‌باشد. سطوح متیلاسیون توسط دستگاه FACS و با اندازه‌گیری شدت نور فلورسنت اندازه گیری شده است. همانگونه که در نمودار مذکور مشاهده می‌شود با افزایش غلظت ترکیب 5-aza-2'-dc سطوح متیلاسیون DNA در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد. آنالیز آماری نشان می دهد که این کاهش در گروه ۰/۳ میکرومولار 5-aza-2'-dc در مقایسه با سایر گروهها (گروه کنترل و گروههای ۰/۰۱ و ۰/۰۸ میکرومولار 5-aza-2'-dc) معنی دار می باشد (P <۰/۰۵) در حالیکه در سایر گروههای این تغییرات معنی دار نمی‌باشد.

- استیلاسیون هیستونها

نمودار ۳ نشان دهنده تأثیر تیمار 5-aza-2'-dc بر سطوح استیلاسیون لیزین ۹ بر روی هیستون H3 سلولهای فیبروبلاست گاوی می باشد که این سطوح توسط دستگاه FACS اندازه گیری شده است. همانگونه که در نمودار مذکور مشاهده می شود در مقایسه با گروه کنترل با افزایش غلظت ترکیب 5-aza-2'-dc در گروه‌های مختلف تیمار شده سطوح استیلاسیون هیستون H3K9 افزایش می یابد. اما آنالیز آماری نشان می دهد که این افزایش در بین گروههای مختلف کنترل و تیماری معنی دار نمی باشد.

۳- تکوین آزمایشگاهی جنین های شبیه سازی شده با سلولهای فیبروبلاستی گاوی درمان شده با ترکیب 5-aza-2'-dc

جدول ۱ نشان می‌دهد که هیچگونه تفاوت آماری معنی داری بین درصد تسهیم گروه کنترل و گروههای درمانی با غلظتهای مختلف 5-aza-2'-dc مشاهده نمی گردد. اما با این حال کمترین درصد تسهیم مربوط به گروه درمان شده با غلظت ۰/۳ میکرومولار 5-aza-2'-dc می باشد درصد تکوین جنین های شبیه سازی شده در مرحله بلاستوسیست در روز ۸ پس از کشت اولیه جنینها در گروههای درمان شده با ترکیب 5-aza-2'-dc نسبت به گروه غیر درمانی پایین تر می باشد به گونه‌ای که با افزایش غلظت ترکیب 5-aza-2'-dc درصد بلاستوسیست کاهش یافته است (۱). آنالیز آماری نشان می دهد که این کاهش در گروههای تیماری ۰/۰۱ و ۰/۰۸ میکرومولار 5-aza-2'-dc در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبوده در حالیکه در گروه تیماری ۰/۳ میکرومولار 5-aza-2'-dc این کاهش معنی دار می باشد (P <۰/۰۵).

از مطالب گفته شده می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که اگر چه مارکرهای اپی ژنتیکی (متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستونها) در سلولهای فیبروبلاستی درمان شده با غلظت های ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار به صورت معنی دار و چشم گیری در مقایسه با گروه کنترل و ۰/۰۱ میکرومولار کاهش یافته است اما به دلیل اینکه تیمارهای ۰/۰۸ و ۰/۳ میکرومولار 5-aza-2'-dc به صورت معنی داری منجر به کاهش تکوین جنین ها در مرحله بلاستوسیست گردیده است لذا اینگونه به نظر می رسد که این درمان، یک درمان مناسب در جهت بهبود کارآیی شبیه سازی نمی باشد. بنابراین تحقیقات بیشتری در زمینه استفاده از این ترکیب با غلظتهای کمتر و زمانهای متفاوت دیگر مورد نیاز می‌باشد. علاوه براین استفاده از ترکیبات دیگری همانند ترکیب 5-aza-2'-dc که در سطح DNA ایجاد دمتیلاسیون کنند اما نسبت به این ترکیب برای سلول ایمن‌تر باشند لازم می‌باشد.

منابع

1- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. Nature, 1997; 385 (6619): 810–813.

2- Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, Reik W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 98:13734-13738.

3- Bourc'his D, Le Bourhis D, Patin D, Niveleau A, Comizzoli P, Renard JP, Viegas-Pequignot E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. Curr Biol, 2001; .11:1542-1546.

4- Kang Y, Koo D, Park J, Choi Y, Chung A, Lee K, Han Y. Aberrant methylation of donor genome in clonedbovine embryos. Nat Genet, 2001; 28:173-177.

5-Ohgane J, Wakayama T, Kogo Y, Senda S, Hattori N, Tanaka S, Yanagimachi R, Shiota K. DNA -۴ methylation variation in cloned mice. Genesis, 2001; 30:45-50.

6- Enright BP, Jeong BS, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics of bovine donor cells for nuclear transfer: levels of histone acetylation. Biol Reprod, 2003a; 69:1525-1530.

		اووسیتهای فعالسازی شده (تعداد)	تکوین جنین	
			تسهیم	بلاستوسیست
			(S.E.M ± %)	(S.E.M ± %)
5-aza-dc (µM)	۰	۱۷۵	۱۵۶ (۹۴/۵±۲/۱) a	۵۰ (۳۲/۱±۴/۳) b
	۰/۰۱	۱۷۵	۱۵۴ (۹۷/۵±۰/۸) a	۴۴ (۲۸/۶ ±۵/۳) b
	۰/۰۸	۱۰۴	۹۲(۹۶/۸±۲/۹) a	۲۵ (۲۷/۲ ±۱/۲) b
	۰/۳	۱۴۲	۱۰۸(۸۷/۱±۲/۰) a	۷ (۶/۵ ± ۱/۵) a

جدول ۱- تکوین آزمایشگاهی جنینهای شبیه‌سازی شده با استفاده از سلولهای درمان شده با غلظتهای مختلف 5-aza-2'-dc به مدت ۷۲ ساعت.

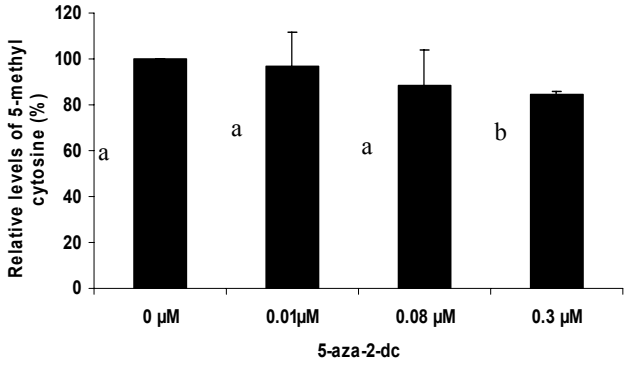
نمودار ۱- تأثیر تیمار ترکیب 5-aza-2'-dc با غلظتهای مختلف بر توزیع مراحل مختلف سیکل سلولی در سلولهای فیبروبلاست گاوی

a ab b c

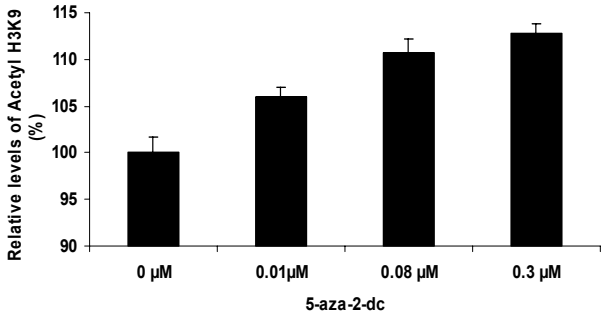
b b b a

c bc ab a

نمودار ۲- تأثیر تیمار ترکیب 5-aza-2'-dc با غلظت های مختلف بر سطوح متیلاسیون DNA سلولهای فیبروبلاست گاوی



نمودار ۳- تاثیر تیمار ترکیب 5-aza-2'-dc با غلظت های مختلف بر سطوح استیلاسیون H3K9 درسلولهای فیبروبلاست گاوی.



