دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

# شناسایی چند شکلی‌های ژن HSP70A1A در گوسفندان نژاد مهربان و رومانف با تکنیک PCR-SSCP

احمد احمدی[۱]، محیا محمدی‌زاده[۲]، پویا زمانی[۳]، عباس فرح‌آور[۴] و رضا طالبی[۵و۶]

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، (نویسنده مسوول: ahmadi@basu.ac.ir)
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح‌نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۳ و ۴- دانشیار و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۵- دانش‌آموخته دکتری اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۶- محقق بخش زیست شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کشور، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۱
صفحه: ۱۶۹ تا ۱۷۹

**چکیده**

**در اقلیم‌های مختلف، نقش مقاومت سلولی به استرس‌های ناشی از تغییر دما از طریق خانواده‌ای از پروتئین‌ها که اصطلاحاً، پروتئین‌های شوک گرمایی (HSP) نامیده می‌شوند، کنترل می شود. در پژوهش حاضر، شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در مناطقی از ژن HSP70A1A در گوسفند بومی نژاد مهربان و گوسفند وارداتی نژاد رومانف به جهت ویژگی این نژادها به سازگاری در اقلیم‌های سردسیری، بررسی شدند. در مجموع، تعداد ۱۴۱ حیوان شامل گوسفند نژاد مهربان (۱۰۰ رأس) و گوسفند نژاد رومانف (۴۱ رأس)، به طور تصادفی انتخاب و مراحل خونگیری و استخراج DNA طبق دستورالعمل‌های متداول انجام شد. سپس، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر اگزون ژن HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr20, NC_019477.2) به اندازه ۲۴۷ و ۲۹۸ جفت باز انجام شد. همچنین، جهت تعیین چند شکلی نمونه‌ها از تکنیک PCR-SSCP و متعاقب آن، توالی یابی مبتنی بر سانگر استفاده شد. بر اساس نتایج SSCP، به طور مشابه در هر دو نژاد مهربان و رومانف تعداد ۵ الگوی باندی مشاهده شد که قطعات تکثیر شده ۲۴۷ و ۲۹۸ جفت بازی به ترتیب دو و سه الگوی الکتروفوزی را دارا بودند. علاوه بر این، هیچ تفاوتی در فراوانی الگوهای مشاهده شده بین این دو نژاد گوسفند یافت نشد. همچنین، در این نژادها نتایج توالی یابی وجود تعداد ۵ چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) شامل g.26562252C>A، g.26562261G>C، g.26562270T>C، g.26562273C>T و g.26562279C>T در قطعه ۲۴۷ جفت بازی و تعداد سه چند شکلی تک نوکلئوتیدی شامل g.26561745T>C، g.26561784C>T و g.26561877G>A در قطعه ۲۹۸ جفت بازی شناسایی نمود. در مجموع، نتایج نشان داد که، همه چند شکلی‌ها به غیر از g.26561745T>C و g.26561877G>A به طور معنی‌داری خارج از تعادل هاردی واینبرگ هستند (p<۰/۰۵). به عنوان نتیجه‌گیری نهایی، با توجه به نقش پروتئین‌های شوک دمایی در مقاومت به استرس‌های محیطی، شناسایی این چند شکلی‌ها می‌تواند تاثیر بسزایی در درک مکانیسم سازگاری به تحمل دمایی در نژادهای گوسفندان بومی ایرانی داشته باشد.**

**واژه‌های کلیدی: تحمل سرمایی، چندشکلی نوکلئوتیدی، ژن HSP70A1A، گوسفند رومانف، گوسفند مهربان**

## مقدمه

در طی دهه‌های گذشته شواهد علمی مبنی بر تأثیر قابل توجه تغییرات دمایی روی وضعیت سلامتی دام‌ها و همچنین تولید در آن‌ها اشاره شده است (۲۷). به عنوان مثال، گزارش شده است که تنش‌های دمایی از طریق کاهش تولید شیر، سالیانه ۸۹۷ تا ۱۵۰۰ میلیون دلار ضرر را به صنعت شیر در ایالات متحده وارد می کنند که این رقم، بزرگترین ضرر اقتصادی برای این کشور محسوب می‌شود (۴). همچنین، گزارشات بسیاری از تأثیر تنش‌های دمایی روی عملکرد تولید شیر و باروری در گوسفند اشاره شده است (۱۳). از جمله این که، تنش‌های دمایی تأثیر منفی بر روی تولید اسپرم، نمو اووسیت، نمو رویان در مراحل ابتدایی و رشد جفت می‌گذارد (۱۵). در جنس نر تنش‌های دمایی از طریق افزایش دمای محیط اسکروتوم[1] و در نهایت تأثیر مستقیم روی بیضه‌ها منجر به پیامدهای منفی همچون کاهش حجم مایع منی[2]، کاهش تحرک اسپرم، افزایش شمار اسپرم‌های معیوب و کاهش میل جنسی در قوچ می‌شود (۳۱). تاکنون یک سری راهکارهایی از قبیل امکانات موجود در تأسیسات دامپروری، تغییر در جیره غذایی و نقش مدیریتی تا حدی توانسته مشکلات مربوط به تنش‌های دمایی را کاهش دهد. ولی این راهکارها تأثیر کوتاه مدت و ناکافی دارند. لذا نقش انتخاب ژنتیکی به عنوان یک عامل پایدار به منظور شناسایی تحمل دام‌ها در مقابل تنش‌های دمایی بسیار پر رنگ می‌کند (۴).

