دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

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

علی قاضی خانی شاد و محمد کاظم شریفی شورابی

گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران (نویسنده مسوول: alighazikhanishadd@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۶

چکیده

هدف پژوهش حاضر، مطالعه چند شکلی ژن لپتین با استفاده از تکنیک PCR- SSCP در گوسفند نژاد لری بختیاری و آمیخته لری بختیاری- افشاری و بررسی ارتباط الگوهای 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 آمیخته 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 اسپکتروفتومتری انجام شد. تکثیر قطعه ۲۷۵ جفت بازی اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز صورت گرفت. چندشکلی فضایی تک رشته ای SSCP محصولات PCR با استفاده از ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره بدست آمد. هشت الگوی باندی برای گوسفندان لری بختیاری با درصد فراوانی (۱۸/۹۷)، (۱۰/۳۵)، (۵/۱۷)، (۶/۸۹)، (۴۱/۳۷)، (۱۰/۳۵)، (۳/۴۵) و (۳/۴۵) برای الگوهای ۱ تا ۸ ~~مشاهده~~ شد. همچنین ده الگوی باندی با درصد فراوانی (۹/۵۲)، (۲۸/۵۸)، (۷/۱۴)، (۹/۵۲)، (۴/۷۶)، (۲/۳۸)، (۱۴/۲۸)، (۹/۵۲)، (۹/۵۲) (۴/۷۶) به ترتیب برای الگوهای ۱ تا ۱۰ برای گوسفندان آمیخته لری بختیاری- افشاری مشاهده شد. نتایج نشان‌دهنده چندشکلی بالا در ژن لپتین در هر دو نژاد بود. نتایج مقایسه میانگین نشان از ارتباط معنی‌دار ژن لپتین با وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی داشت ولی با وزن تولد و وزن از شیرگیری ارتباط معنی‌داری در گوسفند لری بختیاری نداشت.

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

مقدمه

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 بره‌های کشتاری می‌باشد. گوسفند نژاد لری بختیاری یکی از نژادهای درشت جثه بوده و هدف اصلی از پرورش آن تولید گوشت است که دارای ظرفیت بالقوه سود بیشتر از طریق مدیریت بهتر و بهبود ژنتیکی است. لپتین پروتئینی با ۱۴۶ اسید آمینه و ۱۶ کیلودالتون جرم مولکولی است که به طور عمده توسط بافت چربی سفید تولید می‌شود. این هورمون یکی از تنظیم کننده‌های مصرف خوراک است و مقادیر بالای آن باعث کاهش اشتها و از سوی دیگر نبود پروتئین 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 مسوول چاقی تولید می‌شود. منبع اصلی تولید و ترشح لپتین، سلول‌های بافت چربی یا آدیپوسیت‌ها هستند. لپتین عمده‌ترین کنترل کننده‌ی اشتها، متابولیسم انرژی، بلوغ، سندرم چاقی، افزایش وزن، تغییر برون‌ده سمپاتیک و دیابت نوع دوم در انسان است. اندازه ژن لپتین در گونه‌های مختلف بسیار متفاوت و در دامنه ۰/۵ تا ۵ کیلوباز متغیر است . در گوسفند، این ژن دارای سه اگزون و دو اینترون 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، بالانس انرژی، استفاده از انرژی و آداپته شدن با گرسنگی تنظیم می‌کند. کشف لپتین موجب ایجاد زمینه‌های تحقیقاتی در مورد کنترل مصرف خوراک و بازده متابولیکی شد. شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تاثیر گذار بر روی توازن انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوراک از علاقه مندی‌های 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 خوراک 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 هزینه ی 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 الگوی 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 ژنوتیپ‌ها برمیانگین 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 قند غیر وابسته به انسولین، رابطه دارد. این چند شکلی‌ها در ژن لپتین گاو ارتباط معنی‌دار با مصرف غذا (۱۰) تولید شیر (۱۱،۴) صفات کیفیت گوشت و لاشه (۱۳) دارند. سلگی و همکاران (۱۵) بیان کردند غلظت پلاسمایی لپتین ارتباط معنی‌داری با میزان چربی بدن در گاو و گوسفند دارد که به صورت آزاد تغذیه می‌شوند. همچنین وجود لپتین را در

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]

هیپوتالاموس و هیپوفیز پیشین گوسفند گزارش کردند. لپتین با تاثیر بر هیپوتالاموس و هیپوفیز ترشح هورمون LH را تغییر 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 خوراک شده که دلیل آن متصل شدن ژن لپتین به گیرنده خاصی در هیپوتالاموس است (۲۴). Bahrenberg و همکاران (۲) با بررسی بر روی ژن لپتین نتیجه گرفتند که هورمون لپتینی که از بافت چربی آزاد می‌شود نقش کلیدی در هموستازی انرژی 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 گیرنده‌های 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 ژنوتیپی 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 میلی‌لیتر خون بود که از سرخرگ وداج حیوان گرفته و بلافاصله 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.

