



بررسی تنوع ژنتیکی در ژنهای خانواده DNMT در گاوهای نژاد هلشتاین با تکنیک PCR-SSCP

مهدی وفای واله^۱ و سجاد شهبادی ساردو^۲

۱- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران، (نویسنده مسوول: mehdi.valleh@uoz.ac.ir)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۳

صفحه: ۱۰۴ تا ۱۱۲

چکیده

ژنهای خانواده DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) بواسطه نقش کلیدی در شکل گیری و ابقاء الگوهای اپی ژنتیکی، اهمیت بالایی در کنترل تکوین و رشد و نمو جنینی از مرحله لقاح تا دوران پس از تولد دارند. مطالعه حاضر به منظور شناسایی جهشهای بالقوه در اگزون ۳ ژن DNMT-1، اینترون ۴ ژن DNMT-3a و اینترون ۳ ژن DNMT-3b و ارتباط آنها با وزن تولد در گاوهای نژاد هلشتاین صورت گرفت. خونگیری به طور تصادفی از تعداد ۶۰ رأس گاو هلشتاین دارای رکورد وزن تولد تا بلوغ از یک گاوداری صنعتی در استان کرمان انجام شد. استخراج نمونههای DNA با استفاده از روش فنل کلروفرم انجام گرفت و جایگاههای هدف با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط واکنشهای زنجیره ای پلیمرز (PCR) تکثیر شدند. به منظور ردیابی چندشکلی در توالیهای هدف از تکنیک چندشکلی ساختار فضایی رشتههای منفرد (SSCP) و رنگ آمیزی با نیترا ت نقره استفاده شد. نتایج این مطالعه حاکی از عدم وقوع جهش در تمامی جایگاههای مورد مطالعه بود، بطوریکه در تمام نمونههای مورد بررسی، بر اساس اندازه قطعه مورد بررسی، الگوی باندهای یکسانی شناسایی شد. عدم شناسایی وجود چندشکلی در نواحی مورد بررسی، احتمالاً ممکن است به دلایلی نظیر ناکارآمدی نسبی تکنیک PCR-SSCP در شناسایی جهشها، کوچک بودن اندازه نمونههای مورد بررسی، پیامدهای تصادفی ناشی از رانش ژنی و یا تاثیر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در نواحی مزبور باشد. بنابراین، نواحی ژنی مورد بررسی در این تحقیق به عنوان نشانگر مولکولی برای ارزیابی صفت وزن تولد در گاوهای هلشتاین فاقد کارایی هستند.

واژههای کلیدی: تنوع ژنتیکی، DNMTs، گاو هلشتاین ایران، PCR-SSCP

مقدمه

با وجود یکسان بودن توالی ژنومی در سلول اولیه تخم و سلولهای مختلف حاصل از آن، تنوع الگوی بیان ژنی در این سلولها، پایه و اساس فرآیند تکوین است که با تغییر تدریجی الگوی اپی ژنتیکی سلولها در طی مراحل جنین زایی شکل می گیرد (۸، ۱۲، ۳۵). از جمله تغییرات اپی ژنتیکی که در سلولهای تمایز یافته به طور پایداری قابلیت توارث دارد فرآیند متیلاسیون DNA است که در پیدایش اندامها و بافتهای مختلف جنین در حال تکوین نقش بسزایی دارد (۲۴، ۱۶، ۲۹). متیلاسیون کربن ۵ نوکلئوتید سیتوزین در مناطق دارای دی نوکلئوتیدهای CPG به منظور تولید ۵-متیل سیتوزین، یکی از مدیفیکاسیونهای اصلی اپی ژنتیک می باشد. سیتوزین متیله شده در شیار بزرگ مارپیچ دو رشته ای DNA قرار می گیرد که در روند اتصال فاکتورهای رونویسی تداخل کرده و بیان ژن ها را مهار می کند (۱۳، ۲۹). الگوهای متیلاسیون در طول دوره جنینی ایجاد شده و از طریق میتوز به ارث می رسند. متیلاسیون DNA دارای نقش مهمی در تنظیم بیان ژنهای ایمپرینت و ژنهای دارای الگوی بیان وابسته به جنس که نقش تعیین کننده ای در فرآیند تکوین و نیز کنترل وزن جنین دارند، می باشد (۷، ۱۱، ۱۶، ۳۵). الگوهای اپی ژنتیکی همچنین نقشی کلیدی در خاموش کردن ترانسپوزن ها دارند. در این رابطه پژوهشگران گزارش کردند که اعضای خانواده ژنهای DNMTs به ترتیب شامل ژن DNMT-1 مسوولیت حفظ الگوهای متیلاسیون و در مقابل ژنهای DNMT-3a و DNMT-3b نقشی کلیدی در شکل گیری الگوهای جدید

