



مطالعه چندشکلی ژن IGFBP3 و ارتباط آن با صفات لاشه و ترکیب اسیدهای چرب و برخی فراسنجه‌های خون در گوسفند نژاد زل با روش PCR-SSCP

علی قاضی خانی شاد^{1*}، حسین مرادی شهربابک²، مصطفی صادقی²، رضا فرجی³، محمد رضا محمدآبادی⁴

¹ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، گروه علوم دامی، ساوه، ایران

² استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، کرج، ایران

³ دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، کرج، ایران

⁴ دانشیار دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه علوم دامی، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: 1391/07/19، تاریخ پذیرش: 1392/01/17

چکیده

هورمون *IGF1* در مایعات بیولوژیک به یکی از پروتئین‌های باند شونده متصل می‌شود که عمده ترین آنها تیپ 3 (*IGFBP3*) می‌باشد. این پروتئین به عنوان حامل *IGF1* عمل کرده و نیمه عمر آن را طولانی تر می‌کند و در سطح سلولی سبب افزایش یا کاهش فعالیت بیولوژیکی *IGF* می‌شود. تحقیق حاضر با هدف مطالعه ارتباط چندشکلی این ژن با صفات لاشه و ترکیبات اسید چرب در گوسفند نژاد بی دنبه زل با روش *PCR-SSCP* انجام شد. در این پژوهش 130 راس گوسفند زل به طور تصادفی مورد خون گیری و ثبت صفات لاشه قرار گرفتند. برای مطالعه اسیدهای چرب، خون گیری با ونوجکت‌های EDTA دار انجام شد و بلافاصله نمونه‌ها برای جداسازی پلاسما سانتریفیوژ شدند. استخراج DNA از بافت ماهیچه بوسیله کیت شرکت *BIOTECH* صورت گرفت. سپس *PCR* برای تکثیر قطعه 654 جفت‌بازی ژن *IGFBP3* انجام گرفت. برای تعیین چندشکلی نمونه‌ها، الکتروفورز محصولات *PCR* پس از تکرار شده شدن قطعات (روش *SSCP*) روی ژل اکریل آمید و رنگ آمیزی ژل به روش نترات نقره انجام شد. نتایج بیانگر وجود الگوهای متفاوت بود که می‌تواند ناشی از وجود چندشکلی در این جایگاه باشد. فراوانی الگوهای ژنوتیپی 1، 2، 3، 4 و 5 ژن *IGFBP3* در این جمعیت به ترتیب 66/67، 3/33، 6/67، 13/33 و 10 درصد بود. صفات وزن لاشه گرم ($P < 0.05$)، ضخامت چربی پشت ($P < 0.01$) و پروتئین خام گوشت ($P < 0.01$) ارتباط معنی دار با الگوهای مختلف نشان دادند. درمورد ترکیبات اسید چرب هم تنها ارتباط معنی دار بین اسیدچرب هپتادکانوئیک (C17:0) با الگوهای مختلف ژن *IGFBP3* مشاهده شد ($P < 0.01$). بین سایر صفات و اسیدهای چرب هیچ ارتباط معنی داری با الگوهای *IGFBP3* در این تحقیق مشاهده نشد. کلمات کلیدی: صفات لاشه، *IGFBP3*، چند شکلی، *PCR-SSCP*، اسیدهای چرب، زل.

مقدمه

امروزه در امر پرورش گوسفند، عواملی نظیر شرایط اقلیمی، سیستم‌های پرورشی باز، شرایط محیطی فقیر و محدودیت‌های اقتصادی از یک طرف و همچنین عدم استقبال مردم از چربی (به دلیل ارتباط آن با بیماری‌های قلبی و عروقی) از طرف دیگر باعث کاهش روز افزون بازار پسندهای و صرفه اقتصادی تولید چربی (دنبه و چربی بین بافتی) شده است. بنابراین به نظر می‌رسد که کاهش چربی نسبت به پروتئین لاشه و تغییر ترکیب اسیدهای چرب گوشت به سمت کاهش چربی‌های اشباع (سخت) و افزایش اسیدهای چرب مطلوب نظیر امگا 3 (C18:3) و امگا 6 (C18:2)، برای بهبود کیفیت لاشه امری لازم و اقتصادی محسوب می‌شود. کاهش مقدار چربی از دو روش بر سود آوری اثرگذار است: الف- افزایش سرعت رشد و بهبود کیفیت لاشه به دلیل افزایش بازار پسندهای، منجر به افزایش درآمد می‌گردد. ب- کاهش هزینه غذا به ازای هر کیلوگرم وزن زنده یا لاشه نیز باعث افزایش میزان سود حاصل می‌شود (Martin and Baxter, 1992). در این تحقیق نژاد زل 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 وجود دم به جای دنبه است. محورسوماتوتروپیک (IGF-IGFBP-GH) مهمترین سیستم هورمونی بدن بوده که

