مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع ساختار کروموزومی در ژنوم گاوهای هلشتاین با استفاده از بسته نشانگری 50K

مریم نصرتی*[1]، مجتبی طهمورث‌پور[2]، محمدرضا نصیری[3]

[1] دانشجوی دکتری رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[2] استاد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[3] دانشیار رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: 1391/07/16، تاریخ پذیرش: 1392/04/30

چکیده

تنوع ساختار کروموزومی در مکانیزم‌های بیولوژیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. به منظور تعیین تعداد و توزیع این تنوع در ژنوم سه کروموزم 6، 14 و 20 که حضور جایگاه صفات کمی موثر بر تولید در آن تایید شده است، مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از 580 راس گاو هلشتاین نمونه خون گرفته شد و پس از استخراج DNA، تعیین ژنوتیپ با استفاده از بسته نشانگری 50K گاوی شرکت ایلومینا صورت گرفت. پس از تصحیح داده‌ها برای شدت سیگنال و نواحی غنی از GC، تعداد 383 نمونه برای آنالیز نهایی باقی ماند. داده‌ها بر اساس اسمبلی UMD3.1 ژنوم گاو برای کروموزم‌های 6، 14 و 20 آنالیز شد. پس از اعمال کلیه فیلترها تعداد 199 تنوع ساختار کروموزومی (132 حذف و 67 اضافه) با متوسط 0/5 برای هر فرد و میانگین طول 147/3 kb و میانه 139/4 kb شناسایی شد. نسبت حذف به اضافه برابر با 1/97 و کروموزم‌های 6 و 20 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تنوع ساختار کروموزومی بودند. آنالیز-های بیوانفورماتیکی مشخص نمود که 77 ژن با این نواحی تنوع ساختار کروموزومی در ارتباط هستند. نتایج این پژوهش نشان داد تنوع ساختار کروموزومی بخش قابل توجهی از این سه کروموزم که حاوی تعداد قابل توجهی جایگاه صفات کمی هستند را پوشش می‌دهد. به دلیل اثر این تنوع بر ایجاد تغییر در ساختار و دز ژن‌ها، به نظر می‌رسد تنوع ساختار کروموزومی می‌تواند بر واریانس فنوتیپی صفات کمی موثر باشد لذا احتمالا این تنوع قابلیت استفاده در برنامه‌های اصلاح‌نژادی را دارد.

کلید واژه: *گاو هلشتاین، تنوع ساختارکروموزومی، جهش تک نوکلئوتیدی، ژنوم.*

* نویسنده مسئول: مریم نصرتی تلفن: 09153860817 Email: Mehraveh58@yahoo.com

مقدمه

گونه گاو در حدود 10000 سال پیش در مناطقی از آسیا و خاور نزدیک اهلی شد (Gotherstrom *et al*. 2005). بدلیل اهمیت آن در تولید شیر، گوشت و فعالیت‌های کشاورزی مطالعه برای پرورش و اصلاح‌نژاد آن گسترش یافت. ژنوم گاو از 29 جفت کروموزوم اتوزوم و یک جفت کروموزوم جنسی تشکیل شده است که در حدود 2/87 Gbp طول دارد. تاکنون 22000 ژن در آن شناسایی شده است (Bae *et al* 2010). بر اساس مطالعات مختلف، جایگاه بسیاری از صفات کمی[1] مانند رشد، تولید شیر و ترکیب آن و ماربلینگ روی کروموزوم 14، 6 و 20 شناسایی شده است (Plante *et al*, 2001; Miyata *et al*, 2007; Mehar *et al*, 2004 Marques *et al*, 2008;). لذا مطالعه روی تنوع ژنومی در این کروموزم‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است.

انواع تنوع ژنومی شامل حذف، اضافه، جایگزینی، بازترتیبی، معکوس‌شدن و تنوع ساختار کروموزومی[2] (CNV) است (liu 2011). تنوع ساختار کروموزومی شامل حذف، اضافه یا دو برابر شدن قطعه‌ای از DNA به طول 1 kb تا چندین مگا جفت باز است. مطالعات نشان می‌دهد که این تنوع می‌تواند منجر به تغییر در دز ژن، توالی‌های کد کننده و تنظیم بیان ژن شود (Aboura *et al* 2009). لذا تاثیر آن بر تنوع فنوتیپی بیش از جهش‌های تک نوکلئوتیدی می‌باشد (Li *et al*, 2010). در پستانداران این تنوع ٪ 5-0/4 کل تنوع ژنوم را شامل می‌شود (Fontanesi *et al*, 2010). اولین مطالعات بر روی تنوع ساختار کروموزومی در انسان و در سال 2006 صورت گرفت (Roden *et al*. 2006) از آن زمان تاکنون 29000 تنوع ساختار کروموزومی در انسان شناسایی شده است که 9000 مورد آن در نزدیکی یا داخل یک ژن قرار دارند (Conrad *et al*, 2009; Redon *et al*, 2006). ٪12 تنوع ژنوم انسان مرتبط با تنوع در ساختار کروموزومی است و تقریبا″40 درصد این ساختارها حداقل با یک ژن همپوشانی دارد (Li *et al* 2010). به علاوه، این نوع تنوع با بیماری‌های از قبیل شیزوفرنی، دیابت نوع اول و سرطان و ... مرتبط است (Kijas *et al* 2011; Hastings *et al*, 2009; Mills *et al* 2011). با این حال، مطالعه روی نحوه گسترش، توزیع و نقش تنوع ساختار کروموزومی در حیوانات اهلی در مراحل ابتدایی است. این امر می‌تواند به دلیل کمبود ابزارهای ژنومی در حیوانات اهلی باشد. اولین مطالعه برای شناسایی تنوع ساختار کروموزومی گاو توسط Liu *et al*. (2008) با روش aCGH[3] صورت گرفت. آنها توانستند 25 تنوع ساختار کروموزومی را در سلول‌های جنسی شناسایی کنند (Liu *et al* 2008). پس از آن مطالعات روی

[1] Quantitative traits loci
[2] Copy Number Variance
[3] Array-comparative genomic hybridization

سایر حیوانات مزرعه‌ای مانند جوجه گوشتی(Wang *et al* 2010)، گوسفند (Fontanesi at al 2011) و بز (Fontanesi *et al* 2010) صورت گرفت. با توسعه تکنولوژی، ساخت چیپ‌های شناسایی جهش‌های تک نوکلئوتیدی ژنوم، شناسایی تنوع ساختار کروموزومی با دقت و سرعت بیشتری انجام گرفته است.

