



بررسی چندشکلی ژن MEG9 و ارتباط آن با وزن تولد در گاوهای سیستانی

حسین اکبری^۱، غلامرضا داشاب^۲ و مهدی وفای واله^۳

۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه زابل
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: dashab@uoz.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۸

چکیده

به منظور بررسی چندشکلی ژن MEG9 و ارتباط آن با وزن تولد در گاوهای سیستانی، از تعداد ۱۳۰ رأس گوساله (نر و ماده) مرکز به‌گزینی گاو سیستانی به طور تصادفی خونگیری به عمل آمد. استخراج DNA از خون کامل به روش فنل-کلروفرم انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۲۱۰ جفت بازی واقع در اگزون ۳ ژن مذکور با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. شناسایی جهش‌ها با روش SSCP با الکتروفورز محصولات پی‌سی‌آر بر روی ژل پلی‌آکریل‌امید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام گرفت. به منظور بررسی ارتباط الگوهای شناسایی شده در جایگاه ژنی MEG9 با وزن تولد در گوساله‌های گاو سیستانی از مدل‌های ثابت خطی و مقایسه میانگین‌ها با روش توکی-کرامر انجام گرفت. نتایج مطالعه در جایگاه ژنی MEG9 سه الگوی باندی (ژنوتیپ) q_1 ، q_2 و q_3 را به ترتیب با فراوانی‌های ۳۷، ۳۴ و ۲۹ درصد نشان داد. مطالعه همبستگی الگوهای مشاهده شده در جایگاه ژنی MEG9 با صفت وزن تولد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که ژن MEG9 می‌تواند یک نشانگر مولکولی مناسب جهت انتخاب وزن تولد در گاوهای سیستانی باشد.

واژه‌های کلیدی: MEG9، چند شکلی، PCR-SSCP، گاو سیستانی، وزن تولد

مقدمه

تعریف جدید اپی‌ژنتیک شامل مطالعات تغییرات ژنتیکی قابل توارث است که طی میوز و میتوز منتقل شده و بر الگوی بیان ژن‌ها تأثیر گذاشته، اما این تغییرات به دلیل تغییر در توالی نمی‌باشند (۳).

حک‌دار شدن مکانیسمی است که به صورت سیس عمل می‌کند و روی یک کروموزوم اثر می‌گذارد. حک‌دار شدن بسته به سیستم اپی‌ژنتیکی یکی از دو کروموزوم والدی را تغییر می‌دهد. این تغییرات بیان ژن حک شده را روی یک کروموزوم والدی فعال می‌کند. بنابراین، اثر ژنوتیپی فرد هتروزیگوت بستگی به منشأ والدی آلاها دارد (۳۴). متیلاسیون سیتوزین، یکی از مهمترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی است که حک شدن پدری و مادری را در مرحله گامتی معین می‌کند. مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی دیگر شامل مدیفیکاسیون‌های هیستونی، واریانت‌های هیستونی و RNAهای غیر کدکننده بیان متفاوت ژن‌های حک شده را بر اساس منشأ والدی تفویض می‌کنند (۲۹،۳).

اخیراً حدود ۲۳۳ تا از ژن‌های حک‌دار، در ژنوم موش و ۳۲۴ تا در ژنوم انسان شناسایی شده است. بیشتر ژن‌های حک‌دار وظایفی در تنظیم رشد پستانداران، به ویژه در رشد جفت و جنین دارند (۲۸،۱۳). ناهنجاری رشدی اغلب در حیوانات تولید شده توسط فن‌آوری کمک باروری (ART) مشاهده شده است (۳۵،۲۸،۲۱). اگر چه گاو یک گونه‌ای است که کمتر توسط فن‌آوری کمک باروری به وجود می‌آید، به همین خاطر تنها چند ژن حک‌دار، در گاو شناسایی شده است. در کروموزوم ۱۲ موش دسته‌های $DLK1-DIO3$ وجود دارد که شامل سه دسته از ژن‌های بیان شده‌ی پدری (Peg9/Dlk1، Peg11/Rdl1، Dio3) و همچنین شش ژن