تعیین کمیت و کیفیت DNA ی استخراج شده

جهت تعیین غلظت DNA از دستگاه اسپکتوفتومتری 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 انتها 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:

ضریب رقت ×۵۰×A۲۶۰=C ng/µl

نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ تا ۲۸۰ به عنوان معیاری برای غلظت DNA است. نسبت مناسب بین ۲ – ۱/۸ بوده و نشان‌دهنده غلظت بالای DNA استخراجی است. برای تعیین کیفیت DNA ژنومی از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه‌های DNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر از بافر بارگذاری (لودینگ)6X 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 می‌شد. سپس تانک الکترو فورز به منبع جریان وصل شد و ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم گردید. برای نمونه‌های زیاد، ابتدا ردیف اول بارگذاری و به مدت کوتاهی (به مدت ۵ دقیقه) با ولتاژ ۸۰ ولت ران شد و بعد ردیف دوم بارگذاری شد. پس از حدود ۳۰–۲۰ دقیقه جریان ولتاژ را قطع نموده و توسط دستگاه ژل داک در زیر نور ماورای بنفش (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 در 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 میلی‌لیتری 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 نوکلئوتیدی و آغازگرها، از فریزر خارج شدند و در یخ قرار گرفتند و به آرامی ذوب شدند.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]

جدول ۱- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 1. The required materials for polymerase chain reaction

ماده	غلظت در محلول پایه	حجم مورد نیاز به ازای یک نمونه	غلظت یا مقدار مورد نیاز
DNA	۲۵ نانوگرم در میکرو لیتر	۲ میکرو لیتر	۵۰ نانو گرم
بافر PCR	۱۰X	۲/۵ میکرو لیتر	۱ X
کلرید منیزیم	۲۵ میلی مولار	۱ میکرو لیتر	۱/۵ میلی مولار
مخلوطنوکلئوتیدی	۱۰ میلی مولار	۰/۵ میکرو لیتر	۰/۲ میلی مولار
آغازگر رفت	۱۰ پیکو مول در میکرو لیتر	۱ میکرو لیتر	۱۰ پیکو مول
آغازگر برگشت	۱۰ پیکو مول در میکرو لیتر	۱ میکرو لیتر	۱۰ پیکو مول
تک پلیمراز	۵ واحد در میکرو لیتر	۰/۲۵ میکرو لیتر	۱/۲۵ واحد

پس از محاسبه مقدار مواد لازم، برای به‌حجم رساندن (۲۵ میکرو لیتر در هر واکنش) از آب مقطر استریل استفاده گردید و در میکروتیوب‌های ۱/۵ که در یخ قرار داشت، ریخته شد. پس از ذوب، به‌ترتیب بافر PCR، کلرید منیزیم و مخلوط نوکلئوتیدی ورتکس شدند و به میزان مورد نظر از آن‌ها کشیده شد و در میکروتیوب ۱/۵ که در یخ 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 (دمای 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 میلی لیتری به اندازه 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 سایکلر گرادیانت ساخت آلمان قرار داده شدند. برنامه زمانی مورد استفاده ترمال سایکلر جهت تکثیر قطعه مورد نظر به این ترتیب بود: مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه با دمای $95^{o}C$، ۳۲ چرخه شامل سه مرحله: $94^{o}C$ به مدت ۱ دقیقه جهت واسرشت سازی ثانویه، $59^{o}C$ به مدت ۱ دقیقه برای اتصال آغازگر و $72\ ^{o}C$ به مدت ۱دقیقه جهت گسترش آغازگر و در پایان نیز یک چرخه گسترش نهایی به صورت $72\ ^{o}C$ به مدت۵ دقیقه در نظر گرفته شد.

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	
واسرشت سازی ثانویه	۹۴	۱ دقیقه	
اتصال آغازگر	۵۹	۱ دقیقه	۳۲ چرخه
گسترش آغازگر	۷۲	۱ دقیقه	
گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه	

مشاهده محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

هشت میکرو لیتر از مواد حاصل از واکنش زنجیرای پلیمراز با دو میکرو لیتر بافر بارگذاری مخلوط شد و روی ژل آگارز ۱درصد TBE که به آن اتیدیوم برماید 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 بنفش مشاهده گردیدند.