مطالعات اخیر نشان می‌دهد تنوع ساختار کروموزومی با تنوع فنوتیپی برخی صفات مرتبط است. مثلا" تاج نخودی در طیور ناشی از تنوع ساختار کروموزومی در اینترون یک ژن SOX5 می‌باشد (Wright *et al* 2009). در گوسفند دو برابر شدن در ژن ASIP منجر به تنظیم رنگدانه در پوشش بدن می‌شود (Norris and Whan, 2008). رنگ سفید غالب در پوشش بدن خوک ناشی از دو برابر شدن در ژن Kit می‌باشد (Giuffra *et al*, 2002). تاخیر در پر درآوری جوجه‌ها به دلیل دوبله ناقص در ژن‌های PRLR و SPEF2 می‌باشد (Elferink *et al*, 2008). دو برابر شدن kb 4/6 در اینترون 6 ژن stx17 منجر به خاکستری شدن رنگ بدن در اسب با افزایش سن می‌شود(Rosengren *et al*, 2008). حذف ناحیه بین ژنی بطول kb 11/7 در ژنوم بز منجر به حذف شاخ می‌شود (Pailhoux *et al*, 2001). با توجه به پوشش قابل توجه این تنوع در ژنوم و اثر آن بر تنوع فنوتیپی برخی صفات، اهمیت مطالعه بیشتر روی این نوع تنوع آشکارتر می‌شود. در این پژوهش تنوع ساختار کروموزومی در 580 گاو هلشتاین با استفاده از بسته نشانگری 50K گاوی روی کروموزوم‌های 6، 14 و 20 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

نمونه‌گیری و تعیین ژنوتیپ

نمونه خون از 580 گاو نر هلشتاین دارای شجره از موسسه[1] ANAFI تهیه شد. استخراج DNA از خون با استفاده از کیت Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega Corporation, Madison, WI) در آزمایشگاه ژنتیک مرکز ژنومیک حیوانات اهلی، دانشگاه بولونیا کشور ایتالیا انجام شد. در این پژوهش بسته نشانگری 50K گاوی نوع دو شرکت ایلومینا[2] (Illumina, Inc.,USA) برای تعیین ژنوتیپ SNP 54604 در سراسر ژنوم استفاده شد. چیپ مورد نظر بر مبنای پروتکل Infinium HD Assay شرکت ایلومینا طراحی شده است. مفهوم Infinium بر اساس هیبریداسیون مستقیم قطعات کل ژنوم به پرایمرهای 50 مری متصل به آرایه دانه[3] می‌باشد (and Gunderson, 2007 Steemers). نمونه‌های DNA با غلظت ng 400– 200 با محلول 0/1 نرمال NaoH دناتوره شده و سپس با محلول MA2 (کیت ایلومینا) خنثی شده تا برای تکثیر آماده شود. در مرحله بعد محلول MSM[4] که حاوی مستر میکس است به DNA اضافه شده و سپس پلیت در آون

[1] National Association of Italian Holstein Breeders
[2] Illumina BovineSNP50 BeadChip v2
bead array [3]
[4]Multi-Sample AmplificationMaster Mix

هیبریداسیون در دمای 37 C° به مدت 24-20 ساعت انکوبه شد تا تکثیر صورت گیرد. این روش موجب تکثیر DNA بطور یکنواخت تا چندین برابر و بدون اریب (خطا) خواهد شد. DNA توسط سیستم آنزیمی تحت کنترل به قطعات کوچکتر بریده شد. DNA هضم شده با 2-پروپانول 100٪ مخلوط و با سانتریفیوژ در دمای 4 درجه سانتیگراد رسوب داده شد و دوباره با محلول بافر هیبریداسیون سوسپانسیون شد. در مرحله بعد نمونه های DNA برروی Beadchips قرار داده شد و به مدت 24-16 در دمای 48 در آون هیبریداسیون نگهداری شد. در این مرحله از طریق سیستم مویرگی موجود در اطراف چیپ و تزریق محلول‌های هیبریداسیون، ابتدا DNA دناتوره شده و سپس هیبرید می‌شود. پس از هیبریداسیون، شستشو Beadchips برای حذف DNA هیبرید نشده انجام شد. نمونه‌ها برای بسط تک بازی و رنگ آمیزی آماده شد. به دلیل اینکه طول پرایمرهای (یک جفت) متصل به آرایه دانه تا یک نوکلئوتید قبل از محل جهش است پس از اتصال DNA تک رشته (بعنوان الگو) به پروب 50 مری (بعنوان پرایمر)، بسط تک بازی در انتهای ´3 پروب انجام می‌شود. بدین منظور محلول TEM در اطراف Beadchips رها شده تا با استفاده از نوکلئوتیدهای نشاندار (فلورسنس) تکثیر صورت گیرد. در این محلول A و T به رنگ قرمز و C و G به رنگ سبز نشاندار شده است. پس از این مرحله DNA الگو توسط محلول فرامید ٪95 بر 1 میکرومول EDTA حذف شد. در این حالت پرایمر بسط یافته متصل به آرایه دانه، تحت فرآیندهای مختلف انجام گرفت تا برای اسکن آماده شود. Beadchips با استفاده از iScanReader یا Bead Array reader تحت لیزر قرار گرفت تا فلورسنس تک باز انتهای پرایمرهای بسط داده شده در آرایه دانه برانگیخته شود. اگر لوکاس مورد نظر فاقد جهش (A/T یا C/G) باشد رنگ قرمز یا سبز ساطع می‌کند اما اگر جهش صورت گرفته باشد یعنی در مقابل A مثلا C باشد رنگ زرد (ترکیب قرمز و سبز) ساطع می‌گردد. نور ساطع شده ثبت شد و داده‌ها بدست آمده از این تصویر با Illumina's BeadStudio v1.0 تصحیح شد. بدین معنی که گراف تشکیل شده از SNP ها برای کلیه نمونه‌ها کنترل شد و دسته بندی[1] و نرمال سازی[2] داده‌ها انجام گرفت. بر اساس مطالعات Diskin *et al.* (2008) گاهی در هنگام هیبریداسیون بدلیل نوسان در غلظت DNA نمونه‌های مختلف و محتوی GC متفاوت، اتصال پروب‌ها بطور یکنواخت صورت نمی‌گیرد این پدیده را امواج ژنومیکی[3] می‌نامند که بر بازخوانی ژنوتیپ‌ها اثر می‌گذارد. این پدیده احتمالاً بر صحت تعیین تنوع ساختار کروموزومی نیز موثر است. بدین منظور GenCall Score نمونه‌ها بررسی شد. این پارامتر که توسط BeadStudio بدست می‌آید یک کمیت متریک برای نشان دادن قابلیت اطمینان[4] ژنوتیپ‌های خوانده شده است که حد آستانه آن

