مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه چندشکلی اگزون 4 ژن IGF-I و ارتباط آن با صفات رشد و تولید شیر در بز نژاد مهابادی به روش PCR-SSCP

لیلا قره داغی*[1]، حسین مرادی شهربابک[2]، مصطفی صادقی[2]، مهدی گنج خانلو[2]

[1و2] به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام و استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج دانشگاه تهران،کرج، ایران.

تاریخ دریافت: 1391/08/27، تاریخ پذیرش: 1392/04/26

چکیده

پژوهش حاضر با هدف مطالعه ارتباط چند شکلی ژن IGF-I با صفات رشد و تولید شیر در بزهای نژاد مهابادی به روش PCR-SSCP انجام شد. در این مطالعه از 89 رأس بز و 51 رأس بزغاله نژاد مهابادی موجود در مزرعه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، واقع در کرج با استفاده از لوله‌های خلاء حاوی EDTA از سیاهرگ وداج خونگیری شد. استخراج DNA از خون با روش نمکی بهینه یافته انجام شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای تکثیر قطعه 365 جفت بازی اگزون 4 ژن IGF-I صورت گرفت. برای تعیین چندشکلی نمونه‌ها الکتروفورز محصولات PCR پس از تک رشته‌ای شدن قطعات (روش SSCP) روی ژل پلی‌اکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد. نتایج بیانگر وجود دو الگوی باندی متفاوت بود که فراوانی الگوهای ژنوتیپی 1 و 2 به ترتیب 65/7 ٪ و 34/3٪ بود. آنالیز آماری نشان داد که صفت تولید شیر ارتباط معنی‌داری با الگوهای باندی دارد (P<0.05)، ولی اثر ژنوتیپ-های IGF-I بر درصد چربی، پروتئین و شمار سلول‌های بدنی معنی‌دار نبود (P<0.05)، همچنین آنالیز داده-های مربوط به صفات رشد، نشان داد که ژنوتیپ‌های مختلف IGF-I، اثر معنی‌داری بر وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه، مقدار خوراک مصرفی 80 روز و وزن نهایی بزغاله‌ها نداشت.

کلمات کلیدی: *ژن IGF-I، چندشکلی، PCR-SSCP ، بز نژاد مهابادی.*

*1 نویسنده مسئول: لیلا قره داغی تلفن: 09191886003 E-mail: leilagharedaghi@ut.ac.ir

مقدمه

بز قادر به زندگی در هر منطقه آب و هوایی است و می‌تواند مواد فیبری با کیفیت پایین را استفاده کند و به فرآورده‌های حیوانی تبدیل نماید. یکی از اهداف اصلی پرورش بز، تولید شیر و محصولات لبنی است. شیر بز به علت کوچک بودن اندازه گویچه‌های چربی موجود در آن زود هضم شده و باعث می‌شود کودکان نسبت به آن حساسیتی نداشته باشند، قند شیر بز نسبت به سایر شیرها کمتر است و لذا باعث عدم مقاومت به لاکتوز در انسان نمی شود، و پنیر حاصل از آن دارای بهترین کیفیت است (Khaldari, 2008). درصد چربی و پروتئین شیر بز به شیر انسان نزدیکتر است و عمل هموژناسیون به طور طبیعی در شیر بز در پستان صورت می‌گیرد (Valizadeh, 2011).

هورمون‌های رشد شبه‌انسولینی (IGF) مواد پروتئینی با وزن مولکولی کم هستند که در پاسخ به هورمون رشد آزاد شده وهورمون رشد اثرات خود را از طریق این عوامل القا می‌کند. به فاکتور-های رشد شبه انسولینی سوماتومدین نیز گفته می‌شود و به دلیل اینکه این مواد واسطه عمل هورمون رشد هستند به نام هورمون رشد سوماتوتروپ نیز شناخته می‌شوند. این فاکتورها اثراتی شبیه انسولین بر سلول‌ها دارند ولی برخلاف انسولین در مایعات بیولوژیکی تقریبا 98٪ آن به یکی از 6 پروتئین باند شونده (IGFBP) وصل می شود (Zhou yinli, 2007). سیستم سیگنال دهنده‌ی IGFs[1] شامل IGF-I، IGF-II، گیرنده‌ی IGF-I، گیرنده‌ی IGF-II و شش پروتئین باند شونده (IGFBPI~IGFBP-6) نقش مهمی در توسعه، رشد و تولیدمثل پستانداران ایفا می‌کنند (Duan *et al.*, 2005). IGF-I پلی پپتید تک زنجیره‌ای با سه پل دی-سولفید دارای وزن مولکولی 7649 دالتون، و شامل 70 اسیدآمینه می باشد که هورمون رشد مترشحه از غده هیپوفیز عامل اصلی تحریک آزادسازی آن است (Renderknecht & Humbel, 1978). هپاتوسیت‌ها یا سلول‌های کبدی محل اولیه و اصلی ترشح IGF-I به عنوان یک هورمون اندوکرین می‌باشد(Combes *et al.*, 1997)، ولی در بعضی بافت‌های محیطی نظیر استخوان نیز ممکن است آزادسازی سوماتومدین-ها به صورت اوتوکرین/ پاراکرین تحت تاثیر عوامل یا فاکتورهای موضعی صورت گیرد (Yee, 1994). نقش این هورمون در رشد بافت های مختلف بدن (سلول های ماهیچه، غضروف و استخوان)، تحریک سنتز پروتئین، افزایش متابولیسم قندها و چربی ها در بدن، محرک تقسیم میتوز، تحریک ازدیاد سلول های اپیتلیال (مخاطی) و استرومال غده پستانی، سنتز و بیان ژن کازئین و حمل گلوکز شناخته شده است