بیان شده‌ی مادری (Meg3/Gtl2، Meg8/Rian،) (Meg9/Mirg، PEG11AS، Ak050713، Ako53394 هستند (۱۰). بیان صحیح ژن‌های حک‌دار، برای رشد و نمو جنین موش ضروری می‌باشد (۲۰). در پژوهش ncRNAهای بیان شده‌ی مادری از دسته‌های Dlk1-Dio3 که در iPSCs موش قرار دارند، مؤثر در رشد جنین گزارش شدند (۳۱). البته در مورد گاو اطلاعات کمتری در مورد ncRNAهای بیان شده‌ی مادری در دسته‌های Dlk1-Dio3 نسبت به ژن‌های MEG8 حک‌دار و Gtl2 وجود دارد. چندین قطعه از mRNA_s و EST_s مانند AK013406، CB193969 و BQ175773 در حدود ۸۸-۷۳ kb که دورتر از انتهای ۳ قرار گرفته‌اند، در مطالعات بیان با RT-PCR گزارش شده است که بیان آنها تنها از طریق آلل‌های مادری است. بنابراین، بر این اساس MEG9^۲ یا ژن بیان شده‌ی مادری نام‌گذاری گردید. cDNA بدست آمده از ژن مذکور نشان داد که در سن ۱۹ روزگی جنین موش با افزایش بیان همراه بوده و منجر به شناسایی سه رونویسی با طول حدود ۳-kb شد که این رونویسی‌ها تحت عنوان mirg^۴ شناسایی شده است (۱۲). در بیشتر مطالعات mirg و MEG9 معادل هم به کار برده شده‌اند، ولی ژن MEG9 نسبت به mirg نه‌اگرگون و همچنین چهار microRNAs بیشتری دارد که شامل miR-134، miR-382، miR-668 و miR-485 هستند (۳۲). این ژن در موش و گوسفند شناسایی شده است، ژن MEG9/mirg شامل سیزده microRNA در موش گزارش شده است، اما حالت حک‌دار و الگوهای مختلف این ژن در گاو شناسایی نشده است (۱۵). چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP C.1354C>G) در اگزون سوم ژن MEG9 گاو شناسایی شده است که برای تشخیص بیان تک

1- Imprinting
3- Maternally expressed gene

2- Induced pluripotent stem cells
4- MicroRNA containing gene

ملکولی فواید مهم زیادی دارد. یکی از این فواید تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه‌های ژنتیکی خاص می‌باشد (۱۷، ۲۴). ژن‌هایی که صفات پلی‌ژنیک، مانند تولید شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهند به طور دقیق شناسایی نشده‌اند. در استفاده از ژن‌های کاندیدا برای شناسایی ژن‌های مسئول تغییرات در صفات پلی‌ژنیک، فرآیند شامل انتخاب ژن‌های کاندیدا بر اساس ارتباط بین فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دخیل در بیان فنوتیپ و سپس تست کردن ژن‌های انتخاب شده به عنوان جایگاه‌های صفات کمی (QTL) بالقوه می‌باشد (۲۴، ۲۵). نقشه ژنومی نشانگری گاوی (bovine marker genome map) دربرگیرنده ۳۶۰۰ جایگاه است که استفاده وسیع و گسترده از آن‌ها را در جستجوی ژن‌های دارای اثرات معنی‌دار بر تغییرات صفات کمی تسهیل می‌کند (۱۷).

پژوهش‌های متعددی در مطالعه چندشکلی جایگاه ژنی MEG9 در گونه‌های مختلف و ارتباط آنها با صفات تولیدی و تولیدمثلی مورد بررسی قرار گرفته است. در مطالعه جهش موجود در اگزون دوم از جایگاه ژنی MEG9 گوسفند گزارش شده است که این جهش رشد و نمو جنین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). همچنین، در یک مطالعه‌ی دیگر ارتباط معنی‌دار بین رشد و تمایز ماهیچه‌ی گوسفند با چندشکلی در ناحیه اگزون دوم MEG9 گزارش شده است (۹)، اما در گاو چندشکلی در جایگاه ژن مذکور مشاهده نشد (۶). در یک پژوهش دیگر چندشکلی‌هایی در جایگاه ژن MEG9 در انسان و موش گزارش شده که با افزایش رشد در نوزادان مرتبط است (۱۱). گزارش شده است که جهش شناسایی شده در اگزون سوم از ژن MEG9 گوسفند مرتبط با رشد جنین است و جنین‌هایی که در معرض افزایش بیان این ژن قرار گرفته‌اند نسبت به آن‌هایی که بیان این ژن در آن‌ها کاهش داشته، رشد جنین کمتری داشته‌اند (۵). در جایگاه ژنی MEG9 در گاو سه جهش تک نوکلئوتیدی (SNP) گزارش شده که با صفات رشد ارتباط معنی‌داری دارند (۱). نتایج این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ژن MEG9 یک ژن حکم‌دار در پستانداران است که کاهش بیان آن باعث افزایش رشد در پستانداران شده و نقش کلیدی در کنترل رشد و نمو جنین دارد. اگرچه پژوهش‌های متعددی روی گاو سیستمی انجام شده است (۲۲، ۲۳)، ولی تاکنون ژن MEG9 مورد مطالعه قرار نگرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی چندشکلی احتمالی در ناحیه اگزون سوم جایگاه ژنی MEG9 و ارتباط آن با وزن تولد در گاوهای سیستمی بود.