مقاومت سلولی به تنش گرمایی با تولید خانواده‌ای از پروتئین‌ها با دامنه گسترده از وزن مولکولی ۱۰۰، ۹۰، ۷۰ و ۶۰ کیلو دالتون (kDa) که به اصطلاح پروتئین‌های شوک گرمایی (HSPs)[3] نامیده می‌شوند، کنترل می شود. به طوریکه، از میان آن‌ها، پروتئین HSP70 فراوان‌ترین نوع را در این گروه بندی به خود اختصاص داده است (۲۸). این دسته از پروتئین‌ها به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی در فرآیندهایی از قبیل تاخوردگی پروتئین‌ها، تجمع و انتقال آن‌ها، عبور و مرور پپتیدها و پردازش آنتی ژن‌ها در شرایط استرس منجر به محافظت هسته و غشای لیپیدی سلول‌ها در مقابل آسیب‌های محیطی می شوند (۲۰،۷). پروتئین شوک گرمایی ۷۰ (HSP70) که به وسیله ژن

1- Scrotal 2- Semen 3- Heat shock protein

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

HSP70 تولید می شود عضوی از خانواده پروتئین‌های شوک گرمایی است که دارای وزن مولکولی از دامنه‌ی ۶۸ تا ۷۳ کیلودالتون است. ژن HSP70A1A روی کروموزوم شماره ۲۰ گوسفند قرار گرفته است. این ژن دارای ساختاری حاوی یک اگزون می‌باشد. طول ORF (Open Reading Frame) آن ۱۹۲۶ جفت باز و شامل ۶۴۱ اسیدآمینه در ساختار پروتئینی است (۱۴). همچنین، بر اساس اطلاعات پایگاه GeneCards(https://www.genecards.org) این پروتئین در گستره‌ای از فرایندهای سلولی مرتبط با محافظت از پروتئوم سلول در برابر استرس‌ها و همچنین در مسیرهای آپوپتوزیس سلولی (مرگ طبیعی سلولی) یا در تنظیم تقسیمات سلولی یعنی فرآیندهای تقسیم به روش میتوز و میوز نقش بسزایی ایفا می‌کند. این در حالی است که فقدان ژن HSP70 منجر به، افزایش معنی‌دار در مرگ سلولی می شود (۸).

مطالعه تحقیقاتی روی مقایسه قابلیت دو نژاد گوسفند پلیبوئی[1] و سافوک[2] در تنظیم دمای بدنشان طی یک دوره تنش گرمایی ۴۳ درجه سانتیگراد، تأثیر معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) مقاومت به تنش گرمایی بین این دو نژاد گوسفند اثبات شد (۲۸). جزئیات مطالعاتی در این خصوص نشان می دهد که با افزایش تنش‌های گرمایی غلظت پروتئین HSP70 خون در نژاد گوسفند پلیبوئی به طور معنی‌دار نسبت به نژاد گوسفند سافوک افزایش پیدا کرد که منجر به افزایش در زنده مانی سلولی و ثبات دمای بدن در این نژاد شد. لذا، این احتمال مطرح شده است که این مقاومت نسبی طبیعی به تنش‌های گرمایی در نژاد گوسفند پلیبوئی احتمالاً به خاطر مکانیسم‌های ذاتی مرتبط با پروتئین‌های HSP70 باشد (۲۸). همچنین در بررسی منابع مقالات دیگر، تأثیراتی از سطوح پروتئین HSP70 بر روی کیفیت مایع منی در گراز (*Sus scrofa*) گزارش شده است (۳۴،۱۷،۱۶). بر اساس یافته‌های محققین پیشین، پروتئین HSP70 به عنوان پروتئین باند شونده اسپرم در لوله اویداکت منجر به افزایش طول عمر و زنده‌مانی اسپرم‌های گراز و گاو نر شده است (۹). همچنین، نشان داده شده است که موش‌هایی که برای ژن HSP70 غیرفعال شده اند دارای ساختار غیرطبیعی و عدم تکامل اسپرماتوسیت‌ها و در نهایت مرگ سلولی در آن‌ها شده است (۶).