Ivestigation Of Epigenetic Modification Of Somatic Donor Cells (Hypomethylation) [a] [a] On The Efficiency Of Cloned Bovine Embryos

Farnoosh Jafarpour*[1], Sayed Morteza Hosseini[1], Mehdi Hajian[1], Mohsen Forouzanfar[1], Parvaneh Abedi[1], Somayyeh Ostadhosseini[1], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani[1]

1- Department of Reproduction and Development, Reproductive Biomedicine Center, Royan Institute for Animal Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran.

*** Corresponding E-mail address: mh_nasr@med.mui.ac.ir**

Abstract

Reconstructed embryos from terminally differentiated somatic cells revealed high levels of genomic methylation which results into inappropriate expression patterns of imprinted and non-imprinted genes. Improvement in cloning competency maybe achieved through modification in epigenetic markers of donor cells. Our objective was to determine if treatment of donor cells for 72 hours with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-2'-dc) (0-0.01-0.08 and 0.3 μM), improved development . 5-aza-2'-dc at lower concentration showed little effect on cell cycle. However 0.3 μM 5-aza-2'-dc resulted in an increased cell population at the G0/G1 stage. Increased 5-aza-2'-dc concentrations led to elevated in acetylation of H3K9 and reduction in DNA methylation, in compare to untreated cells. Treating cells with 0.01 and 0.08 μM 5-aza-2'-dc decreased blastocyst rate insignificantly (32.1% vs. 28.6% and 27.2% respectively) while it was significant for 0.3 μM treated cells (6.5%). In conclusion these results show that 0.01 μM 5-aza-2'-dc had less deleterious effects. Nonetheless this chemical is not a suitable choice for modifying nuclear reprogramming. Finally we could conclude that wide genomic hypomethylation induced by 5-aza-2'-dc have deleterious effects on developmental competency of cloned embryos.

Keywords: Epigenetic, SCNT, 5-aza-2'-dc, Nuclear reprogramming

موقعیت یابی ایمنوهیستوشیمی آروماتاز در دستگاه تناسلی بز نر

صباح محمدی[1*]، امجد فرزین پور[2] ، اسعد وزیری[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دام دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان، ۲-عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان

* Email: Sabahsanandaj@yahoo.com

مقدمه:

استروژن‌ها مدت‌ها به عنوان هورمون مخصوص جنس ماده در پستانداران مورد نظر بودند. اما، جدا سازی استروژن‌ها از ادرار اسب نر توسط زوندک در دهه ۴۰ دیدگاه جدیدی از نقش استروژن‌ها در جنس نر را مطرح نمود(۶ و ۱۱).

بیضه پستانداران یک اندام پیچیده است که دو عمل سنتز هورمون‌های استروئیدی و تولید اسپرم را انجام می‌دهد. به خوبی مشخص شده که رشد طبیعی بیضه و حفظ اسپرماتوژنز به وسیله گنادوتروپین ها کنترل می‌شود و این اثرات به وسیله عوامل موضعی تولید شده تنظیم می‌شود، و در این میان استروژن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۱). در سال‌های اخیر شواهد فراوانی به دست آمده که نشان می‌دهد استروژن‌ها برای باروری جنس نر دارای نقش مهمی هستند. بنابراین تجویز استروژن و گزنواستروژنها در طی رشد جنینی و نوزادی سبب بروز اختلالات جنسی شامل، نهان بیضگی، نواقص اپیدیدیمی، اختلال در باروری و افزایش میزان بروز سرطان بیضه می‌گردد. آزمایشات انجام گرفته بر روی موش فاقد گیرنده(ERαKO)[1] نشان داد که یکی از دلایل ناباروری عدم رشد و تکامل لوله‌های وابران[2] در غیاب استروژن‌ها می‌باشد(۸). همچنین تحقیقات دیگر نشان داد ناباروری موش‌های فاقد ژن عملکردی آروماتاز (ArKO)[3] ناشی از عدم رشد سلول‌های زایای بیضه در غیاب استروژن‌ها بوده است(۵ و ۹).

در حال حاضر پذیرفته شده که استروژن‌ها نقش فیزیولوژیکی مهمی در تولید مثل جنس نر دارند (۴). سیتوکروم آروماتاز P450 آنزیمی است که تبدیل آندروژن ها به استروژن‌ها را کاتالیز می‌کند(Simpson.1994). فعالیت این آنزیم و در مجاری تناسلی جنس نر بیان شده و موجب بیوسنتز موضعی استروژن‌ها می‌گردد. در پستانداران مختلف، آروماتاز در سلول‌های لایدیگ، سلول‌های سرتولی و سلول‌های زایا شناسایی شده است. بنابراین پیشنهاد شده که استروژن در رشد بیضه و بلوغ اسپرم نقش دارد(Carpino 2001). موقعیت یابی آروماتازP450 در سلول‌های بیضه پستانداران در طی چند دهه گذشته موضوع جالب و بحث برانگیزی بوده است. حضور آروماتاز P450 در سلول‌های زایا و سلول‌های لایدیگ بیضه پستانداران با آزمایش ایمونوهیستوشیمی تائید شده است(۴ و ۸). از آنجا که آروماتاز در مجاری تناسلی بز نر تایید و گزارش نشده ، هدف از انجام این مطالعه موقعیت یابی ایمونوهیستوشیمی آروماتاز در سیستم تولیدمثل بز بود.

مواد وروش ها:

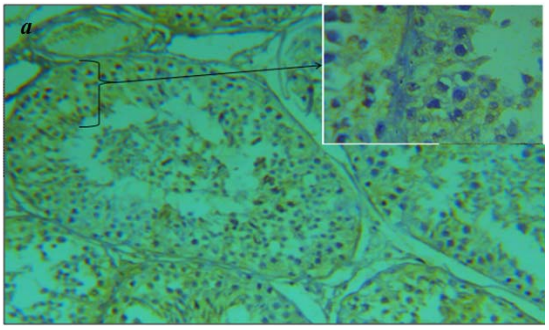
نمونه برداری بافتی بیضه از دام‌های ۴-۱ ساله کشتار شده در کشتارگاه دام سنندج انجام گرفت. نمونه های تهیه شده شامل قسمت های سر، بدنه، دم اپیدیدیم، قسمت مرکزی و حاشیه ای بافت بیضه به ابعاد ۱×۰/۰۵×۰/۰۵ سانتی متر بود. تهیه شد و نمونه ها بعد از قرار گرفتن در یونیکاست های پلاستیکی به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو بوئن قرار گرفت. بعد از مراحل آبگیری، شفاف سازی، آغشته سازی با پارافین، قالب

1-estrogen receptor alpha knock out
۲-efferent tubule
۳-aromatase knock out

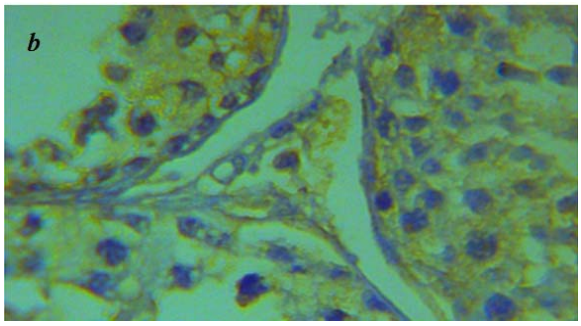
گیری، بلوک‌های پارافینی تهیه شد و مقاطع بافتی به ضخامت ۵-۴ میکرون توسط دستگاه میکروتوم تهیه و بر روی لام های آغشته شده به چسب سیتولوژی فیکس شدند.