[1] clustering
[2] Normalization
[3] Genomic wave
[4] reliability

0/15 است. ژنوتیپ‌ها با GenCall Score کمتر از 0/15 بدلیل عدم اطمینان در تعیین ژنوتیپ صحیح حذف شد. پس از حذف نمونه‌ها ناصحیح 472 نمونه باقی ماند که پس از انتخاب آیتم‌ها مورد نیاز برای محاسبه CNV، فایل شدت سیگنال در فرمت متنی که همان فایل ورودی نرم افزار PennCNV است تهیه شد. کلیه مراحل تعیین ژنوتیپ با استفاده از کیت شرکت ایلومینا و براساس پروتکل Infinium HD Assay انجام شد. اطلاعات بیشتر در وب سایت شرکت ایلومینا (http://www.illumina.com) در دسترس می‌باشد.

آنالیز با PennCNV و کنترل کیفیت

نرم افزارهای متعددی برای شناسایی تنوع ساختار کروموزومی بر اساس داده‌های SNP وجود دارد. متداول‌ترین آنها PennCNV می‌باشد که از طریق وب سایت http://www.neurogenome.org/cnv/penncnv قابل دسترسی می‌باشد. فایل ورودی نرم افزار PennCNV که همان فایل شدت سیگنال[1] است، حاوی اطلاعات نام SNP و موقعیت آن، پارامتر-های لگاریتم نسبت شدت سیگنال[2] (LRR) و نسبت شدت سیگنال نسبی دو آلل SNP[3] (BAF) می‌باشد. با توجه به نحوه تعیین ژنوتیپ SNPها، از شدت سیگنال ساطع شده آلل A و B (مقادیر X و Y) برای تهیه فایل‌های LRR و BAF استفاده می‌شود. به این ترتیب که LRR کل شدت سیگنال نرمال شده برای هر دو آلل SNP می‌باشد که در زمان حذف، کاهش و در زمان اضافه شدن، افزایش می‌یابد. نحوه محاسبه آن به این صورت است اگر $R = Y + X$ باشد آنگاه $LRR = Log_2(R_{observed} / R_{expected})$ است که $R_{expected}$ از طریق درون‌یابی خطی دسته‌های ژنتیکی SNP نمونه‌ها به دست می‌آید. BAF نرمال شده، نسبت شدت سیگنال نسبی آلل A و B است که از طریق محاسبه $arc\text{-}(Y/X) / (\pi/2)$ به دست می‌آید. در شروع آنالیز، فایل $\theta = \tan$ شدت سیگنال ورودی به فایل‌های کوچکتر شکسته شد که هر فایل حاوی اطلاعات فوق برای هر فرد به طور مجزا است. فایل فراوانی آللی B در جمعیت (PFB) بر اساس BAF هر مارکر در جمعیت محاسبه شد. محل و موقعیت SNP ها روی کروموزم از فایل PFB اخذ می-شود لذا در صورت تغییر در اسمبلی ژنوم تعیین محل جهش‌ها به راحتی امکان پذیر است. فایل GC مدل بر اساس محتوی GC یک مگا جفت باز از ژنوم ساخته شد. فایل HMM مدل HMM[4] را برای نرم افزار PennCNV فراهم می‌کند و مقدار شدت سیگنال مورد انتظار برای CNVهای مختلف را به برنامه القاء می‌کند. با توجه به اینکه مدل HMM برای همه ژنوم‌ها تقریبا یکسان است از فایل hh550.hmm که برگرفته از پانل Illumina HumanHap550 انسانی است استفاده شد. به این ترتیب تنوع ساختار کروموزومی با استفاده از مدل زنجیره مارکوف در نرم افزار

[1] signal intensity file
[2] Log R Ratio
[3] B Allele Frequency
[4] hidden Markov model

PennCNV محاسبه شد (Wang *et al*, 2007). پارامتر cn[1] گزارش شده توسط نرم‌افزار PennCNV در کروموزوم اتوزوم برای نواحی که فاقد تکرار هستند برابر 2 (موجود دیپلوئید) برای نواحی که حذف صورت گرفته برابر 1 یا صفر بسته به میزان حذف و برای نواحی دو یا سه برابر شده معادل به ترتیب 3 و 4 است. پس از محاسبه تنوع ساختار کروموزومی فیلترهای کنترل کیفیت نرم‌افزار PennCNV اعمال شد. نمونه‌های با انحراف استاندارد LRR کمتر از 0/03، BAF برابر با حداقل 0/01 و waviness factor value بین 0/05 تا 0/05- انتخاب شدند. تصحیح برای محتوی GC با استفاده از فایل GC مدل انجام شد. پس از اعمال فیلترهای مورد نظر تعداد 383 نمونه باقی ماند. داده‌ها بر اساس اسمبلی UMD3.1 ژنوم گاو برای بررسی تنوع ساختار کروموزومی سه کروموزم 14، 6 و 20 آنالیز شد.