تنظیم متابولیسم و فرایندهای فیزیولوژیکی مرتبط با رشد را کنترل می‌کند. این سیستم شامل هورمون رشد، IGF-1 (تیپ 1 و 2)، گیرنده های مربوط به IGF (تیپ 1 و 2) و 6 پروتئین باند شونده (IGFBP-6) می‌باشد (3 و 14). هورمون های IGF-1 و IGF-2، پیپتید های تک زنجیره ای با وزن مولکولی 7500 دالتون می باشند (Morimoto et al, 2005). IGF-1 از 70 اسید آمینه و IGF-2 از 67 اسید آمینه تشکیل شده است و توالی اسید آمینه های آنها 62 درصد با هم مشابه می‌باشد (Moradi Shahrehabak et al, 2009). برخلاف انسولین، هورمون های IGF در مایعات بیولوژیکی به یکی از 6 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 (Chudhary et al, 2007). پروتئین باند شونده تیپ 3 به عنوان حامل IGF عمل کرده و نیمه عمر آن را طولانی تر می کند، در سطح سلولی IGFBP ها می‌توانند سبب فعال یا غیر فعال شدن فعالیت بیولوژیکی هورمون IGF شوند (Hastie et al, 2004). ژن پروتئین باند شونده به فاکتور رشد شبه انسولین تیپ 3 ژن ساختاری و مسئول اثرات متعددی از ژن IGF-1 است (Cheong et al, 2008). ژن IGFBP3 در گاو مشخص و mRNA آن کلون سازی شده است که شامل 1650 جفت-باز

ذبح به کشتارگاه صنعتی از اوسط تیر ماه تا اواخر شهریور ماه سال 1388 آورده شده بودند، انجام گرفت. گوسفندان مورد آزمایش به صورت تصادفی از بین گوسفندان ارائه شده جهت فروش انتخاب گردیدند. بدین صورت که در خلال مدت داده برداری در هر هفته 5 تا 6 روز به کشتارگاه مراجعه می‌شد و به طور متوسط روزانه 7 تا 8 رأس گوسفند به طور تصادفی مورد رکورد برداری قرار می‌گرفت. گوسفندان مورد مطالعه بین سنین مختلف و تحت شرایط اقلیمی، پرورشی و مدیریتی متفاوتی قرار داشتند. به طوری که برخی از آنها بلافاصله پس از شیرگیری و برخی دیگر دوره‌های متفاوت پروراری را با استفاده از جیره‌های مختلف و یا چرا بر روی پس چر گیاهان زراعی و کشتزار یونجه طی کرده و برای کشتار عرضه شده بودند. اغلب گله داران، گوسفندان خود را یک شب قبل از کشتار به سالن انتظار کشتارگاه حمل می‌کردند. قبل از کشتار گوسفندان در نظر گرفته شده جهت اندازه گیری رکوردهای مورد نظر، با آویزان کردن پلاک موقتی به گردن آنها، شماره گذاری و شناسایی می‌شدند. پس از شماره گذاری، جنس، سن (با سوال از دامدار و ارزیابی دندان‌ها) و وزن آنها تعیین می‌شد. در حالی که گوسفند در یک جایگاه ثابت و مهار می‌شد، خونگیری برای انجام استخراج DNA و گرفتن پلاسما جهت اندازه گیری پارامترهای خونی صورت می‌گرفت. پس از اتمام اندازه گیری‌ها و خون‌گیری، گوسفندان

است. کل ژن دارای 8500 جفت باز و شامل 5 اگزون می‌باشد (Chudhary et al, 2007). ژن پروتئین باند شونده به فاکتور رشد شبه انسولین تیپ 3 در انسان روی کروموزم 7 مشخص شده (در گوسفند هنوز مکان یابی نشده است). مطالعات چندشکلی و توالی یابی نوکلئوتیدهای این ژن در گاو و گاو میش گزارش شده، اما در مورد گوسفند تا کنون بررسی شایان ذکری صورت نگرفته است. گرچه توالی قطعات mRNA این ژن در گوسفند بررسی و در سایت GEN BANK ثبت گردیده است. ارتباط بین ژن IGFBP3 با صفات لاشه در گاو گزارش شده است. (Sun, 2002). هدف از تحقیق حاضر، شناسایی چندشکلی‌های موجود در اگزون 3 ژن پروتئین باند شونده تیپ 3 (IGFBP3) به فاکتور رشد شبه انسولین و برآورد میزان فراوانی الگوهای ژنوتیپی مختلف این جایگاه و بررسی ارتباط این چندشکلی‌ها با صفات رشد و ترکیب اسیدهای چرب در نژاد زل با استفاده از تکنیک PCR-SSCP بود. که در نهایت بتوان در راستای بهبود صفات لاشه و ترکیبات اسیدهای چرب از شناسایی و انتخاب ژنومیک دام‌های برتر از لحاظ این ژن کمک گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با استفاده از رکوردهای اندازه گیری شده روی 120 رأس گوسفند زل که برای

غشاء سلولی و خارج کردن هسته از درون سول استفاده می‌شود.