مواد و روش‌ها

خون‌گیری از سیاهرگ گردنی تعداد ۱۳۰ رأس گوساله‌های نر و ماده (شامل ۵۵ رأس نر و ۷۵ رأس ماده) سیستمی تقریباً هم سن مربوط به یک سال زایش (۱۳۹۲) به طور تصادفی انجام شد. نمونه‌های خون در لوله‌های خلأ ۶ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA (۵ درصد) جمع‌آوری و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آلی و دو آلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین، یک جایگاه چندشکل دیگر (AN: kc469608) C.1354C>G توالی‌یابی مستقیم یک قطعه‌ی ۲۰۰ جفت بازی از DNA ژنومی گاو شناسایی شده است که سه الگوی ژنوتیپی شامل هتروزیگوت‌ها (C/G)، هموزیگوت (G/G) و هموزیگوت (C/C) از ژن MEG9 نشان داده‌اند (۱۴).

توالی cDNA جایگاه ژنی MEG9 گوسفند (شماره دسترسی AF354168.3) در بانک ژنی ثبت شده است. توالی cDNA جایگاه ژنی MEG9 گاو از مقایسه توالی جایگاه مذکور با توالی cDNA گوسفند به دست آمده است و نتایج همترازی آنها هفده ESTs با انتهای ۳' و ۵' مشابه داشت. مقایسه توالی cDNA مذکور با توالی ژنوم کروموزوم ۲۱ گاو منجر به شناسایی سه توالی متفاوت از ژن MEG9 در گاو گردید که طولی حدود ۱۶۶۴، ۱۱۵۳، ۶۴۴ جفت باز داشتند و به ترتیب MEG9-C1، MEG9-C2 و MEG9-C3 نامیده شدند (۲۸).

رشته‌های مختلف MEG9-C1 شامل سه اگزون هستند و MEG9-C2 نسبت به MEG9-C1 در اگزون یک، ۵۰۹ نوکلئوتید کمتر دارد و MEG9-C3 فاقد اگزون یک می‌باشد و طول اگزون دوم ۱۲۸۰ جفت باز می‌باشد. تجزیه و تحلیل توالی‌های مشابه گاو نشان می‌دهد که توالی MEG9-C1 گاو حدود ۹۲٪ با توالی MEG9 گوسفند (AF354168)، ۴۶٪ با توالی انسان (NR-047664) و ۳۵٪ با توالی موش (EU616813) شباهت دارد. همچنین در مشاهده‌ی الگوهای بیانی MEG9-C1 در چهار بافت مختلف شامل کبد، طحال، کلیه و ماهیچه، MEG9-C2 در شش بافت شامل قلب، کبد، طحال، شش، کلیه و ماهیچه و رشته‌ی MEG9-C3 در سه بافت کبد، کلیه و ماهیچه به صورت تک آلی بیان شده‌اند (۲۸).

بنابراین، مطالعات نشان داده‌اند که جایگاه ژنی MEG9 یک ژن حکم‌دار در گاو می‌باشد. در مطالعه‌ی دیگری فرم‌های متفاوت از جایگاه ژن MEG9 شناسایی شد که در توسعه و تمایز و همچنین جلوگیری از بروز برخی بیماری‌ها مانند سرطان نقش دارند (۳۳)، که این امر باعث افزایش پیچیدگی بیولوژیکی یک ژن می‌گردد. جایگاه ژن MEG9 به عنوان یک ژن بیان شده‌ی مادری اولین بار در مغز، پوست و بافت بیضه‌ی جنینی فیروبولاست موش گزارش شده است. در دیگر گونه‌های پستانداران تعداد متفاوتی از ایزوفرم‌های MEG9 گزارش شده است که در گوسفند چهار ایزوفرم (AF354168.3) و در موش سه ایزوفرم (EU616812، EU616813، EY434920) می‌باشد (۴). رشته‌های متفاوت MEG9 گاو شامل ORFS (ژن رمزگردان) می‌باشد، اما برای شروع ترجمه توالی خاصی ندارد، به نظر می‌رسد که MEG9 وظیفه‌ای تحت عنوان RNA غیرکدگذاری داشته باشد که این امر با یافته‌های موجود در ژن MEG9 موش مطابقت دارد (۱۵). نتایج مطالعات مختلف نشان دهنده‌ی بیان این ژن در بافت‌های مختلف پستانداران بوده و همچنین نشان می‌دهد که این ژن در همه‌ی گونه‌های پستانداران در دسته‌ی Dkl1-Dio3 حفظ شده است. از طرفی استفاده از ژنتیک

با بافر SSCP مخلوط نموده و بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد در ولتاژ ۶۰ به مدت ۵ ساعت الکتروفورز شدند. در نهایت جهت وضوح الگوهای بانندی از نیترات نقره استفاده شد.