ارزیابی نواحی تنوع ساختار کرموزومی

به منظور تایید نواحی شناسایی شده, چهار ناحیه تنوع و یک ناحیه کنترل انتخاب و آزمایش Quantitative PCR در سه تکرار و پنج نمونه برای هر CNVR انجام شد. ناحیه کنترل قسمتی از ژن RPP30 روی کروموزم 26 گاوی (bp 12893277-12893408) بود که در مطالعات انسانی بعنوان ژن مرجع در نظر گرفته شده است (Wang *et al* 2010) و در مطالعات مختلف بر روی ژنوم گاو تاکنون تنوع ساختار کروموزومی در این ناحیه شناسایی نشده است (Liu *et al* 2010; Bae *et al* 2010; Fadista *et al* 2010) در مطالعه Seroussi *et al*. (2010) برای بررسی تنوع ساختار کروموزومی ژنوم گاو این ناحیه بعنوان ژن مرجع برای آزمایش PCR کمی در نظر گرفته شده است. پرایمرها با نرم افزار Primer version 3.0 برای نواحی مورد نظر طراحی شد که طولی کمتر از 150 kb داشت (جدول 4). شرایط واکنش به شرح ذیل بود: 2 میکرولیتر DNA، 10 میکرولیتر محلول UltraSYBR 2 X، 0/4 میکرولیتر پرایمرهای رفت (10 X) و 0/4 میکرولیتر پرایمرهای برگشت (10 X) در حجم نهایی 20 میکرولیتر در شرایط دمایی 10 دقیقه 95C° در 40 سیکل PCR با مراحل 95C° بمدت 15 ثانیه، 60C° بمدت یک دقیقه تکرار شد. پرایمرها با منحنی دمای ذوب برای بررسی حضور دایمر پرایمر کنترل شد. آنالیزهای PCR کمی با روش $\Delta\Delta C_t$ انجام شد. متوسط C_t برای نمونه‌های هدف (سه تکرار) محاسبه شد و ΔC_t نمونه هدف از اختلاف متوسط C_t هر ناحیه تنوع در نمونه‌های که حضور تنوع در آن از طریق نرم افزار PennCNV تایید شده است با ناحیه ژن مرجع به‌دست آمد. ΔC_t نرمال از اختلاف متوسط C_t در ناحیه مورد نظر در نمونه‌ای فاقد تنوع و ناحیه ژن مرجع محاسبه شد. $\Delta\Delta C_t$ از اختلاف بین ΔC_t نمونه‌های هدف وΔC_t نمونه‌های نرمال محاسبه شد. کمیت نسبی از رابطه $2^{-\Delta\Delta ct}$ بدست آمد. نرم افزار PennCNV تعداد کپی‌ها را بر اساس موجود دیپلوئید (که دارای یک جفت

[1] Copy Number

کرموزم همولوگ است) محاسبه می کند. لذا، برای این که بتوان نتایج PCR کمی را با نتایج نرم افزار PennCNV مقایسه کرد بایستی مقدار کمیت نسبی بدست آمده از آزمایش PCR کمی را در عدد 2 ضرب کرد. از این رو تعداد کپی هر ناحیه مورد آزمون از رابطه $2^{1+\Delta\Delta ct}$ یا $2 * 2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه شد. برای اطلاعات بیشتر به راهنمای نرم افزار PennCNV به قسمت مربوط به نحوه محاسبه تنوع ساختار کروموزومی در موجود دیپلوئید توسط نرم افزار (De novo CNV_) مراجعه نمائید

نتایج و بحث

شیوه‌های متعددی برای شناسایی تنوع ساختار کروموزومی وجود دارد. از آن جمله می-توان شناسایی بر اساس SNP array , Comparative Genomic Hybridization (CGH) array و Next-Generation Sequencing را نام برد. در مقایسه با دو روش دیگر روش SNP array ارزان‌تر و پوشش وسیع-تر و متراکم‌تری در ژنوم دارد (Hou *et al*, 2012). در این پژوهش از تکنیک SNP array استفاده شد و بررسی‌های ذیل انجام شد.

شناسایی تنوع ساختار کروموزومی

پس از اعمال کلیه فیلترها تعداد 199 جایگاه تنوع ساختار کروموزومی با متوسط 0/5 جایگاه برای هر فرد و میانگین طول 147/3 و میانه 139/4 کیلو باز شناسایی شد. از این تعداد 132 مورد حذف صورت گرفت که نسبت حذف به اضافه برابر با 1/97 بود. در بین کروموزوم‌ها، کروموزوم 6 بیشترین تنوع و طول ساختار کروموزومی را داشت ولی با توجه به طول کروموزوم‌ها, کروموزم 14 دارای بیشترین درصد تنوع ساختار کروموزومی به میزان ٪5/4 بود (جدول 1). اولین مطالعه روی تنوع ساختار کروموزومی ژنوم گاو در سال 2008 با شناسایی 25 تنوع در 16 کروموزوم به روش aCGH انجام شد(liu *et al* 2008). در سال 2010 در مطالعات Bae *et al.* (2010) با استفاده از بسته نشانگری 50K گاوی تعداد 855 تنوع در کل ژنوم گاو شناسایی شد. در مطالعه آنها متوسط و میانه تنوع ساختار کروموزومی به ترتیب 149/8 و 171/5 بود که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. Wang *et al.* (2010) با روش aCGH تعداد 96 تنوع ساختار کروموزومی در ژنوم طیور شناسایی کردند که 16 مگا جفت باز و معادل ٪1/34 ژنوم طیور بود که از این 96 تنوع 46 جایگاه در نواحی غیر کد کننده بود. در مطالعه Fontanesi *et al* (2010) با روش aCGH روی ژنوم بز تعداد 161 تنوع ساختار کروموزومی با متوسط 17/9 تنوع به ازاء هر فرد شناسایی شد. علاوه بر این نتایج این پژوهش نشان داد که تقریبا ٪60 تنوع‌ها طولی کمتر از 200 kb داشتند (جدول 2).

جدول 1 - توزیع تنوع ساختار کروموزومی (CNV) در کروموزوم‌های 6، 14 و 20 با نرم افزار PennCNV.

Table1-Copy number variation on BTA6, BTA14, BTA20 with PennCNV.

کروموزوم chr	تعداد کل تنوع Total CNV	حذف loss	اضافه gain	طول تنوع CNV length	طول کروموزوم Chromosome length	درصد percentage
BTA6	105	70	35	5085829	119458736	4.26
BAT14	57	37	20	4569117	84648390	5.4
BAT20	37	25	12	2770349	72042655	3.85
جمع	199	132	67	12425295	276149781	--

اندازه کروموزم از سایت ***www.ensembl.org*** بدست آمد.

جدول 2- توزیع نواحی تنوع ساختار کروموزومی (CNVR) در کروموزوم‌های 6، 14 و 20.

Table 2- Copy number variation region (CNVR) distribution on BTA6, BTA14 and BTA20.

کروموزوم chromosome	تعداد نواحی تنوع CNVR number	کل طول نواحی CNVR length	kb < 100	100 -200 Kb	200 -300 Kb	300 -400 Kb	400 kb>
BTA6	17	5.085	27.5	34.9	13.8	6.7	17.1
BTA14	12	4.569	26	24.6	24.1	3.5	21.8
BTA20	12	2.770	31	31	8	13.5	16.5
جمع	41	12.324	--	--	--	--	--

اعداد بر اساس درصد می‌باشد.