روش ایمنوهیستوشیمی در این تحقیق بر اساس دستورالعمل ایمنوپروکسیداز هاندبرگ(۱۹۹۹) و هربرت (۲۰۰۳) با کمی تغییر به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا مقاطع بافتی پارافینی در گرم خانه ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. لامها با استفاده از زایلین دپارافینه و با آب جاری شستشو داده شدند و سپس توسط الکل اتیلیک با درجات مختلف آبدهی شده دوباره با آب جاری به مدت ۲ دقیقه شستشو داده شدند بعد با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام ها در H_2O_2٪۳ درPBS برای غیر فعال شدن فعالیت پروکسیداز اندوژنوسی به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. لام ها در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. بعد لام ها جهت Antigen Retrieval با استفاده از بافر سیترات(10 nM,PH 6)درآوون میکرویو در حداکثر قدرت به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند و این کار سه بار تکرار شد. سپس لام ها را در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد تا خنک شدند. بعد در PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام ها با سرم ۵٪ گاوی در PBS به مدت 15 دقیقه برای دو بار شستشو داده شدند. سپس لام ها با آنتی بادی اولیه رقیق شد به نسبت $\frac{1}{200}$ درPBS حاوی ۱٪ BSA در اتاق مرطوب در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شبانه روز خوابانده شدند. لام ها در PBS برای ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. لام ها با آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با HRP رقیق شده در PBS به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه خوابانده شدند. لام ها در PBS به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. بعد جهت نمایان کردن واکنش آنتی ژن و آنتی بادی از محلول سوبسترای دی آمینوبنزیدین (DAB) در H2O2 به مدت ۶-۴ دقیقه استفاده شد. لام ها در آب جاری شستشو داده شدند. از محلول رنگ آمیزی زمینه هماتوکسیلین استفاده شد. سپس لام ها توسط الکل اتیلیک آبگیری وشفاف سازی شدند و با قرار دادن یک قطره چسپ سیتولوژی روی لام وگذاشتن لامل، عمل مونته کردن انجام و برای بررسی اسلاید ها از میکروسکوپ نوری استفاده شد.

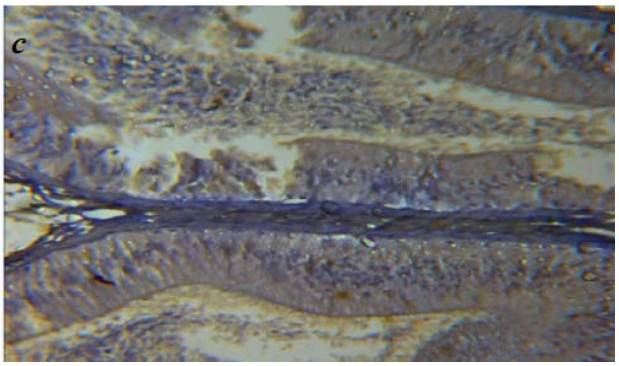
نتایج



شکل (a): مقطع عرضی بافت بیضه بز ۴ ساله، واکنش قهوه ای رنگ نشان دهنده واکنش ایمنوپراکسیداز آنتی ژن آروماتاز P450 در مراحل اسپرماتوژنز می باشد (۱۰۰×).



شکل (b): مقطع عرضی بافت بیضه بز ۴ ساله، واکنش قهواه ای نشان از واکنش ایمنوپراکسیداز علیه آنتی ژن آروماتاز P450 در سلول لایدیگ می باشد. (۴۰۰×).



شکل(c): مقطع عرضی بافت سر اپیدیدیم بیضه بز ۴ ساله که واکنش قهوه ای رنگ نشان از واکنش ایمنوپراکسیداز علیه آنتی ژن آروماتاز P450 در این بافت می باشد (۱۰۰×).

با بررسی نمونه های تهیه شده ظهور رنگ قهوه ای روشن تا تیره در مقاطع بافتی نشان از واکنش ایمنوپراکسیداز در نمونه های بافتی تهیه شده بود. این واکنش های رنگی در زنجیره اسپرماتوژنز(شکلa)، سلول لایدیگ(شکلb) و سر اپیدیدیم قابل مشاهده بود(شکلc). لذا می توان گزارش نمود که آنتی ژن آروماتاز P450 در این سلول ها قابل ردیابی و شناسایی می باشد. این نتایج با نتایج سایر محققین که حضور آروماتاز را در موش (جانولیس و همکاران۱۹۹۸)، اسب (سپاهوتار و همکاران۲۰۰۳) و انسان (کارپینو و همکاران ۲۰۰۴) موافق بود، اما با نتایج شمالز و همکاران(۱۹۹۸) و هنری میکیوگو(۲۰۰۶) که به ترتیب در میمون و خوک گزارش کرده بودند آروماتاز ضرورتاً در سلول‌های لایدیگ می‌باشد، مخالف بود. لازم به ذکر است که ما در این تحقیق برای راه اندازی آزمایش ایمنوهیستوشیمی از نمونه بیضه گوسفند به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بحث

تولید استروژن توسط سلول‌های زایای بیضه منبع موضعی استروژن در لوله‌های اسپرم ساز بوده که می‌تواند روی سلول‌های سرتولی یا سایر سلول‌های زنجیره اسپرماتوژنز را تحت تأثیر قرار دهد و نیز ممکن است از طریق کنترل فیدبک فعالیت سلول‌های لایدیگ را در تولید آندروژن را تنظیم کند. همچنین احتمال دارد بر روی ساختار یا فعالیت سلول‌های اپیتلیوم اپیدیدیم نقش داشته باشند(۷).

وجود گیرنده‌های استروژن در بیضه و اپیدیدیم نشان می‌دهد که اپیدیدیم یک بافت مورد هدف استروژن‌ها می‌باشد و اینکه ممکن است نقش تنظیم کننده در این نواحی داشته باشند.نقش مجاری وابران انتقال اسپرم از ریته تستیس به مجرای اپیدیدیم، باز جذب تقریباً ۹۰٪ مایع لومنی بوده که سبب تغلیظ اسپرم می‌گردد. ثابت شده است که استروژن‌ها با واسطه گیرنده‌های استروژنی باز جذب سدیم و انتقال غیر فعال آب را در مجاری وابران انواع موش تنظیم می‌کنند و همچنین مسئول حفظ ساختار سلول‌های راسی اپیدیدیم هستند. بنابراین پذیرفتنی است که استروژن‌ها در جذب مایعات این نواحی نقش دارند(۲ و۷).

به طور کلی نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که نه تنها آندروژن ها بلکه استروژن‌ها برای تمایز جنسی، حفظ اسپرماتوژنز ضروری هستند. در نتیجه، احتمال دارد آروماتازی که به طور موضعی در سلول‌های سرتولی و زنجیره اسپرماتوژنز تولید می‌شود، برای اسپرماتوژنز، مخصوصاً برای تکثیر اسپرماتوگونی و میوز و همچنین بلوغ اسپرم و یا اسپرمیوژنز ضروری باشد(۳).

منابع:

1-Arthur, C., Guyton, M., and Johne, E.H. 2003. Text Book of Medical Physiology. Book 11st. PP. 1256-1273.

