



بررسی چند شکلی ژن لپتین و ارتباط آن با برخی صفات رشد در گوسفندان نژاد لری بختیاری و همچنین لری بختیاری-افشاری

علی قاضی خانی شاد و محمد کاظم شریفی شورابی

گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (نویسنده مسؤول: alighazikhhanhadd@gmail.com)
تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۱

چکیده

هدف پژوهش حاضر، مطالعه چند شکلی ژن لپتین با استفاده از تکنیک PCR-SSCP در گوسفند نژاد لری بختیاری و همچنین لری بختیاری-افشاری و بررسی ارتباط گوکوهای ژنوتیپی با صفات رشد در گوسفندان لری بختیاری بود. از ۵۸ راس گوسفند نژاد لری بختیاری نر و ماده موجود در ایستگاه شولی شهرکرد و ۴۲ راس گوسفند نژاد همچنین لری بختیاری-افشاری از روستاهای شهرکرد خونگیری به عمل آمد. استخراج DNA با کیت شرکت سیناژن صورت گرفت. تعیین کیفیت و کمیت DNA با ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری انجام شد. تکثیر قطعه ۲۷۵ جفت بازی اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز صورت گرفت. چندشکلی فضایی تک رشتہ ای PCR با محصولات SSCP با استفاده از ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره بدست آمد. هشت گوکوی باندی برای گوسفندان لری بختیاری با درصد فراوانی (۱۸/۹۷)، (۱۰/۳۵)، (۱۰/۳۷)، (۶/۸۹)، (۴/۳۷)، (۹/۴۵) و (۳/۴۵) برای گوکوهای ۱ تا ۸ مشاهده شد. همچنین ده گوکوی باندی با درصد فراوانی (۹/۵۲)، (۲۸/۵۸)، (۷/۱۴)، (۹/۵۲)، (۹/۵۲)، (۲/۲۸)، (۴/۷۶) به ترتیب برای گوکوهای ۱ تا ۱۰ برای گوسفندان همچنین امیخته لری بختیاری-افشاری مشاهده شد. نتایج نشان دهنده چندشکلی بالا در ژن لپتین در هر دو نژاد بود. نتایج مقایسه میانگین نشان از ارتباط معنی دار ژن لپتین با وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی داشت ولی با وزن تولد و وزن از شیرگیری ارتباط معنی داری در گوسفند لری بختیاری نداشت.

واژه‌های کلیدی: ژن لپتین، گوسفند لری بختیاری، صفات رشد و PCR-SSCP

مقدمه

تنظیم می‌کند. کشف لپتین موجب ایجاد زمینه‌های تحقیقاتی در مورد کنترل مصرف خوارک و بازده متابولیکی شد. شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمدۀ تاثیر گذار بر روی توازن انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوارک از علاقه‌مندی‌های اخیر محققان ژنتیک و اصلاح نژاد است. اثرات لپتین برای اولین بار در آزمایشگاه با مطالعه موش‌های جهش یافته‌ی چاق مشخص شد، تا اینکه Zhang و همکاران (۲۴) موفق به کشف هورمون لپتین شدند. با کشف این هورمون رابطه چربی بدن و عوامل هورمونی مشخص شد. لپتین علاوه بر تنظیم خوارک مصرفی در متابولیسم انرژی، ترکیب بدن، تولید مثل و سیستم ایمنی نیز نقش ایفا می‌کند (۲۰). پژوهش‌های انجام شده بر روی لپتین نشان داد که این ژن با نگهداری تعادل میان دریافت غذا و هزینه‌ی انرژی، وزن بدن را کنترل می‌کند (۱۲، ۷). طهمورث پور و همکاران (۱۸) برای اولین بار به بررسی چندشکلی ژن لپتین با استفاده از PCR-SSCP در گوسفندان بلوچی پرداختند و سه گوکوی باندی برای اگزون ۳ در ژن لپتین گزارش کردند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که چند شکلی ژنتیکی در جایگاه‌های ژنی لپتین وجود دارد. همچنین اثر ژنتیک‌ها بر میانگین افزایش وزن روزانه از تولد تا سه ماهگی معنی دار بود. Van Der Lande و همکاران (۲۱) گزارش کردند وجود چند شکلی در ژن لپتین انسان با سطوح پایین لپتین، افزایش وزن و مرض قدر غیر واسته به انسولین، رابطه دارد. این چند شکلی‌ها در ژن لپتین گاو ارتباط معنی دار با مصرف غذا (۱۰) تولید شیر (۱۱، ۴) صفات کیفیت گوشت و لاشه (۱۳) دارند. سلکی و همکاران (۱۵) بیان کردند غلاظت پلاسمایی لپتین ارتباط معنی داری با میزان چربی بدن در گاو و گوسفند دارد که به صورت آزاد تقدیم می‌شوند. همچنین وجود لپتین را در