[1] – Insulin-like growth factor

(Zhou Yinli, 2007). علاوه بر این IGF-I سنتز شیر و تکامل غده پستانی را در طول دوره‌ی شیردهی تسهیل می‌کند. مطالعات نشان دادند که IGF-I یک محرک قوی برای ماندگاری سلول‌ها، جلوگیری از مرگ و میر برنامه ریزی شده‌ی سلول[1]ها و بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند مرگ و میر برنامه ریزی شده‌ی سلول‌های غده پستانی شناخته شده است، همچنین بیان ژن‌هایی که در انتقال و متابولیسم آمینواسیدها و همچنین بیوسنتز و پایداری پروتئین‌ها درگیر هستند را تنظیم می-کند.(Zhou Yinli, 2007). ژن IGF-I دارای 6 اگزون و 5 اینترون است و در73/5 سانتی مورگانی کروموزوم 5 نقشه یابی شده است (Wibowo *et al*., 2008).

در مطالعه چند شکلی ناحیه 5´-Flanking ژن IGF-I با استفاده از روش PCR-SSCP در ده نژاد بز چینی، نتایج حاصل از توالی یابی این ناحیه حاکی از حذف دو نوکلئوتید(CA) و همچنین وجود دو SNP به ترتیب در نوکلئوتید-های 1637(A به G)،1640(T به C) بودکه فقط در یکی از نژادها ارتباط معنی داری با چندقلوزایی مشاهده شد (P<0.05)، (Ping- Qiong *et al*., 2011). در مطالعه دیگری روی همان ناحیه ژن IGF-I در گوسفند نژاد بلوچی 3 الگوی باندی متفاوت مشاهده شد و تفاوت معنی‌داری در متوسط افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری بین افراد با ژنویپ AB وBB مشخص شد (P<0.05) و افراد با ژنوتیپ AB در مقایسه با افراد ژنوتیپ‌های دیگر بالاترین متوسط افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری را نشان دادند (P<0.05) (Tahmoorespur *et al*., 2009). در بررسی اگزون 4 ژن IGF-I در سه نژاد بومی بز در چین با استفاده از روش PCR-SSCP و توالی‌یابی DNA، دو جهش در نوکلئوتیدهای 1617 (G>A) و1620(C>T) گزارش شد که از نوع جهش‌های خاموش بودند. برای اولین بار این SNP ها در بز گزارش شد که به طور معنی‌داری با صفت تولید کشمیر مرتبط بود، افراد دارای 4 نوع ژنوتیپ بودند که ژنوتیپ AA به طور معنی-داری تولید کشمیر پایین‌تری نسبت به ژنوتیپ AB داشتند (P<0.05). وزن بدن ژنوتیپ AC به طور معنی‌داری بالاتر از ژنوتیپ BB بود (p<0.05) (Quing *et al*., 2011). در مطالعه چندشکلی اگزون 4 ژن IGF-I با روش PCR-RFLP در دو نژاد بز چینی، ارتباط معنی‌داری بین تنوع ژنتیکی در این ناحیه با تولید کشمیر، قطرالیاف و وزن بدن بز مشاهده نشد (Wu-Jun *et al*., 2010).

هدف از انجام پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی‌های موجود در اگزون 4 ژن IGF-I و برآورد میزان فراوانی الگوهای ژنوتیپی مختلف این جایگاه و بررسی ارتباط بین چندشکلی‌های این جایگاه ژنی با صفت تولید شیر در بزهای نژاد مهابادی و صفات رشد در بزغاله‌ها با استفاده از تکنیک PCR-SSCP بود.