نواحی تنوع ساختار کروموزومی

نواحی تنوع ساختار کروموزومی با استفاده از یکی کردن نواحی از تنوع که با هم همپوشانی داشتند ساخته شد (Redon *et al* 2006). به طور کلی تعداد 41 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی در این مطالعه شناسایی شد که شامل 12/3 مگا جفت باز با میانگین و میانه به ترتیب 303 kb و 146kb بود (جدول 2). این میزان ٪0/6 توالی کروموزوم‌های اتوزومی و ٪0/5 کل ژنوم گاو را در بر می‌گیرد. بیشترین تعداد و طول نواحی تنوع ساختار کروموزومی روی کروموزوم شش مشاهده گردید. Liu *et al.* (2010) 200 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی با پوشش 1/07 درصد کل ژنوم در نژادهای مختلف گاو شناسایی کردند

که با 400 ژن مختلف همپوشانی داشت. Hou *et al.* (2011) در بررسی تنوع ساختار کروموزومی گاو، تعداد 682 ناحیه تنوع به طول کلی 139/8 مگاجفت باز (٪4/6 ژنوم) شناسایی کردند. در مطالعه Hou *et al.* (2012) تعداد 3346 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی با طول کلی 142/7 مگا جفت باز در اسمبلی Btau_4.0 ژنوم گاو و تعداد 3438 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی با طول کلی 146/9 مگا جفت باز در اسمبلی UMD3.1 ژنوم گاو شناسایی کردند که به طور کلی ٪4/7 کل ژنوم را شامل شد. در مطالعه‌ای دیگر روی ژنوم گاو 368 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی شناسایی شد (Bae *et al* 2010). در پژوهش Fontanesi *et al* (2010) روی ژنوم گوسفند، با روش aCGH، 135 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی با طول 10/8 مگا جفت باز شناسایی شد. میزان تنوع شناسایی شده و به طبع طول آن در پژوهش‌های مختلف متفاوت است. در واقع تعداد تنوع بستگی به عوامل متعددی از قبیل روش مورد استفاده، تعداد افراد، تعداد کروموزوم‌های مورد بررسی و تراکم چیپ مورد استفاده دارد. لذا با توجه به این که در این پژوهش فقط سه کروموزوم مورد بررسی قرار گرفته است تعداد کل تنوع‌ها و درصد پوشش ژنوم با سایر مطالعات متفاوت است، اما میانگین و میانه تنوع با سایر مطالعات مطابقت دارد.

ارزیابی نواحی تنوع ساختار کروموزومی

به طور کلی طول ناحیه تنوع ساختار کروموزومی ژنوم گاو در مطالعات مختلف متفاوت است و از 32 kb تا 5/6 Mb متغیر است. مقدار گزارش شده در این مطالعه در داخل این دامنه قرار دارد (1 Mb– 74 kb). Hou *et al.* (2011) دلیل این تنوع را در استفاده از روش-های مختلف شناسایی تنوع ساختار کروموزومی یعنی aCGH و بسته نشانگری 50 K گاوی اذعان کردند. بسته نشانگری 50 K با تراکم بالای SNP برای مطالعات ارتباطی در ژنوم گاو طراحی شده است، لذا توزیع SNPها در همه قسمت‌های ژنوم یکنواخت نیست. شناسایی این تنوع با نرم افزار PennCNV نسبت به تراکم پایین SNPها و توزیع غیریکنواخت آن بخصوص در نواحی حاوی تنوع ساختار کروموزومی حساس است. لذا در اغلب موارد فقط تنوع‌های بلند شناسایی می‌شود. علاوه‌براین بسته نشانگری 50 K برخلاف aCGH فاقد پروب اختصاصی برای نواحی تنوع ساختار کروموزومی است. از این رو نتایج پژوهش‌های اخیر با مطالعات قبلی (با روش aCGH) متفاوت است و تنوع زیادی بین آنها وجود دارد. به منظور تایید تنوع ساختار کروموزومی از بین 41 CNVR شناخته شده برای چهار ناحیه و یک کنترل، آزمایش PCR کمی انجام شد(جدول 4). برای هر ناحیه از نمونه‌ای که تنوع ساختار کروموزومی توسط نرم افزار PennCNV در آن تایید شده بود به عنوان نمونه هدف و در نمونه‌هایی که حضور تنوع تایید

نشده بود به‌عنوان نرمال استفاده شد. حضور تنوع ساختار کروموزومی در CNVR7 روی کروموزوم 20 و CNVR3 روی کروموزوم 14 تایید شد($p<0.05$). نتایج واکنش PCR کمی این پژوهش در ٪50 نواحی، تنوع ساختار کروموزومی را تایید کرد (جدول 5). در مطالعه Fadista *et al.* (2008) نیز بر روی خوک ٪50 نواحی تایید شد. این مقدار در مطالعه Hou *et al.* (2011) در گاو هلشتاین ٪60 بود که بیشتر از نتیجه این پژوهش می‌باشد. همچنین مقدار تایید شده در این پژوهش از مقدار گزارش شده توسط Fadista *et al.* (2011) (٪66) و Hou *et al.* (2012) (٪77) در گاو هلشتاین کمتر بود. این کاهش می‌تواند به دلیل تعداد کم نواحی انتخاب شده یا به دلیل خطا در برآورد به دلیل پوشش نه چندان متراکم و غیر یکنواخت SNPها چیپ مورد استفاده نیز باشد که باعث می‌شود طول تنوع‌ها بیش‌تر از مقدار واقعی برآورد شود.