الکتروفورز با ژل پلی اکریل آمید

از آنجا که حساسیت ژل پلی اکریل آمید۲۰۰-۳۰۰ برابر ژل آگارز 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 برده 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) درون میکروتیوپ‌هایی که قبلاً شماره‌گذاری شده‌اند مخلوط کرده، به مدت۱۰ دقیقه و با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در دستگاه ترمال سایکلر 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 چاهک‌ها بارگذاری گردید. تانک به منبع تغذیه با ولتاژ ۲۰۰ ولت متصل شد و به مدت ۶/۵ ساعت نمونه‌ها الکتروفورز شدند. پس از الکتروفورز، شیشه‌ها از تانک خارج شدند و رنگ‌آمیزی با روش زیر انجام گرفت: ژل را پس از جدا کردن از شیشه‌ها به ظرف حاوی محلول تثبیت‌کننده هدایت و به کمک یک کاردک شیشه رویی از ژل جدا شده و ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تثبیت کننده (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 و۳۰۰ میکرولیتر فرمالدئید و۲۰۰ 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 (۲۰۰ میلی لیتر هیدروکسید سدیم

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]

سه درصد و ۳۰ میکرو لیتر تیوسولفات سدیم) شناور شد. در این مرحله به تدریج باندها ظاهرگردیدند. 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 تثبیت‌کننده 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 آماده برای اسکن شدن گردید. اسکن باندها توسط دستگاه 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

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

مدل بررسی ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی و وزن تولد:

$y_{ij}= \mu+S_i+G_j+SG_{ij}+e_{ij}$

و مدل مورد استفاده برای بررسی ارتباط بین الگوهای ژنوتیپی با وزن از شیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی به شرح زیر بود:

$$y_ij=\mu+s_i+G_j+〖SG〗_ij+\beta(W_ij-W\ )+e_ij$$

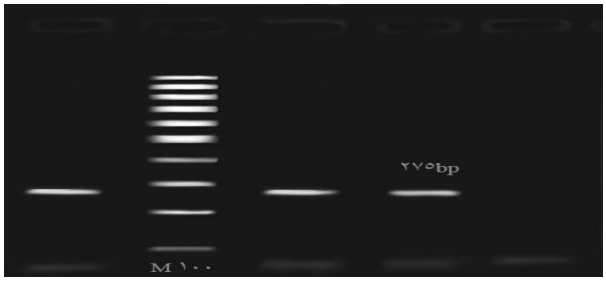
که در این مدل‌ها y_{ij}: مقدار هر یک از مشاهدات مربوط به صفات وزن، μ: میانگین جامعه برای هر صفت، S_i: اثر iامین جنس حیوان (نر، ماده)، G_j : اثر j امین الگوی ژنوتیپی، SG_{ij} اثر متقابل جنس و الگوی ژنوتیپی، β: ضریب تابعیت وزن تولد، W_{ij}: وزن هنگام تولد، $\overline{W}$: میانگین وزن دام‌ها و e_{ij}: اثر اشتباه 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 آلودگی 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 جفت بازی از اگزون ۳ ژن لپتین به کمک واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، برنامه حرارتی مناسب و شرایط خوب آزمایشگاهی بدون قطعات غیر اختصاصی به دست آمد.



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

بررسی تفاوت در شکل فضایی تک رشته‌های DNA

پس از بررسی ژل‌های آگارز برای جایگاه ۲۷۵ جفت بازی، قطعه تکثیر شده با تکنیک SSCP مورد بررسی قرار گرفته شد. این روش شامل سه مرحله واسرشته سازی، الکتروفورز 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.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]



شکل ۲- پلی مورفیسم حاصل از تکنیک SSCP در ژن 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 ژن 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)

فراوانی الگوهای ژنوتیپی 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 را الگوی شماره ۵ (۴۱/۳۷) و کمترین درصد فراوانی را الگوهای شماره ۷و۸ (۳/۴۵) دارا است (جدول ۳) و نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها در نژاد آمیخته نشان داد که بیشترین درصد فراوانی را 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 شیرگیری، وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی نژاد لری بختیاری مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۵).