بررسی منابع مطالعات پیشین نشان می‌دهد که ژن‌های پروتئین شوک گرمایی، مقاومت دام را به شرایط محیطی تحت تاثیر قرار می‌دهند. بر اساس مطالعه سینق و همکاران (۳۳)، کمترین بیان ژن HSP برای نژاد گوسفند ماگرا[3] با بیشترین سازگاری با شرایط خشک و نیمه خشک گزارش شده است. یافته‌های علمی از وجود ارتباط آماری معنی‌دار بین چند شکلی‌های ژن HSP با صفات کیفیت اسپرم در گراز (۱۷)، مشخصات ظاهری اسپرم در گاو نر (۳۲)، صفت گوساله‌زایی در گاو (۲۹) و همچنین صفات مقاومت به تنش‌های گرمایی در گاو بومی نژاد ساهیوال[4] هندوستان (۳۸)، گاوهای بومی نژادهای چینی (۳۹) و مقاومت به تنش‌های سرمایی در گاوهای نژاد مغولستان (۱۸) دارند. در مطالعه‌ایی روی اگزون شماره ۱ ژن HSP70 در بز نژاد بوئر و آمیخته‌های آن دو چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) شامل ss836187517 (c.74A>C) و ss836187518 (c.191C>G) ارتباط آماری معنی‌داری را با صفات مربوط به کیفیت اسپرم نشان دادند (۲۳). بر اساس مطالعه مارکوس–کارکاویلا و همکاران (۲۲) بر روی ۲۴ نژاد گوسفند از مناطق مختلف آسیا، اروپا و آفریقا وجود چند شکلی تک نوکلئوتیدی g.660C>G در ژن HSP90AA1 ارتباط معنی‌دار را با تنش‌های دمایی نشان داد. همچنین در مطالعه جدیدتر سینق و همکاران (۳۳) یک هاپلوتایپ از چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی معنی دار با تنش دمایی را در ژن‌های HSP90 و HSP70 در نژادهای گوسفند هندی شناسایی کردند.

با توجه به گزارشات فوق، گوسفند نژاد مهربان بومی استان همدان ایران است که تحمل تنش‌های سرمایی به دلیل تغییرات دمایی روزانه قابل توجه استان همدان و زمستان‌های بسیار سرد در این نژاد قابل تامل است. در این راستا، تاکنون مطالعات بسیاری در راستای شناسایی چندشکلی‌های ژن‌های کاندیدای مرتبط با صفات تولیدی و تولید مثلی در گوسفند نژاد مهربان صورت گرفته است (۳۷،۲۱،۲،۱). به طوریکه، هیچیک از این مطالعات به عملکرد این نژاد با توجه به تحمل در شرایط تنش‌های دمایی یا ژن‌های کاندیدای آن از قبیل خانواده پروتئین‌های شوک دمایی نپرداخته اند. لذا در تحقیق حاضر تصمیم گرفته شد با هدف گسترش دامنه اطلاعات در خصوص چند شکلی‌های ژنی موجود در خانواده پروتئین‌های شوک دمایی، چند شکلی ژن HSP70A1A در گوسفندان نژاد مهربان با گوسفندان نژاد رومانف که از جمله نژاد گوسفند بومی مناطق سردسیر کشور روسیه است، مورد مقایسه قرار گیرد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری و استخراج DNA

در پژوهش حاضر از گوسفندان نژاد مهربان (گوسفند بومی استان همدان ایران) و همچنین نژاد رومانف (نژاد وارداتی از روسیه به ایران) استفاده شد. هردو نژاد بومی اقلیم سردسیر و مقاوم به آب و هوای سرد و خشن می باشند. در این تحقیق از ۱۰۰ رأس قوچ و بره‌های نر نژاد مهربان واقع در مزرعه‌ی آموزشی–پژوهشی دستجرد دانشگاه بوعلی سینا واقع در استان همدان و همچنین از ۴۱ رأس قوچ رومانف خالص از گله تولید اسپرم گوسفند رومانف موجود از ایستگاه پرورش نژاد گوسفند رومانف با استفاده از لوله‌های خلا حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداجی بطور تصادفی خونگیری انجام شد. استخراج DNA با استفاده از کیت DNPTM Kit (شرکت سیناژن) انجام شد.

### طراحی واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر از ناحیه اگزونی ژن HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) به طول ۲۴۷ و ۲۹۸ جفت باز انجام شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مربوطه مورد استفاده برای قطعه ۲۴۷ جفت بازی از اگزون (رفت: -5′ ACCTGGGCACCACCTACTC -3′ و برگشت: -5′

1- Pelibuey 2- Suffolk 3- Magra 4- Sahiwal

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

AAAGGCCAGTGCTTCATGTC -3′)، و قطعه ۲۹۸ جفت بازی از اگزون (رفت: 5′- CTACTTCAACGACTCGCAGC-3′ و برگشت: 5′- CCTCTTGAACTCCTCCACGA -3′) بوده است. لازم به ذکر است جهت تکثیر قطعه‌ی به طول ۲۴۷ جفت باز از آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق نیک بین و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد (۲۳) و برای تکثیر قطعه به طول ۲۹۸ جفت باز آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 (۴۱) طراحی شدند. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل SG51 A14-5A متعلق به شرکت سازنده Life Technologies طبق مقاله منتشر شده مجد و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد (۲۱). حجم نهایی محلول مورد نیاز برای انجام واکنش PCR ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که با استفاده از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس Ampliqon ساخت کشور دانمارک، یک میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (با غلظت ۱۰پیکومول در هر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر DNA (با غلظت ۵۰-۷۰ نانوگرم) و ۷ میکرولیتر آب استریل دوبار تقطیر به دست آمد. از برنامه دمایی و زمانی PCR جهت تکثیر اگزون ژن HSP70A1A ( Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) به شرح ذیل: مرحله واسرشته‌سازی اولیه[1] در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای ۱ چرخه، مرحله واسرشته‌سازی ثانویه[2] در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۵ چرخه، مرحله اتصال[3] در دمای ۶۳ و ۶۱ درجه سانتیگراد به ترتیب برای قطعات ۲۴۷ و ۲۹۳ جفت بازی به مدت ۴۵ ثانیه برای ۳۵ چرخه، مرحله تکثیر[4] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۳۵ چرخه و در نهایت مرحله تکثیر پایانی[5] در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای ۱ چرخه انجام شد.

