مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 4، شماره 2، پاییز و زمستان 1391)

مطالعه چندشکلی در ناحیه ´5 فلانکینگ ژن فاکتور رشد شبه انسولین و ارتباط آن با صفات لاشه در دو نژاد دنبه‌دار و بی‌دنبه لری‌بختیاری و زل به روش PCR-SSCP

محمود هنرور*[1]، حسین مرادی شهربابک[2]، مصطفی صادقی[2]، شهاب بهزادی[3]، محمد رضا محمدآبادی[4]

1- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد واحد شهر قدس، تهران
2- استادیار گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
3- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
4- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: 1390/11/13، تاریخ پذیرش: 1391/3/21

چکیده

فاکتور رشد شبه انسولین (*IGF-I*) ساختار مشابهی با هورمون انسولین دارد. این هورمون نقش مهمی در رشد و نمو بافت‌های مختلف بدن دارد و بوسیله ژن *IGF1* رونویسی می‌شود. ژن فاکتور رشد شبه انسولین (*IGF-I*) روی کروموزوم شماره 5 گوسفند قرار دارد و دارای 6 اگزون و 5 اینترون می‌باشد. پژوهش حاضر با هدف مطالعه ارتباط چندشکلی این ژن با صفات رشد در دو نژاد دنبه‌دار و بی‌دنبه لری-بختیاری و زل به روش *PCR-SSCP* انجام شد. در این پژوهش 4 میکرولیتر از 177 راس گوسفند نژاد زل و لری‌بختیاری با ونوجکت‌های حاوی EDTA از سیاهرگ وداجی خونگیری شد. استخراج DNA از خون با روش استخراج نمکی بهینه انجام و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (*PCR*) جهت تکثیر قطعه 265 جفت بازی ناحیه `5 فلانکینگ ژن فاکتور رشد شبه انسولین انجام گرفت. تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد *PCR-SSCP* برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. الکتروفورز محصولات *PCR* پس از تک‌رشته شدن قطعات بر روی ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد که نتایج بیانگر چندشکلی زیاد این جایگاه بود. فراوانی الگوهای ژنوتیپی 1، 2، 3 و 4 *IGF-I* در گوسفندان نژاد زل به ترتیب 37/40، 41/98، 2/29 و 18/32 درصد و فراوانی الگوهای ژنوتیپی 1، 2، 3 و 4 ژن *IGF-I* در گوسفندان نژاد لری-بختیاری به ترتیب 58، 32، 4 و 6 درصد مشاهده شد.. آنالیز داده‌های صفات با نرم‌افزار SAS انجام گرفت. هیچ یک از ژنوتیپ‌های موجود با صفات مورد مطالعه ارتباط معنی داری نشان ندادند.

کلمات کلیدی: *صفات لاشه، IGF-I، پلی مورفیسم، PCR-SSCP ،گوسفند زل و لری‌بختیاری.*

* نویسنده مسئول: محمود هنرور تلفن: 09375941526 Email:honarvar.mahmood@gmail.com

مقدمه

از آنجایی که در پرورش گوسفند عوامل مؤثر با اندازه بزرگ دنبه (شرایط اقلیمی، سیستم-های پرورشی باز، شرایط محیطی فقیر، محدودیت‌های اقتصادی و نیاز مردم به چربی) اهمیت خود را از دست داده‌اند، به نظر می‌رسد که کاهش اندازه دنبه یا درصد دنبه نسبت به لاشه بتواند در کاهش چربی لاشه و بهبود کیفیت لاشه مؤثر باشد(Moradi Shahrebabak H, 2009). کاهش میزان چربی از جمله اندازه دنبه یا درصد دنبه از دو طریق بر سود آوری اثرگذار است: یکی با افزایش سرعت رشد و بهبود کیفیت لاشه، منجر به افزایش درآمد می گردد زیرا که بازار پسندی لاشه افزایش و در نتیجه قیمت محصول افزایش می‌یابد. دوم از طریق کاهش هزینه غذا به ازای هر کیلوگرم وزن زنده یا لاشه، میزان سود حاصل را افزایش می‌دهد. در این پژوهش دو نژاد زل و لری‌بختیاری مورد بررسی قرار گرفت. نژاد زل در مناطق ساحلی دریای خزر و قسمتی از دشت گرگان پرورش داده می‌شود. خصوصیت منحصر به فرد گوسفند زل این است که به جای دنبه دارای یک دم می‌باشد که از 7 مهره تشکیل شده که طول آن حدود 12-10 سانتیمتر است و در مقایسه با نژادهای دم دار خارجی بسیار کوتاه است. این نژاد به رنگ‌های سیاه، سفید و قهوه‌ای روشن تا تیره دیده می‌شود. پوست آن به دلیل کوچک و نازک بودن مرغوب نیست. گوسفند لری بختیاری یکی از نژادهای سنگین و ممتاز کشور از نظر صفات تولیدی می‌باشد. محل اصلی پرورش آن استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد ولی به سبب خصوصیات ممتاز آن در استان‌های همجوار (نظیر اصفهان، لرستان، کهکیلویه و بویر احمد و خوزستان) به صورت آمیخته پرورش می‌یابد (Moradi Shahrebabak H, 2009).