به منظور بررسی ارتباط چندشکلی الگوهای ژنی MEG9 در گاوهای سیستانی با وزن تولد از مدل‌های خطی ثابت و روبه GLM نرم‌افزار SAS9.2 (۳۰٪) مقایسه میانگین گروه‌ها با روش توکی کرامر در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد که مدل آماری نهایی به شرح ذیل است:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + AD_k + e_{ijk}$$

که در معادله بالا، y_{ijk} مشاهده مربوط به رکورد وزن تولد هر یک از گوساله‌های سیستانی می‌باشد، μ میانگین کل، S_i اثر ثابت جنس گوساله (۲ سطح)، G_j اثر ثابت الگوهای ژنی در جایگاه MEG9 (۳ سطح)، AD_k سن مادر در هنگام تولد گوساله (۳ سطح) و e_{ijk} اثرات تصادفی خطاهای آزمایشی هستند. در مدل اولیه اثر متقابل جنس با الگوهای بانندی در جایگاه ژن MEG9 نیز آورده شد، اما به جهت این که از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$)، در نهایت در مدل نهایی حذف شد.

نتایج و بحث

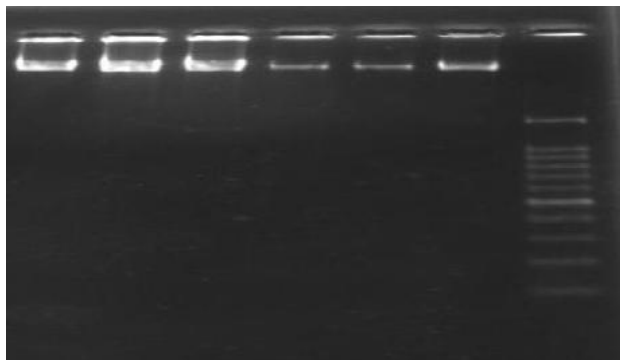
استخراج DNA کل از خون کامل با روش فنل-کلروفرم کیفیت مناسبی داشت. وجود تک باند نشان‌دهنده کیفیت و سلامت DNA استخراج شده است (شکل ۱). همچنین، نتایج اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ در محدوده بین ۱/۵-۱/۸۲ بود که مقداری آلودگی پروتئینی را نشان می‌دهد. غلظت DNA در جذب نوری ۲۶۰ نانومتر در محدوده ۲۴۸-۱۸۰ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ بودند.

استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش فنل-کلروفرم انجام شد (۸). جهت تکثیر قطعه ۲۱۰ جفت بازی از ناحیه اگزون سوم جایگاه ژنی MEG9 بر اساس توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی NCBI (شماره دسترسی: AF354168.3) یک جفت پرایمر اختصاصی با نرم‌افزار Primer premier v6 طراحی شد و با ابزار BLAST از یکسان بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل گردید که توالی‌ها عبارتند از:

Forward 5'-GCTGATGAACCAGGCGGAGG-3'
Reverse 5'-TTTGTCTCCCCTGAGTCCAC-3'

واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر DNA ژنومی، دو میکرولیتر پرایمرهای رفت و برگشت و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر در دستگاه ترموسیکلر مدل اپندورف امریکا انجام گرفت (کیت لئوفیلیزه شرکت دنا زیست آسیا). چرخه دمایی جهت انجام واکنش شامل یک چرخه واسرشت کردن اولیه DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در ادامه با ۳۵ چرخه شامل واسرشت کردن ثانویه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته‌های DNA در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد و نهایتاً جهت بسط نهایی واکنش از دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