متیلاسیون در طی فرآیند همانند سازی را در رشتههای جدید DNA دارند (۸). پژوهشگران همچنین گزارش کردند، ژنهای DNMT3a و DNMT3b نه تنها در فرآیند تشکیل الگوهای اپی ژنتیکی اسپرم و یا تخمک در طی فرآیند گامتوژن دخالته دارند (۱۲، ۲۹، ۳۵)، بلکه نقش بسزایی در ایجاد الگوهای جدید اپی ژنتیکی در طول فرآیند برنامه ریزی مجدد الگوهای اپی ژنتیکی ژنوم در طول دوران پس از لقاح ایفاء می کنند (۱۳، ۲۹). از طرف دیگر، نتایج تحقیقی نشان داد که ژنهای اعضای خانواده DNMTs نقش مهمی در کنترل تکوین و نیز کنترل مراحل مختلف رشد جنینی در پستانداران دارند (۱۱، ۲۴). در این رابطه نشان داده شده است که اختلال در میزان بیان هریک از ژنهای DNMT-1، DNMT3a و DNMT3b منجر به بروز اختلال در لانه گزینی رویان، تکوین جفت، سقط جنین پس از لانه گزینی و مرده زائی می شود (۳۵، ۱۶، ۱۱). پژوهشگران همچنین گزارش کردند که اختلال در عملکرد فعالیت ژنهای DNMTs، بر ساختار الگوهای متیلاسیون و نیز الگوی بیان ژنهای ایمپرینت، نظیر ژنهای IGF2 و H19 که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین جنین و جفت در دوران قبل از تولد دارند، اثرات معنی داری می گذارند (۱۶، ۷، ۲، ۳۵، ۲۴).

محققان گزارش کردند که سطح بیان DNMT3a و یا DNMT3b با صفاتی مانند کیفیت گوشت و صفات لاشه (۱۴، ۲۵)، میزان بیان سیتوکینهای التهابی در بافت چربی (۱۹) و نیز میزان حساسیت و یا مقاومت به بیماریها از جمله بیماری مارک (Marek Disease) در پرندگان (۳۴) ارتباط

پژوهش حاضر، شناسایی تنوع ژنتیکی در ژنهای DNMT1، DNMT3a و DNMT3b در گاوهای هلشتاین به کمک تکنیک PCR-SSCP بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون

در این تحقیق، تعداد ۶۰ رأس گاو هلشتاین در گله‌ای واقع در استان کرمان که با سیستم پرورشی صنعتی نگهداری می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. خونگیری به صورت تصادفی از ورید گردن در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام شد. نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری سریعاً داخل ظرف حاوی یخ فراوان قرار گرفتند و مستقیماً به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون کامل توسط روش فنل کلروفرم مشابه روش شریعت و همکاران (۳۲) انجام شد. کیفیت نمونه‌های DNA توسط روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها

توالی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier نسخه ۶ طراحی (جدول ۱) و به وسیله سایت Ncbi Blast یکسان بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل شد و به منظور سنتز به شرکت پیشگام تهران ارسال شدند.

دارد. از طرفی تغییر الگوی بیان ژنهای اعضای خانواده DNMTs از جمله دلایل مشترک در بروز انواع سرطان‌ها می‌باشد (۳۱،۳۳).

بنابراین با توجه به نقش کلیدی ژنهای خانواده DNMTs در شکل‌گیری و ابقاء الگوهای متیلاسیون در طی فرآیند گامتوژنسیس، دوره پس از لقاح و با توجه به نقش کلیدی آن‌ها در کنترل طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی و به طور خاص فرآیندهای مربوط به رشد و تکوین جنین (۱۶،۳۵)، بنابراین چندشکلی احتمالی در این ژن‌ها احتمالاً بر وزن گوساله در زمان تولد نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد (۱۶،۳۵). با توجه به ارزش اقتصادی وزن تولد، این صفت به عنوان یک صفت مهم در اهداف اصلاحی مطرح می‌باشد (۶،۲۷،۱۸،۳۰). محققان گزارش کردند که وزن گوساله متولد شده بر عملکرد صفات تولیدی و تولیدمثلی مؤثر است، بطوریکه نتایج تحقیقات دلالت بر وجود همبستگی مثبت معنی‌داری بین وزن تولد و میزان نرخ رشد در بلندمدت (حتی تا سن ۸ سالگی) دارد (۳۶). از طرف دیگر، یکی از دلایل عمده‌ی سخت‌زایی، نامتناسب بودن جثه گاو ماده (جثه کوچک) با اندازه جثه گوساله (که تا حدود زیادی با وزن تولد مرتبط است) می‌باشد (۲۷،۳۰)؛ در این رابطه گزارش شده است که به ازاء افزایش هر کیلوگرم وزن گوساله‌ی تازه متولد شده، سخت‌زایی حدود ۱۳ درصد افزایش می‌یابد (۱۸).