2- ورتکس نمونه‌ها و قرار دادن بر روی یخ به مدت 10 دقیقه و سانتریفیوژ در 3000 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه

3- خارج کردن مایع رویی و نگهداری رسوب

4- تکرار مراحل فوق تا تشکیل رسوب سفید

5- اضافه کردن بافر لیز کننده (10 Tris-HCl میلی مولار pH=8.2, 400 mM NaCl, EDTA 2mM pH=8) به میزان 300 میکرولیتر و سپس آنقدر ورتکس می‌کنیم تا رسوب کاملاً حل شود. از این بافر برای از بین بردن دیواره هسته استفاده می‌کنیم. سانتریفیوژ در 2500 دور در دقیقه به مدت 10 دقیقه.

6- مایع رویی دور ریخته می‌شود. 25 میکرو لیتر بافر لیز کننده، 150 میکرو لیتر SDS 10 درصد و 27 میکرو لیتر آنزیم پروتئیناز K (با غلظت 5 واحد در میکرو لیتر) به محلول حاصله اضافه شده و به مدت 3 ساعت در دمای 55 درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار داده می‌شود تا هضم محتویات هسته گلوبول های سفید کامل می‌شود

7- اضافه کردن 700 میکرو لیتر نمک اشباع (7/5 مولار) و ورتکس شدید به مدت 40-50 ثانیه

8- محلول مزبور به مدت 15 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه با دمای 2 درجه سانتیگراد سانتریفیوژ می‌گردد. سپس مایع رویی به فالكون دیگر منتقل می‌گردد. (در این مرحله پروتئین‌های

به روش مرسوم در کشتارگاه صنعتی، ذبح شدند و بعد از خونگیری، پوست کنی، تخلیه امعاء و احشاء از حفره بطنی، ارزیابی لاشه از نظر بهداشتی توسط دامپزشک صورت می‌گرفت. اندازه گیری ضخامت چربی پشت در ناحیه بین دنده دوازده و سیزده با استفاده از کولیس انجام می‌گرفت. در مرحله آخر لاشه گرم توزین، و بعد از جدا کردن دنده از بدن، دوباره لاشه بدون دنده توزین و ثبت می‌گردید. وزن دنده به تفکیک هر رأس گوسفند، از کم کردن وزن لاشه گرم بدون دنده از وزن کل لاشه گرم محاسبه و ثبت گردید. - در کشتارگاه ونوجکت‌های حاوی خون سانتریفیوژ (10 دقیقه با سرعت 3000g) شدند تا پلاسما و سرم بطور کامل جدا شود سرم و پلاسما جدا شده داخل میکروتیوپ 1/5 میلی لیتری ریخته می‌شد و بعد از شماره گذاری در یخچال در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

- برای استخراج DNA روشهای مختلفی وجود دارد. در این پژوهش استخراج DNA از بافت ماهیچه بوسیله ی کیت شرکت بایوتک با پروتوکل اختصاصی توصیه شده انجام شد.

پروتکل این روش برای استخراج DNA از 2- 1/5 میلی لیتر خون کامل به شرح زیر می‌باشد:

1- اضافه کردن بافر جدا کننده به میزان 10 میلی لیتر (ساکارز 0/32 مولار، 5 MgCl₂ میلی مولار، 10 Tris-HCl میلی مولار، 1 Triton 100X درصد، pH=7/6). از این بافر جهت از بین بردن

2 DNA، 0/3 Taq میکرولیتر (0/25 unit/ μ L)، میکرولیتر، آب دیونیزه (dH₂O) 14/2 میکرولیتر. طی واکنش‌های چند زنجیره ای پلی‌مراس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط نرم-افزار Vector NTI، یک قطعه 654 جفت بازی از ژن پروتئین باند شونده به فاکتور رشد شبه انسولین تیپ 3 تکثیر شد که توالی آغازگرها به شرح زیر می‌باشد:

آغاز گر رفت (Forward primer):
 5'- CCAAGCGTGAGACAGAATAC-3'
 آغازگر برگشت (Reverse primer):

5'-AGGAGGGATAGGAGCAAGAT-3'
 تکثیر قطعات مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر نوع TECHNE با شرایط دمایی زیر انجام شد: (1) شروع واسرشت سازی اولیه DNA: 3 دقیقه، 95°C (یک چرخه). (2) واسرشت سازی شدن DNA: 45 ثانیه، 95°C، اتصال آغازگر به DNA: 40 ثانیه 60°C، بسط: 50 ثانیه 72°C (35 چرخه). (3) تکمیل بسط: 10 دقیقه 72°C (یک چرخه).

الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز 2 درصد با ولتاژ 88 ولت و مدت 30 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 16 به 4 به مدت زمان 10 دقیقه در دمای 96 درجه سانتی‌گراد تک‌رشته‌ای شدند که

اتصال به اسیدهای نوکلئیک همراه با نمک در انتهای لوله رسوب سفید رنگی تشکیل می‌دهند) 9- هم حجم محلول، اتانول مطلق اضافه کرده و به آرامی تکان می‌دهیم تا مخلوط شود. در این مرحله رشته های DNA ظاهر می‌شوند. سپس به مدت 10 دقیقه در 3000 دور در سانتریفیوژ می‌کنیم.