نژاد گوسفند لری بختیاری دارای سر بزرگ و بینی تا قسمت انتهایی آن دارای خمیدگی محدب است. گوشها بلند و افتاده و پشت و کمر پهن و تخت است. دنده‌ها و پهلو پهن و دراز و در مجموع استخوان بندی قوی و محکم است. چشم‌ها درشت، ران‌ها پهن و عضلانی و بطور کلی تمام اندازه‌ها متناسب با جثه و قوس‌دار می باشند. دنبه متناسب با اندازه بدن و بزرگ است که توسط یک شکاف عمیق به دو لب قرینه تقسیم شده است. همچنین از محل رویش شاخ‌ها یک دسته پشم ضخیم و بلند رشد می نمایند که بر زیبایی این نژاد می‌افزاید. در این نژاد رنگ غالب سفید است ولی به رنگ‌های ابلق سیاه و سفید، قرمز و سفید و حنایی نیز دیده می‌شود (Moradi Shahrebabak H, 2009).

فاکتور رشد شبه انسولین (*IGF-1*) پپتید کوچکی است که رشد و نمو بسیاری از سلول ها از طریق چرخه سلولی را کنترل می کند. این هورمون در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی بدن مثل رشد، شیر دهی، تولید مثل و سیستم ایمنی نقش دارد. اگر چه مقادیر کمی *IGF-1* در بعضی از بافت ها ساخته می شود اما بخش عمده این هورمون در کبد سنتز می شود. هورمون رشد یا سوماتوتروپین یکی از عواملی است که ممکن