2-Carpino, A., Romeo, F and Rago, V. 2004. Aromatase immunolocalization in human ductuli efferent's and iroximal ductus epididymis. J.Anatomical society of great Britain and Ireland. 204: 217-220

3-Carreau, S., Slaweck, W., and Isabelle, G.D. 2009. Aromatase, oestrogen and Human Male Reproduction. J. Biological Sciences. 365: 1571-1579.

4-Carreau, S., Sophie, L., Christelle, D., Isabelle, D. G., Barbara, B., and Sonia, B. Review. 2003. Aromatase Expression and Role of Estrogens in Male Gonad. J. Reproductive Biology and Endocrinology. 1(35): 1-6

5-Couse JF, Korach KS, 1999: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev 20:358-417

6-Hees, R.A., Carnes, K. 2004. The Role of Estrogen in Testis and the Male Reproductive Tract: a Review and Species Comparison. J. Animal Reproduction. 1(1): 5-30

7-Janulis, L., Janice, M. B., Rex, A.H., Sarah, J., Yoshio, O. 1998. Rat Testicular Germ Cells and Epididymal Sperm Contain Active P450 Aromatase. J. Journal of Andrology. 19:1

8- Lambard, S., Silander, D., Delalande., I., Galeraud- Denis, I., Bourguiba, S., and Carreau, S. 2005. Aromatase in Testis: Expression and Role in Male Reproduction. J. Steroid Biochemistry or Molecular Biology. 95: 63-69

9-Mutembei, H.M. 2006. Expression of Estrogen Receptor Alpha and Beta, Aromatase, Steroid Sulfates and Estrogen Sulfotransferase in Testes of Immature and Mature Boars. Book. 1st Edition 2006.

9- Sipahutar, H., Pascal, S., Safa, M., Bruno, P and Gilles-Eric, S. 2003. Immunolocalization of Aromatase in Stallion Leyding Cells and Seminiferouse Tubules. J. The Histochemical Society, Inc. 51(3): 311-318.

Immunohistochemical localization of aromatase in reproductive tract of male goat

Abstract

Cytochrome P450 aromatase is a terminal enzyme that catalyses the conversion of androgens into oestrogens. This study investigated the immunohistochemical localization of aromatase in male goat reproduction tract using a mouse polyclonal aromatase antibody as primary antibody and a HRP-conjugated, goat polyclonal anti-mouse IgG as secondary antibody. A strong immunoreaction was observed in leydig cells but also for the first time in spermatogenic stages and also in epithelial cell cytoplasm of both ductuli efferentes and proximal ductus epididymis. The present study for the first time in i male goat indicates that in addition to Leydig cells, spermatogenic stages and epithelial cells of ductuli efferentes and proximal caput epididymis express aromatase, suggesting that locally produced oestrogens may have a play a paracrine role in the regulation of spermatogenesis and in epididymal function.

Key words: ductus epididymis; oestrogens; goat reproduction tract; P450 aromatase.

تاثیر چندشکلی ژن کاپاکازئین روی صفات شیرواری گاوهای شیری هلشتاین استان اصفهان

خداویردی جوان سیاه بیگدیلو*[۱]، حمیدرضا رحمانی[۲]، محمدعلی ادریس[۳]، محمد خوروش[۴] و بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[۵]، رضا مرادی حاجی دولو[۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشیار، استاد و استادیار گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان،
۵- استاد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان، ۶- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان
* نویسنده مسئول: خداویردی جوان سیاه بیگدیلو، دانشگاه صنعتی اصفهان-دانشکده کشاورزی، javan.ulduz.1983@gmail.com

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر ژنوتیپ‌های ژن کاپاکازئین روی صفات تولیدی گاوهای شیری هلشتاین استان اصفهان بود. به منظور خونگیری، ۴۰۸ رأس گاو هلشتاین از پنج گاوداری استان اصفهان، که دارای اطلاعات شجره و فنوتیپی بودند انتخاب شدند. نمونه خون بوسیله لوله ونوجکت حاوی دو درصد EDTA از سیاهرگ دمی تهیه گردید. DNA هر نمونه به روش استخراج نمکی میلر و همکاران (۱۹۸۸) به دست آمد و برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد TAE (0.5x) استفاده شد. قطعه bp ۶۳۳ از ژن کاپاکازئین بوسیله دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد و جهت ژنوتایپ قطعه حاصل بوسیله آنزیم *Hind*III هضم گردید. سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۶۶۷، ۰/۳۰۱ و ۰/۰۳۲ در گله‌ها مشاهده گردیدند. فراوانی آلل A و B برابر ۰/۸۱۷ و ۰/۱۸۳ بود. آزمون کای مربع نشان داد که همه گله‌ها در تعادل هاردی وینبرگ قرار دارند. به منظور بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های این ژن با صفات تولیدی دوره اول شیردهی از نرم افزار آماری SAS رویه MIXED استفاده شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر ژنوتیپ روی درصد چربی و پروتئین معنی‌دار، ولی بین تولید شیر ۳۰۵ روز با ژنوتیپ ارتباطی مشاهده نشد طی این تحقیق گاوهایی که دارای ژنوتیپ AB بودند نسبت به افراد با ژنوتیپ AA درصد چربی و درصد پروتئین شیر بالایی داشتند (p<۰/۰۵).

واژگان کلیدی: ژن کاپاکازئین، ژنوتیپ، گاو هلشتاین، صفات تولیدی ، الکتروفورز.

مقدمه

در راستای افزایش تولیدات دام‌ها، هر چند تاکنون با استفاده از روش انتخاب از روی فنوتیپ نتایج مهمی بدست آمده، ولی بدلیل کاهش واریانس طی زمان، کارایی آن کاهش یافته همچنین باعث افزایش افت تولید ناشی از همخونی شده است. در حالی که با روش‌های اصلاح نژادی بر اساس انتخاب ژنوتیپی، می‌توان میزان این موارد را کاهش داد. ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی می‌تواند به عنوان ابزارهایی قوی برای اصلاح حیوانات استفاده گردد. یکی از کارآمدترین ابزار در این زمینه، نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌باشد که قابل توارث است. انتخاب به کمک نشانگرها (MAS[۱]) در اصلاح دام از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و استفاده درست از آن‌ها باعث افزایش سرعت و دقت در میزان بهبود ژنتیکی دام می‌گردد. انتخاب براساس نشانگرها در ارتباط با صفات با وراثت‌پذیری پائین، صفاتی که اندازه‌گیری آن‌ها مشکل است، صفات محدود به جنس و صفاتی که در ابتدای زندگی بروز نمی‌کند، در پیشرفت ژنتیکی بسیار موثر می‌باشد.