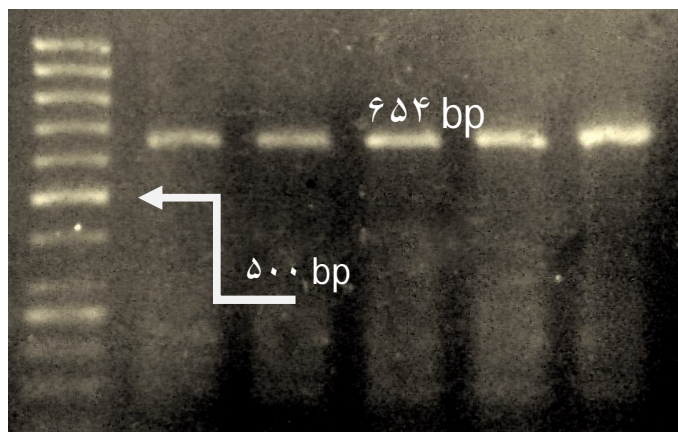
10- رسوب انتهای فالكون به میکروتیوب جدید منتقل می‌شود. رسوب حاصله دو بار با اتانول مطلق 75% شستشو داده می‌شود و نهایتاً در 100 میکرولیتر TE (EDTA 1 میلی مولار، Tris-HCl 10 میلی مولار) حل می‌گردد.

11- قرار دادن در حمام آب گرم (55 درجه سانتی‌گراد) به مدت 2 ساعت تا زمان حل شدن کامل DNA در بافر TE و نگهداری در دمای 20- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده.

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتوفتومتر و روش الکتروفورز روی ژل آگارز (1%) تعیین شد. جهت تکثیر رشته‌ی مورد نظر، 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 (1/5 Mm/ μ L)، بافر (PCR buffer) 2/5 میکرولیتر (X1)، بازهای آزاد دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) 2 میکرولیتر (0/8 Mm/ μ L)، آغاز گر رفت 1/25 میکرولیتر (0/5 pm/ μ L)، آغازگر برگشت 1/25 میکرولیتر (0/5 pm/ μ L)، آنزیم DNA پلی‌مراس

مدت 19 ساعت برای بررسی چند شکلی‌ها انجام و رنگ آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره صورت گرفت.

بلافاصله پس از این مرحله در داخل یخ قرار گرفتند. الکتروفورز محصولات تک رشته‌ای شده روی ژل اکریل آمید 13 درصد با ولتاژ 280 V به



شکل 1- قطعه 654 جفت بازی حاصل از تکثیر اگزون 3 ژن IGFBP3 روی ژل آگارز 2%.



شکل 2- الگوهای ژنوتیپ حاصل از الکتروفورز عمودی (SSCP) ژن IGFBP3.

ابتدا گلیسرول توسط آنزیم لیپوپروتئین لیپاز از اسیدهای چرب جدا شده و سپس طی مراحل زیر، پراکسید هیدروژن آزاد شده از گلیسرول با 4- آمینو آنتی پیرین و فنول در مجاورت آنزیم

اندازه‌گیری پارامترهای خونی
تری گلیسرید

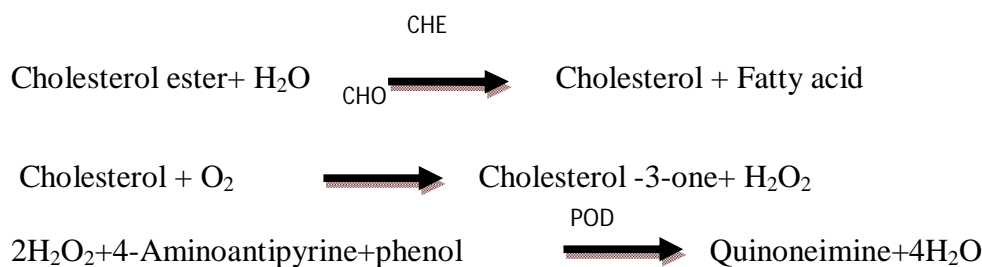
برای اندازه‌گیری تری گلیسرید از کیت‌های شرکت پارس آزمون استفاده شد. در این آزمایش

پراکسید هیدروژن تولید شده در نتیجه هیدرولیز و اکسیداسیون کلسترول، به همراه فنول و 4-آمینو آنتی پیرین در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده که به صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است با مقدار کلسترول رابطه مستقیم دارد. کلسترول طبق فرمول‌های زیر هیدرولیز و کاتالیز شده و در نهایت در طول موج 546 نانومتر (500-546 نانومتر) اندازه‌گیری می‌شود.

پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده که به صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است با مقدار تری گلیسرید رابطه مستقیم دارد. تری گلیسرید طبق فرمول‌های زیر هیدرولیز و کاتالیز شده و در نهایت در طول موج 546 نانومتر (500-546 نانومتر) اندازه‌گیری شد.

کلسترول

برای اندازه‌گیری کلسترول از کیت‌های شرکت پارس آزمون استفاده شد. در این آزمایش



جنس دام وارد برنامه Excel و پس از ویرایش، وارد برنامه SAS شده و با رویه GLM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این آزمایش اثر ژنوتیپ‌های IGFBP3 و اثر سن و جنس حیوان به عنوان عامل ثابت و اثر وزن هنگام کشتار دام به عنوان کواریت در مدل قرار داده شد (فرض یکسان بودن شرایط پرورشی و جیره در نظر گرفته شد). مدل مورد استفاده بصورت زیر بود:

روش تجزیه آماری

پس از تعیین الگوی بانندی برای تک تک دامها و محاسبه فراوانی الگوها برای جایگاه مورد بررسی (اگزون 3)، داده‌های مربوطه (وزن زنده، وزن لاشه گرم، بازده لاشه، ضخامت چربی پشت بین دنده دوازده و سیزده، پروتئین خام گوشت، تری گلیسرید خون، کلسترول خون، اسیدهای چرب (شرح در جدول 4)، سن و

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + G_j + D_k + b(W_{ijkl} - \bar{W}) + (AG)_{ij} + e_{ijkl}$$

امین سن حیوان در هنگام خونگیری (سن بطور تقریبی از شمارش دندان‌ها محاسبه شد)، اثر G_j

که در این مدل y_{ijkl} هر یک از مشاهدات مربوط به صفات، μ میانگین صفت در جمعیت، اثر A_i

نتایج

فراوانی‌های الگوها در جدول 1 آورده شده است. الگوهای ژنوتیپی 1، 2، 3، 4 و 5 مربوط به ژن IGFBP3 به ترتیب با فراوانی های 3/33، 66/67، 6/67، 13/33 و 10 درصد مشاهده شدند. ملاحظه می‌شود که بیشترین فراوانی مربوط به الگوی اول می‌باشد.

امین ژنوتیپ، D_k اثر K امین جنس، b ضریب تابعیت صفات بر روی وزن هنگام خونگیری و کشتار دام، W_{ijkl} وزن هر دام هنگام خونگیری، \bar{W} میانگین وزن دام‌ها هنگام خونگیری، $(AG)_{ij}$ اثر متقابل ژنوتیپ و سن حیوان و e_{ijkl} اثر عوامل تصادفی باقیمانده بود.

جدول 1- فراوانی الگوهای SSCP اگزون 3 ژن IGFBP3 در گوسفندان نژاد زل.

Table 2: The pattern frequency of ovine IGFBP3 gene in Zel sheep

فراوانی (%) (Frequency)	الگوها (Pattern)
66.67	1
3.33	2
6.67	3
13.33	4
10	5

گلیسرید و کلسترول خون ارتباط معنی داری وجود ندارد. ($P>0.05$). همچنین نتایج آنالیز واریانس ترکیبات اسیدهای چرب نیز که در جدول 3 ارائه شده است، نشان می‌دهد که اثر الگوهای IGFBP3 تنها بر مقدار اسید هپتادکانوئیک (C17:0) معنی دار شده است ($P<0.01$) و بر روی دیگر اسیدهای چرب معنی دار نیست.

همانطور که نتایج آنالیز واریانس صفات لاشه در جدول 2 نشان می‌دهد رابطه بین الگوهای IGFBP3 و صفات وزن لاشه گرم ($P<0.05$)، ضخامت چربی پشت ($P<0.01$) و پروتئین خام گوشت ($P<0.01$) معنی دار و با سایر صفات رابطه معنی داری نداشتند ($P>0.05$). از سوی دیگر نتایج آنالیز واریانس فراسنجه‌های خونی که در جدول 2 ارائه شده است، نشان می‌داد که بین الگوهای مختلف ژن IGFBP3 و تری

جدول 2- میانگین حداقل مربعات ($LSM \pm SE$) صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی و ارتباط آن‌ها با الگوهای SSCP ژن IGFBP3 در گوسفندان نژاد زل.

Table 2- Least square means (LSM) of carcass traits and blood parameters and its associations with IGFBP3 gene's patterns in Zel breed sheep.