است سبب افزایش سنتزIGF-1 در کبد شود و همچنین تولید موضعی این هورمون را در دیگر بافت ها تحریک کند (Abdolmohammadi, 2008). محورسوماتوتروپیک (*IGFBP-IGF-GH*) مهمترین سیستم هورمونی در بدن بوده که تنظیم متابولیسم و فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با رشد را کنترل می کند. این سیستم شامل هورمون رشد، *IGF-1* تیپ 1و2، گیرنده های تیپ 1و 2 مربوط به*IGF* و 6 پروتئین باند شونده‌ی (*IGFBP1-6*) می‌باشد (Abdolmohammadi, 2008). در دهه 1950 برای اولین بار هورمون‌های *IGF* در موش شناسائی و تحت عنوان عوامل واسطه محرک رشد نام گذاری شدند. در سال 1963 مشخص شد که این هورمون ها فعالیتی شبیه انسولین در بدن دارند. در سال 1972، نام سوماتومدین برای این هورمون ها انتخاب گردید و در نهایت در دهه 1970 هورمون های IGF در پلاسمای انسان خالص سازی و با شناسائی دو پپتید فعال، نام *IGF* تیپ 1و2 برای آنها مرسوم شد (Abdolmohammadi, 2008). هورمون های *IGF-1* و *IGF-II*، پپتید های تک زنجیره ای با وزن مولکولی 7500 دالتون می باشند.*IGF-1* از 70 اسید آمینه و *IGF- II* از 67 اسید آمینه تشکیل شده است و توالی اسیدآمینه های آنها 62 درصد با هم مشابه می باشد. دلیل نامگذاری *IGF-1*، تشابه توالی اسید آمینه آن با انسولین در انسان(50 درصد) و عمل تقریباً مشابه آنهاست، اما تفاوت عمده آنها در نحوه گردش این دو هورمون در خون است. برخلاف انسولین، هورمون های *IGF* در مایعات بیولوژیکی به یکی از6 پروتئین باند شونده (*IGFBP*) وصل می شوند که عمده ترین آنها پروتئین تیپ 3 می باشد .این پروتئین ها نقش های متفاوتی در تنظیم فعالیت بیولوژیکی *IGF* ایفاء می کنند. پروتئین باند شونده تیپ 3 به عنوان حامل IGF عمل کرده و نیمه عمر آن را طولانی تر می کند، در سطح سلولی *IGFBP* هامی توانند سبب فعال یا غیر فعال شدن فعالیت بیولوژیکی هورمون *IGF* شوند (Abdolmohammadi, 2008). نتایج مطالعات متعددی نشان می دهد که در زمان سن بلوغ گاوهای نر و ماده (9 ماهگی)، غلظت *IGF-1* پلاسما به اوج می رسد. افزایش غلظت این هورمون در زمان اوج رشد بدن تلیسه ها، مشاهده شده است و غلظت *IGF-1* پلاسما در گاوهای ماده جوان در حال رشد در مقایسه با دامهای مسن، بالاتر می باشد. رابطه بین *IGF-1* پلاسما با تعادل انرژی، تولید و تولید مثل، این پتانسیل را ایجاد می کند که *IGF-1* به عنوان ابزاری در برنامه های اصلاحی و مدیریتی دام‌ها مورد استفاده قرار گیرد. بر همین اساس برای بهبود راندمان تبدیل غذا در گاو های گوشتی استرالیا، انتخاب برای *IGF-1* با موفقیت انجام گرفته است. وراثت پذیری غلظت *IGF-1* پلاسما در گاوهای شیری و گوشتی، از 18 تا 48 درصد گزارش شده است، این برآوردها نشان می دهد که در نظرگرفتن فاکتوری مثل IGF-1 در شاخص انتخاب چند صفته، ممکن است بتواند سبب

افزایش سودمندی دام‌ها شود (Abdolmohammadi, 2008). ژن IGF-1 دارای 6 اگزون و 5 اینترون بوده و در 73/5 سانتی مورگانی کروموزوم 5 نقشه یابی شده است. در ناحیه 5' این ژن ، یک نشانگر ریزماهواره مشخص گردیده ،که در گاوهای گوشتی با صفات وزن از شیر گیری و وزن تولد در ارتباط است. اولین بار با استفاده از تکنیک *SSCP* یک موتاسیون تک نوکلوتیدی در ژن IGF-1 گزارش شد (Li K et al., 1997). در پژوهشی مشخص کردند که در ناحیه `5 فلانکینگ این ژن و512 جفت قبل از اولین کدون اگزون اول (ATG)، یک جایگزینی نوکلئوتیدی T به جای C اتفاق افتاده است. این پلی‌مورفیسم با آنزیم برشی S*na*BI قابل شناسائی است (Ge, W. et al., 2001). در مقالات آلل وحشی این جایگاه (نوکلئوتید C) به اسم آلل B شناخته شده و آنزیم مذکور سبب برش آن نمی شود. آلل جهش یافته (نوکلئوتید T)، یا آلل A در این جایگاه، توسط این آنزیم شناسائی و برش داده می شود. در تحقیق اول فراوانی آلل A در دو جمعیتی که برای غلظت *IGF-1* پلاسما انتخاب شده بودند، به طور معنی داری متفاوت بود (88 درصد در لاین سنگین و 26 درصد در لاین سبک). ژنوتیپ BB در این جایگاه ژن *IGF-1* با اضافه وزن بدن در 20 روز پس از شیر گیری ارتباط داشت. اولین بار با استفاده از تکنیک SSCP دو موتاسیون تک نوکلوتیدی در پروموتور ژن *IGF-1* در گوسفندان خالص Polypay (تلاقی داده شده با نژادهای همپشایر، رامبویلت، دورست، سافوک) گزارش شد. به طوری که جایگزینی C با T و C با G در ناحیه تنظیمی ژن کشف شد، که توسط آنزیم برشی *Hae*I و *Bsp*143II شناسائی و برش داده می شوند (Yilmaz A. et al., 2005).

