دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

شناسایی چندشکلی در اگزون دوم ژن GDF9 در گوسفندان خالص و آمیخته پاکستانی

رسول خدابخش‌زاده[۱]، محمدرضا محمدآبادی[۲]، علی اسمعیلی‌زاده کشکوئیه[۳] و حسین مرادی شهربابک[۴]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- استاد، دانشگاه شهید باهنر کرمان، (نویسنده مسوول: mrm@uk.ac.ir)
۴- استادیار، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۱

چکیده

ژن GDF9 از مهم‌ترین ژن‌های موثر بر چندقلوزایی گوسفندان می‌باشد. لذا، هدف از انجام این تحقیق شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی موجود در اگزون دوم ژن GDF9 در گوسفندان خالص و آمیخته پاکستانی به روش PCR-SSCP بود. به این منظور، نمونه های خون از ۳۰ رأس گوسفند پاکستانی، ۱۷ رأس گوسفند آمیخته پاکستانی و لری بختیاری و ۷ رأس گوسفند آمیخته پاکستانی و کرمانی تهیه و استخراج DNA به روش نمکی بهینه انجام شد. با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی یک قطعه ٦٣٤ جفت بازی با کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. پس از تعیین چند شکلی فضایی تک رشته‌ای محصولات PCR، الگوهای باندی مربوط به ژن GDF9 روی ژل پلی اکریل‌آمید ۸ درصد رنگ آمیزی شده با نیترات نقره مشاهده شد. در مجموع در سه جمعیت مورد مطالعه، چهار الگوی باندی ۱، ۲، ۳ و ٤ با فراوانی‌های ۰/۰۹۳، ۰/۱۲۹، ۰/۳۷۱ و ۰/٤۰۷ بدست آمد. نتایج توالی‌یابی منجر به شناسایی سه جهش در موقعیت‌های نوکلئوتید ٤٤۳، ٤۷۷ و ۷۲۱ ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه گردید.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، چندقلوزایی، ژن GDF9، PCR-SSCP، SNP

مقدمه

مصرف گوشت گوسفند به‌عنوان یک منبع رایج پروتئین در کشور ما به شمار می‌آید، ولی به‌علت اینکه مقدار گوشت تولید شده متناسب با نیاز جمعیت رو به افزایش نمی‌باشد، لذا افزایش بازدهی در تولید گوشت گوسفند از اهمیت خاصی برخوردار است. صفت چند قلوزایی در گوسفندان از جمله صفات اقتصادی مهم است که به میزان زیادی بازده تولید گوشت در گله‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگرچه صفت تولیدمثل از جمله صفات کمی و از نظر توارث پلی‌ژنیک می‌باشد، اما نشان داده شد که کنترل صفات کمی توسط ژن‌های با اثرات عمده نیز صورت می‌گیرد، از این رو کشف ژن‌های با اثرات عمده بر نرخ تخمک‌ریزی و در نتیجه تعداد بره در هر زایش، توجه بسیاری از متخصصین اصلاح نژاد دام را به خود جلب کرده است. از طرفی استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (۲۰). همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع می‌کند (۱،۱۰). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است (۱). بالغ بر ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند (۲۳،۱۴). در حال حاضر تولید گوشت مهم‌ترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است (۱۲) و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (۱۹). به طور کلی در بیشترکشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است. این بهبود می‌تواند از طریق انتخاب گوسفندان برتر به عنوان والدین نسل آینده بر اساس شایستگی ژنتیکی آنها برای صفات مورد نظر صورت گیرد (۱۳،۱۶). همگام با افزایش پیشرفت‌های ژنتیکی، حفظ تنوع ژنتیکی یک جمعیت برای اطمینان از پاسخ به انتخاب بلند مدت، یک وظیفه مهم برنامه‌های اصلاح نژادی است (۱۳). برنامه‌های اصلاح نژادی بیشتر در جهت بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی عمل می‌کنند که توفیق این برنامه‌ها به مقدار تنوع ژنتیکی موجود در گله‌ها بستگی دارد (۱۳). ژن GDF9از جمله ژن‌های موثر بر صفت چندقلوزایی می‌باشد (۹). طول این ژن در گوسفند ۲/۵ کیلو باز است که دارای دو اگزون و یک اینترون می‌باشد، اگزون یک شامل ۳۹۷ جفت باز است که اسیدهای آمینه ۱ تا ۱۳۴ را کد می‌کند. اگزون دو شامل ۹۶۸ جفت باز است که اسیدهای آمینه ۱۳۵ تا ۴۵۶ را کد می‌کند و اینترون آن شامل ۱۱۲۶ جفت باز می‌باشد. پروتئین اولیه آن دارای ۴۵۳ اسیدآمینه است، در صورتی که پروتئین بالغ آن شامل ۱۳۵ اسیدآمینه می‌باشد (۹). هانراهان و همکاران (۹) وجود هشت جهش را در ژن GDF9 گوسفندان نژاد کمبریج و بلکلار گزارش کردند (۹). طی انجام تحقیقی برای بررسی وجود جهش در mRNA ژن GDF9 در میش‌های نژاد افشاری، از تخمدان‌های میش‌های کشتار شده برای بررسی وجود فولیکول‌ها و استخراج RNA استفاده کردند. طی این بررسی از هر سه نوع تخمدان کوچک، بزرگ و متوسط و از روش RT-PCR برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده شد، سپس محصولات مورد نظر توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی آن‌ها وجود سه جهش G2، G3 و G4 را در میش‌های نژاد افشاری نشان داد (۷). فاکتور متمایزکننده رشد (GDF9) و پروتئین مورفوژنتیک استخوانی (BMP15) در گوسفند، دو عضو ازخانواده بزرگ فاکتور مبدل رشد (TGFβ) هستند (۸). وجود همزمان آلل‌های جهش‌یافته از BMP15 و GDF9 منجر به افزایش چندقلوزایی در مقایسه با وجود این