الگوها (Patterns)					صفات (Traits)
الگوی 5 (Pattern5)	الگوی 4 (Pattern4)	الگوی 3 (Pattern3)	الگوی 2 (Pattern2)	الگوی 1 (Pattern1)	
28.41±10.81	26.77±5.27	44.04±9.20	33.28±3.34	37.28±8.19	وزن کشتار ^{n.s} Slaughter Weight
11.82 ^b ±2.45	16.34 ^a ±1.29	10.84 ^b ±2.13	15.87 ^a ±0.75	13.25 ^{ab} ±1.84	وزن لاشه گرم* Carcass Weight
4.13±1.42	46.72±3.38	33.68±6.22	44.70±2.21	37.95±5.37	بازده لاشه ^{n.s} Carcass Efficiency
4.13 ^a ±1.42	2.47 ^{ab} ±0.74	1.17 ^c ±0.23	2.27 ^{bc} ±43.0	2.78 ^{ab} ±1.06	ضخامت چربی پشت** back fat thickness
176.37 ^b ±1.59	217.52 ^a ±0.83	215.03 ^a ±1.38	217.98 ^a ±0.49	215.81 ^a ±1.19	پروتئین خام** Crude Protein
15.63±2.97	43.30±8.53	37.15±15.60	38.80±4.38	12.33±2.12	تری‌گلیسرید ^{n.s} (triglyceride)
62.67±36.71	74.36±20.05	92.50±36.63	67.54±11.24	93.67±28.48	کلسترول ^{n.s} (cholesterol)

حروف لاتین غیر مشابه در هر سطر بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد (ns: غیر معنی دار، * و ** به ترتیب معنی دار در سطح 0/05 و 0/01)

جدول 3- میانگین حداقل مربعات (LSM±SE) پروفایل اسیدهای چرب و ارتباط آنها با الگوهای SSCP ژن IGFBP3 در گوسفندان نژاد زل.

Table 4- Least Square Means (LSM) of fatty acids profiles and its association with IGFBP3 gene's patterns in Zel breed sheep.

الگوها (Patterns)					اسیدهای چرب (Fatty Acids)
الگوی 5 (Pattern5)	الگوی 4 (Pattern4)	الگوی 3 (Pattern3)	الگوی 2 (Pattern2)	الگوی 1 (Pattern1)	
3.51±1.39	3.04±0.68	2.81±1.18	3.16±0.43	2.62±1.05	مریستیک اسید (C14:0)
30.82±4.39	26.82±2.14	17.85±3.74	26.49±1.36	26.79±3.33	اسید پالمیتیک (C16:0)
3.94±1.83	3.53± 0.89	3.80±1.56	4.52±0.56	6.15±1.39	اسید پالمیتولیک (C16:1)
3.24±1.42 ^{ab}	2.61±0.69 ^b	7.49±1.21 ^a	2.01±0.44 ^b	2.01±1.08 ^b	اسید هپتادکانوئیک (C17:0)
0.34±0.47	0.62± 0.22	0.87±0.40	0.75± 0.14	0.30±0.35	اسید هپتادکانوئیک (C17:1)
14.03±4.17	17.87±2.04	13.76±3.55	15.94±1.29	19.31±3.16	اسید استئاریک (C18:0)
40.49±4.45	39.70± 2.17	43.25±3.79	40.45±1.37	36.27±3.37	اسید اولئیک (C18:1)
7.20± 2.12	6.16± 1.03	3.01± 1.80	5.37± 0.65	5.85± 1.61	اسید لینولیک (C18:2)
0.34±0.36	0.22±0.17	0.26±0.09	0.24±0.11	0.27±0.27	اسید لینولیک (C18:3)
1.46 ±0.84	1.14 ±0.41	0.28 ±0.72	0.77±0.26	0.88±0.64	اسید ایکوزاتترانوئیک (C20:4)(n-6)
0.46 ±0.36	0.23 ±0.17	0.20 ±0.31	0.23 ±0.11	0.27 ±0.27	اسید ایکوزاپنتانوئیک (C20:5)(n-3)EPA
0.36 ±0.25	0.25 ±0.12	0.16 ±0.21	0.23 ±0.07	0.30 ±0.19	اسید ایکوزاهگزانوئیک (C22:6)(n-3)DHA
75.30±5.07	74.30±2.47	82.85±4.31	77.18±1.56	73.09 ±3.84	اسیدهای چرب اشباع (SFA)
40.72±8.07	41.81±3.94	54.67±6.87	45.50±2.49	41.66±6.12	اسیدهای چرب با چند پیوند (MUFA)
10.29±3.09	7.57±1.51	7.21±2.63	6.63±0.95	7.28±2.35	اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه (PUFA)
0.13±0.04	0.10±0.02	0.08±0.03	0.08±0.01	0.09±0.03	نسبت اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه به اسیدهای چرب اشباع (PUFA/SFA)
7.78±5.78	12.64±2.82	8.81±4.92	9.72±1.79	7.97±4.39	نسبت اسید لینولیک به اسید لینولیک (n6/n3)

حروف لاتین غیر مشابه در هر سطر بیانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد (ns: غیر معنی دار، * و ** به ترتیب معنی دار در سطح 0/05 و 0/01)