[1] –apoptosis

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از 89 رأس بز و 51 رأس بزغاله نژاد مهابادی موجود در مزرعه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در کرج، با استفاده از لوله‌های خلاء حاوی EDTA از سیاهرگ وداجی خونگیری انجام شد. استخراج DNA با روش نمکی تغییر یافته صورت گرفت. برای تکثیر قطعه 326 جفت بازی ژن IGF-I از آغازگرهای رفت و برگشت که توسط نرم افزار Vector NTI طراحی شد، استفاده گردید که این آغازگرها توسط شرکت متابیون سنتز شد. توالی آغازگرها به شرح زیر بود: توالی آغازگر رفت: 5`-ATT TGA ACA GAC AAG CCC AC-3` و توالی آغازگر برگشت 5`- TTT GAC ACT ATG AGC CAG AAG-3` جهت بهینه سازی واکنش PCR برنامه‌های حرارتی مختلفی استفاده شد. ولی در نهایت برنامه حرارتی زیر با 35 چرخه، ایده آل ترین شرایط برای تکثیر ژن IGF-I تشخیص داده شد. واسرشت سازی اولیه DNA به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی گراد، واسرشت سازی DNA به مدت 30 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به DNA به مدت 30 ثانیه در دمای 61/4 درجه سانتی گراد، بسط DNA به مدت 30 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی گراد و بسط نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد انجام شد. واکنش PCR بوسیله مواد مخصوص PCR شرکت GENNET به شرح زیر با غلظت نهایی واکنش 25 میکرولیتر انجام شد: کلرید منیزیم (MgCl2) 1/5 میکرولیتر (1/5mM/µL)، بافر (PCR buffer) 2/5 میکرولیتر (1X)، بازهای آزاد دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) 2 میکرولیتر (mM/µL 0/8)، آغاز گر رفت 1 میکرولیتر (0/5 pm/µL)، آغازگر برگشت 1 میکرولیتر (0/5 pm/µL)، آنزیم DNA پلی مراز Taq 0/3 میکرولیتر (unit/-0/25 µL)، DNA 2 میکرولیتر، آب دیونیزه (dH2O) 14/7 میکرولیتر.

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 2 درصد، با ولتاژ 92 ولت، به مدت نیم ساعت صورت گرفت. برای رنگ آمیزی ژل آگارز از DNA Safe Stain استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز از دستگاه اشعه ماورای بنفش برای بررسی قطعه تکثیر شده استفاده شد. به منظور انجام واکنش SSCP، محصول PCR تکثیر شده، با استفاده از بافر SSCP (فرمامید[1] 99٪ (1960 میکرولیتر)، 0.5m اتیلن دی‌آمید ترا استیک اسید[2] (40 میکرولیتر)، برومونول‌بلو[3] (0.025%)، زینول‌سیانید[4] (0.25)) به نسبت 4 به 16 به مدت 10 دقیقه در دمای 96 درجه تک رشته ای شدند که بلافاصله پس از این مرحله در داخل یخ قرار گرفتند. الکتروفورز محصولات تک

[1]- Formamid

[2]- EDTA

[3] -Bromophnol blue

[4] -Xyleno cyanol

رشته‌ای، روی ژل پلی‌اکریل‌آمید 10 درصد ، با ولتاژ300 به مدت 24 ساعت انجام و رنگ آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه گذاری و ظهور صورت گرفت.

پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی و تعیین ژنوتیپ تمام نمونه‌ها، شمارش ژنوتیپ‌ها و تعیین فراوانی ژنوتیپ‌ها با استفاده از شمارش مستقیم انجام گرفت.

در این تحقیق پس از تعیین ژنوتیپ دام‌ها برای جایگاه مورد بررسی این اطلاعات به همراه داده های مربوط به تولید شیر، درصد پروتئین شیر، درصد چربی شیر و شمارش سلول‌های بدنی وارد نرم‌افزار Excel گردید و بعد از نرمال-کردن داده‌ها (روش لگاریتم‌گیری) از نرم‌افزار9.1 SAS و رویه Mixed (به دلیل رکوردگیری تکراری برای هر حیوان) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. در این آزمایش اثر ژنوتیپ‌های ژن IGF-I به عنوان عامل ثابت تاثیرگذار بر صفات مورد مطالعه در مدل قرار داده شد به این صورت که الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده‌ی این ژن (2 الگو)، اثر سن حیوان هنگام زایش، سال زایش، و ماه رکوردگیری به عنوان عوامل ثابت و اثر صفت تعداد روزهای شیردهی به عنوان عامل کواریت، همچنین اثر حیوان به عنوان عامل تصادفی در مدل قرار داده شد. معادله مدل به شکل زیر بود.

$$Y_{ijklmn} = \mu + A_i + G_j + Y_k + M_l + b\,(D_{ijklmn} - \overline{D}) + Animal_n(G_i) + e_{ijklmn}$$

Y_{ijklmn}: هریک از مشاهدات مربوط به مقدار شیر، درصد چربی، درصد پروتئین، شمار سلول‌های بدنی، μ: میانگین، G_j: اثر j امین ژنوتیپ (IGF-1)، A_i: اثر i امین سن حیوان هنگام زایش، Y_k : اثر k امین سال زایش، M_l: اثر l امین ماه رکوردگیری، $Animal_n(G_i)$ n: اثر تصادفی حیوان، b: ضریب تابعیت صفت مورد نظر از تعداد روزهای شیردهی، D_{ijklmn}: تعداد روزهای شیردهی، $\overline{D}$: میانگین تعداد روزهای شیردهی، e_{ijklmn}: اثر عوامل باقی‌مانده.