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]

جهش‌ها به صورت جداگانه گزارش شده است (۶ ،۹). این گزارش تاییدکننده این فرضیه است که مکانیسم فعالیت دو فاکتور BMP15 و GDF9 از یکدیگر مستقل است (۲۲). این فاکتورهای رشد اووسیت برای پیشرفت مراحل اولیه فولیکوژنز و همچنین مراحل انتهایی نمو فولیکول حیاتی هستند و نقش مهمی در تمایز انواع متفاوت سلول‌های گرانولوزا و تنظیم عملکرد کلیدی سلول‌های گرانولوزا ایفا می‌کنند و روی الگوهای بیان ژن در سلول‌های سوماتیک فولیکول اثر می‌گذارند. وجود هورمون GDF9 در موش (۲۳) و وجود همزمان دوهورمون BMP15 و GDF9 در گوسفند (۹) .به‌عنوان فاکتورهای ضروری جهت تکمیل فولیکولوژنز گزارش شده‌اند و درصورت غیرفعال شدن این فاکتور، حداکثر رشد فولیکول‌ها تا مرحله تیپ دو است (۹). چندقلوزایی در زایش اول کمتر از زایش‌های دوم و سوم گزارش شده است (۳ و ۲۱). در گوسفندان نژاد بورولا با افزایش تعداد دفعات زایش تا سن چهار سالگی تعداد گوسفندان چندقلوزا افزایش یافت (۲۱). افزایش چندقلوزایی در این گوسفندان ممکن است ناشی از افزایش ظرفیت تولیدمثلی شامل افزایش گنجایش غدد و مجاری تناسلی باشد (۲۱). با این وجود، با افزایش چندقلوزایی، میزان بقای بره‌ها کاهش می‌یابد (۳). با توجه به اینکه آب و هوای کشور ما تقریباً گرم و نیمه خشک است اسپرم‌های مورد استفاده در این طرح از یک نژاد پاکستانی که متعلق به مناطق گرمسیر بوده انتخاب شده است. این نژاد پاکستانی دارای دوقلوزایی و توانایی تولید مثل خارج از فصل بالا بوده و از طرفی جثه بزرگ و بدون دنبه و افزایش وزن روزانه بالایی دارد. با در نظر گرفتن تأثیر افزایش تعداد بره متولد شده بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال، برای کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که برنامه‌های اصلاح نژادی روی ژن‌های با اثر عمده بر چندقلوزایی در نژادهای کشور لازم باشد. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر شناسایی چندشکلی‌های موجود در اگزون ۲ ژن GDF9 در گوسفندان خالص و آمیخته پاکستانی به روش PCR-SSCP و توالی‌یابی محصولات PCR بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، تعداد ۳۰ رأس گوسفند پاکستانی (۲۵ ماده و ۵ نر) که در مزرعه‌ای در حوالی شهرستان بم پرورش داده می‌شدند، تعداد ۱۷ رأس گوسفند (۱۲ ماده و ۵ نر) آمیخته پاکستانی و لری بختیاری، که در مزرعه دانشکده مهندسی علوم دامی و زراعی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران پرورش داده می‌شدند و ۷ رأس گوسفند نر آمیخته پاکستانی و کرمانی که در مزرعه‌ای در حوالی شهر کرمان پرورش داده می‌شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. خونگیری با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی ۵۰ میلی‌مول ماده ضد انعقاد EDTA صورت گرفت و نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک و اصلاح‌نژاد حیوانات اهلی بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر منتقل گردیدند و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA و بررسی کیفیت و کمیت آن

استخراج DNA از ۵۰۰ میکرولیتر خون با استفاده از روش نمکی بهینه یافته انجام گرفت (۱۷). جهت ارزیابی DNA استخراج شده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد و روش اسپکتوفتومتری با دستگاه نانودراپ (Varian Carry 50) استفاده شد.