جدول ۳- فراوانی الگوهای SSCP ژن لپتین در گوسفندان نژاد لری بختیاری
Table 3. Frequency of SSCP pattens 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 pattens 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]
[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]

جدول ۵- ویژگی آماری گوسفندان نژاد لری بختیاری

Table 5. Descreptive Statistics of Lori Bakhtiari sheep breed

صفت	تعداد دام	محدوده	حداقل	حداکثر	مجموع	میانگین	انحراف معیار
وزن تولد	۵۸	۳/۴	۳/۶	۷/۹	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	۳۵۳۹	۶۱/۰۱	۱۲/۶۸

رابطه الگوهای ژنوتیپی و صفات مورد بررسی

اثر الگوی ژنوتیپی بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن شش ماهگی معنی‌دار نبود، اما اثر الگوی ژنوتیپی بر وزن دوازده ماهگی در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. (جدول ۶). بیشترین میانگین وزن در سن شش ماهگی مربوط به الگوی ژنوتیپی شماره ۷ (۶۲/۵۰) است که از لحاظ آماری با الگوی ژنوتیپی شماره ۵ (۵۸/۱۰) تفاوت معنی‌داری ندارد. همچنین کمترین میانگین وزن شش ماهگی مربوط به الگوی ژنوتیپی شماره ۶ (۴۰/۳۳) است. از سوی دیگر نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میانگین وزن در سن دوازده ماهگی مربوط به الگوی ژنوتیپی شماره ۷ (۷۷/۲۵) و کمترین میانگین وزن مربوط به الگوی ژنوتیپی شماره ۴ (۴۵/۶۲) است (جدول ۷). نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل الگوی ژنوتیپی و جنس بر وزن دوازده ماهگی در سطح ۵ درصد معنی‌دار است و بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن شش ماهگی معنی‌دار نبود. (جدول ۶). تعداد الگوی ژنوتیپی یافت شده در گوسفندان نژاد لری بختیاری تعداد ۸ الگو بود. نتایج نشان داد که چند شکلی ژنتیکی در جایگاه‌های ژنی لپتین وجود دارد.

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

Table 6. Analysis of Variance for birth weight, weaning weight and weight at 6 and 12 months

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تولد	Sig	وزن از شیرگیری	Sig	وزن شش ماهگی	Sig	وزن دوازده ماهگی	Sig
جنس	۱	۳/۱۵^{ns}	۰/۰۸	۳/۲۹^{ns}	۰/۰۷	۱۷/۰۳**	۰	۸/۷۶**	۰
الگوی ژنوتیپی	۷	۰/۲۰^{ns}	۰/۹۸	۰/۵۷^{ns}	۰/۷۷	۱/۲۷^{ns}	۰/۲۸	۲/۴۴*	۰/۰۳
اثر متقابل	۷	۰/۶۷^{ns}	۰/۶۱	۰/۳۰^{ns}	۰/۸۷	۰/۹۵^{ns}	۰/۴۴	۲/۶۰*	۰/۰۴

طهمورث پور و همکاران (۱۹) در بررسی ژن لپتین در گوسفندان بلوچی سه الگوی ژنوتیپی گزارش کردند. همچنین Zho و همکاران (۲۵) در مطالعه‌ای 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 ژنوتیپی یافت شده در گوسفندان نژاد آمیخته لری بختیاری- افشاری تعداد ۱۰ الگو بود. شجاعی و همکاران (۱۴) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند آن‌ها در بررسی چند شکلی اگزون شماره سه ژن لپتین در گوسفندان نژاد کرمانی ۱۰ الگوی ژنوتیپی را گزارش کردند. شیبک و همکاران (۱۶) در مطالعه چند شکلی اگزون ۳ ژن لپتین در گوسفندان کردی خراسان شمالی سه الگوی ژنوتیپی گزارش کردند. همچنین نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان می‌دهد 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 دوازده هگی معنی‌دار بود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که اثر جنس بر وزن تولد و وزن از شیرگیری معنی‌دار نبود. اثر الگوی ژنوتیپی بر وزن دوازده ماهگی معنی‌دار بود. که نتایج این آزمایش با نتایج شجاعی و همکاران (۱۴) مطابقت دارد. آن‌ها در مطالعه چندشکلی اگزون شماره سه ژن لپتین در گوسفندان نژاد کرمانی بیان کردند که اثر ژنوتیپ بر وزن شش ماهگی و وزن دوازده ماهگی در گوسفندان نژاد کرمانی معنی‌دار 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 سنین مختلف تفاوت معنی‌داری دارد. اثر الگوی ژنوتیپی بر وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن شش ماهگی در این پژوهش معنی‌دار 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 ژنوتیپ بر وزن تولد و وزن از شیرگیری اثر معنی‌داری ندارد.