برای تجزیه واریانس اثر چندشکلی ژن IGF-I بر صفات رشد، داده‌های مربوط به وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه، میانگین مقدار خوراک مصرفی 80 روز و تاریخ تولد مربوط به 51 بزغاله ی مورد مطالعه، پس از تعیین ژنوتیپ دام‌ها و ثبت در نرم افزار Excel، با استفاده از نرم افزار SAS با رویه GLM انجام شد. در این مطالعه اثر ژنوتیپ، سال تولد، ماه تولد و سن دام هنگام زایش به عنوان عوامل ثابت، همچنین وزن مادر هنگام زایش و وزن تولد بزغاله به عنوان عامل کواریت در معادله مدل قرار داده شد.

دو معادله مدل برای تجزیه واریانس مربوط به صفات رشد به کار گرفته شد که به صورت زیر می‌باشند.

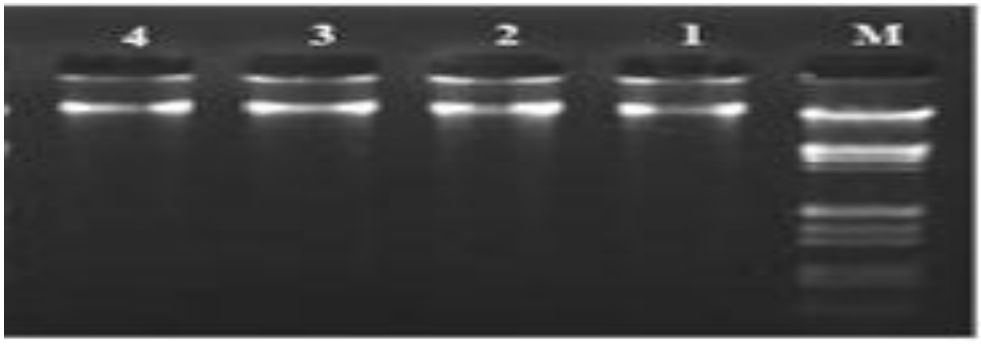
$$Y1_{ijklm}=\mu+G_i+Y_j+M_k+Al+b_1\,(W_{ijklm}-\overline{W}) + e_{ijklm}$$

$$Y2ijklmn=\mu+Gi+Yj+Mk+Al+b1\,(W_{ijklm}-\overline{W}) + b2\,(Wijklmn - \overline{W}_n) + eijklmn$$

$Y1_{ijklmn}$= هر یک از مشاهدات مربوط به وزن تولد و میانگین خوراک مصرفی 80 روز، هریک از مشاهدات مربوط به وزن از شیرگیری، Y_{2ijklm}= وزن نهایی و میانگین خوراک مصرفی 80 روز، μ: میانگین صفت در جامعه، Gi=اثر i امین ژنوتیپ (IGF-1)، Yj= اثر j امین سال تولد، M_k= اثر k امین ماه تولد، A_l= اثرl امین سن مادر هنگام زایش، W_{ijklm}=وزن ijklm امین مادر هنگام زایش، $\overline{W}$ = میانگین وزن مادر هنگام زایش، b_1 =ضریب تابعیت Y روی W (وزن دام هنگام زایش)، W_{ijklmn}= اثر ijklmn امین وزن تولد، b_2=ضریب تابعیت Y روی W (وزن تولد بزغاله-ها)، $\overline{Wn}$ = میانگین وزن تولد بزغاله ها، e_{ijklmn}= اثر عوامل باقیمانده.

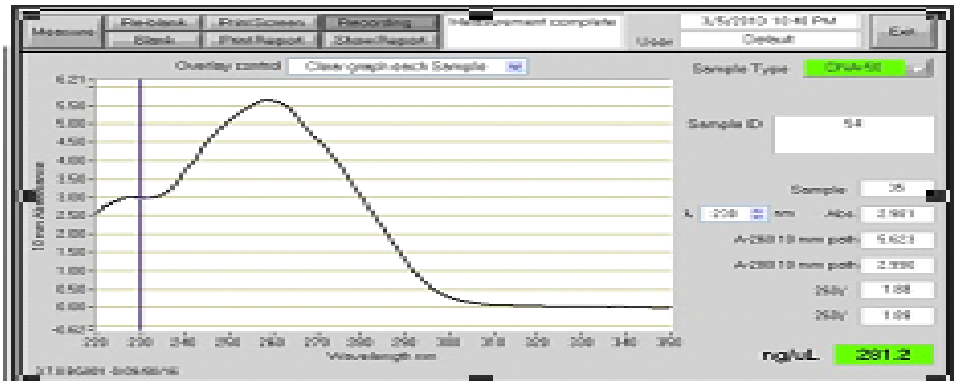
نتایج و بحث

با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز 1 درصد، کمیّت و کیفیت DNA استخراج شده مورد تایید قرار گرفت (شکل 1 و 2).