بنابراین، با توجه به اهمیت ژنهای خانواده DNMTs در کنترل فرآیند تکوین جنین در دوران آبستنی، هدف از

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر نواحی هدف در ژنهای DNMTs

Table 1. Designed primers for amplification of target region in the DNMTs genes

نام ژن	توالی آغازگرهای رفت و برگشت	تعداد جفت باز تکثیر شده	کد پیگیری در بانک ژن
DNMT-1	F: 5'-CCACGGTGTTCACAGAGGACTG-3' R: 5'-CGCACAGCATCTCCACATCTCC-3'	114bp	NM_182651.2
DNMT-3a	F: 5'-TCTGGTGAGAGGAACGGTAGGA-3' R: 5'-GACTTTGGAAGCAGGACCTTGAC-3'	176bp	AC_000168.1
DNMT-3b	F: 5'-CACAGAGGAGGTTCCAAGAGAT-3' R: 5'-ATTCAGGTCATTATCAGGCACTG-3'	207bp	AC_000170.1

آزمون چندشکلی ساختار فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)

به منظور شناسایی تنوع ژنتیکی، محصولات PCR به کمک روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)، بر اساس پروتکل‌های توسعه یافته با اندکی تغییرات ارزیابی شدند (۱). برای این منظور، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP مخلوط شد و برای مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵°C واسرشت‌سازی شدند. نمونه‌های واسرشت شده در کمترین زمان ممکن روی یخ انتقال یافتند تا از به هم چسبیدن رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید. به منظور نمایان‌سازی ژنوتیپ‌ها از تانک الکتروفورز عمودی و ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد استفاده شد. سپس الکتروفورز نمونه‌ها با ولتاژ ۱۸۰ ولت

مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

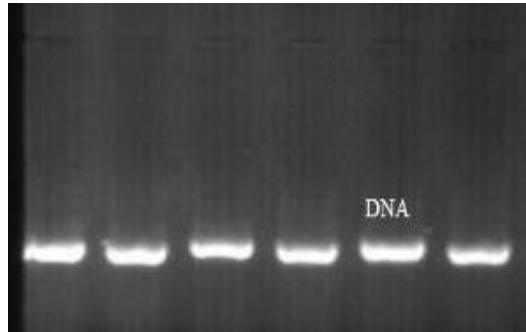
واکنش PCR مطابق با پروتکل‌های بهینه‌سازی شده در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر؛ به این صورت که ۱۲ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (رفت و برگشت)، ۲ میکرولیتر DNA و ۹ میکرولیتر آب دویار تقطیر در دستگاه ترموسایکلر مدل اپندرف ساخت آمریکا انجام شد. شرایط دمایی PCR به منظور تکثیر نواحی مورد نظر شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه برای مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۰°C و ۳۸ چرخه شامل سه مرحله: مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۹۴°C، دمای اتصال [۶۰°C] به مدت ۴۵ ثانیه برای ژن DNMT-1، (۶۳°C) برای ژنهای DNMT-3a و DNMT-3b به مدت ۴۵ ثانیه]] و مدت زمان ۴۵ ثانیه با دمای ۷۲°C و یک چرخه بسط نهایی ۷۲°C به مدت ۱۵ دقیقه اعمال شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از استخراج نمونه‌های DNA

استخراج نمونه‌های DNA با روش فنل کلروفرم منجر به حصول مقادیر بالایی از DNA ژنومی شد که به صورت تک‌باند و بدون هرگونه تکثیر غیراختصاصی بودند (شکل ۱).

به مدت ۶ ساعت در دمای ۴۰°C انجام گرفت. در نهایت رنگ‌آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای بانندی به روش نیترا-نقره به ترتیب در سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور انجام شد (۱).

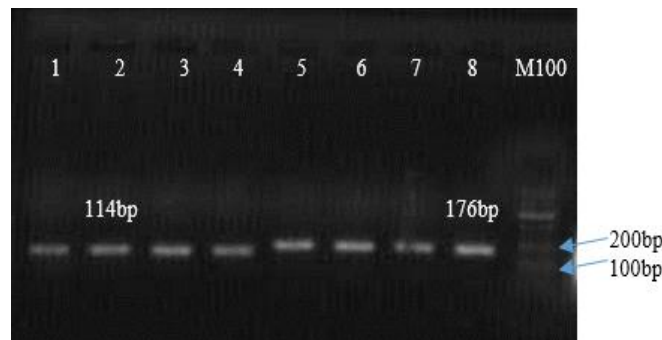


شکل ۱- کیفیت DNAهای استخراج‌شده از نمونه خون گاو هلشتاین روی ژل آگارز یک درصد
Figure 1. Quality of extracted DNA from blood samples of Holstein cow on a 1% agarose gel

پلی‌مراز (PCR) و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بدون تکثیر باند غیراختصاصی انجام گرفت. نشانگر وزن مولکولی استفاده‌شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعات مورد نظر را تأیید کرد.