در پژوهشی اثر معنی دار چند شکلی در ناحیه پروموتور این ژن را روی وزن بدن گوسفند را نشان دادند (Thomas et al., 2007). در پژوهشی دیگر اثر معنی دار ژن *IGF-1* در گاوهای آنگوس وشاروله را بر چربی پشت (اندازه گیری شده با اولتراسوند) افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک نشان دادند (Sherman EL. Et al., 2008) ($P<0.05$). در گاوهای گوشتی آنگوس، ژنوتیپ TT یا آلل جهش یافته (A) سبب کاهش معنی داری در ضخامت چربی پشت (اندازه‌گیری شده توسط اولتراسوند) می‌شوند ($P<0.03$) و اثر متوسط جایگزینی آللی برابر 0/57- میلی متر بود و سبب افزایش وزن لاشه گرم با اثر متوسط جایگزینی آللی 2/53 کیلوگرم شده بود (Islam K. et al., 2009). در گاوهای گوشتی آنگوس و سمینتال نشان دادند که اثر این جایگاه بر وزن بدن و ضخامت چربی پشت معنی دار بود ($P<0.05$) و ژنوتیپ BB دارای وزن لاشه گرم و ضخامت چربی بالاتری بود (Curia RA. Et al., 2005). فراوانی آلل A یا آلل جهش یافته 0/32 و آلل B 0/68 بود که دارای تفاوت معنی‌دار بود.

هدف از پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی‌های موجود در ناحیه 5 فلانکینگ ژن

فاکتور رشد شبه انسولین و برآورد میزان فراوانی الگوهای ژنوتیپی مختلف این جایگاه و بررسی رابطه بین چندشکلی این الگوهای ژنوتیپی با صفات رشد در گوسفندان نژاد زل و لری‌بختیاری با استفاده از تکنیک *PCR-SSCP* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد 177 رأس از گوسفند زل و لری‌بختیاری با استفاده از ونوجکت‌های EDTA دار خونگیری شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای 4- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA با روش استخراج نمکی بهینه یافته انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتوفوتومتر تعیین شد. برای انجام واکنش *PCR* از مواد شرکت GENNET جهت تکثیر رشته‌ی مورد نظر استفاده شد. غلظت نهایی واکنش 25 میکرولیتر بود که به شرح جدول 1 می‌باشد.

با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، یک قطعه 265 جفت بازی از ناحیه `5 فلانکینگ ژن فاکتور رشد شبه انسولین بوسیله واکنش زنجیره پلی‌مراز تکثیر شد که توالی آغازگرها به شرح زیر می‌باشد:

F: 5′-ATTACAG CTGCCTGCCCCTT-3′
R: 5′-CACATCTGCTTACACCTTACCCG-3′

تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر نوع *BIO-RAD* با شرایط دمایی زیر انجام شد:

شروع واسرشت سازی DNA	5 دقیقه	95c
تک رشته‌ای شدن DNA	30 ثانیه	95˚c
اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای	30 ثانیه	62C
بسط آغازگر	30 ثانیه	72c
تکمیل بسط	7دقیقه	72c

35 چرخه

الکتروفورز محصولات *PCR* روی ژل آگارز 2 درصد با ولتاژ 120 ولت و مدت 20 دقیقه صورت گرفت و ژل مربوطه پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر اشعه ماورای بنفش بررسی شدند. به منظور انجام واکنش *SSCP*، رشته‌های DNA تکثیر شده با استفاده از *SSCP* dye به نسبت 12 به 5 به مدت زمان 10 دقیقه در دمای 95° C تک‌رشته‌ایی شدند که بلافاصله پس از این مرحله در داخل یخ قرار گرفتند. الکتروفورز محصولات تک رشته‌ایی شده روی ژل اکریل آمید 12 درصد با ولتاژ 300 V به مدت 17 ساعت جهت بررسی چند شکلی‌ها انجام و رنگ آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره صورت گرفت.

جدول 1- غلظت‌های مورد استفاده از مواد برای انجام واکنش *PCR*.

Table 1: Concentration of material used for the reaction of *PCR*.