تکثیر ژن GDF9 با استفاده از PCR

با توجه به ژن انتخاب شده، ابتدا توالی ژن و mRNA آن از ژنوم گوسفندان مختلف در بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری ایالات متحده[1] (NCBI) با شماره دستیابی AF078545 استحصال شد. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه‌ای بطول ۶۳۴ جفت باز برای تکثیر نیمه اول (منتهی به ’5 رشته پیشرو) جایگاه اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند با استفاده از سایت[2] primer3plus طراحی شدند و برای اطمینان از صحت آغازگرهای طراحی شده از سایت oligo Analyzer[3] استفاده شد. توالی آغازگرها عبارت بودند از:

F: 5’-GAT TCC TTG ATT TGA CTTCCTGTT-3’
R: 5’- TGG CAC TCT CCT GG TCT CTG-3’

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA (غلظت ۵۰ng/µl)، ۱۶/۷ میکرولیتر آب، ۳/. میکرولیتر آنزیم Tag پلی‌مراز (غلظت ۵Unit/µl)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (غلظت ۱۰pM)، ۵/. میکرولیتر از dNTP (غلظت ۱۰mM)، ۲/۵ میکرولیتر از (۱۰X) PCR buffer و ۱ میکرولیتر از Mgcl2 (غلظت ۱/۵mM) انجام شد واکنش PCR با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه حرارتی عبارت بود از: ۱) ۵ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت سازی اولیه DNA، ۲) انجام ۳۳ چرخه تکرار برای: الف- ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور تک رشته‌ای شدن DNA، ب- ۵۰ ثانیه دمای ۶۲/۵ درجه سانتی‌گراد به منظور اتصال آغازگر به DNAی تک رشته‌ای، پ- ۵۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور بسط آغازگر، ۳) پایان چرخه‌ها، ۴) ۸ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک چرخه تکرار برای بسط نهایی. جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد استفاده شد.

بارگذاری و الکتروفورز محصولات SSCP

قبل از آماده‌سازی ژل اکریل‌آمید برای تک‌رشته‌ای شدن محصولات PCR میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شدند و بعد از اتمام زمان میکروتیوب‌ها بلافاصله به فریزر در دمای ۲۰- درجه برای ۵ دقیقه انتقال داده شدند. برای تهیه ژل اکریل‌آمید ۸ درصد از محلول پایه اکریل‌آمید ۳۸/۵ درصد (نسبت ۳۷/۵ گرم پودر اکریل‌آمید به ۱ گرم پودر بیس اکریل‌آمید) استفاده شد. جهت انجام SSCP، به ۶ میکرولیتر از هر نمونه مقدار ۱۲ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه شد و به

1- National center for biotechnology information
2- http://primer3plus.com
3- http://eu.idtdna.com/calc/analyzer

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]
[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]

وسیله مینی سانتریفیوژ با هم مخلوط شدند و بعد از گذشت ۵ دقیقه مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید ۸ درصد بارگذاری و با ولتاژ ۱۷۰–۱۸۰ ولت به مدت ۸–۷ ساعت، الکتروفورز شدند. جهت الکتروفورز محصولات SSCP از سیستم الکتروفورز عمودی دارای سیستم خنک‌کننده با آب استفاده شد که با اتصال آن به این سیستم، جهت به جریان انداختن آب با دمای ۴ تا ۵ درجه سانتی‌گراد، دمای بافر TBE (1X) و ژل در دمای ۵–۴ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. برای مشاهده الگوهای SSCP از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

توالی‌یابی محصولات PCR

در این مطالعه بر اساس الگوهای باندی متفاوت، از هر الگو یک نمونه از محصولات PCR انتخاب و برای توالییابی به شرکت فضاپژوه (ایران) ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی و شناسایی و اعمال جهش‌ها در توالی هر هاپلوتایپ با استفاده از کدهای نوکلئوتیدی پیشنهادی IUPAC[1]، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN[2] جهت تعیین جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی به همراه توالی‌های گزارش شده در NCBI هم‌تراز شده و مقایسه شدند و از نرم‌افزار Bioedit7.0[3] برای رسم گراف‌های حاصل از توالی یابی استفاده شد.

نتایج و بحث

به منظور تایید تکثیر قطعه‌های مورد نظر، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از یک نشانگر وزنی M100 مورد ارزیابی قرار گرفتند و نشان داده شد که قطعه ۶۳۴ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی و بدون هیچ باند غیر اختصاصی تکثیر یافته است (شکل ۱).

پس از انجام SSCP، چهار الگوی باندی متفاوت برای این جایگاه (شکل ۲) در جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد که هر یک از الگوی‌های مشاهده شده بیانگر یک ژنوتیپ می‌باشند. الگوهای باندی شماره ۱ و ۳ مشاهده شده در این مطالعه با الگوهای باندی مشاهده شده به روش SSCP در نژاد چینی هان دم کوتاه (۵) مطابقت دارد. آنها نیز دو جهش G3 و G4 در موقعیت ۴۷۱ و ۷۲۱ را شناسایی کردند که با جهش‌های شناسایی شده پژوهش حاضر مطابقت دارد.