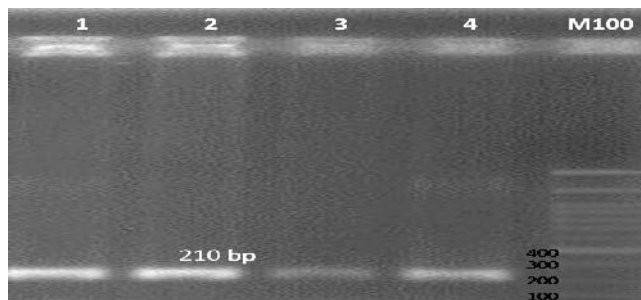
شناسایی جهش‌ها و الگوهای ژنی در قطعه تکثیری از روش PCR-SSCP بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام گرفت که در این روش در ابتدا DNA واسرشت شده و سپس روی ژل آکریل‌آمید بر اساس شکل فضایی الگوهای بانندی متفاوت نشان می‌دهند. بدین منظور مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR را



شکل ۱- کیفیت DNA استخراج شده از خون کامل با استفاده از روش فنل-کلروفرم در گاوهای سیستانی روی ژل آگارز ۱ درصد (چاهک اول سمت راست نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی و سایر چاهک‌ها مربوط به DNA استخراج شده از دام‌های مختلف هستند)
Figure 1. The quality of DNA extracted from whole blood with phenol-chloroform method in Sistani cattle on the % 1 agarose gel (the first cell in right side related to size marker of M100 bp and other cells related to DNA extracted from different animals)

الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان از اختصاصی بودن آغازگرها و کیفیت مناسب باند بدست آمده است (شکل ۲).

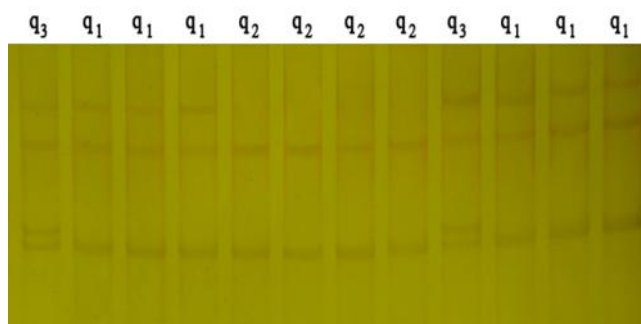
واکنش تکثیر قطعه ۲۱۰ جفت بازی اگزون سوم جایگاه ژنی MEG9 در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد بهینه گردید و



شکل ۲- الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش تکثیر قطعه ۲۱۰ جفت بازی آگزون سوم جایگاه ژن MEG9 در گاوهای سیستانی (چاهک اول سمت راست نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی و سایر چاهکها مربوط به محصول واکنش تکثیر نمونه‌های مختلف هستند)
Figure 2. The electrophoresis of amplified of 210-bp segment of exon 3 on MEG9 gene in Sistani cattle (the first cell in right side related to size marker of M100 bp and other cells related to PCR products of different animals)

q3 را به ترتیب با فراوانی ۳۷، ۳۴، ۲۹ درصد در جمعیت گاوهای سیستانی نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به الگوهای بانندی q1 بود (جدول ۱). در جمعیت گاوهای سیستانی دامهایی که الگوی بانندی q1 را داشتند در مقایسه با سایر الگوهای بانندی، وزن تولد بیشتری داشتند که احتمالاً جهشی که باعث ایجاد این الگو شده، باعث گردیده که بیان ژن MEG9 کاهش یابد و از منابع مادری بیشتری برای رشد جنین استفاده گردد و به تبع آن رشد جنین افزایش یابد که نتیجه آن وزن تولد بیشتر در هنگام زایمان است (جدول ۱).

پس از تکثیر قطعه ۲۱۰ جفت بازی، محصولات واکنش جهت تک‌رشته‌ای شدن با بافر SSCP-dye و به نسبت ۱ به ۱ در دمای ۹۵°C و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری قرار داده شدند. محصولات تک‌رشته‌ای بلافاصله در داخل یخ قرار گرفتند و بر روی ژل آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز شدند. باندهای چندگانه بیانگر چندشکلی تک نوکلئوتیدی در جایگاه ژن مورد مطالعه است و پس از نمایان‌سازی با نیترات نقره، حیوانات بر اساس الگوی بانندی نامگذاری شدند (شکل ۳). نتایج مطالعه حاضر وجود سه الگوی بانندی شامل q1، q2 و



شکل ۳- الکتروفورز تک‌رشته‌ای قطعه ۲۱۰ جفت بازی آگزون سوم جایگاه ژنی MEG9 بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد (PCR-SSCP) و الگوهای مختلف مشاهده شده شامل q1، q2 و q3
Figure 3. The electrophoresis of single-strand of 210-bp segment of exon3 of MEG9 on 8% poly-acrylamide gel (PCR-SSCP) and different pattern observed between animals including q1, q2 and q3

متعاقب آن کاهش وزن تولد شود. در نهایت فراوانی دامهای با الگوی q2 در جمعیت گاوهای سیستانی در حدواسط (۳۴ درصد) بودند. میانگین وزن تولد دامهای با الگوی بانندی q1 و q3 معنی‌دار بود ($P < 0.05$)، اما میانگین وزن تولد دامهای با الگوی بانندی q1 و q2 و همچنین دامهای با الگوی بانندی q2 و q3 معنی‌دار نبود ($P > 0.05$).