**انجام آزمایش چند شکلی ساختار فضایی تک رشته ای (SSCP)[6]**

جهت انجام روش SSCP روی قطعات تکثیر شده، ابتدا مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR به مقدار ۱۰ میکرولیتر بافر مخصوص SSCP (برم فنل بلو ۰/۰۵ درصد، گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد، فرم آمید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی‌مولار) اضافه و مخلوط شد. در ادامه برای تک رشته‌ای کردن محصولات PCR، نمونه‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۹۷ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و به سرعت به مدت ۵ دقیقه جهت جلوگیری از دو رشته‌ای شدن دوباره، نمونه‌ها به ظرف حاوی یخ انتقال یافتند. سپس نمونه‌ها با استفاده از الکتروفورز عمودی به مدت ۲۴ ساعت با ولتاژ ۲۵۰V در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد روی ژل پلی آکریلامید ۱۰ درصد الکتروفورز شدند. همچنین رنگ آمیزی ژل آکریل آمید به روش نیترات نقره ۰/۱ درصد (۳۰) انجام شد.

**انجام آزمایش توالی یابی سانگر و تجزیه و تحیل نتایج**

پس از انجام SSCP و مشاهده ژل‌های رنگ‌آمیزی شده و تعیین الگوهای متفاوت، برای اطمینان از تفاوت موجود در هر قطعه مورد مطالعه، از هر الگوی مشاهده شده تعداد سه تا پنج نمونه‌ی مشابه آن برای تعیین توالی به صورت تصادفی انتخاب شدند. در ادامه مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه آغازگرهای برگشت (توالی یابی رشته معکوس) با غلظت ۱۰ پیکومول جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer در کشور کره فرستاده شدند. آنالیز نتایج توالی یابی به منظور شناسایی چندشکلی‌ها به وسیله نرم‌افزار CLC Main Workbench Version 7.6.4 (۲۵) انجام شد.

به‌منظور رسم درخت تبارزایی (فیلوژنی)، در ابتدا توالی ژن HSP70A1A در الگوهای SSCP مشاهده شده با توالی این ژن از پایگاه NCBI در گونه‌ی گوسفند نژاد تکسل (*Ovis aries*)، بز (*Capra hircus*)، گاو (*Bos taurus*)، اسب (*Equus cabalus*)، خوک (*Sus scrofa*)، موش ( *Mus musculus*)، انسان (*Homo sapiens*)، و شامپانزه ( *Pan paniscus*) بصورت همردیفی چندگانه[7] به وسیله نرم‌افزار CLC Main Workbench Version 7.6.4 (۲۵) مقایسه شدند. سپس بر اساس نتایج همردیفی چندگانه درخت تبارزایی بر اساس رویه‌ی UPGMA ( unweighted pair group method with arithmetic mean) با اندازه فاصله کیمورا ۸۰ و به خودراه اندازی یا Bootstrapping تعداد ۱۰۰۰ بار تکرار برای گونه‌های مورد بررسی به وسیله نرم‌افزار CLC Main Workbench Version 7.6.4 (۲۵) ترسیم شد.

**بررسی فراوانی‌های الگوهای مختلف**

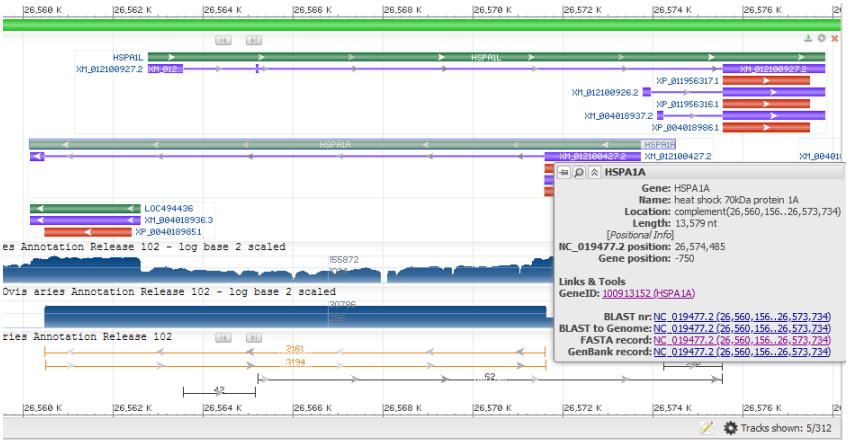
پس از شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs)، تعداد هر الگوی SSCP شمارش و فراوانی‌های الگوها برای هر چند شکلی با استفاده از نرم‌افزار Version POPGENE 1.31 (۴۰) محاسبه شد. سپس بر اساس این نتایج تعادل هاردی- واینبرگ (HWE)[8] بررسی شدند.