بحث و نتیجه گیری

طی واکنش PCR، قطعه 654 جفت بازی از ژن پروتئین باند شونده به فاکتور رشد شبه انسولین (IGFBP3) تکثیر شد (شکل 1). سپس الگوهای باندهای حاصل از SSCP نمونه‌ها (شکل 2) مشخص شد (الگوهای 1 با 3 و 2 با 4 در تصویر نسبتاً به هم شبه بنظر می‌آیند که به علت عدم کیفیت عکسبرداری می‌باشد). همانطور که مشاهده می‌شود الگوی 1 با 66/67 درصد بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود. الگوهای IGFBP3 با صفات وزن لاشه گرم ($P < 0.05$)، ضخامت چربی پشت ($P < 0.01$) و پروتئین خام گوشت ($P < 0.01$) و ترکیب اسید چرب هپتادکانوئیک ($P < 0.01$) ارتباط معنی داری نشان دادند. در پژوهشی با مطالعه ژن IGFBP3 (شامل بخشهای انتهایی اگزون 2، کل اینترون 2، اگزون 3 و بخشی از اینترون 3) بر روی 4 نژاد از گوسفندان (Ossimi, Awassi, Barki Rahmani) در مصر با استفاده از تکنیک PCR-RFLP فقدان هر گونه پلی مورفیسم ژنتیکی را در هر 4 نژاد گزارش نمودند که در نژادهای گوسفندان هند نیز همین نتایج گزارش شده است (Ali et al., 2009). همچنین هیچگونه پلی مورفیسمی را در این جایگاه ژنی در 5 نژاد گوسفند در هند گزارش نکردند و تنها یک ژنوتیپ AA را مشاهده نمودند (Kumar et al. 2006). در پژوهشی دیگر با مطالعه ژن IGFBP3 در نژاد گوسفند

Muzaffarnagari و ارتباط آن با صفات اقتصادی پلی مورفیسم در این جایگاه مشاهده نشد. (Sharma et al., 2011). همانگونه که مشاهده می‌شود در اغلب این مطالعات که از تکنیک PCR-RFLP استفاده شده است در جایگاه فوق الذکر پلی مورفیسمی مشاهده نشده است.

نتایج این پژوهش با مطالعات دیگر محققین که گزارش کردند که بین چندشکلی ژن IGFBP3 و صفات لاشه در گاو ارتباط معنی داری وجود دارد همخوانی داشت (Sun., 2002). همچنین ارتباط معنی داری بین چندشکلی این ژن و صفات رشد و لاشه در گاوهای هلشتاین گزارش شده است (Chudhary., 2007). در مطالعه‌ای دیگر نیز ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم موجود در ناحیه پروموتر این ژن با صفات لاشه (ماربلینگ اسکور) در گاوهای کره‌ای گزارش کردند (Cheon et al., 2008). همچنین ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم این ژن با صفت ضخامت چربی پشت در خوک گزارش شده است (Wang et al., 2009). از طرف دیگر هیچ چندشکلی در این ژن در بین گاو میش‌های هندی مشاهده نشده است (Padma et al., 2004) که این مطلب با نتایج ما در تناقض بود. از آنجا که ژن پروتئین باند شونده به فاکتور رشد شبه انسولین تیپ 3 نقش کلیدی در محور سوماتوتروپیک دارد، و ارتباط آن با صفات لاشه و چربی محرض شده است، به عنوان یک مارکر

گیرد و حتی الامکان روی داده‌های دقیق‌تر ایستگاهی (که دوره‌ی پرورش و عوامل مدیریت و تغذیه شناخته شده است) انجام شود تا اثرات این ژن کامل‌تر و دقیق‌تر شناخته شود.

مولکولی مهم در بررسی صفات رشد و تولیدمثلی در دام‌های مزرعه‌ایی می‌تواند استفاده شود و با توجه به اینکه داده‌های این تحقیق کشتاری است، بهتر است که برای شناسایی کامل جهش‌ها توالی یابی ژن در دستور کار صورت

منابع

- Ali BA, EL-Hanafy AA, Salem HH (2009). Genetic biodiversity studies on IGFBP-3 gene in Egyptian sheep breeds. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25: 101-109.
- Bale IK, Conover CA (1992). Regulation of insulin like growth factor binding protein 3 messenger ribonucleic acid expression by insulin like growth factor-1. *Journal of Cellular Physiology* 158 : 198-204.
- Cheong HS, Yoon DH, Kim LH, Park BL, Lee HW, Kim SNEM, Chung ER, Shin HD (2008). Association Analysis between Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) Polymorphisms and Carcass Traits in Cattle. *Journal of Asian-Australian Journal of Animal science* 21: 309-313.
- Chudhary V, Kumar P, Bhattachraya TK, Bhushan B, Sharma A, Shukla A (2007). DNA polymorphism of insulin-like growth factor-binding protein-3 gene and its association with birth weight and body weight in cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 1: 29-34.
- 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.
- 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.
- Haegeman A, Van Zeveren V, Peelman LJ (1999). A new mutation in the bovine insulin-like growth factor binding protein-3. *Journal of Animal Genetics* 30: 382-405.
- Hastie PM, Onagbesan OM, Hareign W (2004). Co-expression of messenger ribonucleic acids encoding IGF-I, IGF-II; type I and II IGF receptors and IGF-binding proteins (IGFBP-1 to -6) during follicular development in the ovary of seasonally anoestrous ewes. *Journal of Animal Reproduction Science* 84 : 93-105.
- Hossner KL, McCusker RH, Dodson MV (1997). Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. *Journal of Animal Science* 64: 1-15.
- Khaldari M (2007). Husbandry of sheep and goat. Iranian Students Book Agency, INC. Iran.
- 11Kumar RP, Choudhary V, GaneshkumarK, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A, MishraA (2006). Nucleotide sequencing and DNA polymorphism studies on IGFBP-3 gene in sheep and its comparison with cattle and buffalo. *Small Ruminant Research* 64: 285-292.
- Maciulla JH, Zhang HM, Denise SK (1997). A novel polymorphism in the bovine insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene. *Journal of Animal Genetics* 28: 375.
- Martin JL, Baxter RC (1992). Insulin-like growth factor binding protein-3, biochemistry and physiology. *Growth Regulat* 2: 88-89.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.