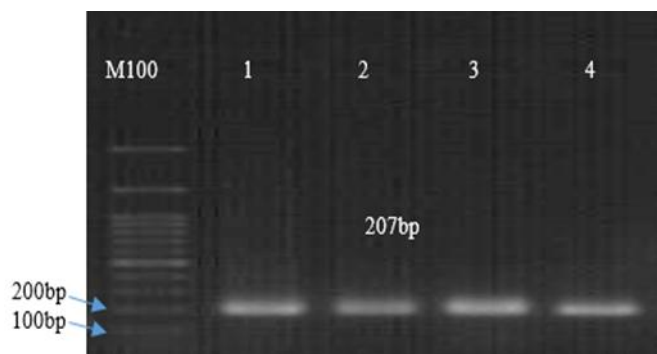
نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، تکثیر قطعه ۱۱۴ جفت‌بازی از ژن DNMT-1، قطعه ۱۷۶ جفت‌بازی از ژن DNMT-3a (شکل ۲) و قطعه ۲۰۷ جفت‌بازی مربوط به ژن DNMT-3b (شکل ۳) به وسیله واکنش زنجیره‌ای



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR برای ژن‌های DNMT-1 (لاین‌های شماره ۱ تا ۴) و DNMT-3a (لاین‌های شماره ۵ تا ۸) روی ژل آگارز

Figure 2. Agarose electrophoresis patterns of PCR-amplified fragments of DNMT-1 DNMT3a (lanes 5-8) genes (lanes 1-4)

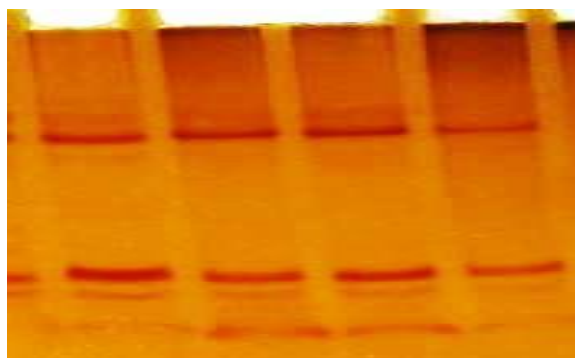


شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR برای ژن DNMT-3b بر روی ژل آگارز
Figure 3 . Agarose electrophoresis patterns of PCR-amplified fragments of DNMT3b gene

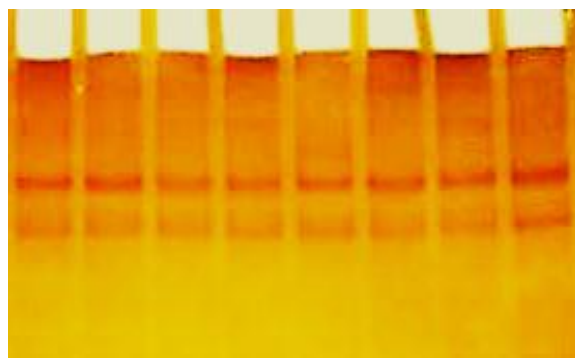
نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ با روشی SSCP

چندشکلی در نواحی ژنی مورد بررسی در جمیع گاو هلستاین مورد ارزیابی در این مطالعه داشت؛ بطوریکه برای هر یک از جایگاههای مورد بررسی الگوهای بانندی مشابهی شناسائی شد (شکل‌های ۴، ۵ و ۶).

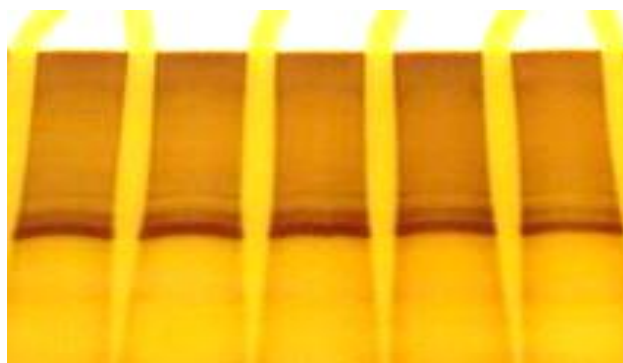
پس از تکثیر قطعات مورد نظر، از روش SSCP جهت تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی وجود چندشکلی در اگزون ۳۳ ژن DNMT1، اینترون ۴ ژن DNMT3a و اینترون ۳ ژن DNMT3b حاکی از عدم وجود



شکل ۴- الگوهای یک‌شکل PCR-SSCP نمایان شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اگزون ۳۳ ژن DNMT-1
Figure 4. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the exon 33 region of the DNMT1 gene on the 10% polyacrylamide gel



شکل ۵- الگوهای یک‌شکل PCR-SSCP نمایان شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اینترون ۴ ژن DNMT-3a
Figure 5. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the intron 4 region of the DNMT3a gene on the 10% polyacrylamide gel



شکل ۶- الگوهای یک‌شکل PCR-SSCP نمایان‌شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد برای ناحیه اینترون ۳ ژن DNMT-3b
Figure 6. Monomorphic PCR-SSCP pattern of the introns 3 region of the DNMT3b gene on the 10% polyacrylamide gel