شیر گاو دارای ۳/۵٪ پروتئین بوده که ۸۰٪ آن کازئین‌ها (آلفا اس۱-، آلفا اس۲-، بتا- و کاپا-کازئین) و ۲۰٪ پروتئین‌های آب پنیر (بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتوآلبومین، ایمیونوگلوبولین، پروتئوس پپتون، آلبومین سرمی، لاکتوفرین و ترانسفرین) می‌باشد. پروتئین کاپاکازئین

[1]- Marker-Assisted Selection

حدود ۱۲٪ از کل کازئین شیر گاو را تشکیل می‌دهد. این پروتئین دارای ۱۶۹ اسید آمینه با وزن مولکولی ۱۹۰۰۰ دالتون می‌باشد. ژن این پروتئین در ناحیه q31-33 کروموزوم ۶ گاو قرار دارد. دوازده نوع آلل مختلف این ژن شناسایی شده که شامل: A، B، B2 ، C، E، F، F1 ، G، H، I، A1 و J می‌باشد (caroli, 2009). بیشتر جهش‌های نقطه‌ای (SNP[1]) که بیان می‌شوند در اگزون ۴ این ژن قرار دارند. از میان این آلل‌ها، آلل‌های A و B در گاوهای هلشتاین معمول بوده و بقیه آلل‌ها در نژادهای دیگر و با فراوانی پایین دیده می‌شوند. تفاوت آلل‌های A و B در ایجاد جایگزینی اسیدآمینه‌های موقعیت ۱۳۶ و ۱۴۸ پروتئین کاپاکازئین می‌باشد. آلل A دارای ایزولوسین و آلانین درموقعیت ۱۳۶ و ۱۴۸ بوده در حالی که آلل B دارای ترئونین و آسپارتیک اسید در این موقعیت‌ها می‌باشد (caroli, 2009). آلل‌های A و B کاپاکازئین روی تولید شیر، درصد و تولید چربی و پروتئین شیر و همچنین خواص فیزیکوشیمیایی و تکنولوژی شیر اثر دارند (Comin, 2007; Beata, 2008). بدلیل ارتباط بین صفات تولیدی گاوهای شیری هلشتاین با ژنوتیپ‌های ژن کاپاکازئین، به نظر می‌رسد که این ژن می‌تواند به عنوان ژن کاندید بر معیارهای اصلاح نژادی گاو شیری اضافه شود. بدلیل وجود تناقضات در نتایج تحقیقات صورت گرفته و جهت تعیین فراوانی آلل‌های این ژن در گاوهای هلشتاین استان اصفهان و بررسی احتمال وجود ارتباط آلل‌های A و B این ژن با صفات تولیدی از طریق پیوستگی با جایگاه‌های ژنی صفات کمی پژوهش حاضر صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

به منظور خونگیری، ۴۰۸ رأس گاو هلشتاین از پنج گاوداری استان اصفهان، که دارای اطلاعات شجره و رکورد از فنوتیپ بودند انتخاب شدند. نمونه خون طی تابستان سال ۱۳۸۹ به‌وسیله لوله ونوجکت حاوی دو درصد EDTA از سیاهرگ دمی تهیه گردید. DNA هر نمونه به روش استخراج نمکی میلر و همکاران (۱۹۸۸) به دست آمد و برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از دو روش اسپکتروفتومتری (نسبت جذب نور با طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز DNA استخراجی روی ژل آگارز ۰/۷ درصد TAE (0.5x) انجام شد. قطعه ۶۳۳ bp از ژن کاپاکازئین که شامل ۴ bp از انترون۳، ۵۱۷ bp از اگزون۴ و ۱۱۳ bp از انترون ۴ بود بوسیله دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) تکثیر شد. مواد هر واکنش شامل ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز، ۲ میکرولیتر PCR Buffer، ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۵۰ میکرومولار dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر و ۵۰ نانوگرم DNA در حجم کل ۲۰ میکرولیتر بود. برنامه حرارتی PCR شامل: ۹۴ درجه سانتیگراد جهت واسرشته سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. آغازگر رفت: '5-CAGCGCTGTGAGAAAGATGA-3' و برگشت: '5-CCCATTTCGCCTTCTCTGTA-3' بود. محصول PCR روی ژل آگاروز ۰/۷درصد TAE مشاهده شد. قطعات حاصل از PCR توسط آنزیم اندونوکلئاز *Hind*III (با توالی شناسایی '5AAGCTT3') در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برش داده شدند. در صورت وجود جهش در موقعیت ۴۲۳ که باعث تغییر در توالی آمینواسیدی پروتئین کاپاکازئین می‌شود برش ایجاد می‌شود و نشانگر آلل B خواهد بود. محصول هضم جهت شناسایی ژنوتیپ‌ها روی ژل آگاروز دو درصد TBE الکتروفورز شد. به منظور بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های این ژن با تولید شیر تصحیح شده، درصد چربی و درصد پروتئین دوره اول شیردهی از نرم افزار آماری SAS رویه MIXED استفاده شد و آنالیز طبق مدل آماری زیر انجام گرفت.

$$Y_{ijk} = M + G_i + HYS_j + b_1 \times Z_{ijk} + b_2 \times N_{ijk} + F_{ijk} + e_{ijk}$$

که در آن Y_{ijk}: صفات تولید شیر تصحیح شده، درصد چربی و درصد پروتئین شیر، M: میانگین کلی هر صفت، G_i: اثر ثابت ژنوتیپ (AA، AB یا BB)، HYS_j: اثر ثابت گله و سال فصل زایش، Z_{ijk} و N_{ijk} به ترتیب واریانس مشترک طول دوره شیردهی و روزهای باز می‌باشد. b_1 و b_2 نیز ضریب رگرسیون طول دوره شیردهی و روزهای باز می‌باشند. F_{ijk} اثر تصادفی پدر و e_{ijk} نیز خطا می‌باشد.

---

[1]- ***Single Nucleotide Polymorphism***

نتایج و بحث

قطعه ۶۳۳bp تکثیر شده توسط دستگاه ترموسایکلر بوسیله آنزیم *Hind*III هضم شده و هر دو نوع آلل A (بدون برش) وB (دو قطعه ۴۲۳bp و ۲۱۰bp) در گله‌ها مشاهده گردیدند. تعداد ژنوتیپ‌های AA، AB و BB در گله‌های مورد بررسی به ترتیب برابر ۲۷۲، ۱۲۳ و ۱۳ بدست آمد. فراوانی آلل A و B به ترتیب برابر ۰/۸۱۷ و ۰/۱۸۳ بود. این نتایج مشابه نتایج تحقیقات دیگر روی این نژاد می‌باشد. آزمون کای مربع نشان داد که همه گله‌ها در تعادل هاردی وینبرگ قرار دارند. نتایج آنالیز آماری نشان داد که اثر ژنوتیپ روی درصد چربی و پروتئین معنی‌دار بود ولی بین تولید شیر تصحیح شده ۳۰۵ روز با ژنوتیپ ارتباطی مشاهده نشد (جدول ۱). طی این تحقیق گاوهای که دارای ژنوتیپ AB بودند نسبت به افراد با ژنوتیپ AA درصد چربی شیر بالایی داشتند ($p<0/05$). همچنین ژنوتیپ AB نسبت به AA به طور معنی‌داری با درصد پروتئین بالا نیز ارتباط داشت و ژنوتیپ AA دارای کمترین درصد چربی و پروئتین بود. این نتایج مشابه گزارش هانگ و همکاران بود که گزارش کردند ژنوتیپ AA دارای کمترین درصد چربی و پروتئین می‌باشد (Ng-Kwai-Hang, 1986). همچنین نتایج ما گزارش بتا و همکاران را که بیان کردند ژنوتیپ AB با درصد چربی و پروتئین بالا ارتباط دارد را تائید می‌کند (Beata, 2008). اما سیاراس و همکاران ارتباطی بین ژنوتیپ این ژن با درصد چربی پیدا نکردند (Tsiaras, 2005). آلیاندری و همکاران (Aleandri, 1990) بیان کردند که ژنوتیپ BB به طور معنی‌داری باعث افزایش درصد پروتئین شیر شده ولی اثری روی درصد چربی شیر ندارد.

براساس تحقیق حاضر ارتباطی بین ژنوتیپ‌ها با صفت تولید شیر ۳۰۵ روز مشاهده نشد. این نتیجه مشابه نتایج سیاراس و همکاران (Tsiaras, 2005) و کومین و همکاران (Comin, 2007) بوده ولی با نتایج لین و همکاران و همچنین هانگ و همکاران که گزارش کردند ژنوتیپ AB نسبت به AA و BB با تولید شیر بالا ارتباط معنی‌داری دارد اختلاف دارد (Tsiaras, 2005).