الگوی q3 در جمعیت گاو سیستانی کمترین فراوانی را داشت (جدول ۱) و افرادی که این الگو ژنوتیپی را نشان دادند وزن کمتری نسبت به بقیه دامها داشتند (جدول ۱). بنابراین، جهشی که در این الگو اتفاق افتاده باعث شده که بیان ژن MEG9 افزایش یافته و از منابع مادری کمتری برای رشد جنین استفاده گردد که در نتیجه منجر به کاهش رشد جنین و

جدول ۱- فراوانی الگوهای بانندی در اگزون سوم جایگاه ژنی MEG9 و میانگین حداقل مربعات وزن تولد در گاوهای سیستانی
Table 1. The frequency of different pattern on exon 3 of MEG9 and least square means of birth weight of Sistani cattle

الگوهای بانندی	فراوانی (درصد)	وزن تولد (کیلوگرم) میانگین حداقل مربعات \pm انحراف معیار*
q ₁	۳۷	۲۷/۷۲ \pm ۰/۹۱۷ ^{ab}
q ₂	۳۴	۲۶/۶۳ \pm ۱/۸۱۹ ^{ab, d}
q ₃	۲۹	۲۳/۹۹ \pm ۰/۶۴۲ ^d

*: حروف متفاوت بیانگر اختلافات معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

و سرم خون باعث کاهش رشد جنین در گاوها می‌گردد (۷). در بررسی غلظت mRNA و پیتید MEG9 موجود در رحم موش، گزارش شده که افزایش بیان ژن MEG9 در رحم موش باعث کاهش رشد جنین می‌شود (۱۹). همچنین، در مطالعه جایگاه ژن MEG9 در بافت‌های موش و انسان چندشکلی‌های متعددی گزارش شده که منجر به بیان تک آلی می‌گردد (۱۵). بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی در اگزون ۳ ژن MEG9 در موش نشان داد که با وزن تولد ارتباط معنی‌داری دارد و افزایش میزان بیان این ژن در خون باعث کاهش رشد در جنین شده است (۱۶).

در مطالعه حاضر سه الگوی بانندی در جایگاه ژن MEG9 در جمعیت گاوهای سیستانی با روش PCR-SSCP مشاهده شد که وجود چندشکلی در این جایگاه ژنی را تأیید می‌کنند. در ضمن ارتباط معنی‌دار این الگوها با وزن تولد در گوساله‌های گاو سیستانی می‌تواند دلیل بر تأثیر بیان این ژن در توسعه و تکامل جنین و در نهایت تغییر وزن تولد گردد. با توجه به این که در گزارشات متعدد این جایگاه ژنی به عنوان ژن حک شده گزارش شده است، لذا تفاوت اثرات الگوهای ژنی با وزن تولد ممکن است به واسطه الگوی بیان متفاوت آنها به واسطه آل‌های پدیری یا مادری باشد.

نتایج اثر متقابل الگوهای ژنی با جنس گوساله معنی‌دار نبود. ژن MEG9 یک ژن حک شده است و از طریق آل‌های مادری بیان می‌شود. مطالعات محققین نشان داده است افرادی که تحت تأثیر افزایش بیان ژن MEG9 قرار گرفته‌اند نسبت به آن‌هایی که در معرض کاهش بیان این ژن بوده‌اند وزن کمتری داشته‌اند (۲۲، ۲۳). تحقیقات متعددی در ارتباط با نقش جایگاه ژن مذکور بر وزن تولد انجام گرفته است. گزارش شده است که ژن MEG9 در بافت‌های مورد آزمایش گاو، موش و گوسفند به صورت تک آلی بیان شده و یک ژن حک‌دار می‌باشد و با چندشکلی نوکلئوتید منفرد (SNP C.1354C>G) مشاهده شده در اگزون سوم جایگاه ژن MEG9 در گاوهای سیستانی مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۶). جایگاه‌های چندشکلی متفاوتی در جایگاه ژنی MEG9 در توالی DNA گاو گزارش شده است که با وزن تولد ارتباط معنی‌داری دارند (۱۴). چهار چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در ژن MEG9 و بر روی کروموزوم شماره‌ی ۱۸ گوسفند گزارش شده که در ارتباط با صفات رشد هستند (۲۷). جهش یافت شده در جایگاه ژن MEG9 در خوک در صورت افزایش بیان باعث کاهش وزن تولد و کاهش بیان این ژن باعث افزایش وزن تولد می‌شود (۲۶). در مطالعه جایگاه ژن MEG9 گزارش شده که افزایش بیان این ژن در سطح بافت