در بین دامهای اهلی، گوسفند بیشترین تنوع را دارد، به طوری که حدود ۱۰۰۰ نژاد متفاوت گوسفند در دنیا وجود دارد. سرعت رشد و میزان گوشت از مهم‌ترین اهداف اصلاحی در تولید و پرورش برده‌های کشتاری می‌باشد. گوسفند نژاد لری بختیاری یکی از نژادهای درشت جنه بوده و هدف اصلی از پژوهش آن تولید گوشت است که دارای ظرفیت بالقوه سود بیشتر از طریق مدیریت بهتر و بهبود ژنتیکی است. لپتین پروتئینی با ۱۴۶ اسید امینه و ۱۶ کیلودالتون جرم مولکولی است که به طور عمدۀ توسط بافت چربی سفید تولید می‌شود. این هورمون یکی از تنظیم کننده‌های مصرف خوارک است و مقادیر بالای آن باعث کاهش اشتها و از سوی دیگر نبود پژوهشین لپتین یا نبود گیرنده آن باعث پرخوری منجر به چاقی می‌شود. ژن لپتین از جمله ژن‌هایی است که چندشکلی‌های موجود در آن با صفات اقتصادی و مهم در ارتباط است. این هورمون در نتیجه‌ی جهش ایجاد شده در سطح ژن مسؤول چاقی تولید می‌شود. منع اصلی تولید و ترشح لپتین، سلول‌های بافت چربی یا آدیپوسیت‌ها هستند. لپتین عمدت‌ترین کنترل کننده‌ی اشتها، متابولیسم انرژی، بلوغ، سندرم چاقی، افزایش وزن، تغییر برون‌ده سیپاتیک و دیابت نوع دوم در انسان است. اندازه ژن لپتین در گونه‌های مختلف بسیار متفاوت و در دامنه ۰/۵ تا ۵ کیلوبارز متغیر است. در گوسفند، این ژن دارای سه اگزون و دو ایتنtron است. لپتین با چندین فعالیت مهم نظیر تنظیم وزن بدن، تولید مثل، فعالیت‌های ایمنی و شکل‌گیری استخوان‌ها و رشد بیان شده است. ژن لپتین در گاو روی کروموزوم ۴ نقشه یابی شده است. لپتین فرایند سیری را توسط گیرنده‌های هیپوتالاموسی اختصاصی، بالاگنس انرژی، استفاده از انرژی و آدپتیه شدن با گرسنگی

تعیین کمیت و کیفیت DNA ای استخراج شده
 جهت تعیین غلظت DNA از دستگاه اسپکتوفوتومتری با طول موج ۲۶۰-۲۸۰ نانومتر استفاده شد. بدین صورت که ۵ میکرولیتر از DNA با ۹۵ میکرو لیتر آب مخلوط شد و به مدت چند ثانیه در دستگاه قرار گرفت. در انتهای غلظت DNA قرائت گردید. طول موج ۲۶۰ نانومتر نشان دهنده مقدار جذب DNA بوده و طول موج ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده مقدار جذب پروتئین‌ها است. غلظت DNA بر حسب نانو گرم بر میکرولیتر از فرمول زیر محاسبه شد:

$$C_{\text{ng}} = A_{260} \times 50 \times 10^{-4}$$

نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ به عنوان معیاری برای غلظت DNA است. نسبت مناسب بین ۲ - ۱/۸ بوده و نشان دهنده غلظت بالای DNA استخراجی است. برای تعیین کیفیت DNA ژنومی از ژل آکارز ۱ درصد استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه‌های DNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر از بافر بارگذاری (لودینگ) ۶X مخلوط و درون چاهک‌ها ریخته شد و با آرامی درون چاهک بارگذاری گردید. برای این منظور دقت شد که از هرگونه حرکت دادن تانک خودداری شود زیرا تکان خوردن تانک باعث خارج شدن نمونه‌ها از داخل چاهک‌ها می‌شود. سپس تانک الکترو فورز به منبع جریان وصل شد و ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم گردید. برای نمونه‌های زیاد، ابتدا دیف اول بارگذاری و به مدت کوتاهی (به مدت ۵ دقیقه) با ولتاژ ۸۰ ولت ران شد و بعد دیف دوم بارگذاری شد. پس از حدود ۲۰-۳۰ دقیقه جریان ولتاژ را قطع نموده و توسط دستگاه ژل داک در زیر نور ماورای بنش (UV) ژل مشاهده گردید و پس از بررسی صحت DNA استخراج شده از آن عکس گرفته شد. وجود باندهای کاملاً تمیز و بدون کمترین کشیدگی کیفیت خوب DNA را نشان می‌داد. وجود اندکی کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند نشان از آلودگی پروتئین یا باقی ماندن آلودگی نمونه‌ها داشت.

مراحل انجام PCR-SSCP

پرایمرهای مورد نیاز برای تکثیر قطعه ۲۷۵ جفت بازی اگزون سوم ژن لپتین به صورت زیر بودند:

F: 5'-GCT CCA CCC TCT CCT GAG TTT GTC
C-3

R: 5-TGT CCT GTA GAG ACC CCT GTA GCC
G-3

مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و غلظت آنها در جدول ۱ آمده است. جهت انجام PCR دو میکرولیتر از هر نمونه DNA ژنومی داخل میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی لیتری ریخته شد. سپس با توجه به تعداد نمونه‌ها اقدام به تهیه مخلوطی از مواد مورد نیاز برای همه نمونه‌ها گردید. بافر PCR، کلرید منیزیم، مخلوط نوکلوتیدی و آغازگرهای از فریزر خارج شدن و در بین قرار گرفتن و به آرامی ذوب شدن.