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که ژن کاپاکازئین – بدلیل اثر ژنوتیپ‌های آن روی درصد چربی و پروتئین شیر– می‌تواند به عنوان ژن کاندید در برنامه های اصلاح نژادی جهت بهبود ترکیبات شیر استفاده شود.

منابع

1. Aleandri, R., L. G. Bultazzoni and J. C. Schneider. 1990. The Effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. Journal of Dairy Science, 73:241-255
2. Beata, S., N. Wojciech, and W. Ewa. 2008. Relations between Kappa-Casein Polymorphism (CSN3) and Milk Performance Traits in Heifer Cows. Journal of Central Europe Agriculture, 9(4): 641-644
3. Caroli, A. M., S. Chessa, and G. J. Erhardt. 2009. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. Journal of Dairy Science, 92: 5335–5352
4. Comin, A., M. Cassandro, S. Chessa, M. Ojala, R. Dal Zotto, M. De Marchi, P. Carnier, L. Gallo, G. Pagnacco, and G. Bittante. 2007. Effects of Composite β- and κ-Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. Journal of Dairy Science, 91:4022–4027
5. Ng-Kwai-Hang, K. F., J. F. Hayes, J. E. Moxley and H. G. Monardes. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. Journal of Dairy Science, 69: 22-26
6. Tsiaras, A. M., G. G. Bargouli, G. Banos, and C. M. Boscos. 2005. Effect of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. Journal of Dairy Science, 88: 327–334

جدول۱- میانگین حداقل مربعات (± اشتباه استاندارد) اثر ژنوتیپ‌های کاپاکازئین روی صفات تولیدی دوره اول شیردهی

ژنوتیپ	شیر تصحیح شده ۳۰۵ روز (kg)	درصد چربی (%)	درصد پروئتین (%)
AA	۹۵۶۳/۴۸^{a}±۱۶۴/۱	۳/۲۴^{a}±۰/۰۵۳	۲/۹۶^{a}±۰/۰۲۳
AB	۹۸۵۹/۱۶^{a}±۲۰۲/۵۸	۳/۳۵^{b}±۰/۰۶۵	۳/۰۱^{b}±۰/۰۲۸
BB	۹۲۶۰/۲۵^{a}±۳۹۴/۶	۳/۵^{ab}±۰/۱۲۷	۳/۰۴^{ab}±۰/۰۵۶

* میانگین‌ها که در هر زیر ستون با حروف متفاوت نشان داده شده است در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری با هم دارند.

Effect of Kappa-Casein Gene Polymorphism on Milk Production Traits of Isfahan Province Holstein Dairy Cows

Khodaverdi Javansiah Bigdilo[1*], HamidReza Rahmani[2], Mohammad Ali Edriss[3], Mohammad Khorvash[4] and Badraldin Ebrahim Sayed-Tabatabaei[5]

1, 2, 3, 4- Msc Student, Associate Professor, Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan Univercity of Technology, 5- Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan Univercity of Technology

*** Corresponding E-mail address: javan.ulduz.1983@gmail.com**

Abstract:

The objective of this research was to investigate the effect of kappa-casein gene polymorphism on milk production traits of Holstein dairy cows in Isfahan province. Blood samples obtained from 408 Holstein dairy cows of five dairy herd of isfahan province in summer of 2010 by venoject tube. All cows have pedegree and phenoypic data. DNA extracted by procedure that Miller *et. al.* (1988) suggested. Quality and quantity of obtained DNA tested by spectrophotometry and electrophoresis on %0.7 TAE agarose gel. The 633 bp of kappa casein gene fragment amplified using Eppendorf thermocycler and specific primers. For genotyping, the fragments digested by *Hind*III endonuclease enzyme showed three genotypes AA, AB, and BB by frequency 0.667, 0.301, and 0.032. A and B frequency was 0.817 and 0.183. All herds were in Hardy-Weinberg equilibrium for this locus. We used MIXED procedure of SAS for study effect of genotypes on milk production traits. Results showed that fat and protein percentage affected significantly by genotype but no significant effect of different genotypes on milk production was observed in this study. Animals with AB genotype have higher milk fat and protein percentage compared with AA animals ($p< 0.05$).

Keywords: Kappa Casein Gene, Genotype, Holstein Cows, Production Traits, Electrophoresis.

تشخیص موتاسیون ژن $DNA\text{-}PK_{CS}$ در اسب های نژاد عرب (اصیل) در ایران

رویا شهیدزاده عربانی[1*]، علیرضا ترنگ[2]، فرزام عجمیان[3]، علی حائری روحانی[4] ، رامین صیقلانی [2]
۱.گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
۲.مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور
۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
۴. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تهران
Roya.shahidzadeh@yahoo.com

چکیده : DNA-PKcs زیر واحد کاتالیتیکی آنزیم هسته‌ای "سرین / ترئونین پروتئین کیناز وابسته به DNA " به نام DNA-PK است و نقش حیاتی در نوترکیبی V(D)J دارد. بازآرایی موفق V(D)J در شناسایی آنتی ژن، مفید است و برای رشد و بقا لنفوسیت های B و T کاملاً ضروری است. ژن کد کننده آنزیم $DNA\text{-}PK_{CS}$ در اسب ها روی کروموزوم 9p12 قرار دارد. تحقیقات نشان می دهند که حذف ۵ جفت باز TCTCA در ژن $DNA\text{-}PK_{CS}$ اسب منجر به تغییرچارچوب در کدون ۳۱۵۵ و تولید کدون پایان زودرس و فقدان فعالیت کینازی DNA-PKcs می شود. کره‌هایی که نسبت به این جهش هموزیگوت باشند به بیماری نقص ایمنی شدید مرکب[1] (SCID) مبتلا می‌شوند. کره‌های مبتلا در بدو تولد سالم به نظر می‌رسند اما در طی ماه اول زندگی علائم بیماری در آنها ظاهر شده و به دلیل ابتلا به عفونت های ثانویه و عدم پاسخ ایمنی اختصاصی حداکثر تا ۵ ماه زنده می مانند. از آنجایی که این بیماری به صورت اتوزومی مغلوب به ارث می رسد، می‌توان با شناسایی ناقلین و اجرای مدیریت مناسب در برنامه های تولید مثلی از انتشار آلل معیوب در جمعیت جلوگیری کرد. ناقلین این بیماری فقط در اسب های نژاد عرب و دورگه های حاصل از آمیزش آنها مشاهده شده است . در این تحقیق ۱۳۸ اسب نژاد عرب ایرانی به کمک PCR آزمایش شدند که از بین آنها یک نفر ناقل و سایرین سالم تشخیص داده شدند. این آزمایش نشان می دهد که فراوانی این آلل در جمعیت مورد مطالعه بسیار کم است.