منابع

1. Abramowitz, J.S., B.J. Deacon and S.P. Whiteside. 2012. Exposure therapy for anxiety: Principles and practice. Guilford Press, 28: 75-89.
2. Alinaghizadeh, R., M.R. Mohammadabadi, S. Moradnasab Badrabadi. 2007. Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(23): 4291-4294.
3. Amiri Roudbar, M., M.R. Mohammadabadi and V. Salmani. 2015. Epigenetics: a new challenge in animal breeding. Genetics in the 3rd millennium, 12(4): 3900-3914.
4. Amiri, F., S.R. Mirraei-Ashtiani and M. Sadeghi. 2011. Polymorphism in the GDF8 gene and their effects on carcass traits in Lori-Bakhtiari and Zel sheep breeds. Research on Animal Production, 2(4): 12-23.
5. Barlow, D.H. 2014. Clinical handbook of psychological disorders: A step-by-step treatment manual. Guilford publications Microarray profiling of microRNAs reveals Rna, 11: 241-247.
6. Baskerville, S., D.P. Bartel and M.J. Beechey. 2007. A closer look at the sensitivity puzzle: The sensitivity of expected future short rates and term premia to macroeconomic news. Nature, 35: 89-90
7. Bischoff-Ferrari, H.A., B. Dawson-Hughes, H.B. Staehelin, J.E. Orav, A. Stuck, R. Theiler, J.B. Wong, A. Egli, D. P. Kiel and J. Henschkowski. 2009. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. Bmj, 339: b3692.
8. Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-VanDillen and J. Vander Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology, 28(3): 495-503.
9. Byrne, M., N.A. Soars, M.A. Ho, E. Wong, D. McElroy, P. Selvakumaraswamy, S.A. Dworjanyn and A.R. Davis. 2010. Fertilization in a suite of coastal marine invertebrates from SE Australia is robust to near-future ocean warming and acidification. Marine Biology, 157: 2061-2069.