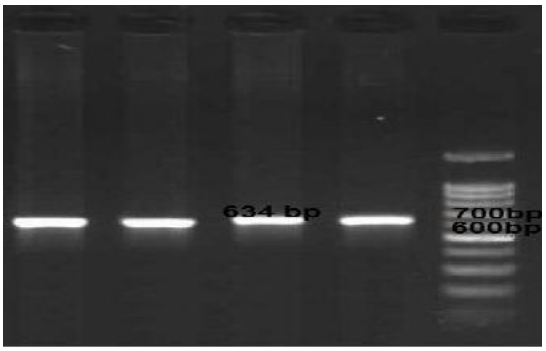
همچنین الگوهای باندی شماره ۲ و ۳ و ۴ به دست آمده از تحقیق حاضر دو نژاد گوسفند بهمئی و لک قشقایی به روش SSCP برای اگزون ۲ ژن GDF9 مطابقت داشت (۲۱). به علاوه، الگوهای باندی شماره یک و دو و سه این مطالعه با سه الگوی AA، BB و AB مشاهده شده برای اگزون ۲ ژن GDF9 در گوسفند نژاد قره‌گل مطابقت داشت (۲). محققین در مطالعه‌ای روی ژن GDF9 گوسفند قره‌گل با روش PCR-SSCP چهار الگوی باندی مختلف را در یک قطعه ۱۵۰۳ جفت بازی تکثیر شده، مشاهده کردند که با الگوهای باندی سه و چهار این تحقیق مطابقت داشت، هر چند که آنها توالی‌یابی محصول PCR را انجام نداده بودند، اما قطعه تکثیر شده آنها جهش‌های مشاهده شده مطالعه حاضر را پوشش می‌دهد (۳).

SNPهای شناسایی شده نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی و بررسی آنها، سه جهش برای اگزون ۲ ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد که در جدول ۱ ذکر شده‌اند. جدول (۱) SNPهای شناسایی شده در این مطالعه و مقایسه آن با SNPهای گزارش شده توسط هانراهان و همکاران (۹). هاپلوتایپ‌های شناسایی شده اگزون ۲ ژن GDF9 و ژنوتیپ‌های آن‌ها به ترتیب در جدول ۲ و ۳ آمده است. هاپلوتایپ شماره یک در جدول ۲ همان نوکلئوتید مرجع می‌باشد.

کروماتوگرام و هم‌ردیف کردن نتایج حاصل از توالی یابی برای SNPهای شناسایی شده نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

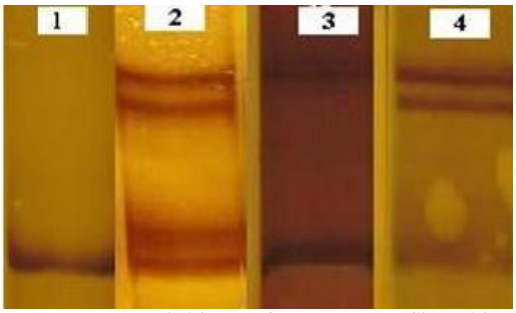
برای ارزیابی وجود جهش‌های موجود در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9، نتایج حاصل از توالی‌یابی این قطعه از ژن GDF9 با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 7.0 و DNA MAN مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت که منجر به شناسایی سه SNP در موقعیت‌های ۴۴۳، ۴۷۷ و ۷۲۱ (شکل ۳ و ۴) و چهار ژنوتیپ متفاوت شد.



شکل ۱– نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR
Figure 1. Gel electrophoresis of some PCR products

1- International Union of Pure and Applied chemistry (http://www.iupac.org)
2- http://www.lynnon.com/dnaman.html
3- Bioedit.software.informer.com/7.0

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]
[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]



شکل ۲- الگوهای SSCP جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9
Figure 2. SSCP patterns for exon 2 of GDF9 gene

جدول ۱- جهش‌های شناسایی شده برای اگزون ۲ ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه
Table 1. Detected mutations for exon 2 of GDF9 gene in studied populations

موقعیت نوکلئوتید در توالی ژن GDF9	۷۲۱	۴۷۷	۴۴۳
جهش‌های شناسایی شده در این مطالعه	G/A	G/A	C/A
نوکلئوتید گزارش شده توسط هانراهان و همکاران	G/A	G/A	C/C

جدول ۲- هاپلوتایپ‌های شناسایی شده در جایگاه اگزون ۲ ژن GDF9
Table 2. Detected haplotypes for exon 2 of GDF9 gene

شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI			
۷۲۱	۴۷۷	۴۴۳	شماره هاپلوتایپ
G	G	C	۱
G	A	C	۲
G	A	A	۳
G	G	A	۴
A	G	C	۵