هیپوتالاموس و هیپوفیز پیشین گوسفند گراش کردند. لپتین با تاثیر بر هیپوتالاموس و هیپوفیز ترشح هورمون LH را تعییر می‌دهد (۹). بررسی‌های انجام شده نشان داد که سطح لپتین در خون با مقدار تجمع چربی در بافت چربی همبستگی مثبتی دارد. سطوح بالای لپتین در آزمایشات اولیه سبب کاهش مصرف خوارک شده که دلیل آن متصل شدن ژن لپتین به گیرنده خاصی در هیپوتالاموس است (۲۴). Bahrenberg همکاران (۲) با بررسی بر روی ژن لپتین نتیجه گرفتند که هورمون لپتینی که از بافت چربی آزاد می‌شود نقش کلیدی در هموستازی انژری و کنترل وزن بدن دارد. در انسان و جوندگانی که به خاطر وقوع جهش توانایی عمل ژن لپتین یا گیرنده آن متوقف شده باشد، نشانه‌های بیماری چاقی و همچنین کاهش باروری مشاهده می‌شود. در مطالعه دیگری بر روی ژن لپتین مشخص شد لپتین توسط بافت چربی به خصوص چربی سفید ترشح می‌شود و با شش نوع گیرنده واکنش می‌دهد. لپتین به جریان خون ترشح شده و بر روی گیرندهای هیپوتالاموسی اثر می‌گذارد که به احتمال زیاد یکی از سیگنال‌های کلیدی برای کنترل سیری است (۶). اطلاعات مربوط به ژن لپتین در گوسفند بسیار اندک است. تحقیقات (۳،۲۵) از جمله‌ی اندک تحقیقاتی ماست که در ژن لپتین گوسفند انجام شده است. هدف این تحقیق، شناسایی چندشکلی اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفندان نژاد لری بختیاری و آمیخته لری بختیاری-افشاری و بررسی ارتباط الگوهای ژنتیکی این ژن با وزن تولد، وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی در گوسفندان نژاد لری بختیاری است.

مواد و روش‌ها دام‌های مورد استفاده

برای انجام این پژوهش از ۵۸ رأس گوسفند نژاد لری بختیاری (نر و ماده) موجود در ایستگاه اصلاح نژاد شولی شهرستان شهرکرد و ۴۲ رأس گوسفند نژاد آمیخته لری بختیاری-افشاری (نر و ماده) موجود در دو گله در روستاهای شوراب صغیر و بارده در شهرستان شهرکرد نمونه برداری انجام شد.

خون‌گیری و استخراج DNA
 خون‌گیری از گوسفندان در بهمن ۱۳۹۱ انجام گرفت. بعد از انتخاب تصادفی دام‌ها، خون‌گیری صورت گرفت. نمونه‌های خون شامل ۵ میلی لیتر خون بود که از سرخرگ و داج حیوان گرفته و بلافصله به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انتقال یافتند و در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایشات مولکولی نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت سیناژن ایران (DNPTM Kit) طبق دستورالعمل کیت مذکور انجام شد.

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 1. The required materials for polymerase chain reaction

ماده	غلظت در محلول پایه	غلظت با مقدار مورد نیاز	حجم مورد نیاز به ازای یک نمونه	غلظت با مقدار مورد نیاز
DNA	۲۵ نانوگرم در میکرو لیتر	۰.۵ نانوگرم	۲ میکرو لیتر	۱۰X
PCR بافر	۱۰X	۱X	۲/۵ میکرو لیتر	۱/۵ میلی مولار
کلرید منزیزیم	۲۵ میلی مولار	۱/۵ میلی مولار	۱ میکرو لیتر	۰/۲ میلی مولار
مخلوط‌توکنوتیدی	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرو لیتر	۰.۵ میکرو لیتر	۰/۱ میلی مولار
آغازگر رفت	۱ پیکو مول در میکرو لیتر	۱ پیکو مول	۱ میکرو لیتر	۰.۱ پیکو مول
آغازگر برگشت	۱ پیکو مول در میکرو لیتر	۰.۱ پیکو مول	۰.۱ میکرو لیتر	۰.۱۲۵ واحد
تک پلیمراز	۵ واحد در میکرو لیتر			

۲۵ میکرو لیتر کشیده و به میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری حاوی نمونه DNA ریخته و به منظور جلوگیری از تبخیر یک قطره روغن معنی اضافه گردید، سپس در میکروتیوب‌ها بسته شد و بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه مستر سایکل گرادیانت ساخت آمان قرار داده شدند. برنامه زمانی مورد استفاده ترمال سایکل جهت تکثیر قطعه مورد نظر به این ترتیب بود: مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۵°C چرخه شامل سه مرحله: ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه جهت واسرشت سازی ثانویه، ۵۹°C به مدت ۱ دقیقه برای اتصال آغازگر و ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه جهت گسترش آغازگر و در پایان نیز یک چرخه گسترش نهایی به صورت ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