تک‌نوکلئوتیدی شناسائی‌شده با صفات لاشه از جمله رنگ و میزان چربی گوشت، وضعیت دنده‌ها، بازده لاشه و ضخامت چربی پشت بدن در ارتباط بودند (۲۵). بطور مشابه ارزیابی تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs در ۱۴ نژاد گاو دلالت بر ارتباط معنی‌دار برخی از جهش‌های شناسائی‌شده با صفات لاشه داشت؛ بطوریکه از میان ۱۰ جهش شناسائی‌شده تنها جهش‌های واقع در اگزون شماره ۱۷ ژن DNMT1 (G>A13154420)، جهش واقع در اینترون شماره ۱۱ ژن DNMT3a (G>A76198537) و جهش واقع در اینترون شماره ۱۰ ژن DNMT3b (T>C63037313) با برخی از صفات لاشه ارتباط معنی‌داری داشتند (۲۶). بعلاوه نتایج تحقیقات سایر محققان دلالت بر ارتباط بین الگوی بیان ژن‌های DNMT3a/3b با صفات اقتصادی و نیز صفات لاشه در گاو گوشتی دارند (۱۴).

اگرچه تاکنون ارتباط چندشکلی‌های اعضای ژن‌های خانواده DNMTs با وزن تولد و صفات رشد در مدل‌های حیوانی گزارشی ارائه نشده است؛ اما نتایج مطالعات پژوهشگران در سال‌های اخیر دلالت بر اهمیت توارث فرا نسلی الگوهای اپی‌ژنتیکی در کنترل طیف گسترده‌ای از صفات اقتصادی در حیوانات اهلی در نسل‌های آتی دارد (۱۲،۳۵). در این رابطه بطور خاص نقش ژن‌های خانواده DNMTs در مدل‌های مختلف حیوانی به اثبات رسیده است (۱۴،۲۴،۳۵). بعلاوه اهمیت کلیدی این ژن‌ها در شکل‌گیری الگوهای ایمپرینت ژنومی، که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین در دوران جنینی، کنترل وزن تولد، قابلیت زنده‌مانی و نیز وقوع سخت‌زائی دارد، در مدل‌های مختلف انسان و حیوان به اثبات رسیده است (۲،۷،۱۶،۲۴،۳۵). در این رابطه نتایج طیف گسترده‌ای از مطالعات دلالت بر ارتباط بین تغییر الگوی بیان ژن‌های خانواده DNMTs با میزان متیلاسیون ژن‌های ایمپرینت (ژن‌های موثر در رشد و تکوین در دوران جنینی) بر تکوین و عملکرد جفت (پلاستا) دارد (۲۴،۱۶،۳۵).

صرف‌نظر از محدودیت یافته‌های ارائه‌شده مرتبط با مدل‌های حیوانی؛ نتایج طیف گسترده‌ای از مطالعات اپیدمیولوژیکی دلالت بر وجود ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی‌های موجود در ژن‌های خانواده DNMTs با احتمال وقوع طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها دارند. در این رابطه نتایج

از دلایل احتمالی برای توجیه این نتایج می‌توان به تفاوت روش مورد استفاده برای شناسائی جهش در این مطالعه (PCR-SSCP) و مطالعات سایر محققان (عمدتاً تعیین توالی)، کوچک‌بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا اثرات احتمالی مرتبط با استراتژی‌های اصلاحی (کنترل آمیزش‌ها) مورد استفاده در گله مزبور اشاره کرد. در این رابطه نشان داده شده است که بکارگیری برخی از استراتژی‌های اصلاحی می‌تواند منجر به افزایش سطح روابط خویشاوندی بین افراد جامعه و نیز گاه‌آ تثبیت برخی ژن‌ها (رانس ژنی) در سطح جامعه شود (۲۲). از دیگر عوامل مؤثر بر عدم‌وجود تنوع در جایگاه‌های مورد بررسی می‌توان به اثر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در جایگاه‌های مورد بررسی اشاره کرد، هر چند برای تایید این فرضیه‌ها می‌بایست احتمال وقوع جهش‌های مزبور در سایر نژادها و نیز جمعیت‌هایی با اندازه بزرگ نیز بررسی شود. علاوه بر این، در تحقیق حاضر از تکنیک SSCP استفاده شد. روش SSCP بخاطر دقت بالا در تشخیص جهش‌های ناشناخته و نیز ارزان‌بودن نسبت به سایر روش‌های شناسائی جهش دارای مطلوبیت بالایی می‌باشد (۱۷،۲۱،۳۳). با این وجود محققان گزارش کردند که قابلیت شناسایی جهش‌های ناشناخته با استفاده از روش SSCP برای قطعات با طول کمتر از ۳۰۰ جفت‌باز، بالاتر از ۸۰ درصد می‌باشد (۱۷،۲۱).