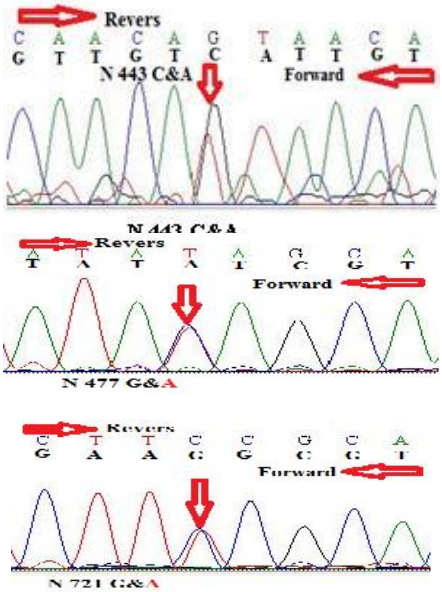
جدول ۳- ژنوتیپ‌های شناسایی شده نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در این مطالعه
Table 3. Detected genotypes for the first half of exon 2 of GDF9 gene in this study

شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI			
۷۲۱	۴۷۷	۴۴۳	شماره ژنوتیپ
GG	GG	CC	۱
GG	GA	CA	۲
GG	AA	CC	۳
GA	GA	CC	۴

پس از مشخص شدن ژنوتیپ‌های جایگاه ناحیه اول اگزون ۲ ژن GDF9، با توجه به در دسترس بودن تعداد کل افراد جمعیت، فراوانی ژنوتیپ‌ها در جمعیت به روش شمارش مستقیم محاسبه شد (جدول ۴). همان‌طور که مشاهده می‌شود ژنوتیپ ۱ در جمعیت آمیخته کرمانی و پاکستانی مشاهده نمی‌شود در حالی که در بقیه جمعیت‌ها دیده می‌شود. این امر می‌تواند به دلیل کوچکی نمونه باشد یا این که به دلیل انجام آمیخته گری با نژاد کرمانی باشد، چرا که در پاکستانی و آمیخته لری بختیاری و پاکستانی مشاهده می‌شود. از طرفی بیشترین ژنوتیپ مشاهده شده، در مجموع سه جمعیت مورد مطالعه مربوط به ژنوتیپ چهار با فراوانی ۰/۴۰۷ بود که برای SNPهای موقعیت ۴۷۷ و ۷۲۱ به صورت هتروزایگوت می‌باشد. برای شناسایی هتروزایگوت‌های موجود در توالی‌ها و جهت تعیین صحت وجود جهش‌های تک نوکلئوتیدی، گراف‌های حاصل از نتایج توالی‌یابی همه نمونه‌های این جایگاه به دقت مورد بررسی قرار گرفت.

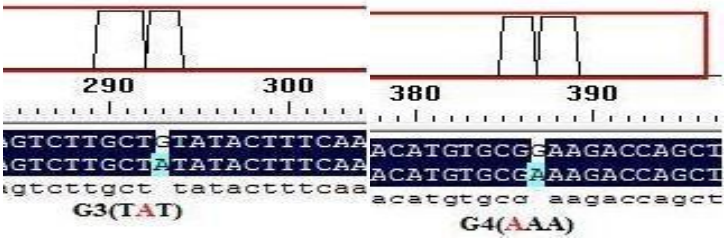
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از نتایج توالی‌یابی برای SNPهای هتروزایگوت شناسایی شده جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

Figure 3. Achieved chromatogram from sequencing for detected heterozygous SNPs in the first half of exon 2 of GDF9 gene



شکل ۴- عکس‌های خروجی از نرم‌افزار DNAMAN برای هم‌ردیف کردن نتایج حاصل از توالی‌یابی و SNPهای هموزایگوت شناسایی شده در نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9

Figure 4. Output of DNAMAN software for alignment of sequencing results and detected homozygous SNPs in the first half of exon 2 of GDF9 gene

پس از تطبیق توالی نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در سایت NCBI برای بدست آوردن ORF[1] آن برای شروع صحیح ترجمه این توالی به پروتئین، فرم ۱+ برای این جایگاه بدست آمد. برای این توالی از سه SNP مشاهده شده در جایگاه نیمه اول، دو SNP با تغییر اسید آمینه همراه بودند. SNP موقعیت نوکلئوتید ۷۲۱ منجر به تغییر اسیدآمینه گلوتامین (Glu) به لیزین (Lys)، SNP موقعیت نوکلئوتید ۴۴۳ منجر به تغییر اسیدآمینه ترهاونین (Thr) به آسپارژین (Asn) می‌شود و SNP موقعیت ۴۷۷ برای اسیدآمینه لوسین (Leu) بدون تغییر اسیدآمینه همراه بود. پس از پیش‌بینی و مشخص نمودن توالی هاپلوتایپ‌های تشکیل‌دهنده هر ژنوتیپ از طریق بررسی و ارتباط ژنوتیپ‌های (توالی‌های) هتروزایگوت و هموزایگوت و شکل الگوهای باندی تشکیل شده، با توجه به در دسترس بودن تعداد هاپلوتایپ‌های موجود در هر جمعیت و تعداد کل افراد هر جمعیت، فراوانی‌های هاپلوتایپی در جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه شد (جدول ۵). هاپلوتیپ شماره ۱، همانند ژنوتیپ شماره ۱ در جمعیت آمیخته کرمانی و پاکستانی مشاهده نمی‌شود در حالی که در بقیه جمعیت‌ها دیده می‌شود. این امر می‌تواند به دلیل کوچکی نمونه یا این که به دلیل انجام آمیخته گری با نژاد کرمانی باشد، چرا که در پاکستانی و آمیخته لری بختیاری و پاکستانی مشاهده می‌شود. از طرف دیگر هاپلوتیپ شماره ۳ فقط در جمعیت پاکستانی وجود دارد و در هیچ یک از آمیخته‌ها دیده نمی‌شود که اگر به دلیل کوچک بودن نمونه‌ها نباشد می‌تواند بیان کننده این باشد که این هاپلوتیپ مختص نژاد پاکستانی است. فراوانی آللی و ژنوتیپی برای هر SNP در جدول‌های ۶، ۷ و ۸ آمده است.