پس از محاسبه مقدار مواد لازم، برای به حجم رساندن ۲۵ میکرو لیتر در هر واکنش) از آب مقطر استریل استفاده گردید و در میکروتیوب‌های ۱/۵ که در بین قرار داشت، ریخته شد. پس از ذوب، به ترتیب بافر PCR، کلرید منزیزیم و مخلوط نوکلئوتیدی ورتکس شدند و به میزان مورد نظر از آن‌ها کشیده شد و در میکروتیوب ۱/۵ که در بین قرار داشت ریخته شد. با توجه به این نکته که ورتکس کردن به آغازگرها آسیب می‌زند، همزدن آغازگرها با پر و خالی کردن توسط سمپلر صورت پذیرفت و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. با توجه به حساس بودن آنزیم تک پلیمراز به دما (دما اتاق باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد)، این آنزیم در مرحله آخر از فریزر خارج و به مواد داخل میکروتیوب‌ها افزوده شد. سپس، از این میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به اندازه

جدول ۲- برنامه‌ی زمانی، دمایی و تعداد چرخه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 2. Thermal cycle program for polymerase chain reaction

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت سازی اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۳۲ چرخه
	۹۴	۱ دقیقه	
	۵۹	۱ دقیقه	
	۷۲	۱ دقیقه	
	۷۲	۵ دقیقه	

شده‌اند مخلوط کرده، به مدت ۱۰ دقیقه و با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترمال سایکل گذاشته شد و پس از گذشت مدت مورد نظر، میکروتیوب‌ها خارج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در محیط یخی قرار داده شدند. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از مخلوط مورد نظر در چاک‌ها بارگذاری گردید. تانک به منبع تغذیه با ولتاژ ۲۰۰ ولت متصل شد و به مدت ۶/۵ ساعت نمونه‌ها الکتروفوروز شدند. پس از الکتروفوروز، شیشه‌ها از تانک خارج شدند و رنگ آمیزی با روش زیر انجام گرفت: ژل را پس از جدا کردن از شیشه‌ها به ظرف حاوی محلول تثیت‌کننده هدایت و به کمک یک کاردک شیشه رویی از ژل جدا شده و ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تثیت‌کننده (اسید استیک ۱۰٪) قرار گرفت و روی شیکر تکان داده شد. سپس ژل به مدت ۲ دقیقه در آب مقطر شستشو داده شد. در ادامه ژل به دومین محلول رنگ آمیزی (نیترات نقره ۰/۱٪ به میزان ۰/۰۲ گرم و ۳۰۰ میکرولیتر فرمالدئید و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر تکان داده شد. دوباره ژل با آب مقطر شستشو داده شد. در مرحله بعدی ژل به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی محلول ظهور (۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم

مشاهده محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

هشت میکرو لیتر از مواد حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با دو میکرو لیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و روی ژل آگارز ادرصد TBE که به آن اتیدیوم بر ماید اضافه شده بود بارگذاری شد، همچنین برای شناسایی اندازه باندها، سه میکرو لیتر از نشانگر با اندازه ۱۰۰ استفاده گردید و در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۰ دقیقه ران گردید و با کمک دستگاه ژل داک، زیر نور ماورای بینش مشاهده گردیدند.

الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید

از آنجا که حساسیت ژل پلی اکریل آمید ۳۰۰-۲۰۰ برابر ژل آغازگر است (۸) در این تحقیق از ژل اکریل آمید برای بررسی نتایج PCR استفاده شد. با توجه به اندازه آلل‌ها و قدرت تفکیک ژل‌های مختلف، پلی اکریل آمید ۸٪ برای تفکیک آلل‌های مورد نظر به کار برد شد.

الکتروفورز کردن نمونه‌ها و رنگ آمیزی

قبل از عمل الکتروفورز کردن، تک رشته‌ای کردن محصولات PCR انجام شد، به این صورت که ۶ میکرو لیتر از محصول PCR را با ۱۰ میکرولیتر از محلول واسرشته ساز dye SSCP (dye SSCP) درون میکروتیوب‌هایی که قبلاً شماره گذاری

که در این مدل ها y_{ij} : مقدار هر یک از مشاهدات مربوط به صفات وزن، مل: میانگین جامعه برای هر صفت، S_i : اثر آامین جنس حیوان (نر، ماده)، G_j : اثر j این الگوی ژنتیکی، e_{ij} : اثر متقابل جنس و الگوی ژنتیکی، β : ضریب تابعیت وزن تولد، W_{ij} : وزن هنگام تولد، W : میانگین وزن دامها و e_{ij} : اثر اشتباہ آزمایشی بود. همچنین میانگین حداقل مربعات صفات در سطح احتمال ۵ درصد گزارش شد.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی DNA استخراج شده بر روی ژل ۱ درصد نشان از غلظت بالای DNA و آلدگی بسیار پایین آن بود. میانگین نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر برابر با ۲ بود.