شکل1-کیفیت نمونه های DNA بر روی ژل آگارز.

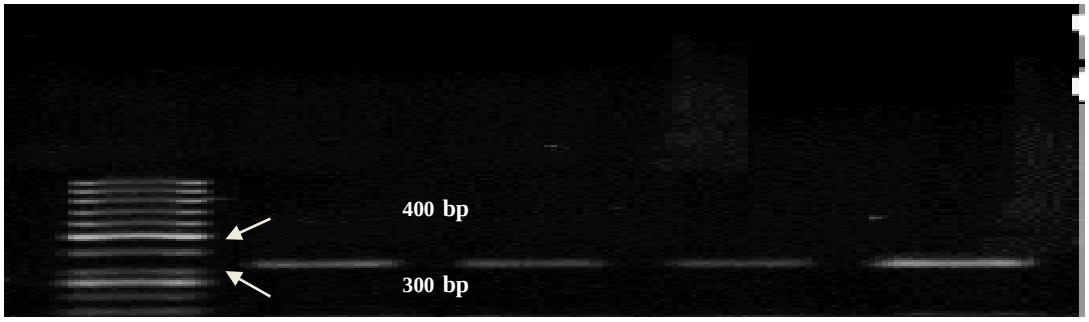
Figure 1- The quality of DNA samples on agarose gel.



شکل 2- تعیین کمیت و کیفیت DNA با دستگاه نانودراپ.

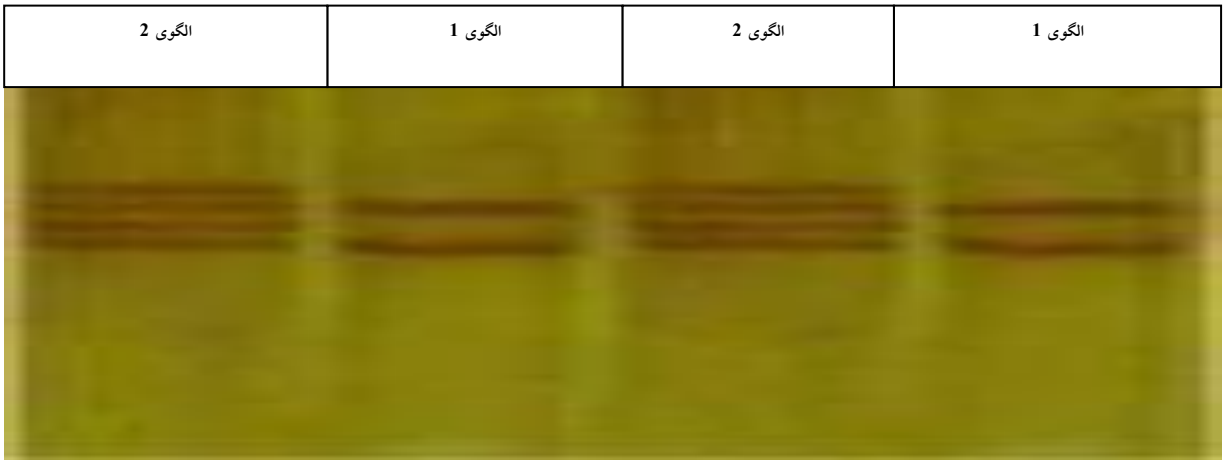
Figure 2- Determination of DNA quality by Nonodrop.

قطعه 326 جفت بازی ژن IGF-I، طی واکنش PCR تکثیر (شکل 3) و در مرحله بعد، از روش SSCP برای شناسایی تنوع در قطعه تکثیر شده استفاده شد. نتایج حاصل از SSCP و رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید بیانگر دو الگوی باندی متفاوت بود که در شکل4 مشاهده می‌شود. و فراوانی الگوهای 1 و 2 برابر با 65/71٪ و 34/29٪ بود. همانطور که Wu-Jun *et al.*, (2010) و Quing *et al.*, (2011) در مطالعه اگزون 4 ژن IGF-I در نژادهای مختلف بز چینی، چندشکلی در این ناحیه را گزارش کرده بودند، طبق انتظار مطالعه ناحیه مذکور در بز نژاد مهابادی نیز دارای چندشکلی می‌باشد. جدول 1 آماره‌های توصیفی مربوط به رکورد تولید شیر، درصد پروتئین، درصد چربی و شمار سلول‌های بدنی را نشان می‌دهد. بالا بودن ضریب تنوع در صفات مورد مطالعه می‌تواند به دلیل رکوردگیری در دوره‌های مختلف شیردهی هر کدام از حیوانات باشد.



شکل3- تکثیر اختصاصی قطعه 326 bp ژن IGF-1 بر روی ژل آگارز.