تعادل هاردی-واینبرگ

تمام SNPها بجز SNP موقعیت ۴۷۷ در جمعیت آمیخته کرمانی و پاکستانی در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشتند. با در نظر گرفتن تأثیر افزایش تعداد بره متولد شده و میزان بره زایی بر میزان گوشت تولیدی به ازای هر رأس میش در هر سال، کاهش تعداد میش‌های مولد روی مراتع و جلوگیری از تخریب مراتع به نظر می‌رسد که مطالعه برای پیداکردن جهش

1- Open Reading Frame

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]

در سایر ژن‌های با اثر عمده بر چندقلوزایی در گوسفند لازم باشد. از طرفی می‌توان با کشف و وارد کردن این ژن‌ها و برنامه‌ریزی برای تکثیر و تثبیت جهش‌های اتفاق افتاده مرتبط با ژن‌های باروری کمک قابل توجهی به افزایش تولید و درآمد دامداران کشور انجام داد. تحقیق حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن GDF9 را در گوسفند به خوبی نشان داد. می‌توان از وجود این چندشکلی‌ها در جهت بررسی ارتباط بین چندشکلی ژنی با صفات تولیدمثلی و رشد به عنوان مارکرهای ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح‌نژادی کشور و بهبود وضعیت تولیدمثلی گله‌های موجود در کشور استفاده کرد.

جدول ۴- تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌های جایگاه نیمه اول اگزون ۲ ژن GDF9 در جمعیت مورد مطالعه

Table 4. Numbers and frequency of genotypes in the first half of exon 2 of GDF9 gene in studied populations

	ژنوتیپ	۱	۲	۳	۴	کل
آمیخته کرمانی و پاکستانی	تعداد فراوانی	–	۲	۱	۴	۷
		–	۰/۲۸۵	۰/۱۴۳	۰/۵۷۲	۱
آمیخته لری‌بختیاری و پاکستانی	تعداد فراوانی	۱	۱	۹	۶	۱۷
		۰/۰۵۸	۰/۰۵۸	۰/۵۳۱	۰/۳۵۳	۱
پاکستانی	تعداد فراوانی	۴	۴	۱۰	۱۲	۳۰
		۰/۱۳۳	۰/۱۳۳	۰/۳۳۴	۰/۴۰۰	۱
مجموع سه جمعیت	تعداد فراوانی	۵	۷	۲۰	۲۲	۵۴
		۰/۰۹۳	۰/۱۲۹	۰/۳۷۱	۰/۴۰۷	۱

جدول ۵- تعداد و فراوانی هاپلوتایپ‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه

Table 5. Numbers and frequency of haplotypes in studied populations

	شماره هاپلوتایپ	۱	۲	۳	۴	۵	کل
آمیخته کرمانی و پاکستانی	تعداد فراوانی	–	۸	–	۲	۴	۱۴
		–	۰/۵۷۲	–	۰/۱۴۳	۰/۲۸۵	۱
آمیخته لری‌بختیاری و پاکستانی	تعداد فراوانی	۲	۲۵	–	۱	۶	۳۴
		۰/۰۵۹	۰/۷۳۵	–	۰/۰۲۹	۰/۱۷۷	۱
پاکستانی	تعداد فراوانی	۸	۳۳	۳	۴	۱۲	۶۰
		۰/۱۳۳	۰/۵۵۱	۰/۰۵۰	۰/۰۶۶	۰/۲۰۰	۱
مجموع سه جمعیت	تعداد فراوانی	۱۰	۶۶	۳	۷	۲۲	۱۰۸
		۰/۲۳۸	۰/۴۹۲	۰/۰۰۸	۰/۰۱۰	۰/۱۴۷	۱

جدول ۶- فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های SNP موقعیت ۴۴۳ جایگاه ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه

Table 6. Allele and genotype frequencies of SNP in position 443 for GDF9 gene in studied population

	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی		
	C*	A	CC	CA	AA
آمیخته کرمانی و پاکستانی	۰/۸۵۷	۰/۱۴۳	۰/۷۱۴	۰/۲۸۶	۰/۰
آمیخته لری‌بختیاری و پاکستانی	۰/۹۷۱	۰/۰۲۹	۰/۹۴۱	۰/۰۵۹	۰/۰
پاکستانی	۰/۹۳۳	۰/۰۶۷	۰/۸۶۶	۰/۱۳۴	۰/۰
مجموع سه جمعیت	۰/۹۲۰	۰/۰۸۰	۰/۸۴۰	۰/۱۶۰	۰/۰

آلل C که با رنگ تیره و قلم درشت برجسته شده است، آلل وحشی (آلل مربوط به هاپلوتایپ ۱) است.