تکثیر جایگاه ژنی

تکثیر قطعه ۲۷۵ ۲۷۵ جفت بازی از اگزون ۳ ژن لپتین به کمک واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از اگازرگاهی اختصاصی، برنامه حرارتی مناسب و شرایط خوب آزمایشگاهی بدون قطعات غیر اختصاصی به دست آمد.

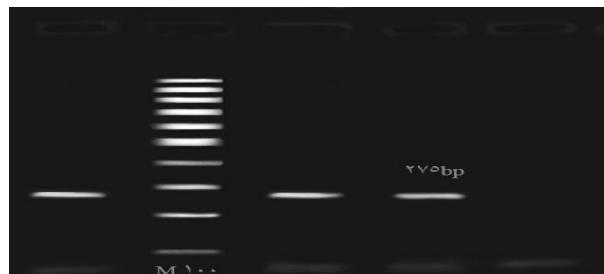
سه درصد و ۳۰ میکرو لیتر تیوسولفات سدیم) شناور شد. در این مرحله به تدریج باندها ظاهر گردیدند. پس از آن که باندها کاملاً ظاهر شدند و رنگ گرفتن ژل کافی به نظر رسید، برای جلوگیری از تیرگی و ناخوانا شدن باندها، ژل دوباره به محلول تثبیت کننده منتقل شده و به مدت ۵ دقیقه روی شیکر تکان داده شد تا بیش از حد رنگ نگیرد. در این مرحله، محلول تثبیت کننده به عنوان محلول متوقف کننده عمل می‌نماید. در آخرین مرحله ژل داک انجام شد. بعد از آنکه اسکن انجام گرفت با مشاهده مستقیم مرحله الگو دادن به باندها انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

فرآوانی الگوهای ژنتیکی با نرمافزار Excel برآورد شد. همچنین، ارتباط الگوهای مشاهده شده با صفات رشد با نرمافزار SAS بررسی شد.

مدل بررسی ارتباط بین الگوهای ژنتیکی و وزن تولد: $y_{ij} = \mu + S_i + G_j + SG_{ij} + e_{ij}$ و مدل مورد استفاده برای بررسی ارتباط بین الگوهای ژنتیکی با وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی به شرح زیر بود:

$$y_{ij} = \mu + s_i + G_j + [SG]_{ij} + \beta(W_{ij} - W) + e_{ij}$$



شکل ۱- محصول PCR قطعه ۲۷۵ جفت بازی اگزون ۳ ژن لپتین
Figure 1. PCR products (fragment 275bp) for Exon 3 of leptin gene

بر روی ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی با استفاده از نیترات نقره بود. در این تحقیق برای جایگاه ۲۷۵ جفت بازی ژن لپتین گوسفندان لری بختیاری هشت الگو و برای گوسفندان نژاد آمیخته لری بختیاری-افشاری ۱۰ الگو مشاهده شد.

بررسی تفاوت در شکل فضایی تک رشته‌های DNA
پس از بررسی ژلهای آگارز برای جایگاه ۲۷۵ جفت بازی، قطعه تکثیر شده با تکییک SSCP مورد بررسی قرار گرفته شد. این روش شامل سه مرحله واسرتنه سازی، الکتروفورز



شکل ۲- پلی مورفیسم حاصل از تکنیک SSCP در زن لپتین گوسفند لری بختیاری با هشت الگوی متفاوت
Figure 2. SSCP polymorphism of Lori- Bakhtiari sheep in leptin gene with eight different patterns (genotype)



شکل ۳- پلی مورفیسم حاصل از تکنیک SSCP در زن لپتین در گوسفند آمیخته لری بختیاری - افشاری با ۱۰ الگوی متفاوت
Figure 3. SSCP polymorphism of Lori Bakhtiari- Afshari Hybrid sheep in leptin gene with ten different patterns (genotype)

الگوی شماره ۲ (۲۸/۵۸) و کمترین درصد فراوانی را الگوی شماره ۶ (۲/۳۸) دارا است (جدول ۴).

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های آماری میانگین، حداقل، حداکثر و انحراف معیار صفات مربوط به وزن تولد، وزن از شبیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی نژاد لری بختیاری مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۵).

فراوانی الگوهای زنوتیبی در گوسفندان نژاد لری بختیاری و آمیخته لری بختیاری- افشاری
نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها در نژاد لری بختیاری نشان داد که بیشترین درصد فراوانی شماره ۵ (۴۱/۳۷) و کمترین درصد فراوانی الگوهای شماره ۷ و ۸ (۳/۴۵) دارا است (جدول ۳) و نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها در نژاد آمیخته نشان داد که بیشترین درصد فراوانی را

جدول ۳- فراوانی الگوهای SSCP زن لپتین در گوسفندان نژاد لری بختیاری
Table 3. Frequency of SSCP patterns leptin gene in Lori- Bakhtiari sheep

شماره الگو	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	کل
فراوانی	۱۱	۶	۳	۴	۲۴	۶	۲	۲	۵۸
درصد الگوها	۱۸/۹۷	۱۰/۳۵	۵/۱۷	۶/۸۹	۴۱/۳۷	۱۰/۳۵	۳/۴۵	۳/۴۵	۱۰۰