ارزیابی بیوانفورماتیکی نواحی تنوع ساختار کروموزومی

بررسی بیوانفورماتیکی نشان داد 77 ژن در نواحی تنوع ساختار کروموزومی واقع شده است (جدول3). برخی از این تنوع‌ها در نواحی اگزون ژن قرار داشت. بسیاری از مطالعات حضور تنوع ساختار کروموزومی را در نواحی ژنی تایید می‌کند(Kijas *et al*, 2011; liu *et al*, 2008; liu *et al*, 2010; Fadista *et al*, 2010). در مطالعه liu *et al.* (2010) 400 ژن در نواحی تنوع ساختار کروموزومی شناسایی شد که اغلب آنها با صفات بیولوژیکی مهمی از قبیل تولید شیر، ایمنی زایی و تولید مثل در ارتباط بودند. Fadista *et al.* (2010) تعداد 304 ناحیه تنوع ساختار کروموزومی در ژنوم گاو شناسایی کردند که ٪30 آنها با ژن‌های پاسخ به محیط همپوشانی داشتند. برخی از ژن‌ها شناسایی شده در این پژوهش در مطالعات مختلف به عنوان ژن کاندیدا در تولید و رشد شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال ژن تیروگولوبولین (TG) روی کروموزوم 14 قرار دارد. مطالعات نشان می دهد برخی ژنوتیپ‌های آن منجر به افزایش سطح ماربلینگ عضله در گاو-های گوشتی می‌شود (Anton *et al*, 2008; Fortes *et al*., 2009). ژن دی‌آسیل گلیسرول آسیل‌ترانسفراز 1 (DGAT1) که بر روی کروموزوم 14 قرار دارد ارتباط معنی‌داری با ترکیب شیر و کیفیت آن دارد (Strucken *et al*, 2010; Marques *et al* 2011; Bouwman *et al*, 2011). با توجه به همپوشانی این نوع تنوع با نواحی ژنی و طول قابل ملاحظه آن, در صورت واقع شدن در نواحی کد کننده یا نواحی تنظیمی به راحتی سطح بیان ژن را تحت تاثیر قرار می-دهد. شناسایی این تنوع در ژنوم حیوانات اهلی در سال 2008 از ژنوم گاو شروع شده است و بررسی ارتباط آن با صفات تولیدی در حیوانات اهلی به تازگی در حال شکل‌گیری است. اما به نظر می‌رسد این نوع تنوع می‌تواند افق جدیدی را در مطالعات اصلاح‌نژادی باز کند.

جدول 3- همپوشانی نواحی ساختار کروموزومی با نواحی ژنی مرجع.

Table3- Coverage of reference gene with CNVR.

تعداد ژن Gene number	ژن مرجع Reference gene	طول(bp) Length	ناحیه تنوع ساختار کروموزومی CNVR	کروموزوم chromosome
1	*PRDM5*	139384	4409404- 4548788	BTA6
1	*UGT8*	115083	12119048-12234131	
1	*PPA2*	74398	20993424-21067822	
3	*ATP8A1 ،APLT ،SHISA3*	144298	62788712-62933010	
1	*C6H4orf22*	100774	97374303-97475077	
3	*HGFAC ، LRPAP1 ،NSG1*	304130	106981782-107285912	
4	*،TNIP2 ،SH3BP2 ،ADD1 ،NOP14 ، WHSC2 ،PIGG ، FGFRL1، HAUS3،MXD4 ،RNF4 MFSD10،PDE6B*	2273588	107678393-109951981	
37	*،LRRC14 ،LRRC24 ،ARHGAP39 ،COMMD5 ،PPP1R16A ،GPT ،MFSD3 ،RECQL4 ،VPS28 ،TONSL ،CYHR1 ،KIFC2 ،FOXH1 ،GPR172A ،ADCK5 ،CPSF1 ،SLC39A4 ،MAF1 ،HEATR7A ،HSF1 ،DGAT1 ،SCRT1 ،EXOSC4 ،GPAA1 ،CYC1 ،SHARPIN ،PUF60 ،NRBP2 ،GRINA ،OPLAH ،PYCRL ،TSTA3 ،CCDC166 ،MAPK15 GSDMD ،NAPRT1 ،EEF1D*	977500	1514056-2491556	BAT14
2	*TSNARE1 ،BAI1 ،ARC*	461705	2880765-3342470	
3	*TRAPPC9 ،CHRAC1 ،EIF2C2*	390054	4103850-4493904	
1	*TG*	84606	9215622-9300228	
2	*UBE2W ،STAU2*	86362	39152496-39238858	
8	*،DSCC1 ،TAF2 ،ENPP2 ،IMPA1 ،CHMP4C MTBP ،MRPL13 ،DEPTOR*	1543819	83072371-84616190	
1	*CDH12*	146990	51422910-51569900	BAT20
9	*،CLPTM1L ،LPCAT1 ،NDUFS6 ،IRX4 SLC9A3 ،TPPP ،BRD9 ،SLC6A18 ،TERT*	1090658	70644666-71735324	
77				جمع

جدول4- توالی پرایمرها برای ارزیابی با qPCR.

Table4- the primer sequence of qPCR.

طول قطعه **length**	پرایمر برگشت **Revers primer**	پرایمر رفت **Forward primer**	تعداد کپی **(cn)**	طول ناحیه **CNVR**	ناحیه خاتمه **CNVR End point**	ناحیه شروع **CNVR Start point**	کروموزم **Chromosom**	ناحیه تنوع **CNVR**
145	CCTTTCCTGCCAGGGGTTC	GCACACCAGGCCGTGATG	Cn=1	304130	107285912	106981782	6	CNVR16
146	CCTTTCCTGCCAGGGGTTC	GCACACCAGGCCGTGATG	Cn=1	146990	51569900	51422910	20	CNVR7
133	GAGATCGGTCCTGAGCCAGC	TGTGCGAAACTGAATTTCCTGC	Cn=1	1090658	71735324	70644666	20	CNVR12
127	GTTGTTGAGTCCCGCAGAGG	CCTGACTCCTTGGGACCCG	Cn=3	390054	4493904	4103850	14	CNVR3
131	TGGGACCAGGTTCCATGATC	TGCTTCCATTGTTTCCTGATGA	–	–	–	–	26	Control(RPP30)

جدول 5-نتایج PCR کمی برای CNVR هر سه کروموزوم.

Table-5 qPCR results for CNVR in 3 chromosomes.