جدول ۷- فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های SNP موقعیت ۴۷۷ جایگاه ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه

Table 7. Allele and genotype frequencies of SNP in position 447 for GDF9 gene in studied populations

	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی		
	G*	A	GG	GA	AA
آمیخته کرمانی و پاکستانی	۰/۴۲۹	۰/۵۷۱	۰/۰	۰/۸۵۸	۰/۱۴۲
آمیخته لری‌بختیاری و پاکستانی	۰/۲۶۵	۰/۷۳۵	۰/۰۵۸	۰/۴۱۳	۰/۵۲۹
پاکستانی	۰/۴۶۷	۰/۵۳۳	۰/۲۶۶	۰/۴۰۱	۰/۳۳۳
مجموع سه جمعیت	۰/۳۸۷	۰/۶۱۳	۰/۱۰۸	۰/۵۵۸	۰/۳۳۴

آلل G که با رنگ تیره و قلم درشت برجسته شده است، آلل وحشی (آلل مربوط به هاپلوتایپ ۱) است.

جدول ۸- فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های SNP موقعیت ۷۲۱ جایگاه ژن GDF9 در جمعیت‌های مورد مطالعه

Table 8. Allele and genotype frequencies of SNP in position 721 for GDF9 gene in studied populations

	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی		
	G*	A	GG	GA	AA
آمیخته کرمانی و پاکستانی	۰/۷۸۶	۰/۲۱۴	۰/۵۷۲	۰/۴۲۸	۰/۰
آمیخته لری‌بختیاری و پاکستانی	۰/۸۲۴	۰/۱۷۶	۰/۶۴۷	۰/۳۵۳	۰/۰
پاکستانی	۰/۴۰۰	۰/۶۰۰	۰/۱۳۳	۰/۵۳۴	۰/۳۳۳
مجموع هفت جمعیت	۰/۶۷	۰/۳۳	۰/۴۵۰	۰/۴۳۹	۰/۱۱۱

آلل G که با رنگ تیره و قلم درشت برجسته شده است، آلل وحشی (آلل مربوط به هاپلوتایپ ۱) است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]