کلمات کلیدی : $DNA\text{-}PK_{CS}$ ، نقص ایمنی شدید مرکب (SCID) ، اسب نژاد عرب

مقدمه :

$DNA\text{-}PK_{CS}$ یک پروتئین کیناز سرین/ ترئونین هسته ای است که در فرآیند نوترکیبی برای تولید سیستم ایمنی کارکردی در مهره داران نقش حیاتی دارد. توانایی سیستم ایمنی در شناسایی محدوده ی وسیع آنتی ژن ها با ارائه گیرنده ها ی گوناگون بر سطح لنفوسیت های B و T ایجاد شده است. مناطقی از این گیرنده ها که مربوط به شناسایی آنتی ژن و اتصال به آن ها ست، به قدری متنوع اند که قادرند در یک لحظه صدها میلیون نوع از آنتی‌ژن ها را شناسایی کنند. تنوع گیرنده های آنتی ژنی به علت بازآرایی ، نوترکیبی، اسپیلاسینگ و یا جهش در تعداد زیادی از قطعات ژنی است که نوترکیبی V(D)J نامیده می شود(۱). نوترکیبی V(D)J در سلول های پستانداران توسط یک کمپلکس پروتئینی به نام DNA-PK متشکل از سه زیر واحد Ku_{70} ، Ku_{80} و$DNA\text{-}PK_{CS}$ انجام می شود. هترو دایمر Ku حسگری است که انتهاهای شکسته شده DNA را شناسایی کرده و اجازه می دهد که $DNA\text{-}PK_{CS}$ روی آنها عمل کند. DNA-PK در این وضعیت به یک پروتئین عملکردی تبدیل شده وگروه های فسفات را به چندین پروتئین پذیرنده متصل می کند تا سایر مراحل نو ترکیبی

1.Severe combined immunodeficiency

انجام شود (۲). ژن کد کننده آنزیم $DNA\text{-}PK_{CS}$ در اسب ها روی کروموزوم 9p12 قرار دارد(۳). در سال ۱۹۹۷ شاین و همکاران نشان دادند که حذف ۵ جفت باز TCTCA در این ژن منجر به تغییرچارچوب در کدون ۳۱۵۵ می شود. در اثر این جهش، ترجمه پروتئین در کدون ۳۱۶۰ متوقف و ۹۸۶ اسید آمینه منطقه C ترمینال از انتهای زنجیره حذف می گردد و در نهایت یک پروتئین ناپایدار تولید می شود (شکل۱). منطقهC ترمینال آنزیم مزبور شامل دمین کامل "فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز" است و خاصیت فسفوریله کردن پروتئین ها را دارد (۴).

شکل ۱. شکل بالا بخشی از توالی ژن نرمال و جهش یافته $DNA\text{-}PK_{CS}$ را نشان می دهد که ناحیه حذفی ۵ جفت باز در آن مشخص شده است.. در اثر این جهش تغییر چارچوب رخ داده وکدون پایان زودرس تشکیل می شود. منطقه حذفی در درون کادر و کدون پایان زودرس با خط نشان داده شده است.

این جهش در نژاد عرب خالص و دو رگه های حاصل از آمیزش آنها مشاهده شده است و افرادی که نسبت به این جهش هموزیگوت باشند به دلیل ناتوانی در تولید گیرنده های اختصاصی آنتی ژن ها، به بیماری نقص ایمنی شدید مرکب (SCID) مبتلا شده و در اثر ابتلا به عفونت های ثانویه می‌میرند(۵). نتیجه این بیماری فقدان لنفوسیت های B و T است، اما عملکرد نوتروفیل ها، ماکروفاژها، NK-cell ها و سیستم کمپلمان طبیعی است (۶). در سال ۱۹۷۳ اولین همتای حیوانی مبتلا به SCID در اسب ها (*Equus caballus*) شناسایی شد(۷). این اختلال در اسب های نژاد عرب محدود شده وراثت آن به صورت اتوزومی مغلوب است(۸). در امریکا در سال ۱۹۹۷ پس از ابداع آزمایش ژنتیکی توسط بایلی و همکاران با انتخاب تصادفی ۲۵۰ اسب عرب، فراوانی ناقلین ۸/۴ درصد گزارش شد(۹). در انگلستان در سال ۱۹۹۹، ۱۰۶ اسب عرب بررسی شدند و فراوانی حاملین ۲/۸ درصد تخمین زده شد(۱۰). در اسلووانی در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ روی ۶۳ اسب عرب خالص و ۱۹ اسب عرب دو رگه انجام گرفت ناقلی شناسایی نشد(۱۱). در سال ۲۰۰۶ در رومانی، ۶۰ اسب عرب آزمایش شدند و هیچکدام ناقل نبودند (۱۲). در ایران در سال ۲۰۰۶، روی نمونه های خون ۱۲۰ اسب عرب ایرانی که از دو منطقه خوزستان و کردان جمع آوری شده بودند، آزمایش انجام گرفت که همه سالم گزارش شدند(۱۳).

مواد و روش ها :

در این تحقیق خون گیری از ۱۳۸ اسب عرب ایرانی انجام شد. نمونه ها از هفت استان گردآوری شدند و DNA آنها توسط کیت DNP™ Kit (سیناژن ، تهران) استخراج شد. جهت سنجش کیفیت و کمیت استخراج، نمونه های حاصل روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بار گذاری و به کمک نانودراپ بررسی شدند. شناسایی ناقلینِ آلل جهش یافته با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آن منطقه و تکنیک AS PCR انجام شد. برای هر اسب دو واکنش PCR جداگانه انجام شد. آغازگر رفت در هر دو واکنش یکسان بود. یک واکنش دارای آغازگر برگشت آلل نرمال بود و محصولی به طول ۱۶۹ جفت باز تولید می کرد و واکنش دیگر دارای آغازگر برگشت آلل جهش یافته بود و محصولی به طول ۱۶۶ جفت باز تولید می کرد . توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

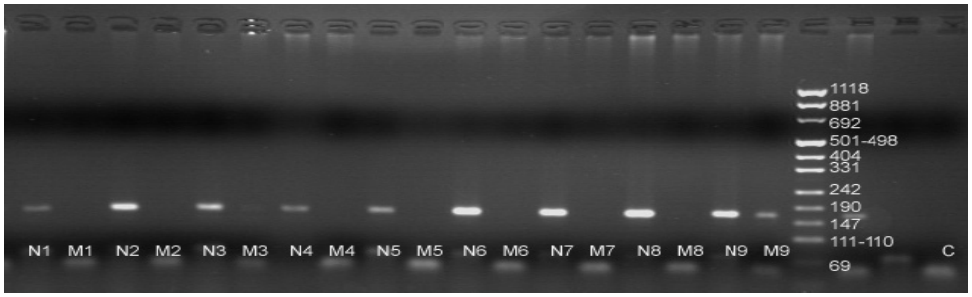
جدول۱- آغازگرهای تکثیر دهنده آلل نرمال و جهش یافته ژن SCID

نام	توالی '3→'5
SCID-Forward	TGTTGCAAAAGGAGACAGAAT
SCID- Reverse N	AGAGTTTAAGGGGAATTCTCTG
SCID- Reverse M	TAGTTTAAGGGGAATTCTCTGAA

برای اطمینان از درستی و تکرار پذیری محصولات PCR ، دو تکرار انجام شد. غلظت DNA در هر واکنش بین ۲۵ تا ۱۰۰ نانو گرم در هر میکرولیتر بود. هر مخلوطPCR ، با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل PCR Buffer 10X، dNTPs ۲ میلی مولار ، کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، آنزیم Taq (۵U/µl) و پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکو مول بر میکرولیتر بود. برنامه PCR شامل ۳۳ چرخه، شامل واسرشته سازی با دمای ۹۴ درجه سانتیگرادبه مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. از دستگاه ترمو سایکلر Gene Amp مدل 9700 بهره گرفته شد. فراورده های PCR بر روی ژل آگارز با خلوص بالا و غلظت ۲ درصد (اینویتروژن) بارگذاری و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. از الگوی نواری به دست آمده با دستگاه ثبت ژل عکس برداری شد. جهت اطمینان از نتیجه آزمایش تعدادی از نمونه ها توالی یابی شدند.