شماره number	ناحیه تنوع ساختار کروموزومی CNVR	متوسط ΔC_t هدف	$\Delta\Delta C_t$	RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relative quantity	تعداد کپی ها (2*RQ)	cn نرم افزار PennCNV	تایید confirm($p<0.05$)
1	CNVR16	-1.22	-0.02	1.01	2.02	Cn=1	خیر
2	CNVR7	-0.32	0.88	0.54	1.08	Cn=1	بلی
3	CNVR12	-1.33	-0.13	1.09	2.14	Cn=1	خیر
4	CNVR3	-1.78	-0.58	1.49	2.99	Cn=3	بلی

نتیجه گیری

در این پژوهش 199 تنوع ساختار کروموزومی و 41 ناحیه با طول کلی 12 مگا جفت باز در سه کروموزوم شناسایی شد (0/5٪). نتایج به دست آمده نشان داد، تنوع ساختار کروموزومی بخش قابل توجهی از ژنوم گاو را شامل می‌شود. با توجه به پوشش وسیع و تقریبا" یکنواخت این تنوع در سراسر ژنوم و در بر گرفتن بخشی از ژن‌ها توسط آن، می‌توان از این تنوع در مطالعات ارتباطی استفاده کرد. اما قدم اول شناسایی محل درست و تعداد دقیق این تنوع است. استفاده از تعداد دام بیشتر و چیپ های متراکم‌تر در این مطالعات می‌تواند تعداد تنوع ساختار کروموزم و دقت ارزیابی را افزایش دهد. بر این اساس پیشنهاد می‌شود برای بررسی بیشتر تاثیر این تنوع بر صفات تولیدی اولا" از پانل‌های متراکم‌تر SNP با تعداد دام بیشتر استفاده شود، ثانیا" برای تایید و شناسایی نواحی از تنوع که مستقیما" بر تنوع فنوتیپی صفات تولیدی موثر است، مطالعات ارتباطی[1] انجام شود. مطالعات ارتباطی کل ژنوم به منظور شناسایی نواحی ژنومی موثر بر بیمارها (انسان) و صفات تولیدی (دام) با پانل‌های متراکم SNP انجام می‌شود. به این ترتیب که ارتباط تمامیSNPهای ژنوم با صفت تولیدی مورد مطالعه بررسی می‌گیرد و سپس SNPهای که ارتباط آن با صفت مورد بررسی معنی‌دار شده است بعنوان جهش‌های موثر بر صفت در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار می‌گیرد. این مطالعات به شیوه‌های متعددی انجام می‌گیرد. قدیمی‌ترین روش آن استفاده مستقیم از خود SNPها در آنالیزها بود پس ازآن به دلیل تراکم بالای SNPهای ژنوم و وقت‌گیر بودن بررسی تک تک آنها، استفاده از قطعات بزرگتر که حاوی چندین SNP و به طبع اطلاعات بیشتری هستند رایج شد. امروزه استفاده از تنوع ساختار کروموزومی نیز در این نوع مطالعات جایگاهی خاصی دارد. با توجه به این که تنوع-های ساختار کروموزومی حداقل یک کیلو باز

[1] Association study

طول دارند و می‌توانند بطور همزمان حاوی چندین TagSNP باشند لذا حامل اطلاعات بیشتری هستند و علاوه بر راحتی آنالیزها، قدرت شناسایی نواحی مرتبط با صفات کمی نیز در آنها بیشتر است، از این رو، این امکان وجود دارد که تنوع ساختار کروموزومی در این مطالعات جایگزین TagSNPها شود.

تشکر و قدردانی

نمونه‌ها و اطلاعات مورد استفاده در این پژوهش از مرکز ANAFI تهیه شد. به این وسیله مولفان از مسئولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Aboura A, Dupas C, Tachdjian G, Portnoi M, Bourcigaux N, Dewailly D, Frydman R, Fauser B, Ronci-Chaix N, Donadille B, Bouchard P, Christin-Maitre S (2009). Array Comparative Genomic Hybridization Profiling Analysis Reveals Deoxyribonucleic Acid Copy Number Variations Associated with Premature Ovarian Failure. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 94: 4540–4546.

Anton I, Kovacs K, Fesus L, Varhegyi J, Lehel L, Hajda Z, Polgar J P, Szabo F, Zsolnai A (2008). Effect of DGAT1 and TG gene polymorphisms on intramuscular fat and on milk production traits in different cattle breeds in Hungary. Acta Veterinaria Hungarica Journal 56: 181-186

Bae J S, Cheong H S, Kim L H, NamGung S, Park T J, Chun J Y *et al*. (2010). Identification of copy number variations and common deletion polymorphisms in cattle. BMC Genomics 11: 232.

Bouwman A C, Bovenhuis H, Visker M H and Arendonk J M. (2011). Genome-wide association of milk fatty acids in Dutch dairy cattle. BMC Genetics 12: 1471-2156

Conrad D F, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, *et al* (2009). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. Nature 464: 704-712.

Diskin, S J, Li M, Hou J, Yang S, Glessner J, Hakonarson M, Bucan M, Maris J M, and Wang K (2008). Adjustment of genomic waves in signal intensities from whole-genome SNP genotyping platforms. Nucleic Acids Research. 36: e126

Elferink M G, Vallée A A, Jungerius A P, Crooijmans R P, and Groenen M A (2008). Partial duplication of the PRLR and SPEF2 genes at the late feathering locus in chicken. BMC Genomics 9: 391.

Fadista J, Thomsen B, Holm L and Bendixen C (2010). Copy number variation in the bovine genome. BMC Genomics 11:284

Fadista J, Nygaard M, Holm L E, B Thomsen and C Bendixen (2008). A snapshot of CNVs in the pig genome.PLoS One 3: e3916.

Feuk L, Carson A R, and Scherer S W (2006). Structural variation in the human genome. Nature Reviews Genetics 7: 85–97

Fontanesi L, Beretti F, Martelli P L, Colombo M, Dall'Olio S, Occidente M, Portolano B, Casadio R, Matassino D, and Russo V (2011). A first comparative map of copy number variations in the sheep genome. Genomics 97: 158-165

Fontanesi L, Martelli P L , Beretti F, Riggio V, Dall'Olio S , Colombo M, Casadio R, Russo V, and Portolano B (2010). An initial comparative map of copy number variations in the goat (Capra hircus) genome. BMC genomics 11: 639.

Fortes M S, Curi R A, Artur L, Chardulo L and Silveira A C (2009). Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. Genetics and Molecular Biology 32: 75-82.

Giuffra E, Tornsten A, Marklund S, Bongcam-Rudloff E, Chardon P, Kijas J M., Anderson SI, Archibald A L., and Andersson L (2002). A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking KIT. Mammalian Genome 1310: 569–577.

Gotherstrom A, Anderung C, Hellborg L, Elburg R, Smith C, Bradley D G and Ellegren H (2005). Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. Proceedings of the Royal Society B 272, 2345–2350

Hastings P J, Lupski J R, Rosenberg S M and Ira G (2009). Mechanisms of change in gene copy number. Nature Review Genetic 10: 551–564.