جدول ۴- فراوانی الگوهای SSCP گوسفندان نژاد آمیخته لری بختیاری- افشاری
Table 4. Frequency of SSCP patterns of leptin gene in Lori- Bakhtiari and Afshari Hybrid sheep

شماره الگو	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	کل
فراوانی	۴	۱۲	۱	۴	۲	۳	۶	۴	۴	۲	۴۲
درصد الگوها	۹/۵۲	۲۸/۵۸	۲/۳۸	۹/۵۲	۴/۷۶	۷/۱۴	۱۴/۲۸	۹/۵۲	۹/۵۲	۴/۷۶	۱۰۰

جدول ۵- ویژگی آماری گوسفندان نژاد لری بختیاری

صفت	تعداد دام	حدوده	حداقل	حداکثر	مجموع	میانگین	انحراف معیار
وزن تولد	۵۸	۳/۶	۷/۹	۲۹۹/۷	۲۹۹/۷	۵/۱۶	۰/۸۶
وزن از شیرگیری	۵۸	۱۹/۷	۲۲/۸	۴۲/۵	۱۹۵۶/۵	۳۳/۷۳	۴/۷۹
وزن شش ماهگی	۵۸	۴۱/۵	۳۲	۷۳/۵	۳۰۵۳/۵	۵۲/۶۴	۱۱/۴۳
وزن دوازده ماهگی	۵۸	۴۹/۵	۳۸/۵	۸۸	۲۵۳۹	۶۱/۰۱	۱۲/۶۸

ماهگی مربوط به الگوی ژنتیکی شماره ۷ (۷۷/۲۵) و کمترین میانگین وزن مربوط به الگوی ژنتیکی شماره ۴ (۴۵/۶۲) است (جدول ۷). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل الگوی ژنتیکی و جنس بر وزن دوازده ماهگی در سطح ۵ درصد معنی دار است و بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن شش ماهگی معنی دار نبود. (جدول ۶). تعداد الگوی ژنتیکی یافت شده در گوسفندان نژاد لری بختیاری تعداد ۸ الگو بود. نتایج نشان داد که چند شکلی ژنتیکی در جایگاه های ژنی لپتین وجود دارد.

رابطه الگوهای ژنتیکی و صفات مورد بررسی

اثر الگوی ژنتیکی بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن شش ماهگی معنی دار نبود، اما اثر الگوی ژنتیکی بر وزن دوازده ماهگی در سطح ۱ درصد معنی دار بود. (جدول ۶). بیشترین میانگین وزن در سن شش ماهگی مربوط به الگوی ژنتیکی شماره ۷ (۶۲/۵۰) است که از لحاظ آماری با الگوی ژنتیکی شماره ۵ (۵۸/۱۰) تفاوت معنی داری ندارد. همچنین کمترین میانگین وزن شش ماهگی مربوط به الگوی ژنتیکی شماره ۶ (۴۰/۳۳) است. از سوی دیگر نتایج حاصل از مقایسه میانگین ها نشان داد که بیشترین میانگین وزن در سن دوازده

جدول ۶- تجزیه واریانس وزن تولد، وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تولد	وزن از شیرگیری	وزن شش ماهگی	وزن دوازده ماهگی	Sig
الگوی ژنتیکی	۱	۳/۱۵ ^{ns}	۰/۰۸	۱۷/۰۳ ^{***}	.	۰/۷۶ ^{***}
اثر متقابل	۷	۰/۲۰ ^{ns}	۰/۹۸	۱/۲۷ ^{ns}	۰/۲۸	۲/۴۳ ^{**}
جنس	۷	۰/۶۱	۰/۶۱ ^{ns}	۰/۹۵ ^{ns}	۰/۴۴	۰/۰۴ ^{**}

دوازده هگی معنی دار بود. همچنین نتایج نشان می دهد که اثر جنس بر وزن تولد و وزن از شیرگیری معنی دار نبود. اثر الگوی ژنتیکی بر وزن دوازده ماهگی معنی دار بود. که نتایج این آزمایش با نتایج شجاعی و همکاران (۱۴) مطابقت دارد. آن ها در مطالعه چندشکلی اگزون شماره سه ژن لپتین در گوسفندان نژاد کرمانی بیان کردند که اثر ژنتیکی بر وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی در گوسفندان نژاد کرمانی معنی دار بود. همچنین یانگ و همکاران (۲۳) در مطالعه اثر چند شکلی لپتین بر میزان چربی در یک نژاد از خوک نشان دادند که اثر لپتین در سینین مختلف تفاوت معنی داری دارد. اثر الگوی ژنتیکی بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن شش ماهگی در این پژوهش معنی دار نبود. که با هاشمی و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه ارتباط چند شکلی اگزون ۳ ژن لپتین و صفات رشد در گوسفندان ماکوئی مطابقت دارد. آنها بیان کردند که اثر ژنتیکی بر وزن تولد و وزن از شیرگیری اثر معنی داری ندارد.