## نتایج و بحث

تاکنون تحقیقات اندکی روی ژن HSP70A1A در گوسفند صورت گرفته است و بسیاری از کارهای صورت گرفته در مورد سایر حیوانات می باشد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است ژن HSP70A1A گوسفند که پروتئین شوک گرمایی ۷۰ کیلودالتونی خانواده نوع A و عضو شماره ۱ آن شناخته می‌شود دارای ۱۳۵۷۹ نوکلئوتید می‌باشد که از یک اگزون و یک ناحیه غیرکدکننده 3'-UTR تشکیل شده است (شکل ۱).

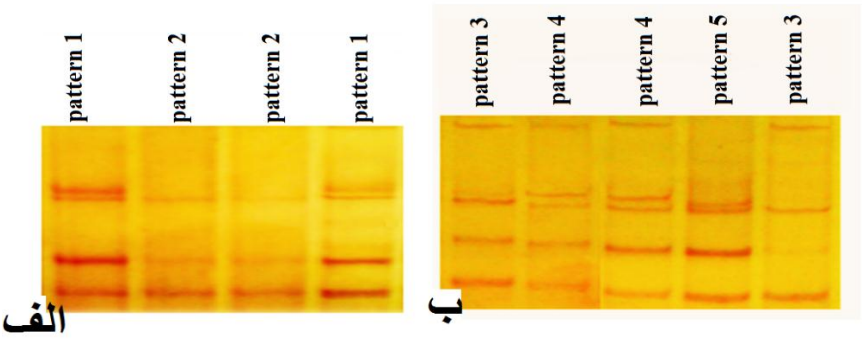
1- Initial denaturation 2- Denaturation 3- Annealing 4- Extention 5- Final extention
6- Single-strand conformation polymorphism 7- Multiple alignment 8- Hardy-Weinberg equilibrium

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]




شکل ۱- اطلاعات بیوانفورماتیکی ژن HSPA1A گوسفند بر اساس مرورگر ژنوم (Genome Browser) نسخه ۴ در پایگاه NCBI
Figure 1. In-*silico* information of the ovine HSPA1A gene based upon NCBI genome browser v. 4.01

بر اساس قطعات تکثیر شده اگزون ژن HSP70A1A گوسفندی (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) تعداد ۵ الگوی باندی به طور یکسان در دو نژاد گوسفند، نژاد مهربان و نژاد رومانف به صورت الگوهای شماره ۱ تا ۵ (pattern 1-5) در نتایج SSCP مشاهده شدند که به ترتیب دو و سه الگو در قطعه ۲۴۷ جفت بازی و قطعه ۲۹۸ جفت بازی یافت شدند (شکل ۲، بخش‌های الف و ب). الگوهای یافت شده در تکنیک PCR-SSCP حاکی از وجود چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی قابل توجه در ژن HSP70A1A گوسفندی به عنوان ژن کاندیدای مقاومت به تنش‌های دمایی در گوسفند محسوب می‌شود. تکنیک PCR-SSCP به عنوان یک روش کم هزینه و پرسرعت می‌تواند در جمعیتی از حیوانات جهت تعیین ژنوتیپ ژن‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک اولین بار برای شناسایی جهش‌های تک نوکلئوتیدی در انسان بر اساس تاخوردگی ساختار ثانویه (heteroduplex) مولکول DNA بکار برده شد. تاخوردگی‌های مولکول DNA به توالی نوکلئوتیدی این مولکول بستگی دارد. بطوریکه تأثیر فاکتورهای خارجی بر روی تاخوردگی‌های مولکول DNA در سیستم شناسایی SSCP به عنوان بزرگترین محدودیت این تکنیک می‌باشد (۳۵).




شکل ۲- تعداد ۵ الگوی باندی متفاوت به صورت الگوهای شماره ۱ تا ۵ (pattern 1-5) در نتایج SSCP از ناحیه اگزونی ژن HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) در گوسفندان نژاد مهربان و رومانف. الف: دو الگوی متفاوت SSCP در قطعه۲۴۷ جفت بازی که به pattern 1 و pattern 2 نامگذاری شده است. ب: سه الگوی متفاوت SSCP در قطعه ۲۹۸ جفت بازی که به pattern 3، pattern 4 و pattern 5 نامگذاری شده است.
Figure 2. Five different SSCP patterns (pattern 1-5) of the exon of the HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) in Mehraban and Romanov sheep breeds. a: Two different SSCP patterns were related to amplification of 247 bp called as pattern 1 and 2. b: Three different SSCP patterns were related to amplification of 298 bp called as pattern 3, 4 and 5.