غلظت نهایی Final concentration	مقدار مورد استفاده Used content	غلظت ذخیره اصلی Concentration of original stock	نام ماده Name of matter
1.5 Mm/µL	1.5 µL	25 Mm/µL	MgCl2
1 X	2.5 µL	10X	PCR buffer
0.8 Mm/µL	2 µL	10 Mm/µL	dNTPs
0.5 pm/µL	1.25 µL	10 pm/µL	Primer (Forward)
0.5 pm/µL	1.25 µL	10 pm/µL	Primer (Reverse)
0.06 unit/µL	0.3 µL	5 unit/µL	Taq DNA Polymerase
-	2 µL	stock	DNA
-	14.2 µL	-	dH_2O

تجزیه آماری ژنوتیپ‌ها

پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی و تعیین ژنوتیپ تمام نمونه ها، شمارش ژنوتیپ ها و تعیین فراوانی ژنوتیپ‌ها مشاهده شده در نژاد مورد بررسی قرار گرفت.

روش آماری

در این پژوهش پس از تعیین ژنوتیپ تک تک دامها برای جایگاه مورد بررسی این اطلاعات به همراه داده‌های مربوط به وزن زنده، وزن لاشه گرم، وزن لاشه گرم بدون دنبه، وزن دنبه، درصد دنبه، ضخامت چربی پشت بین دنده دوازده و سیزده، تری گلیسرید خون، کلسترول خون، سن دام و جنس وارد برنامه Excel و پس از ویرایش وارد برنامه SAS شده و با رویه GLM تجزیه شدند. در این آزمایش اثر ژنوتیپ‌های *IGF-I* به‌عنوان عامل ثابت تأثیرگذار بر صفات لاشه در معادله مدل قرار داده شد. به این صورت که الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده‌ی ژن *IGF-I* تعداد سطوح این عامل ثابت را تشکیل می‌داد. اثر سن و جنس حیوان به عنوان عامل ثابت و اثر وزن مربوط به وزن قبل از کشتار دام مورد نظر به عنوان کوواریت در مدل قرار داده شد. معادله‌ی مدل به شکل زیر بود:

$$Y_{ijlko} = \mu + A_i + G_j + D_k + b(W_{ijlko} - \overline{W}) + (AG)_{ij} + e_{ijko}$$

Y_{ijklo}: هر یک از مشاهدات مربوط به صفات وزن دنبه، وزن لاشه، ضخامت چربی پشت، سطح تری گلیسرید و کلسترول خون از تمام دامهای خونگیری شده.

μ: میانگین جمعیت

A_i: اثر i امین سن حیوان در هنگام خونگیری (سن حیوان با بررسی دندان آنها تعیین و ثبت می شود).

G_j: اثر j امین ژنوتیپ ژن *IGF-I*

b: ضریب تابعیت Y روی W (وزن دام‌ها در هنگام خونگیری)

W_{ijo}: وزن دام‌ها در هنگام خونگیری.

$\overline{W}$: میانگین وزن دام‌ها در هنگام خونگیری.

e_{ijko} : باقیمانده مدل.

محاسبه فراوانی ژنوتیپی *IGF-I*

فراوانی‌های ژنوتیپی بر اساس بررسی در جدول 2 آورده شده است. ژنوتیپ‌های 1، 2، 3 و 4 *IGF-I* در گوسفندان نژاد زل به ترتیب با فراوانی های 37/40، 41/98، 2/29 و 18/32 و ژنوتیپ‌های 1، 2، 3 و 4 *IGF-I* در گوسفندان نژاد لری‌بختیاری به ترتیب با فراوانی های 58، 32، 4 و 6 درصد مشاهده شد. ملاحظه می‌شود که ژنوتیپ 1 و 2 در گوسفندان نژاد زل و لری-بختیاری دارای بیشترین فراوانی ژنوتیپی بود.

در جدول مقایسه میانگین حداقل مربعات مربوط به نژاد لری‌بختیاری، به علت کم بودن تعداد دام‌ها و مشکل داشتن داده‌های مربوط به دام‌های الگوی 4، از آنالیز مقایسه میانگین‌ها حذف شد.

تأثیر چند شکلی ژن *IGF-I* بر وزن و بازده لاشه

نتایج آنالیز واریانس صفت لاشه در جدول 3-الف و 3-ب نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس برای این صفت نشان می‌دهد که اثرات ژنوتیپ‌های *IGF-I* بر وزن لاشه و بازده لاشه گرم معنی دار نبودند.