- Moradi shahrehabak H, Moradi shahrehabak 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).
- Morimoto LM, Newcomb PA, White E, Bigler J, Potter JD (2005). Variation in Plasma Insulin-Like Growth Factor-1 and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3: Genetic Factors. *Journal of Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* 14: 1394-1401.
- Padma B, Kumar P, Choudhary V, Dhara SK, Mishra A, Bhattacharya TK, Bhushan B, Sharma A (2004). Nucleotide sequencing and PCR-RFLP of insulin-like growth factor binding protein-3 gene in riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 17: 910-913.
- Sharma B, Dass G, Sharma D (2011). PCR-RFLP in IGFBP-3 Gene and its Association with Economic Traits in Muzaffarnagari Sheep. *International Conference on Chemical, Biological and Environment Sciences*. Bangkok. Thailand.
- Shukla A (2001). PCR-RFLP studies on insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) gene in cattle. M.V.Sc. Thesis submitted to the Indian Veterinary Research Institute (Deemed University), Izatnagar, Bareilly, UP, India.
- Spratt SK, Tatsuno GP, Sommer A (1991). Cloning and characterization of bovine insulin like growth factor binding protein- 3 (IGFBP-3) gene. *Biochemistry Biophysics Researches Communication* 177: 1025-1032.
- Sun WB (2002). Polymorphism of insulin like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) gene and its relation with beef performance of Qinchuan cattle. *Journal of Animal Biotechnology* 8: 95-99.
- Wang W, Meng Q, Hu X, Li N (2009). Genetic Variation and Association of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 with Performance in Swine. *Journal of Biochemical Genetics* 47: 315-321.

Study polymorphism of ovine *IGFBP-3* Gene and its association with carcass traits and fatty acids profiles in Zel sheep using *PCR-SSCP*

Ghazi Khani Shad.A^{*1}, Moradi-Shahrbabak H², Sadeghi M², Faraji R³, Mohammadabadi M.R.⁴

¹Department of Animal Science, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

²Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.

³M.Sc. student, Department of Animal Science, University of Tehran, Karaj, Iran.

⁴Associate Professor, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

IGF-1 hormone transports by connecting to IGF-binding proteins (often IGFBP-3) in the biological fluids. This protein acts as an IGF1 carrier and helps to prolong half-life of hormone and can increase or decrease biological activity of hormone on cellular surface. The purpose of the research was to study the polymorphisms of IGFBP-3 gene and its association with carcass traits and fatty acids profiles in Zel sheep as a thin-tailed breed using PCR-SSCP. In this study we used 130 Zel sheep randomly and recorded their traits measure we wanted. to determine of fatty acids, we took 6ml blood in venojects containing EDTA and immediately centrifuged them for 10 minutes by 3000g (5200 rpm) to separate the plasma. DNA was extracted from muscle tissue by *Biotech* company kit. Then the Polymerase chain reaction (PCR) used to amplify of 654 bp fragment of exon 3 of IGFBP-3 gene. PCR products were electrophoresed on polyacrylamide gel (method SSCP) and stained with silver nitrate method to distinguish different patterns. Results indicated the different patterns, may be due to polymorphism in this fragment. Frequency of patterns 1, 2, 3, 4 and 5 were 67/66, 33/3, 67/6, 33/13 and 10 percent respectively. Trait carcass weight ($P < 0.05$), back fat thickness ($P < 0.01$) and crude protein in meat ($P < 0.01$) had significantly differences with different patterns. Significant association observed by Heptadecanoic acid (C17: 0) with different patterns of IGFBP3 gene. No other association was observed by IGFBP3 patterns with other traits and fatty acids profiles.

Key words: *Ovine IGFBP-3 gene, PCR-SSCP, Fatty acids profiles, Zel*

* Corresponding Author: Ghazi Khani Shad.A

Tel: 09121466570

Email: A.ghazikhani@iau-saveh.ac.ir