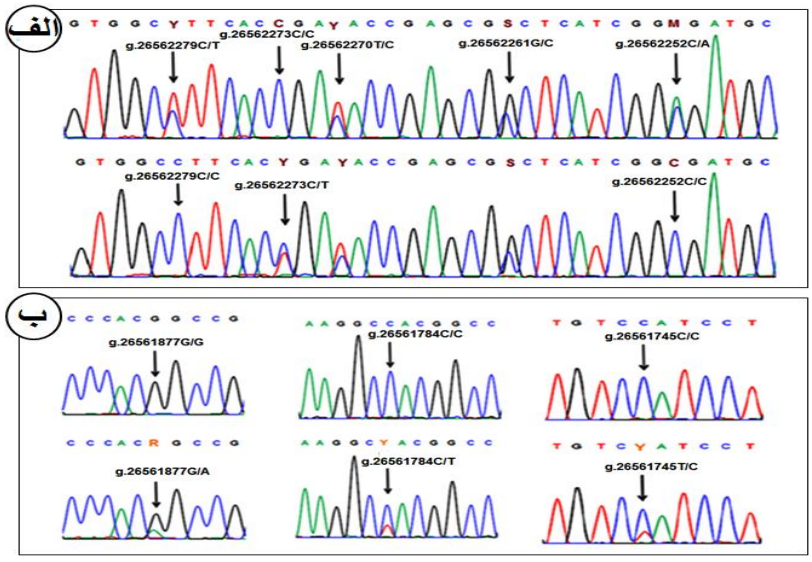
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

جدول ۱- درصد فراوانی‌های الگوهای شناسایی شده برای واریانت‌های SSCP از قطعات تکثیر شده در ژن HSP70A1A گوسفند (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2).

Table 1. Percentage of patterns frequencies of identified SSCP variants among amplified fragments of sheep HSP70A1A gene (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2).

| قطعات تکثیر شده ( جفت باز) | الگوهای SSCP | تعداد/ فراوانی | نژادهای گوسفند | |
|---|---|---|---|---|
| | | | مهربان تعداد ۱۰۰ | رومانف تعداد ۴۱ |
| ۲۴۷ ناحیه اگزون | الگوی ۱ | تعداد | ۶۴ | ۲۸ |
| | | فراوانی | ۰/۶۴ | ۰/۶۸ |
| | الگوی ۲ | تعداد | ۳۶ | ۱۳ |
| | | فراوانی | ۰/۳۶ | ۰/۳۲ |
| ۲۹۸ ناحیه اگزون | الگوی ۳ | تعداد | ۹ | ۳ |
| | | فراوانی | ۰/۰۹ | ۰/۰۷ |
| | الگوی ۴ | تعداد | ۳۴ | ۱۴ |
| | | فراوانی | ۰/۳۴ | ۰/۳۴ |
| | الگوی ۵ | تعداد | ۵۷ | ۲۴ |
| | | فراوانی | ۰/۵۷ | ۰/۵۹ |

در پژوهش حاضر، فقط الگوهای SSCP شناسایی شده در گوسفند نژاد مهربان توالی یابی شدند و در تمامی افراد این چند شکلی‌ها تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج حاصل از توالی یابی الگوهای شناسایی شده در نژاد مهربان، حاکی از تعداد ۵ چند شکلی تک نوکلئوتیدی از قبیل g.26562252C>A، g.26562261G>C، g.26562270T>C، g.26562273C>T و g.26562279C>T در قطعه ۲۴۷ جفت بازی بود (شکل ۳، بخش الف). همچنین تعداد سه چند شکلی تک نوکلئوتیدی از قبیل g.26561745T>C، g.26561784C>T و g.26561877G>A در قطعه ۲۹۸ جفت بازی شناسایی شدند (شکل ۳، بخش ب). لازم به ذکر است در تحقیقات سینق و همکاران (۳۳) چندشکلی g.26561877G>A با عنوان HSP70 set4 222G>A در نژادهای گوسفندان هندی در مقاومت به تنش‌های سرمایی شناسایی شده است. اگرچه هیچ کدام از چند شکلی‌ها تغییر در نوع اسید آمینه را در ساختمان پروتئین نشان ندادند (جدول ۲) یا به اصطلاح SNPهای خاموش یا مترادف[1] بودند، ولی بر اساس گزارش نیک بین و همکاران (۲۳) دو چندشکلی مترادف از قبیل c.74 A>C و c.191 C>G در قطعه ۲۴۷ جفت بازی همبستگی معنی‌داری را با صفات کیفیت اسپرم در بُزهای نژاد بوئر نشان دادند. بطوریکه گزارش شده هست SNPهای مترادف اگرچه در مرحله ترجمه نقشی ایفا نمی‌کنند ولی می توانند با تغییر در رونویسی پروتئین و یا تأثیر بر روی صحت و کارایی اسپلایسینگ mRNA بر روی عملکرد پروتئین مربوطه تأثیرگذار باشند (۱۹،۵). تاکنون مطالعات زیادی به تأثیر بالقوه اسپلایسینگ mRNA نابالغ بر روی عملکرد صفات فنوتیپی اشاره کرده‌اند (۲۴،۱۲).




شکل ۳- چند شکلی‌های شناسایی شده در ناحیه اگزون ژن HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2). الف: چندشکلی‌های یافت شده در قطعه ۲۴۷ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه اگزون ژن HSP70A1A. ب: چندشکلی‌های یافت شده در قطعه ۲۹۳ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه اگزون ژن HSP70A1A

Figure 3. Identified polymorphisms in ovine exon region of HSP70A1A gene (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) a: Identified SNPs in 247 bp segment of the HSP70A1A gene. b: Identified SNPs in 293 bp segment of the HSP70A1A gene.