در خصوص وجود تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs و نیز تأثیر احتمالی آنها بر عملکرد حیوانات اهلی حیوانات اهلی گزارشات اندکی ارائه شده است؛ بطوریکه عمده نتایج تحقیقات ارائه‌شده در خصوص تأثیر تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs بر مدل‌های انسانی تمرکز دارند. به‌طور خاص، ارزیابی ارتباط چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن DNMT3b با کیفیت گوشت و صفات لاشه در گاو گوشتی چینی نژاد Snow Dragon با استفاده از نشانگر PCR-RFLP منجر به شناسائی سه ژنوتیپ CC، CT و TT برای چندشکلی واقع در اینترون شماره ۶ (C63029349T)، سه ژنوتیپ GG، AG و AA برای چندشکلی واقع در اینترون شماره ۵ (G63032883A)، سه نوع ژنوتیپ AA، AG، GG برای چندشکلی واقع در اینترون شماره ۱۳ (A63039420G) شد؛ بطوری‌که چندشکلی‌های

یک مطالعه حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار وابسته به سن بین چندشکلی واقع در ژن DNMT3b (-149C>T) (انواع سرطان‌های ناحیه سر و گردن) و نیز میزان قابلیت زنده‌مانی بیمار داشت (۹). همچنین نتایج مطالعات حاکی از تأثیر معنی‌دار جهش در ناحیه پروموتور (579 G>T) ژن DNMT3b بر افزایش میزان خطر ابتلا به سرطان مری داشت، بطوریکه احتمال وقوع سرطان مری در افراد حامل آلل G در مقایسه با افراد حامل آلل T بالاتر بود (۱۰). نتایج تحقیقات پژوهشگران همچنین حاکی از وجود ارتباط معنی‌دار بین احتمال وقوع سرطان کولورکتال (سرطان روده بزرگ) با چندشکلی واقع در پروموتور ژن DNMT3b (G39179T; rs1569686) داشت، بطوریکه نرخ ابتلا به سرطان در افراد دارای ژنوتیپ TT در مقایسه با ژنوتیپ‌های GT و GG بطور معنی‌داری بالاتر بود (۵).

نتایج تحقیقات پژوهشگران همچنین حاکی از ارتباط بین فقط یکی از چندشکلی‌های شناسائی شده در ژن‌های اعضای خانواده DNMTs با شانس ابتلا به بیماری نفرس دارد؛ بطوریکه تنها چندشکلی شناسائی شده واقع در ناحیه کدکننده ژن DNMT1 (rs2228611) با احتمال وقوع بیماری نفرس ارتباط داشت، در مقابل چندشکلی‌های شناسائی شده واقع در نواحی غیرکدکننده ژن‌های DNMT3a (rs1550117) و DNMT3b (rs2424913) تأثیری روی شانس ابتلا افراد به نفرس نداشت (۳۸). علاوه بر این اگرچه نتایج مطالعات پژوهشگران حاکی از ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی واقع در ناحیه کدکننده ژن DNMT1 (rs16999593) با نرخ ابتلا به الیگواسپرمی (کمبود اسپرماتوزوئید در مایع منی) داشت (۴)، اما در مقابل هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین جهش‌های شناسائی شده در نواحی مختلف این ژن، (Ile311Val, Ala147Gly, His97Arg) و احتمال وقوع سرطان کولورکتال (sporadic colorectal cancer) مشاهده نشد (۲۰). در مقابل نتایج برخی از پژوهش‌های دیگر انجام شده بر روی ارزیابی تأثیر وقوع جهش در ژن‌های خانواده DNMTs بر احتمال وقوع بیماری، منجر به شناسائی چندین جهش در نواحی کدکننده (اگزون) و نیز غیرکدکننده (اینترون) این ژن‌ها

در این تحقیق تمامی الگوهای باندی به‌دست‌آمده برای جایگاه‌های ارزیابی‌شده ژن‌های DNMT1، DNMT3a و DNMT3b، در جمعیت گاو هلشتاین مورد بررسی، بسته به جایگاه مورد ارزیابی دارای الگوی باندی تک‌شکلی (مونومورف) بودند؛ لذا جایگاه‌های مورد مطالعه احتمالاً نمی‌توانند به‌عنوان نشانگر مناسب برای ارزیابی هیچکدام از صفات مورد مطالعه در گاو هلشتاین مورد استفاده قرار گیرند. از دلایل احتمالی توجیه‌کننده این نتایج می‌توان به دلایلی همچون اثرات پدیده رانش ژنی، ناکارآمدی نسبی تکنیک PCR-SSCP در شناسائی جهش‌ها، کوچک‌بودن اندازه جمعیت مورد بررسی و یا تأثیر انتخاب مصنوعی و یا طبیعی بر علیه وقوع جهش در جایگاه‌های مورد بررسی اشاره نمود. از طرف دیگر، با توجه به نقش کلیدی این ژن‌ها در کنترل تمایز سلولی، کنترل میزان بیان ژن‌ها و نیز کنترل فرآیند تکوین جنین در دوران قبل از تولد و حتی رشد و نمو در دوران پس از تولد؛ و با توجه به تحقیقات اندک در رابطه با شناسایی و نیز ارتباط تنوع ژنتیکی در ژن‌های خانواده DNMTs و صفات مهم اقتصادی در حیوانات اهلی، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر بر روی سایر نواحی ژن‌های فوق‌الذکر در جمعیت‌های بزرگ‌تر و دیگر نژادها صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل (UOZ-GR-9517-35) انجام شده است.