طهمورث پور و همکاران (۱۹) در بررسی ژن لپتین در گوسفندان بلوچی سه الگوی ژنتیکی گزارش کردند. همچنین Zho و همکاران (۲۵) در مطالعه ای بر روی ژن لپتین در گوسفندان نژاد نیوزلند پنج الگو را گزارش کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین درصد فراوانی را الگوی شماره ۵ (۴۱/۳۷) و کمترین درصد فراوانی را الگوهای شماره ۷ و ۸ (۳/۴۵) دارا است. تعداد الگوی ژنتیکی یافت شده در گوسفندان نژاد آمیخته لری بختیاری- افساری تعداد ۱۰ الگو بود. شجاعی و همکاران (۴) نیز به نتایج مشابهی دست یافته اند آن ها در بررسی چند شکلی اگزون شماره سه ژن لپتین در گوسفندان نژاد کرمانی ۱۰ الگوی ژنتیکی را گزارش کردند. شیبک و همکاران (۱۶) در مطالعه چند شکلی اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفندان کردی خراسان شمالی سه الگوی ژنتیکی گزارش کردند. همچنین نتایج حاصل از تجزیه آماری داده ها نشان می دهد که بیشترین درصد فراوانی را الگوی شماره ۲ (۲۸/۵۸) و کمترین درصد فراوانی را الگوی شماره ۶ (۲/۳۸) دارا است. اثر جنس بر وزن شش ماهگی و وزن

جدول ۷- مقایسه میانگین صفات وزن تولد، وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی بین الگوهای ژنتیکی

الگوی ژنتیکی	وزن تولد (کیلوگرم)	وزن از شیرگیری (کیلوگرم)	وزن شش ماهگی (کیلوگرم)	وزن دوازده ماهگی (کیلوگرم)
۱	۵/۲۳ ± ۰/۷۴	۳۴/۹۲ ± ۵/۶۷	۵۵/۲۲ ± ۱/۳۱ ^{ab}	۶۱/۷۷ ± ۱/۳۶ ^{bc}
۲	۵/۰۱ ± ۰/۵۶	۳۲/۷۵ ± ۳/۴۳	۴۶/۰۰ ± ۲/۴۸ ^{bc}	۵۱/۵۸ ± ۳/۲۱ ^{cde}
۳	۵/۱۳ ± ۱/۲۳	۳۵/۳۰ ± ۵/۱۶	۵۱/۸۳ ± ۱/۴۸ ^{abc}	۵۷/۶۶ ± ۲/۴۳ ^{bcd}
۴	۴/۵۲ ± ۰/۷۱	۳۰/۱۲ ± ۴/۲۲	۴۰/۷۵ ± ۵/۷۲ ^c	۴۵/۶۲ ± ۱/۴۹ ^e
۵	۵/۳۷ ± ۱/۰۳	۳۴/۸۲ ± ۵/۱۲	۵۸/۱۰ ± ۹/۲۷ ^a	۶۸/۶۰ ± ۱۰/۰۱ ^{ab}
۶	۴/۷۵ ± ۰/۴۸	۳۰/۴۳ ± ۲/۰۲	۴۰/۳۳ ± ۴/۷۵ ^c	۴۸/۲۵ ± ۵/۲۳ ^{de}
۷	۵/۷۵ ± ۰/۳۵	۳۴/۴۵ ± ۱/۳۴	۶۲/۵۰ ± ۷/۰۷ ^a	۶۷/۲۰ ± ۳/۸۸ ^a
۸	۴/۸۱ ± ۰/۰۰	۳۱/۰۰ ± ۰/۰۰	۴۵/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{dc}	۵۲/۰۰ ± ۰/۰۰ ^{cd}