1- Synonymous

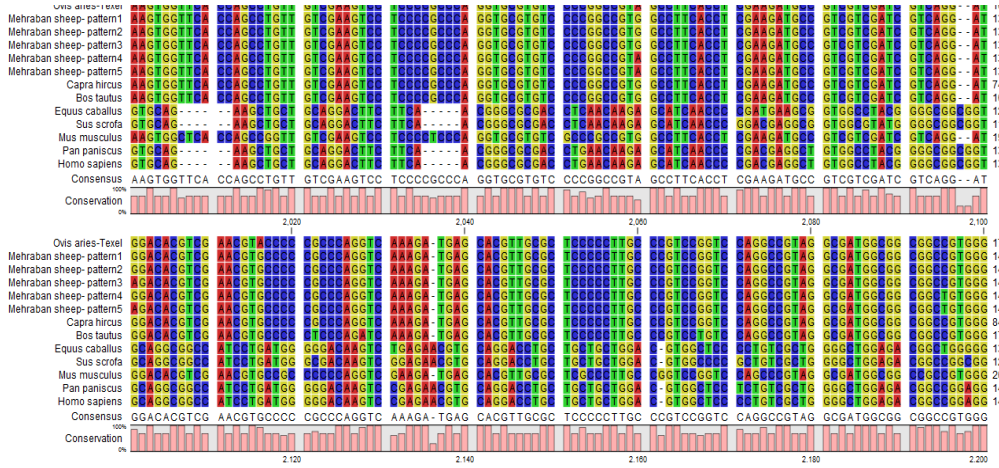
[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

جدول ۲- چندشکلی‌های شناسایی شده در ناحیه اگزونی ژن HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2)

Table 2. Identified SNPs in ovine HSP70A1A gene (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2)

| شماره کروموزوم | نوع چندشکلی | جایگزینی اسیدآمینه در توالی پپتیدی (XP_004018985.1) | چندشکلی نوکلئوتیدی (SNP) شناسایی شده |
|---|---|---|---|
| ۲۰ | اگزونی | p.52 Gly > Gly | g.26562252C>A |
| | | p.49 Arg > Arg | g.26562261G>C |
| | | p.46 Asp > Asp | g.26562270T>C |
| | | p.45 Thr > Thr | g.26562273C>T |
| | | p.43 Ala > Ala | g.26562279C>T |
| | | p.221 Ala > Ala | g.26561745T>C |
| | | p.208 Ser > Ser | g.26561784C>T |
| | | p.177 Thr > Thr | g.26561877G>A |

نتایج همردیفی چندگانه‌ی توالی‌های تک نوکلئوتیدی مورد مطالعه حاکی از وجود باز یکسان سیتوزین (گوانین در رشته مستقیم بر اساس شکل ۴) برای جهش g.26561874C>T در Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2; بین الگوهای SSCP شماره ۱، ۲ و ۳ با یکسری از گونه‌های پستانداران مورد مطالعه از قبیل بز، گاو و موش بود (شکل ۴). در حالیکه عدم جایگزینی باز تیمین با سیتوزین (آدنین در رشته مستقیم بر اساس شکل ۴) که در همین جایگاه ژن HSP70A1A در گوسفند نژاد تکسل موجود هست مشابه با الگوهای SSCP شماره ۴ و ۵ از گوسفند نژاد مهربان و رومانف و همچنین گونه‌های اسب، خوک، انسان و شامپانزه بود (شکل ۴).




شکل ۴- همردیفی چندگانه الگوهای شناسایی شده از چند شکلی ژن HSP70A1A با توالی این ژن در گونه‌ی گوسفند نژاد تکسل (*Ovis aries*)، و سایر گونه‌های پستاندارن از قبیل بز (*Capra hircus*)، گاو (*Bos taurus*)، اسب (*Equus cabalus*)، خوک (*Sus scrofa*)، موش (*Mus musculus*)، انسان (*Homo sapiens*)، و شامپانزه (*Pan paniscus*)

Figure 4. Multiple sequence alignment of the identified SSCP patterns of HSP70A1A gene polymorphisms with its sequences in Texel sheep (*Ovis aries*), and with the different mammalians species e.g., goat (*Capra hircus*), cow (*Bos taurus*), horse (*Equus cabalus*), pig (*Sus scrofa*), mouse (*Mus musculus*), human (*Homo sapiens*), and chimpanzee (*Pan paniscus*)