تأثیر چند شکلی ژن *IGF-I* بر وزن و درصد دنبه و عمق بافت چربی

نتایج آنالیز واریانس صفات وزن و درصد دنبه عمق چربی در جداول 3-الف و 3-ب ارائه شده است. اثر ژنوتیپ‌های *IGF-I* یر روی این صفت معنی‌دار نبود.

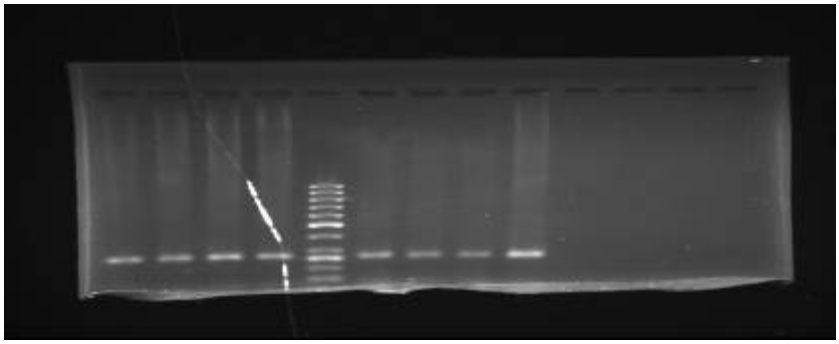
تأثیر چند شکلی ژن *IGF-I* بر مقدار تری گلیسرید و کلسترول خون

نتایج آنالیز واریانس پارامترهای خونی در جدول 3-الف و 3-ب ارائه شده است. نتایج آنالیز واریانس برای تری گلیسرید و کلسترول خون نشان می‌دهد که اثرات ژنوتیپ‌های مختلف معنی دار نبودند.

نتایج و بحث

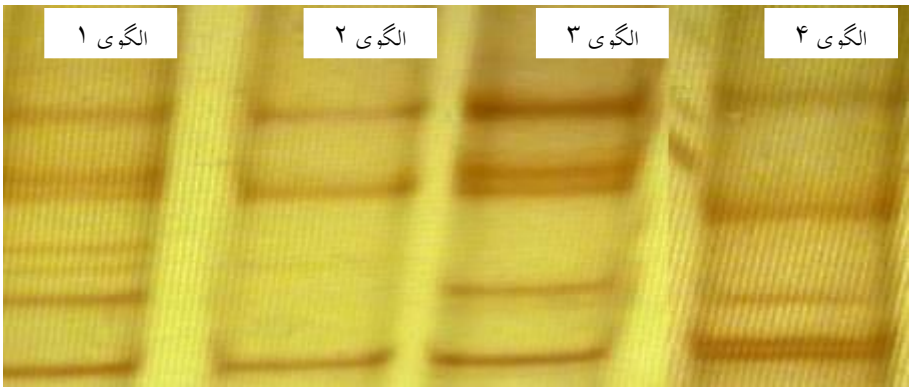
طی واکنش *PCR*، قطعه 265 جفت بازی ناحیه `5 فلانکینگ ژن فاکتور رشد شبه انسولین تکثیر شد (شکل 1). الگوهای ژنوتیپی حاصل از انجام واکنش *SSCP* در شکل 2 آمده‌اند. نتایج حاکی از وجود تنوع در این جایگاه بود که فراوانی آنها محاسبه گردید. همانطور که مشاهده می‌شود در نژاد زل ژنوتیپ 2 با 41/98 درصد بیشترین فراوانی را داشت و در نژاد لری-بختیاری ژنوتیپ 1 با 58 درصد بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. این تفاوت ممکن است ناشی از وجود جهش‌های تک نوکلئوتیدی