منابع

1. Akbari, H., G. Dashab, M. Vafaye Valleh. 2018. Exploration of MEG9 gene polymorphism and its association with birth weight in Sistani cattle. *Research on Animal Production*, 8(17): 194-200.
2. Biniszkiewicz, D., J. Gribnau, B. Ramsahoye, F. Gaudet, K. Eggan, D. Humpherys and R. Jaenisch. 2002. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting and embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 22(7): 2124-2135.
3. Boligon, A.A., M.E.Z. Mercadante, S. Forni, R.B. Lobo and L.G.D. Albuquerque. 2010. Covariance functions for body weight from birth to maturity in Nelore cows. *Journal of Animal Science*, 88(3): 849-859.
4. Cheng, P., H. Chen, R.P. Zhang, S.R. Liu and A. Zhou-Cun. 2014. Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. *Reproductive Biomedicine Online*, 28(5): 644-649.
5. Daraei, A., R. Salehi and F. MohamadHashem. 2011. DNA-methyltransferase 3B 39179 G> T polymorphism and risk of sporadic colorectal cancer in a subset of Iranian population. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 16(6): 807.
6. Dawson, W.M., R.W. Phillips and W.H. Black. 1947. Birth weight as a criterion of selection in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 6(3): 247-257.
7. Delaval, K. and R. Feil, 2004. Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting *Current Opinion in Genetics and Development*, 14(2): 188-195.
8. Denis, H., M.N. Ndlovu and F. Fuks. 2011. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*, 12: 647-656.
9. Farias, L.C., C.A. De Carvalho Fraga, M.V.M. De Oliveira, T.F. Silva, L. Marques-Silva, P.R. Moreira and A.L.S. Guimarães. 2010. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *International Journal of Oncology*, 37(1): 167-176.
10. Fan, H., D.S. Liu, S.H. Zhang, J.B. Hu, F. Zhang and Z.J. Zhao. 2008. DNMT3B 579 G>T promoter polymorphism and risk of esophagus carcinoma in Chinese. *World Journal of Gastroenterology*, 14(14): 2230.
11. Golding, M.C., G.L. Williamson, T.K. Stroud, M.E. Westhusin and C.R. Long. 2011. Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(5): 306-317.
12. Feeney, A., E. Nilsson and M.K. Skinner. 2014. Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals. *Journal of animal science and biotechnology*, 5(1): 48-55.
13. Goll, M.G. and T.H. Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 481-514.
14. Guo, X., X. Liu, X. Xu, M. Wu, X. Zhang, Q. Li and Y. Yu. 2012. The expression levels of DNMT3a/3b and their relationship with meat quality in beef cattle. *Molecular Biology Reports*, 39: 5473-5479.
15. Haggarty, P., G. Hoad, S.E. Harris, J.M. Starr, H.C. Fox, I.J. Deary and L.J. Whalley. 2010. Human intelligence and polymorphisms in the DNA methyltransferase genes involved in epigenetic marking. *PloS One*, 5(6): e11329.
16. Haggarty, P., G. Hoad, G.W. Horgan, D.M. Campbell. 2010. DNA methyltransferase candidate polymorphisms, imprinting methylation, and birth outcome. *PloS One*, 8(7): e68896.
17. Hayashi, K. and D.W. Yandell. 1993. How sensitive is PCR-SSCP?. *Human Mutation*, 2(5): 338-346.
18. Johanson, J.M., P.J. Berger, S. Tsuruta and I. Misztal. 2011. A Bayesian threshold-linear model evaluation of perinatal mortality, dystocia, birth weight, and gestation length in a Holstein herd. *Journal of Dairy Science*, 94(1): 450-460.
19. Kamei, Y., T. Suganami, T. Ehara, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto and Y. Ogawa. 2010. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity*, 18: 314-321.
20. Khatami, F., B. Noorinayer, S.R. Mohebi, S. Ghiasi, R. Mohebi, M. Hashemi and M. Zali. 2009. Effects of amino acid substitution polymorphisms of two DNA methyltransferases on susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 10: 1183-1188.
21. Konstantinos, K.V., P. Panagiotis, V.T. Antonios, P. Agelos and N.V. Argiris. 2008. PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular biotechnology*, 38(2): 155-163.
22. Kristensen, T.N., A.A. Hoffmann, C. Pertoldi and A.V. Stronen. 2015. What can livestock breeders learn from conservation genetics and vice versa? *Frontiers in genetics*, 6: 38-50.
23. Kulis, M. and M. Esteller. 2010. DNA methylation and cancer. *Advances in Genetics*, 70: 27-56.
24. Lan, X., E.C. Cretney, J. Kropp, K. Khateeb, M.A. Berg, F. Peñagaricano, R. Magness, A.E. Radunz and H. Khatib. 2013. Maternal diet during pregnancy induces gene expression and DNA methylation changes in fetal tissues in sheep. *Frontiers in genetics*, 4: 49.