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

Table 7. Comparision of means for birth weight, weaning weight, weight at 6 and 12 months between genotypic patterns

الگوی ژنوتیپی	وزن تولد (کیلوگرم)	وزن از شیرگیری (کیلوگرم)	وزن شش ماهگی (کیلوگرم)	وزن داوزده 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^{cae}
۳	۵/۱۳ ± ۱/۲۳	۳۵/۳۰ ± ۵/۱۶	۵۱/۸۳ ± ۱/۴۸^{abc}	۵۷/۶۶ ± ۲/۴۳^{bca}
۴	۴/۵۲ ± ۰/۷۱	۳۰/۱۲ ± ۴/۳۳	۴۰/۷۵ ± ۵/۷۲^{c}	۴۵/۶۲ ± ۱/۴۹^{e}
۵	۵/۳۷ ± ۱/۰۳	۳۴/۸۲ ± ۵/۱۳	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^{ae}
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^{bc}	۵۲/۰۰ ± ۰/۰۰^{ca}

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]

منابع

1. Ahmadpanah, J. 2016. Phylogenetic analysis and molecular evolution of the leptin gene. Research on Animal Production, 7(13): 208-213.
2. Bahrenberg, G., I. Behrmann, A. Barthel and P. Hekerman. 2002. Indentifition of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinas/ singal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. Molecular Endocrinology, 16(4): 859-872.
3. Boucher, D, M.F. Palin, F. Castonguay, C. Gariépy and F. Pothier. 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptine (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Canadian Journal of Animal Science, 86: 31-35.
4. 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.
5. 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.
6. Daridia, S., J. Williams, U. Bruggemand, M. Onagbesand, N. Raverc, E. Decuypred, J. Djianed, A. Gertlerc and M. Taouis. 2000. Achichen leptin -specific radio immunoassay. Domestic Animal Endocriology, 18: 325-335.
7. Friedman, J.M. and J.L. Halaas. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395: 763-770.
8. Javanmard, A. 2001. Study the polymorphism of growth hormone receptor gene promotor (GHR) in Sistani cows. M.Sc. Dissertation in Animal Science. University of Tehran (In Persian).
9. Keshavarz, A. 2011. Study the polymorphism in Leptin gene in Najdi cows using PCR-RFLP teqnique. MSc Dissertation on Animal Science. Ramin University. 67 pp (In Persian).
10. 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.
11. 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.
12. Matarese, G., A. La Cava, V. Sanna, GM. Lord, R.I. Lechler and S. Fontana. 2002. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin. Trends in Immunology, 23:182-187.1
13. 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.
14. Shojaei, M., M.R. Mohammadabadi, M. Asadi Fozi, K.A. Esmailizadeh, M.H. Ferdowsi, A. Torabi, M. Tayyarzadeh and H. Mirzakhani. 2010. Using PCR-SSCP technique to investigate polymorphism of Leptin gene in Kermani sheep. Animal Science Researches, 20: 115-122.
15. 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).
16. Shibak, A., B. Montazertorbati, H. Farhangfar, R. Ashkani Far. 2014. Study of genetic polymorphisms in exon 3 of the Leptin gene and its assosiation with birth weight and growth traits in North Khorasan Kurdi sheep. Modern Genetic, 4: 511-516 (In Persian).
17. Talebi, M.A., S.R. Miraei Ashtiani, M. Moradi Shahre Babak and A. Nejati Javaremi. 2010. Econimic values for reproduction, growth and carcass in Lori Bakhtiari Sheep. Animal Science Journal, 41(13) 203-213 (In Persian).
18. Tahmoorespoor, M., M.R. Nasiri, M. Ansari, A. Heravi and F. Eftekhar Shahroodi. 2008. Polymorphism of Leptin gene and its relationship with daily dain in Baloochi sheep. Proceeding of 3th Congress on Animal Aquatic Science. University of Ferdoosi. Mashhad (In Persian).
19. Tahmures poor, M., M.R. Nassiry, M. Ansary, A. Heravi Mousavi, M. Vafaye vale and F. Eftekhar Shahroudi. 2009. Analysis of Leptin genepolymorphism and their association with average dailygain trait in Baluchi sheep. 3rd Congress of animal science, Mashhad, Iran.
20. Taouis, M., J.W. Chen, C. Daviaud, J. Dupont, M. Derouet and J. Simon. 1998. Clonning the chiken Leptin gene. Gene, 208: 239-242.
21. 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.
22. 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).
23. Yang, D., H. Chen, H.X. Wang, Zh. Tian and L. Tang. 2007. Association of polymorphisms of leptin gene with body weight and body sizes indexes in Chinese indigenous cattle. Journal of Genetics and Genomics, 34(5): 400-405.
24. 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.
25. Zhou, H., J.G. Hickford and H. Gong. 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. Mol Biotechnology, 41: 22-25.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]

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: alighazikhanishadd@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 $L_1$to L_8 and for crossbreeds sheep, 10 band patterns including $L_1$to 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

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-11-14]

[DOI: 10.29252/rap.9.21.105]