Figure 3- PCR product analyzed by electrophoresis on 2% agarose gel (326bp).



شکل 4- الگوهای حاصل از الکتروفورز محصولاتSSCP اگزون 4 ژن IGF-1 در بزهای مهابادی.

Figure 4- SSCP pattern of IGF-1 gene in Mahabadi goats.

جدول 1- آماره‌های توصیفی صفات تولید شیر، درصد چربی، درصد پروتئین و شمار ش سلول‌های بدنی شیر.

Table 1- Descriptive statistical of milk production, fatty percent, protein percent and somatic cell count traits.

صفت Trait	تعداد number	ماکزیمم maximum	مینیمم minimum	میانگین average	انحراف استاندارد Standard deviation	ضریب تغییرات Coefficient of Variation
تولید شیر(گرم) Milk production (gr)	823	2220	50	614.52	330.26	53.74
پروتئین شیر(درصد) Milk protein(%)	192	7.37	3.27	4.15	0.65	15.81
درصد چربی شیر (درصد) Milk fat (%)	191	7.37	2.20	3.14	1.69	79.38
تعداد سلول‌ها بدنی (تعداد سلول به ازای هر میلی‌لیتر شیر) Somatic cell count (the number of cell per Ml milk)	183	9672	17	715.85	1388.43	193.95

در مطالعه حاضر الگوهای ژنوتیپی IGF-I با مقدار تولید شیر ارتباط معنی‌داری نشان دادند($P<0.05$)، ولی اثر این الگوها بر ترکیبات شیر شامل: درصد چربی، پروتئین و شمار سلول-های بدنی معنی‌دار نبود (جدول 2). در میان سایر عوامل ثابت موجود در مدل، اثر سال زایش و ماه رکوردگیری بر تولید شیر معنی‌دار بود ($p<0.01$)، (جدول 3). ولی، سن حیوان هنگام زایش اثر معنی‌داری روی این صفت نداشت. در این پژوهش رکوردگیری از بزها در ماه‌های اسفند، فروردین، اردیبهشت و خرداد سال‌های 89، 90 و 91 صورت گرفته، که آنالیز داده‌ها نشان داد، سال 90 بیشترین تاثیر و سال 91 کمترین تاثیر را بر روی تولید شیر داشت تاثیر بیشتر سال 90 را می‌توان به تغذیه بهتر در آن سال نسبت داد. همچنین اثر ماه رکورد گیری بر مقدار تولید شیر معنی‌دار بود و ماه دوم بیشترین تولید شیر و ماه دوازدهم کمترین تولید شیر را داشت. می‌توان این اثر را به میزان علوفه و مواد مغذی بهتر در ماه دوم نسبت داد. تعداد روزهای شیردهی که به عنوان عامل کواریت در مدل قرار داده شد تاثیر معنی‌داری بر روی مقدار تولید شیر داشت ($p<0.05$).

جدول 2- اثر ژنوتیپ‌های ژن IGF-I بر میانگین حداقل مربعات تبدیل یافته[1] تولید شیر.

Table 2- The effect of different genotype of IGF-1 gene on least square means milk production.

ژنوتیپ Genotype	1 (58 رأس)	2 (31 رأس)
تولیدشیر* (گرم) Milk production	$28.32^{a} \pm 0.68$	$26^{b} \pm 1.16$
درصد پروتئین ns protein percentage	0.376 ± 0.002	0.375 ± 0.001
درصد چربی ns Fat percentage	0.96 ± 0.33	0.58 ± 0.26
شمارش سلوهای بدنی ns تعداد سلول در هر میلی لیتر somatic cell count	5.79 ± 0.88	5.09 ± 0.82

*اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد. **Significant difference in 5% probability**

جدول 3- اثر عوامل ثابت مؤثر بر میانگین حداقل مربعات تبدیل یافته[2] تولید شیر.

Table 3- The effect of fixed effects on least square means milk production.

		میانگین حداقل مربعات (least square means)
سال زایش** gestation year	89	$26.59^{b} \pm 0.82$
	90	$30.02^{a} \pm 0.72$
	91	$24.86^{b} \pm 1.74$
ماه رکورد گیری** recording month	1	$26.33^{b} \pm 1.17$
	2	$30.23^{a} \pm 0.77$
	3	$27.38^{b} \pm 1.09$
	12	$24.70^{b} \pm 2.04$

** معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد **Significant difference in 1% probability**

[1] – میانگین حداقل مربعات داده‌های نرمال شده که با روش لگاریتم گیری نرمال شدند.