نتایج و بحث : در این تحقیق برای هر DNA ژنومی دو واکنش PCR انجام گرفت و برای هر فرد دو محصول PCR بدست آمد. در افراد سالم هموزیگوت فقط یک باند bp ۱۶۹و در افراد هتروزیگوت دو باند bp ۱۶۹ و bp ۱۶۶ تشکیل شد. در میان ۱۳۸ اسب عرب یک ناقل شناسایی شد (شکل۲).

با توجه به اهمیت اقتصادی پرورش اسب برای کشورهای پرورش دهنده و بالا بودن ارزش اسب‌های اصیل، تولد یک کره اسب مبتلا میتواند ضررهای اقتصادی زیادی را وارد سازد. اسب های ناقل فنوتیپ نرمال دارند و هیچ عواقب منفی در سلامتی و یا فعالیت نشان نمی دهند، اما با احتمال ۵۰ درصد می توانند آلل معیوب را به زاده های‌شان انتقال دهند و ازآنجایی که این بیماری به صورت اتوزومی مغلوب به ارث میرسد در صورت آمیزش دو اسب ناقل ۲۵ درصد احتمال تولد کره مبتلا وجود دارد. بنابراین اگر ناقلین با آزمایشات ژنومی شناسایی شوند، اجرای برنامه‌های پرورشی و اصلاح نژادی در جهت حذف این بیماری کارآیی بیشتری خواهد داشت.



شکل ۲: یک ژل آگارز اینویتروژن ۲٪ و فراورده های PCR . شاخص به کار رفته pUC Mix Marker 8 است. هر دو ستون کنار هم مربوط به یک اسب می باشد و ستون اول مربوط به هر فرد که با حرف N نشان داده شده فراورده PCR آن را با آغازگر نرمال و ستون دوم که با حرف M نشان داده شده فراورده PCR همان فرد را با آغازگر جهش یافته نشان می دهد. فرد شماره ۹ ناقل و سایر افراد سالم می باشند. ستون C شاهد آب (کنترل منفی) می باشد.

درگذشته تولد کره بیمار مبتلا به SCID و بررسی تست نتّاج تنها راه شناسایی ناقلین بود. امروزه این بیماری از جمله بیماری‌های ژنتیکی مغلوبی می‌باشد که مکانیسم نقص ژنتیکی ایجاد کننده آنها مشخص شده است. کشف علت ژنتیکی این بیماری نشان داد حذف ۵ جفت باز در ژن کد کننده آنزیم $DNA\text{-}PK_{CS}$ عامل اصلی بیماری است و در نتیجه اطلاعاتی را جهت انجام یک آزمایش ژنتیکی فراهم کرد. مطالعات گسترده ای روی تشخیص و شناسایی بیماری های ژنتیکی مغلوب در اسب در کشورهای مختلف صورت گرفته است در گزارش شرکت Vet Gen امریکا آمده است: SCID تقریبا در تمام گروه های خطوط خونی مدرن ظاهر شده است و به نظر می رسد که از طریق تولید مثل در سراسر جمعیت توزیع شده باشد. این شرکت از زمان شروع آزمایش ژنتیکی در سال ۱۹۹۷ تا ۲۴ مارس ۲۰۱۰ ، ۹۵۴۴ اسب را آزمایش کرده است که ۱۶/۵ ٪ آنها حامل و ۳۴٪ درصد از آنها به SCID مبتلا بودند (۱۴). در پژوهشی که قبلاً در ایران انجام شد همه نمونه ها سالم گزارش شدند. این اولین گزارش از وجود آلل جهش یافته $DNA\text{-}PK_{CS}$ و ناقل بیماری SCID در جمعیت اسب های نژاد عرب ایرانی است. بررسی بیشتر جمعیت اسب های عرب و زاده های دو رگه آنها پیشنهاد می‌شود.

منابع :

1. Perryman, L.E., 2004. ANIMAL MODELS Molecular Pathology of Severe Combined Immunodeficiency in Mice, Horses, and Dogs. Veterinary Pathology. 41:95–100.
2. Lewin, B., 2008. Genes IX. Louis C, USA , Jones and Bartlett Publisher. Mississauge, Ontario, Canada, p.892.
3. Bailey, E., Reid, R.C., Lear, T.L., Skow, L.C., Mathiason, K., , McGuire, T.C., 1997. Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; synteny and FISH mapping to ECA9. Animal Genetics. 28: 268-273.
4. Shin, E.K., Perryman, L.E., Meek, K., 1997a. A kinase-negative mutation of DNA-PKcs in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. The Journal of Immunology. 158: 3565-3569.
5. Wiler, R,. Leber, B., Moore, B.B., VanDyk, L.F., Perryman, L.E., Meek, K., 1995. Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. Proceeding of the Natlional Academy of Science. 92: 11485-90.
6. Lunn, D.P., McClure, J.T., Schobert. C.S., Holmes, M.A., 1995. Abnormal patterns of equine leucocyte differentiation antigen expression in severe combined immunodeficiency foals suggests the phenotype of normal equine natural killer cells. Immunology. 84: 495-499.
7. McGuire, T.C., Poppie, M.J., 1973Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horses: a Primary Combined Immunodeficiency Disorder. Infection And Immunity. 8: 272-277.
8. Perryman, L.E., Torbeck, R., 1980. Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance. Journal of the American Veterinary Medical Association.176: 1250–1251.
9. Bernoco, D., Bailey, E., 1998. Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA. Animal Genetics. 29: 41-2.
10. Swinburne, J., Lockhart, L., Scott, M., Binns, M.M., 1999. Estimation of the prevalence of severe combined immunodeficiency disease in UK Arab horses as determined by a DNA-based test. Veterinary Record 1999. 145:22-23.
11. Zavrtanik, J., Mesarič, M., Majdič, G., 2005. Genetic monitering for sever combined immunodeficiency carriers in horses in Slovenia. Slovenian Veterinary Research. 42: 37-41.
12. Georgescu, S.E., Condac, E., Dinischiotu, A., Costache, M., 2006. Molecular basis and diagnostication of SCID in Arabian Horses. Roumanian Biotechnological Letters. 11: 2875-2876.
13. Seyedabadi, H.R., Afraz, F., Banabazi, M.H., Emrani, H., 2006. Identification of SCID carriers among Iranian Arab horses using a test based onPCR for DNA-PKcs gene. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, 2006, Belo Horizonte, MG, Brasil.
http://www.vetgen.com/equine-references.html. ©2010 AHA

Identification of DNA-PK$_{CS}$ mutasion in Arabian horses (Asil) in iran

Shahidzade, R., Tarang, A.R., Ajamiyan. F., Haeri Rohani. A.,

DNA-PKcs is the catalytic subunit of a nuclear DNA-dependent serine/threonine protein kinase called DNA-PK and have a critical role in V(D)J recombination. Successful V(D)J rearrangement is useful in terms of antigen recognition and it is absolutely required for the development and survival of B and T cells. Equuin DNA-PK$_{CS}$ is located on chromosome 9p12. Researches show that deletion of a five-base pair TCTCA, resulting a mutation in frame-shift at codon 3155 and premature stop codon. Foals that are homozygous for mutation allele are affected SCID (Severe combined immunodeficiency). A foals affected by SCID appears to be healthy at birth, but during the first month symptoms appear in them, and because of opportunistic infections dies after 5 months.Since the disease inherits as autosomal recessive, transmission of defect allele could be prevented by carrier recognition and a proper management in reproductive program. Currier only were found in arab horses and hybrid resulted from mate of arab and other race. In this study, 138 Persian arab horses were tested by PCR. Only one of them was recognised as infected and others were clean. This experiment demonstrates that frequency of allele in selected population was very low.