25. Liu, X., X.Y. Guo, X.Z. Xu, M. Wu, X. Zhang, Q. Li and C.H. Qin. 2012. Novel single nucleotide polymorphisms of the bovine methyltransferase 3b gene and their association with meat quality traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Research*, 11: 2569-2577.
26. Liu, X., T. Usman, Y. Wang, Z. Wang, X. Xu, M. Wu, Y. Zhang, X. Zhang, Q. Li, L. Liu and W. Shi. 2015. Polymorphisms in epigenetic and meat quality related genes in fourteen cattle breeds and association with beef quality and carcass traits. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(4): 467-475.
27. Meijering, A. 1984. Dystocia and stillbirth in cattle-A review of causes, relations and implications *Livestock Production Science*, 11(2): 143-177.
28. Mmereole, F.U. and J.I. Obinne. 2010. Relationship of the body weight and linear measurements of the west African Dwarf (WAD) sheep under the humid environment of Nigeria. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 43(1): 64-67.
29. Okano, M., D.W. Bell, D.A. Haber and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 247-257.
30. Olson, K.M., B.G. Cassell, A.J. McAllister and S.P. Washburn 2009. Dystocia, stillbirth, gestation length, and birth weight in Holstein, Jersey, and reciprocal crosses from a planned experiment. *Journal of Dairy Science*, 92(12): 6167-6175.
31. Seidel, C.C. Florean, M. Schnekenburger, M. Dicato and M. Diederich. 2012. Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. *Biochemistry*, 94: 2264-2279.
32. Shariat, M., Gh.R. Dashab and M. Vafaye valleh. 2019. Comparison of evolutionary and phylogenetic processes of the nucleotide sequence of the hvr1 mitochondrial genome in goat and other animal species. *Journal of Animal Production Research*, 10(23): 133-143 (In Persian).
33. Sunnucks, P., A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French, and A.C. Taylor, 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular ecology*, 9(11): 1699-1710.
34. Tian, F., F. Zhan, N.D. VanderKraats, J.F. Hiken, J.R. Edwards, H. Zhang, K. Zhao and J. Song. 2013. DNMT gene expression and methylome in Marek's disease resistant and susceptible chickens prior to and following infection by MDV. *Epigenetics*, 8(4): 431-444.
35. Triantaphyllopoulos, K.A., I. Ikonomopoulos and A.J. Bannister. 2016. Epigenetics and inheritance of phenotype variation in livestock. *Epigenetics and Chromatin*, 9(1): 31.
36. Xiang, G., F. Zhenkun, C. Shuang, Z. Jie, Z. Hua, J. Wei, P. Da and L. Dianjun. 2010. Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province. *Clinical Breast Cancer*, 10: 373-377.
37. Ye, C., A. Beehly-Fadiel, W. Lu, J. Long, X.O. Shu, Y.T. Gao, W. Zheng and Q. Cai. 2010. Two-stage case-control study of DNMT-1 and DNMT-3B gene variants and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, 121: 765-769.
38. Zhong, X., Y. Peng, C. Yao, Y. Qing, Q. Yang, X. Guo, W. Xie, M. Zhao, X. Cai and J.G. Zhou. 2016. Association of DNA methyltransferase polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis. *Biomedical Reports*, 5: 467-472.

PCR-SSCP Analysis of Genetic Variation in DNMT Gene Family in Holstein Cattle

Mehdi Vafaye Valleh¹ and Sajjad Shahdadi Sardo²

1- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran,
(Corresponding Author: Mehdi.Valleh@uoz.ac.ir)

2- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: April 13, 2019

Accepted: September 14, 2019

Abstract

Due to their roles in regulating embryonic growth and development members of DNA Methyltransferases (DNMTs) family have been shown to play fundamental parts in embryonic fertilization to postnatal life; through regulating the establishment and/or maintenance of specific epigenetic marks. The present study was conducted to identify potential reported mutations within the exon 33 of DNMT-1, introns 4 of DNMT-3a and introns 3 DNMT-3a genes and their relationship with birth weight in Iranian Holstein cows. A total of 60 blood samples from Holstein dairy cattle with records of weight from birth to adult age were randomly collected from industrial dairy cattle farm located in Kerman province. Genomic DNA samples was extracted using Phenol-Chloroform method and target sequence was amplified with PCR using specific primers. Polymerase chain reaction-single stranded conformational polymorphism (PCR-SSCP) and silver nitrate staining methods was used for screening potential mutation in target sequences. According to results of this study, in all cases, no mutation in target sequence were identified as all samples had the same specific SSCP pattern with respect to their size. The lack of polymorphism may imply that these region may be attributable to a relative inefficiency of PCR-SSCP for mutation detection, small sample size, stochastic effects of genetic drift and/or conserved nature of these genes due to either natural or artificial selection. According to the results of this study, analyzed sequence may not be informative as molecular marker for birth weight in Holstein cattle.

Keyword: DNMTs, Genetic Variation, Iranian Holstein Cattles, PCR-SSCP