منابع

- Ahmadpanah, J. 2016. Phylogenetic analysis and molecular evolution of the leptin gene. *Research on Animal Production*, 7(13): 208-213.
- Bahrenberg, G., I. Behrmann, A. Barthel and P. Hekerman. 2002. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinases/ single transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Molecular Endocrinology*, 16(4): 859-872.
- Boucher, D., M.F. Palin, F. Castonguay, C. Gariépy and F. Pothier. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. *Canadian Journal of Animal Science*, 86: 31-35.
- Buchanan, F.C., C.J. Fitzsimmons, A.G. Van Kessel, T.D. Thue, D.C. Winkelman Sim and S.M. Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine Leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetic Selection Evolution*, 34: 105-116.
- Buchanan, F.C., V. Kessel and A.G. Waldner. 2003. Hot topic. An association between A Leptin single polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science*, 86: 3164-3166.
- Daridria, S., J. Williams, U. Bruggemann, M. Onagbesand, N. Raverc, E. Decuyper, J. Djianed, A. Gertler and M. Taouis. 2000. Achichen leptin -specific radio immunoassay. *Domestic Animal Endocrinology*, 18: 325-335.
- Friedman, J.M. and J.L. Halaas. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- Javanmard, A. 2001. Study the polymorphism of growth hormone receptor gene promoter (GHR) in Sistani cows. M.Sc. Dissertation in Animal Science. University of Tehran (In Persian).
- Keshavarz, A. 2011. Study the polymorphism in Leptin gene in Najdi cows using PCR-RFLP technique. MSc Dissertation on Animal Science. Ramin University. 67 pp (In Persian).
- Lagonigro, R.P., F. Wiener, J.A. Pilla and J. Woolliams. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine Leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*, 34(5): 371-374.
- Liefers, S.C., M.F. Te Pas, R.F. Veerkamp, Y. Chilliard, C. Delavaud and R. Gerritsen. 2003. Association of Leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mammalian Genome*, 14: 657-663.
- Matarese, G., A. La Cava, V. Sanna, G.M. Lord, R.I. Lechler and S. Fontana. 2002. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin. *Trends in Immunology*, 23: 182-187.
- Schenkel, F.S., S.P. Miller, X.Ye.S. Moores, J.D. Nkrumah and C. Li. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 2009-2020.
- Shojaei, M., M.R. Mohammadabadi, M. Asadi Fozi, K.A. Esmailizadeh, M.H. Ferdowsi, A. Torabi, M. Tayyartzadeh and H. Mirzakhani. 2010. Using PCR-SSCP technique to investigate polymorphism of Leptin gene in Kermani sheep. *Animal Science Researches*, 20: 115-122.
- Solgi, H., A. Tohidi and M. Moeini. 2004. Relationship of Leptin concentration and FSH with lambing percent in Iranian sheep. Proceeding of First Congress on Animal Aquatic Science. University of Tehran. 31 August- 2 September (In Persian).
- Shibak, A., B. Montazertorbat, H. Farhangfar, R. Ashkani Far. 2014. Study of genetic polymorphisms in exon 3 of the Leptin gene and its association with birth weight and growth traits in North Khorasan Kurdi sheep. *Modern Genetic*, 4: 511-516 (In Persian).
- Talebi, M.A., S.R. Miraei Ashtiani, M. Moradi Shahre Babak and A. Nejati Javaremi. 2010. Economic values for reproduction, growth and carcass in Lori Bakhtiari Sheep. *Animal Science Journal*, 41(13): 203-213 (In Persian).
- Tahmoerespoor, M., M.R. Nasiri, M. Ansari, A. Heravi and F. Eftekhar Shahroodi. 2008. Polymorphism of Leptin gene and its relationship with daily gain in Baloochi sheep. Proceeding of 3rd Congress on Animal Aquatic Science. University of Ferdoosi. Mashhad (In Persian).
- Tahmures poor, M., M.R. Nassiry, M. Ansary, A. Heravi Mousavi, M. Vafaye Vale and F. Eftekhar Shahroodi. 2009. Analysis of Leptin gene polymorphism and their association with average daily gain trait in Baluchi sheep. 3rd Congress of animal science, Mashhad, Iran.
- Taouis, M., J.W. Chen, C. Daviaud, J. Dupont, M. Derouet and J. Simon. 1998. Cloning the chicken Leptin gene. *Gene*, 208: 239-242.
- Van der Lende, T., M.F. Te Pas, R.F. Veerkamp and S. Liefers. 2005. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. *Vitamins and Hormones*, 71: 373-404.
- Vatan Khah, M., M. Moradi Shahr Babak, A. Nejati Javaremi, R. Vaez Torshizi and S.R. Miraei Ashtiani. 2005. Study the phenotypic and genetic characterizations for growth traits in Lori Bakhtiari lambs. *Iranian Agricultural Science Journal*, 36(6): 1455-1463 (In Persian).
- Yang, D., H. Chen, H.X. Wang, Z. Tian and L. Tang. 2007. Association of polymorphisms of leptin gene with body weight and body size indexes in Chinese indigenous cattle. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(5): 400-405.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, J.M. Friedman. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432.
- Zhou, H., J.G. Hickford and H. Gong. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. *Mol Biotechnology*, 41: 22-25.

Study of the Polymorphism of Leptin Gene and Its Association with some Growth Traits in Lori Bakhtiari and Lori Bakhtiari-Afshari Croessbreed Sheep

Ali Ghazi Khani Shad and Mohammad Kazem Sharifi Shoorabi

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

(Corresponding Author: alighazikhani.shadd@gmail.com)

Received: Nov 13, 2017

Accepted: July 18, 2018

Abstract

The purpose of this study was evaluation of leptin gene polymorphism by PCR-SSCP and its relationship with some growth traits in Lori Bakhtiari and crossbred of Lori Bakhtiari- Afshari sheep. Blood samples were collected from 58 sheep (male and female) of Lori-Bakhtiari in Shahr-e-Kord Sholi station and 42 sheep (male and female) of Lori Bakhtiari-Afshari crossbreed from villages of Shahr-e-Kord. DNA was extracted, using extraction kit of Sinnagen co. Evaluation of quality and quantity of DNA was performed using agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. Polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify 275 bp fragment of exon 3 of leptin gene. Then single strand conformation polymorphism (SSCP) of PCR products was performed and genotypic patterns were obtained using acrylamid gel and silver staining. For leptin gene in Lori bakhtiari sheep, 8 band patterns including L₁to L₈ and for crossbreeds sheep, 10 band patterns including L₁to L₁₀ were obtained. There was a high polymorphism in exon 3 of the leptin gene in both breeds. Also results of means comparison showed that the leptin gene was significantly associated with weight at 6 and 12 months.

Keywords: Lori-Bakhtiari, Growth Traits, PCR-SSCP, Leptin, Polymorphism