[2] – میانگین حداقل مربعات داده‌های نرمال شده که با روش لگاریتم گیری نرمال شدند

آنالیز داده‌های مربوط به 51 رأس بزغاله پس از تعیین ژنوتیپ ، با صفات رشد شامل وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه، وزن نهایی و خوراک مصرفی انجام گرفت که نتایج حاصل نشان داد الگوهای ژنوتیپی IGF-I تاثیر معنی‌داری روی هیچ کدام از صفات ذکر شده نداشت (جدول 4)، وزن مادر هنگام زایش اثر معنی‌داری بر روی وزن تولد بزغاله‌ها ($p<0.05$)، و همچنین سال و ماه تولد اثر معنی‌داری بر خوراک مصرفی داشتند ($p<0.05$).

جدول4- میانگین حداقل مربعات و انحراف استاندارد صفات وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه و خوراک مصرفی.

Table 4- Least square means and standard deviation of birth weight, weaning weight, average daily gain, feed intake and final weight traits.

صفات (traits)	ژنوتیپ 1 (34 رأس) Genotype 1	ژنوتیپ 2 (17 رأس) Genotype 2
وزن تولد^{ns} (کیلوگرم) Birth weight	2.96 ± 0.27	3.31± 0.28
وزن از شیرگیری^{ns} (کیلوگرم) Weaning weight	20.11 ± 2.09	19.88 ±2.06
افزایش وزن روزانه^{ns} (کیلوگرم) Daily gain	0.197 ±0.02	0.194±0.19
خوراک مصرفی^{ns} (کیلوگرم) Feed intake	1.32 ±0.065	1.34± 0.061
وزن نهایی^{ns} (کیلوگرم) Final weight	27.98 ±2.79	31.48 ± 2.78

در مطالعه ارتباط چند شکلی ژن IGF-I با صفت تولید شیر روی بز بومی چین، ارتباط معنی‌دار این ژن با مقدار تولید شیر گزارش شد (Deng *et al*., 2010)، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین در مطالعه چند شکلی ژن فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) و رابطه آن با تولید شیر روی گاوهای شیری، یک جایگزینی تک نوکلئوتیدی، گزارش شد که با تولید شیر، چربی و پروتئین در ارتباط بود (Mullen *et al*., 2011). در یک بررسی دیگر روی گاوهای هلشتاین ارتباط معنی‌دار این ژن با مقدار تولید شیر، چربی و پروتئین گزارش شد (Szewczuk *et al*., 2011). همچنین یک جهش (C/T) در ناحیه 5´-Flanking این ژن در گاو شناسایی شده است که مرتبط با درصد چربی و پروتئین در شیر بود (Ge *et al*., 2001)، ولی Hines *et al*. (1998) در مطالعه‌ی ناحیه مذکور در گاوهای هلشتاین هیچ ارتباطی بین جهش رخ داده با

صفات تولید شیر پیدا نکردند. نتایج پژوهش حاضر بیانگر ارتباط معنی‌دار الگوهای متفاوت ژنتیکی ژن IGF-I با صفت تولید شیر است. ولی اثر چند شکلی این ژن بر روی ترکیبات شیر شامل درصد چربی، پروتئین و شمارش سلول-های بدنی معنی‌دار نبود. نقش هورمون رشد شبه انسولین (IGF-I) در رشد بافت های مختلف بدن (سلول های ماهیچه، غضروف و استخوان)، تحریک سنتز پروتئین، افزایش متابولیسم قندها و چربی ها در بدن، محرک تقسیم میتوز، تحریک ازدیاد سلول های مخاطی و استرومال غده پستانی، سنتز و بیان ژن کازئین و حمل گلوکز شناخته شده است و همچنین IGF-I سنتز شیر وتکامل غده پستانی را در طول دوره‌ی شیردهی تسهیل می‌بخشد، علاوه بر این در طولانی شدن دوره شیردهی نیز نقش دارد (Yinli, 2007 Zhou). با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعات گذشته که اثر پلی‌مورفیسم ژن IGF-I بر صفات تولید شیر را تأیید می‌کند، این ژن می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی برای صفت تولید و ترکیبات شیر استفاده شود.

منابع

Barash H, Aharoni Y, Brosh A, Holzer A (1998). Effect of low energy diets followed by a compensatory diet on body weight gain and plasma hormone concentrations in bull calves. Journal of Dairy Science 81: 250-254.

Combes S, Louveau I, Bonneau M (1997). Effect of GH administration on GH and IGF-I receptors in porcine skeletal muscle and liver in relation to plasma GH-binding Protein. J.Endocrinol 155: 19-26.

Deng Ch, Ma R,Yue X, Lan X, Chen H, Lei C (2010). Association of IGF-I gene olymorphisms with milk yield and body size in Chinese dairy goats. Genetics and Molecular Biology 33: 266-270.

Duan C, Xu Q (2005). Roles of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in regulating IGF actions. Gene Comparison Endocrinology 142: 44–52.

Eulalia S, Lech Z, Jolanta O, Nina S, Emilia B, Krzyzewski J (2006). Effect of polymorphism in IGF-I gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Anim Sci Pap Rep 24:225-237.

Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM and Simmen RC (2001). Association of a genetic marker with blood serum insu- lin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. J Anim Sci 79:1757-1762.

Hines HC, Ge W, Zhao Q, Davis ME (1998). Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. Anim Genet 29:69.

Honarvar M, Sadeghi M, Moradi-Shahrebabak H, Behzadi Sh, Mohammadi H, Lavaf A (2012). Study of polymorphism in the 5´ Flanking region of the Ovine IGF-I gene in Zel Sheep. J. World Applied. Sci. 16: 726-728.

Khaldari M (2008). Sheep and Goat Husbandry, University of Tehran Press.

Kim ES, Shi X, Cobanoglu O, Weigel K, Berger PJ, Kirkpatrick BW (2009). Refined mapping of twinning rate quantitative trait loci on bovine chromosome 5 and analysis of insulin-like growth factor-I as a positional candidate gene. J. Anim Sci 87:835-843.

Mullen Mp, Lynch CO, Watres SM, Hrrvard DJ, Boyle PO, Kenny DA, Buckley F, Horan B, Diskin MG (2011). Single Nucleotide Polymorphism in the growth hormone and insulin –like growth factore-1 genes are associated with milk production , body condition score and fertility traits in dairy cows. Gnetics and Molecular Research.10: (3): 18919-1830.

Ping-qing W,Ying T, Bao-yun Z, Ming-xing C, la-mei D, Qi F, Chong-xu L,(2011). DNA polymorphism of of 5´-flanking region of Insulin-like growth factor 1 gene and their association with reproduction traits in goats. J. Agri. Sci. 10, 1609- 1617.

Qiong W, Chao F, Wu-Jun L, Yi F, Shi-Gang Y (2011). A novel motation of exon 4 of IGF-1 gene in three indigenous Goat breed in China. J. Animal and Veterinary Advanced. 6: 627- 635.

Rinderknecht E, Humbel R E (1978). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. J Biol Chem 253: 2769-2776.

Szewczuk M, Zych S, Czerniawska-piatkowska E (2011). Association between IGF-1/Tasl polymorphism and milk trait of Polish Holstein Friesian cows. Archiv Tierzucht 54: ISSN 0003-9438.

Tahmoorespur M, Vafaye Valeh M, Nasiry MR, Heravi Moussavi A, Ansary M (2009). Association of the polymorphism in the 5’ flanking region of the ovine IGF-I gene with growth traits in the Baluchi sheep. J. South African. Anim. Sci. 39 (supplement 1).

Valizadeh R (2011). Sheep and Goat production, Ferdowsi University of Mashhad Press.

Wibowo TA, Charles T, Gaskins1 Ruth C. Newberry1, Gary H. Thorgaard 2, Jennifer Michal1 J (2008). Genome Assembly Anchored QTL Map of Bovine Chromosome 14 Int. J.Biol. Science 4: p. 406-414.

Wu-Jun L, Guang-Xin F, Yi F, Ke- Chuan T, Xi-Xia H (2010). The polymorphism of a mutation of IGF-1 gene on two goat breed in China. J. Animal and Verterinary Adanaces 9: 790-794.

Yee D (1994). The insulin-like growth factor system as a target in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 32: 85-95.

Zhou Yinli (2007). Effects of growth hormone and Insulin-like growth factor-1 on milk Protein gene expression and nutrent uptake and cell proliferation in clonal bovine mammary epithelial cells, degree of Doctor of Philosophy in Animal and Poultry Science. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute.

Study of the polymorphism at the exon 4 of IGF-I Gene and its association with milk production and growth traits in Mahabadi goats using PCR-SSCP

Gharedaghi L.*[1], Moradi-Shahrebabak H.[2], Sadeghi M.[2], ganjkhanlou M.[2]

[1&2] respectively, M.S.c Student and Assistant Professor Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

The objective of this sudy was to detection of polymorphis in IGF-1 gene and its association with milk producton and growth traits in Mahabadi goats using PCR-SSCP method. For this purpose, blood samples were taken from 140 (89 mature goats and 51 kiddings) Mahabadi goats reared in the farm of department of animal Scince Tehran University(Karaj). Genomic DNA was extracted from whole blood using modified salting out method.The Polymerase chain reaction (PCR) used to amplify of 326 bp fragment of exon 4 of IGF-I gene. PCR products were electrophoresed on polyacrylamide gel (method SSCP) and stained with silver nitrate method to distinguish different patterns.The results revealed two band patterns.The frequency of two Patterns is 65.7% and 34.2% respectively. The polymorphism of the IGF-I gene were associated with milk production($p<0.05$), But fat percent, protein percent, somatic cell count and also birth weight, weaning weight,daily gain, feed intake and final weight among two genotypes were showen not significantly.

Key word:, *IGF-1 gene, polymorphism, PCR-SSCP, Mahabadi goat.*

* Corresponding Author: Gharedaghi L. Tel: 09191886003 E-mail: leilagharedaghi@ut.ac.ir