10. Charlier, C., K. Segers, L. Karim, T. Shay, G. Gyapay, N. Cockett and M. Georges. 2001. The callipyge mutation ..enhances the expression of coregulated imprinted genes in cis without affecting their imprinting status. *Nature Genetics*, 27: 367-369.
11. Choufani, S., C. Shuman and R. Weksberg. 2010. Beckwith–Wiedemann syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. Wiley Online Library, 343-354.
12. Curchoe, C.L., S. Zhang, L. Yang, R. Page and X.C. Tian. 2009. Hypomethylation trends in the intergenic region of the imprinted IGF2 and H19 genes in cloned cattle. *Animal Reproduction Science*, 116: 213-225.
13. Ferguson, H. 2001. Men and masculinities in late-modern Ireland. *A man's world*, 118-134.
14. Gygax, D. 2014. Comprehensive Review on the Existence of Genomic Imprinting in Aves. *Placenta*, 25: 37-50.
15. Hagan, J.P., E. Piskounova and R.I. Gregory. 2009. Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16: 1021-1025.
16. Han, J.C., S. Dutta and S. Ekkad. 2012. Gas turbine heat transfer and cooling technology. CRC Press, 54: 305-317.
17. Javanmard, A., M.R. Mohammadabadi, G.E. Zarrigabayi, A.A. Gharahedaghi, M.R. Nassiry, A. Javadmansh, N. Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 44(4): 495-497.
18. John, B., A.J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander and D.S. Marks. 2004. Human microRNA targets. *PLoS Biological*, 2: 363.
19. Kim, J., A. Bergmann, S. Lucas, R. Stone and L. Stubbs. 2004. Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene ZIM2. *Genomics*, 84: 47-58.
20. Lin, C., K. Yeh, J. Chang, T. Lin, Y. Wang and M. Shih. 2003. Correlation between protein exoression and epigenetic and mutation changes of Wnt pathwayrelated genes in oral cancer. *Journal of Oncology*, 23: 1001-1007.
21. Maher, D., P. Chaulet, S. Spinaci and A. Harries. 1997. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. *Treatment of tuberculosis: guidelines for national programs*, 2: 1-77.
22. Mohammadi, A., M.R. Nassiry, J. Mosafer, M.R. Mohammadabadi and G.E. Sulimova. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian journal of genetics*, 45(2): 198-202.
23. Mohammadabadi, M.R., M. Soflaei, H. Mostafavi and M. Honarmand. 2011. Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. *Genetic Molecular Research*, 10 (4): 2658-2663.
24. Mousavizadeh, A., M.R. Mohammadabadi, A. Torabi, M.R. Nassiry, H. Ghiasi, A. Esmailzadeh Koshkoieh. 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology*, 7(1): 51-53.
25. Nasiri, K., A.R. Salehi, A. Yusefi and M. Aminafshar. 2014. Polymorphism of OPN and UTMP genes in the Iranian Holstein Bulls. *Research On Animal Production*, 5(10) : 156-165.
26. Oczkiewicz, M., A. Piestrzy ska-Kajtoch, K. Ropka-Molik, B. Rejduch and R. Eckert. 2011. Expression and imprinting analysis of the NESP55 gene in pigs. *Gene Expression Patterns*, 12: 18-23.
27. O'Doherty, A.M., D.A. Magee, L.C. O'Shea, N. Forde, M.E. Beltman, S. Mamo and T. Fair. 2015. DNA methylation dynamics at imprinted genes during bovine pre-implantation embryo development. *BMC developmental biology*, 1: 13.
28. Reik, W. and J. Walter. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics*, 2: 21-32.
29. Roudbar, M.A., M.R. Mohammadabadi, A.A. Mehrgardi and R. Abdollahi-Arpanahi. 2017. Estimates of variance components due to parent-of-origin effects for body weight in Iran-Black sheep. *Small Ruminant Research*, 149: 1-5.
30. SAS User Guide: statistics. 2009. SAS institute (version 9.2) Cary: NC.
31. Stadtfeld, M., E. Apostolou, H. Akutsu, A. Fukuda, P. Follett, S. Natesan and K. Hochedlinger. 2010. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*, 465: 175-181.
32. Takahashi, T., S.C. Sutherland, R. Wanninkhof, C. Sweeney, R.A. Feely, D.W. Chipman, B. Hales, G. Friederich, F. Chavez and C. Sabine. 2009. Climatological mean and decadal change in surface ocean pCO₂ and net sea–air CO₂ flux over the global oceans. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56: 554-577.
33. Venables, A.J. and N. Limao. 2002. Geographical disadvantage: a Heckscher–Ohlin–von Thünen model of international specialisation. *Journal of International Economics*, 58: 239-263.
34. Verona, G. and D. Ravasi. 2003. Unbundling dynamic capabilities: an exploratory study of continuous product innovation. *Industrial and Corporate Change*, 12: 577-606.
35. Young, A. 2000. The razor's edge: Distortions and incremental reform in the People's Republic of China. National bureau of economic research.
36. Zhang, K., T. Liu, J.A. Li, J.Y. Chen, J. Wang and N. Huang. 2014. Surface modification of implanted cardiovascular metal stents: From antithrombosis and antirestenosis to endothelialization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2: 588-609.

Exploration of MEG9 Gene Polymorphism and Its Association with Birth Weight in Sistani Cattle

Hossein Akbari¹, Gholam Reza Dashab² and Mehdi Vafaye Valleh³

1 and 3- Graduated M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Zabol

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Zabol,

(Corresponding Author: dashab@uoz.ac.ir)

Received: 13 February 2017

Accepted: 17 April 2017

Abstract

To determine of MEG9 gene polymorphism and its association with birth weight in Sistani cattle, the blood sample of 130 calves (male and female) were randomly collected belonging to Sistani cattle Research Center. The DNA extraction from whole blood was performed using phenol-chloroform procedure. Polymerase chain reaction was performed for amplification of 210-bp segments of exon 3 of MEG9 gene using specific primers. Detection of mutations were carried out by electrophoresis of poly-acrylamide gel 8% and silver staining using SSCP method. Association study of allele patterns with birth weight was done with fixed linear model and comparison of means was conducted by Tukey-kramer method. Results showed that three allele patterns including q1, q2 and q3 in PCR product of MEG9 gene in Sistani cattle with frequency of 37, 34 and 29 % respectively. The genetic diversity in MEG9 gene had significant correlation with birth weight ($P < 0.05$). Finally, the results of this study showed that MEG9 gene can be considered as a suitable Molecular marker for selection of birth weight in Sistani cattle.

Keywords: Birth weight, MEG9, PCR-SSCP, Polymorphism, Sistani cattle