Hou Y, Bickhart D M, Hvinden M L, Li C, Song J, Boichard D A, Fritz S, Eggen A, DeNise S, Wiggans G R, Sonstegard T S, Van Tassell C P, and Liu G E (2012). Fine mapping of copy number variations on two cattle genome assemblies using high density SNP array. BMC Genomics 13: 1471-2164

Kijas J W, Barendse W, Barris W, Harrison B, McCulloch R, McWilliam S, and Whan V (2011). Analysis of copy number variants in the cattle genome. Gene 482: 73–77.

Li X, Tan L, Liu X, Lei S, Yang T, Chen X, Zhang F, Fang Y, Guo Y, Zhang L, Yan H, Pan F, Zhang Z, Peng Y, Zhou Q, He L, Zhu X, Cheng J, Zhang L, and Liu Y (2010). A genome wide association study between copy number variation (CNV) and human height in Chinese population. Journal of Genetic & Genomics 37: 779-785

Liu G E, Van Tassel C P, Sonstegard T S, Li R W, Alexander L J, Keele J W, Matukumalli L K, Smith T P, and Gasbarre L C (2008). Detection of germ line and somatic copy number variations in cattle. Journal of Developmental Biology 132: 231-237.

Liu G E, Hou Y, Zhu B, Cardone M F, Jiang L, *et al* (2010). Analysis of copy number variations among diverse cattle breeds. Genome Research journal 20: 693-703

Liu Z J (2011). Next Generation Sequencing and Whole Genome Selection in Aquaculture. 1th Edition pp.87-90

Marques E, Grant J R, Wang Z, Kolbehdari D, Stothard P, Plastow G and Moore S S (2011). Identification of candidate markers on bovine chromosome 14 (BTA14) under milk production trait quantitative trait loci in Holstein. Journal of Animal Breeding and Genetic 128: 305–313

Marques E, Schnabel R D, Stothard P, Kolbehdari D, Wang Z, Taylor J F and Moore S S (2008). High density linkage disequilibrium maps of chromosome 14 in Holstein and Angus cattle. BMC Genetics 9: 45

Mehar S K, Peter C T, Imke T, and Herman W R (2004). Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. Genetics. Selection. Evolution. 36, 163–190

Mills R E, Walter K, Stewart C, Handsaker R E. *et al* (2011). Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. Nature 470: 59-65

Miyata M, Gasparin G, Coutinho L L, Martinez M L, Machado M A, Vinicius M, Silva G B, Campos A L, Sonstegard T S, do Rosário M F, and de Almeida Regitano L C (2007). Quantitative trait loci (QTL) mapping for growth traits on bovine chromosome 14. Genetics and Molecular Biology journal 30: 364-369.

Norris B J, and Whan V A (2008). a gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. Genome Research journal. 188: 1282–1293.

Pailhoux E, Vigier B, Chaffaux S, Servel N, Taourit S, *et al* (2001). A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. Nature Genetice. 29: 453–458.

Plante Y, Gibson J P, Nadesalingam J, Mehrabani-Yeganeh H, Lefebvre S, Vandervoort G, and Jansen G B (2001). Detection of Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production Traits on 10 Chromosomes in Holstein Cattle. Journal of Dairy Science 84: 1516–1524

Redon R, Ishikawa S, Fitch K R, Feuk L, Perry G H, Andrews T D, Fiegler H, Shapero M H, Carson A R, Chen W, *et al* (2006) Global variation in copy number in the human genome. Nature 444: 444-454.

Rosengren P G, Golovko A, Sundstrom E, Curik I, Lennartsson J, *et al* (2008). A cis-acting regulatory mutation causes premature hair greying and susceptibility to melanoma in the horse Nature Gentice 40: 1004–1009.

Seroussi, E, Glick G, Shirak A, Yakobson E, Weller J, Ezra E, Zeron Y (2010). Analysis of copy loss and gain variations in Holstein cattle autosomes using BeadChip SNPs. BMC Genomics. 11: 673

Strucken E M, Rahmatalla S, Koning D D and Brockmann G A (2010). Haplotype analysis and linkage disequilibrium for DGAT1. Archiv Tierzucht. 53: 247-255

Wang K, Li M, Hadley D, Liu R, Glessner J, Grant S F, Hakonarson H, and Bucan M (2007). PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. Genome Resarch journal 17:1665-1674.

Wang X, Nahashon S, Feaster T K, Bohannon-Stewart A, and Adefope N (2010). An initial map of chromosomal segmental copy number variations in the chicken. BMC Genomics 11: 351.

Wright D, Boije H, Meadows J R, Bed'hom B, Gourichon D, Vieaud A, Tixier-Boichard M, Rubin C J, Imsland F, Hallbook F, and Andersson L (2009). Copy number variation in intron 1 of SOX5 causes the Pea-comb phenotype in chickens. PLoS Genetics 5:e1000512.

Detection of Copy number variation in Holstein cattle genome by using 50K

Nosrati M.*[1], Tahmorespur M.[2], Nassiry M.R. [3]

[1] PhD Student, Department of animal science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[2] Professor, Department of animal science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[3] Associate Professor, Department of animal science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Abstract
Copy number variation (CNV) is important on biological mechanism. For CNV detection and distribution, three bovine autosomal chromosomes, BTA6, BTA14 and BTA6 that improved for quantitative trait loci (QTL) previously, were investigated. Blood sample we obtained from 580 animals and after DNA extraction the samples were genotyped by Illumina BovineSNP50v2 BeadChip. Three hundred eighty three samples were remained for further analysis, after correction for signal intensity and GC content. Data were analyzed based on UMD3.1 bovine genome assembly for BTA6, BTA14 and BTA20. After filtration 199 CNV were detected (132 losses and 67 gains) with 0.5 CNV per animal and mean and medium of 147.3 kb and 139.4 kb respectively. A proportion of loss to gain was 1.97 fold. The Max and Min Number of CNV detected on BTA6 and BTA20 respectively. The bioinformatics analysis showed CNV region's coverage some part of 77 reference gene in bovine genome. These results showed that CNV coverage remarkable part of the three chromosomes that contain several QTL. Because of the influence of CNV on gene dosage and gene structure, it can cause phonotypic variation in quantitative traits, so probably it can be useful on livestock breeding programs.

Keyword: Holstein cattle, CNV, SNP, Genome

* Corresponding Author: Nosrati M. Tel: 09153860817 Email: mehraveh58@yahoo.com