(SNP) در ژنوم این دو نژاد باشد. از آنجا که این دو نژاد از لحاظ ژنتیکی با یکدیگر دارای تفاوت معنی‌داری هستند، بصورتی که نژاد زل بی‌دنبه و نژاد لری-بختیاری دنبه‌دار است می‌توان چنین استنباط کرد که جهش‌های تک نوکلئوتیدی سبب بروز تفاوت‌های ژنتیکی بین این نژادها شده است. الگوهای ژنوتیپی با هیچیک از صفات مورد مطالعه اثر معنی‌داری نشان ندادند. از آنجایی که ژن فاکتور رشد شبه انسولین نقش کلیدی در محور سوماتوتروپیک دارد، همچنین به عنوان یک نشانگر مولکولی مهم در بررسی صفات رشد و تولیدمثلی در دام‌های مزرعه‌ایی می‌توان استفاده کرد و با توجه به اینکه داده‌های این پژوهش کشتاری است، بهتر است که روی داده‌های دقیق-تر که دوره‌ی پرورش با عوامل مدیریت و تغذیه شناخته شده انجام شود تا اثرات این ژن کاملا شناخته شود.



شکل 1- قطعه 265 جفت بازی حاصل از تکثیر ژن فاکتور رشد شبه انسولین روی ژل آگارز.

Figure 1- Agarose gel electrophoresis examination of amplification product 265 bp of *IGF-I*.



شکل 2- الگوهای موجود در ژل *SSCP* جایگاه bp 265 ژن *IGF-I*.

Figure 2- *PCR-SSCP* genotypes of *IGF-I*.

جدول 2- الف) فراوانی الگوهای ژنوتیپی مرتبط با ژن *IGF-I* در گوسفندان نژاد زل.

Table 2-a) Frequency of pattern of the genotype related to *IGF-I* gene in Sheep breed Zel.

الگوی ژنوتیپی Genotype pattern	تعداد دام (فراوانی ژنوتیپی) Number of Animals (Genotype frequency)
1	49 (%37.40)
2	55 (%41.98)
3	3 (%2.29)
4	24 (%18.32)

جدول2- ب) فراوانی الگوهای ژنوتیپی مرتبط با ژن *IGF-I* در گوسفندان نژاد لری‌بختیاری.

Table 2-b) Frequency of pattern of the genotype related to *IGF-I* gene in Sheep breed Lori-Bakhtiari.

الگوی ژنوتیپی Genotype pattern	تعداد دام (فراوانی ژنوتیپی) Number of Animals (Genotype frequency)
1	29 (%58)
2	16 (%32)
3	2 (%4)
4	3 (%6)

جدول 3-الف) میانگین حداقل مربعات(±SE) اثر ژنوتیپ‌های مختلف در نژاد لری بختیاری.

Table 3-a) Least square mean (LSM) different effect of genotype in sheep breed Lori-Bakhtiari.

3	2	1	ژنوتیپ Genotype
23.93±0.65	24.20±1.09	24.51±0.37	وزن لاشه گرم (کیلوگرم) Carcass weight???
4.31±0.28	3.77±0.47	4.68±0.31	ضخامت چربی پشت (میلی متر)
4.07±0.32	3.41±0.54	4.51±0.36	وزن دنبه
19.85±0.71	20.78±1.19	19.92±0.79	وزن لاشه گرم بدون دنبه
28.24±1.55	23.75±2.60	30.10±1.73	تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی-لیتر)
95.69±4.32	93.01±7.21	98.17±4.79	کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر)
45.73±0.73	45.45±1.21	45.06±0.81	بازده لاشه
38.22±1.17	40.72±1.96	36.88±1.30	بازده لاشه بدون دنبه
16.60±1.76	10.89±2.94	18.24±1.95	بازده دنبه

* حروف لاتین غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد

جدول 3-ب) میانگین حداقل مربعات(±SE) اثر ژنوتیپ‌های مختلف در نژاد زل.

Table 3-b) Least square mean (LSM) different effect of genotype in sheep breed Zel.

ژنوتیپ Genotype	1	2	3	4
وزن کشتار	25.97±1.05	26.19±0.98	26.78±4.20	21.07±6.02
وزن لاشه گرم (کیلوگرم)	12.01±0.51	12.40±0.48	11.83±2.05	9.28±2.94
ضخامت چربی پشت (میلی متر)	4.33±0.27	4.36±0.25	5.02±1.09	1.26±1.56
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	23.56±0.97	21.81±0.97	17.35±3.89	20.37±5.58
کلسترول (میلی گرم در دسی لیتر)	90.52±2.21	88.76±2.06	99.40±8.81	79.85±12.64
بازده لاشه	46.34±0.60	46.96±0.56	43.56±2.42	43.99±3.47

* حروف لاتین غیر مشابه بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد

منابع

Abdolmohammadi A, Moradi shahrebabak M, Mehrabani Yeganeh H (2008). Study of Genetic Variation for Four Candidate Genes Using PCR-RFLP and HRM and Their Association with Reproduction and Production Traits in Holstein Cows of Iran. Thesis of Ph.D. University of Tehran (In Farsi).