منابع

1. Amiri, F., S.R. Miraei-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): 148-155.
2. Badbarin, N., S.Z.A. Mirhoseini, A. Bahmani and R. Seid Sharifi. 2013. Polymorphism study of the Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene and it's correlation with weight quality in Ghareh Ghol sheep. Animal and Birds congress. North Iran, 1073-1076 (In Persian).
3. Bahmani, A., S.Z.A. Mirhoseini, B. Dlir Safat and Z. Ansari. 2010. Polymorphism study of the Growth Differentiatio-n Factor 9 (GDF9) gene in Ghareh Ghol sheep using PCR-SSCP. In: Proceedings of 4th Animal science congress. Iran, 3590-3593 (In Persian).
4. Barzegari, A., S. Atashpaz, K. Ghabili, Z. Nemati, M. Rustaei and R. Azarbaijani. 2010. Polymorphism in GDF9 and BMP15 genes and association with fertility and ovulation rate in Moghani and Ghezel sheep in Iran. Reproduction in Domestic Animals, 45: 666-669.
5. Chu, M.X., J. Yang, T. Feng, G.L. Cao, L. Feng, R. Di, W.D. Huang, Q. Tang, H.Y. Ma, K. Li and N. Li .2011. GDF9 as a candidate gene for prolificacy of small tail Han sheep. Biology of Reproduction, 38: 5199–5204.
6. Davis, G.H., G.D. Bruce and K.G. Dodds. 2001. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecXI) and Hanna (FecXH) sheep. Procduction of Advance Animal Genetics, 14: 175-178.
7. Eghbalsaied, S.h., K. Ghaedi, S. Shahmoradi, A. Pirestani, T. saeidi, H. Amini, L. Nicol and A. McNielly. 2012. Presence of SNPs in GDF9 mRNA of Iranian Afshari sheep. International Journal of fertilization Sterility, 5: 225-230.
8. Galloway, S.M., B.M. Lumsden, J.P. Hanraha, M. Mullen, X.Z. Mao and G.L. Wang. 2006. Investigation of the Booroola (FecB) and Inverdale (FecXI) mutations in 21 prolific breeds and strains of sheep sampled in 13 countries. Animal Reproduction Science, 92: 87-96.
9. Hanrahan, J.P., S.M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G.H. Davis, R. Powell and S.M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovis aries). Biology of Reproduction, 70: 900-909.
10. Javanmard, A., M.R. Mohammadabadi, G.E. Zarrigabayi, A.A. Gharahedaghi, M.R. Nassiry, A. Javadmansh and 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: 495-497.
11. Juengel, J.L., N.L. Hudson, D.A. Heath, P. Smith, K.L. Reader and S.B. Lawrence. 2002. Growth differentiation factor 9 and bone morpHogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. Biology of Reproduction, 67: 1777-1789.
12. Khanahmadi, A., Sh. Gharehveysi, R. Khataminejad and J. Arab. 2014. Polymorphic variants of G1 and B4 from GDF9 and BMP15 genes of Dalagh sheep. Research on Animal Production, 5(10): 148- 155.
13. Khodabakhshzadeh, R., M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailizadeh Koshkoieh, H. Moradi-Shahrebabak and S. Ansari Namin. 2015a. Study of mutations available in first-halfexon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep born from crossing of Romanov rams with Kermani ewes. Iranian Journal of Animal Science Research, 6(4): 395-403 (In Persian).
14. Khodabakhshzadeh, R., M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailizadeh, H. Moradi-Shahrebabak, F. Bordbar and S. Ansari Namin. 2016b. Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. Polish Journal of Veterinary Sciences, 19(2): 281-289.
15. Khodabakhshzadeh, R., M.R. Mohammadabadi, H. Moradi, A.K. Esmailizadeh and N.S. Ansari. 2015b. Identify of G⟶A point mutation at positions 477 and 721 in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. Modern Genetics, 10 (2): 261-268 (In Persian).
16. Khodabakhshzadeh, R., M.R. Mohammadabadi, H. Moradi-Shahrebabak and A.K. Esmailizadeh. 2016a. Identification of available mutations in the first-half (from 5' end) of exon 2 of GDF9 gene in crossbred sheep from crossing of Romanov and Lori-Bakhtiari breeds. Animal Production Research, 4(4): 15-26 (In Persian).
17. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 12-15.
18. Mishra, A.K., A.L. Arora, S. Kumar and L.L. Prince. 2009. Studies on effect of Booroola (FecB) genotype on lifetime ewes' productivity efficiency, litter size and number of weaned lambs in Garole×Malpura sheep. Animal Reprodution Science, 113: 293-298.
19. Mohammadabadi, M.R. and R. Sattayimokhtari. 2013. Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in kermani sheep. Slovak Journal of Animal Science, 46: 45-51.
20. Mousavizadeh, A., M.R. Mohammadabadi, A. Torabi, M.R. Nassiry, A. Ghiasi and A.K. Esmailizadeh. 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: 51-53.
21. Rahimi, A. and M. Mohaghegh Dolatabadi. 2013. Identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 2 of the Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene in Bahmani and Ghashghai sheep. Animal and Birds congress. North Iran, 1454-1458 (In Persian).
22. Shimasaki. S., R.K. Moore, G.F. Erickson and F. Otsuka. 2000. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. Reproduction, 61: 323-337.
23. Yan, Cm., P. Wang, J. DeMayo, F.J. Demay and J.A. Elvin. 2001. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. Molecular Endocrinology, 15: 854-866.
24. Zamani, P., M. Akhondi and M.R. Mohammadabadi. 2015. Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Ruminant Research, 132: 123-127.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]

Detection of Polymorphism in Exon 2 of GDF9 gene in Pure and Crossbred of Pakistani Sheep

Rasol Khodabakhshzadeh[1], Mohammad Reza Mohammadabadi[2], Ali Esmailizadeh Kashkoyeh[3] and Hosein Moradi Shahrbabak[4]

1 and 3- M.Sc. Student and Professor, Shahid Bahonar University of Kerman
2- Professor, Shahid Bahonar University of Kerman, (Corresponding author: mrm@uk.ac.ir)
4- Assistant Professor, University of Tehran
Received: January 22, 2015 Accepted: July 12, 2015

Abstract

GDF9 gene is one of the most important effective factors on litter size in sheep. Thus, the aim of the present study was to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) available in exon 2 of GDF9 gene in pure and crossbred of Pakistani sheep using PCR-SSCP. Hence, blood samples were collected from 30 Pakistani sheep, 17 crossbred sheep (Pakistani rams × Lori-Bakhtiari) and 7 crossbred sheep (Pakistani rams × Kermani ewes) and genomic DNA was extracted using salting-out method. A 634 bp fragment was amplified using one specific primer pairs using polymerase chain reaction. After single stranded conformation polymorphism (SSCP) of PCR products, band patterns of GDF9 gene were observed on 8% polyacrylamide gel stained with silver-nitrate method. In total, 4 banding patterns 1, 2, 3 and 4 were obtained with frequencies of 0.193, 0.129, 0.371 & 0.407, respectively. The sequencing results were led to identification of 3 mutations in 443, 477 and 721 nucleotide situations of GDF9 gene in the studied populations.

Keywords: GDF9 gene, Litter Size, PCR-SSCP, Polymorphism, SNP

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/rap.8.16.158]