Curia RA, De HN, Oliveirab A, Silveirab C, Lopesa CR (2005). Association between IGF-I, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. Livestock Production Science 94: 159–167.

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

Islam K, Vinsky KM, Crews REE, Okine S, Moore S, Crews DH (2009). Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in hybrid, Angus and Charolais beef cattle. Animal Genetics 40: 766–769.

Li K, Croaker MP, Hansen LB, Chester-Jones H (1997). Ssociation of somatotropin (BST) Gene polymorphism ay the 5th exon with selection for milk yield in holstein cows. Domestic Animal Endocrinology 13: 373-381.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Oxford Journals. Life Sciences. Nucleic Acids Research 16: 1215.

Moradi shahrebabak H, Moradi shahrebabak M, Mehrabani Yeganeh H (2009). Association polymorphism of the genes calpastatin, miostatin, leptin, and potassium with economic traits, blood metabolite and carcass traits in makoei and zel sheep. Thesis of Ph.D. University of Tehran (In Farsi).

Roniasizadeh F (2002). Harison interior doctrine medicine, Gland, methabolism and nourishment, Teymorzadeh Publishers (In Farsi).

Sherman EL, Nkrumah JD, Murdoch BM, Li C, Wang Z, Fu A, Moore SS (2008). Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. Journal of Animal Science 86: 1-16.

Thomas MG, Enns RM, Shirley KL, Garcia MD, Garrett AJ, Silver GA (2007). Associations of DNA polymorphisms in growth hormone and its transcriptional regulators with growth and carcass traits in two populations of Brangus bulls. Genetic and Molecular Research 6: 222-237.

Yilmaz A, Michael E, Harold D, Hines C, Chung H (2005). Detection of two nucleotide substitutions and putative promoters In the 5'flanking region of the ovine IGF-I gene. Journal of Applied Genetics 46: 307-309.

Study of the polymorphism at the 5' flanking region of the ovine *IGF-I* Gene and its association with carcass traits in Zel (tailed) and Lori-Bakhtiari (fat-tailed) breed sheep using *PCR-SSCP*

Honarvar M.[*1], Moradi-Shahrebabak H.[2], Sadeghi M.[2], Behzadi Sh.[3], Mohamadabadi M.R.[4]

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3-M.S. Graduated Student Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran.
4- Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

The Insulin-Like Growth Factor I (*IGF-I*) Gene has a similar structure with Insulin hormone. That has an important functional in growth and development different tissue and transcribe. The *IGF-I* gene coded this hormone which located on Chromosome five which has six exons and five introns. The single nucleotide polymorphism was occurred in *IGF-I* gene and that associated with carcass traits in Zel (tailed) and Lori-Bakhtiari (fat-tailed) breed sheep with using PCR-SSCP marker. For this purpose, 4 mL of total blood was collected from the left jugular vein using vacuum tubes from Zel and Lori-Bakhtiari sheep breeds. Genomic DNA was purified from 1000-µl of blood samples that using the salting-out procedure and amplified region is located in the 5' flanking region of the ovine *IGF-I* Gene. The *IGF-I* gene 5'flanking fragment was amplified which investigated with Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) method for genotyping. Electrophoresis of PCR products were done on acrylamide gel that observed the polymorphic in this region. The frequency of patterns in Zel and Lori-Bakhtiari breeds were A (37.40%), B (41.98%), C (2.29%), D (18.32%) and A (58%), B (32%), C (4%), D (6%) respectively. Finally, for analysis of some traits was used SAS program. No significant associations of the SNPs in the 5' flanking region of the ovine *IGF-I* Gene were observed for any trait.

Key words: *5' flanking region of the ovine IGF-I Gene, SNP, PCR-SSCP, Ovine*.

∗ Corresponding Author: Honarvar M. Tel: 09375941526 Email: honarvar.mahmood@gmail.com