فراوانی الگوهای SSCP از ۸ چند شکلی شناسایی شده در ناحیه اگزون ژن HSP70A1A ( Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) گوسفند نژاد مهربان، و بررسی تعادل یا عدم تعادل ژنوتیپ‌ها با آزمون مربع کای در جدول ۳ نشان داده شده است. بطوریکه تمامی ۵ چند شکلی شناسایی شده در قطعه ۲۴۷ جفت بازی از قبیل g.26562252C>A، g.26562261G>C، g.26562270T>C، g.26562273C>T و g.26562279C>T تفاوت معنی داری ($p < 0.05$) را با تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند (جدول ۳). لذا، به نظر می‌رسد چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در قطعه ۲۴۷ جفت بازی که مربوط به بخش ابتدایی ژن HSP70A1A می‌باشد می‌توانند احتمالاً، دارای اهمیت خاصی از لحاظ ارتباط با صفات مقاومت به استرس‌های محیطی در نژاد مهربان باشند. این موضوع، در تحقیقات نیک بین و همکاران (۲۳) در چند شکلی‌های یافت شده در بخش ابتدایی اگزون ژن HSP70A1A در بُزهای نژاد بوئر نیز اثبات شده است (۲۳). از میان سه چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در قطعه ۲۹۸ جفت بازی تنها SNP g.26561784C>T یک تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) را با تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد (جدول ۳). مارکوس-کارکاویلا و همکاران (۲۲) چند شکلی‌های ژن HSP90AA1 گوسفندی در ۲۴ نژاد گوسفند از نواحی مختلف پرورش اروپا، آفریقا و آسیا بررسی نمودند. نتایج آن‌ها حاکی از تفاوت معنی‌دار در فراوانی ژنوتیپ

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

C/G در موقعیت ۶۶۰ جفت بازی در ناحیه '5 جانبی[1] این ژن در نژادهای مختلف گوسفند بود. نتایج سطح بیان این ژن حاکی از سطح بیان بالاتر ژنوتیپ CC−660 نسبت به CG−660 و GG−660 در قوچهایی بود که بیشتر تحت تأثیر شرایط گرمایی تابستان بودند. بطوریکه آن‌ها نتیجه‌گیری کردند احتمالاً جهش در منطقه 660 جفت بازی از ناحیه '5 جانبی ژن HSP90AA1 تأثیر مهمی بر روی سازگاری نژادهای گوسفند با شرایط مختلف آب و هوایی دارد. همچنین سینق و همکاران (۳۳) با مطالعه برروی نژادهای گوسفند هندی Chokla، Magra، Marwari و Madras تعداد چهار چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی از قبیل 7390T>G، 459A>G، 180C>T و 112G>C را در ژن HSP90 شناسایی کردند. همچنین آن‌ها یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی 222G>A را در ژن HSP70 شناسایی کردند که در تحقیق حاضر به عنوان چند شکلی تک نوکلئوتیدی g.26561877G>A یافت شده است. بر اساس نتایج سینق و همکاران (۳۳) ژنوتیپ AA به طور معنی‌دار تعداد لوکوسیت‌های بیشتری را نسبت به ژنوتیپ AG و GG در گوسفندان مناطق سردسیر نشان داد. آن‌ها نتیجه گرفتند که این چند شکلی تک نوکلئوتیدی می تواند به عنوان یکی از عوامل ایجاد سازگاری در نژادهای گوسفند در مقابل شرایط تنش‌های محیطی باشد. اعتمادی دیندارلو و همکاران (۱۰ الف) چند شکلی جایگاه اینترون ۱۰ ژن HSP90AA1 و ارتباط آن با تنش گرمایی در گوسفندان نژاد لری بختیاری و بلوچی را در اقلیم‌های مختلف آب و هوایی بررسی کردند. در نتایج PCR-SSCP دو الگوی باندی مشاهده نمودند که فراوانی این الگوهای الکتروفورزی در نژادهای لری بختیاری و بلوچی متفاوت بود. همچنین در مطالعه دیگر اعتمادی دیندارلو و همکاران (۱۱ ب) که بر روی دو نژاد گوسفند کرمانی و زل انجام شد، چند شکلی تک نوکلئوتیدی قطعه ۳۱۱ جفت بازی قسمتی از جایگاه '5 جانبی ژن HSP90AA1 را به روشPCR-SSCP بررسی نمودند که در طی آن ۶ الگوی SSCP برای گوسفند زل مشاهده کردند. در نژاد زل الگوی الکتروفورزی ۵ با ۳۴٪ فراوانی بیشترین فراوانی و الگوی الکتروفورزی ۳ با ۵/۷۲٪ فراوانی دارای کمترین فراوانی بود. الگوهای الکتروفورزی ۵ و ۳ به ترتیب بیشترین و کمترین سازگاری را با شرایط معتدل و مرطوب داشتند اما در نژاد کرمانی که سازگار به شرایط خشک و بیابان هستند تنها ۲ الگوی SSCP مشاهده کردند که این ۲ الگو متفاوت از الگوهای SSCP گوسفند نژاد زل بودند (۱۱). این ژن در سازگاری نژادهای مختلف گوسفند ایرانی نسبت به شرایط محیطی آن‌ها موثر می باشد و در این جایگاه دارای تنوع می‌باشد و این تنوع ژنتیکی موجب تنوع در مقاومت دام‌های مختلف نسبت به شرایط و تنش‌های محیطی می‌شود. در تحقیقاتی که بر روی نژادهای گاو انجام شده است هو و همکاران (۱۸)، چند شکلی تک نوکلئوتیدی g.105G>T را به عنوان یک جهش جدید و عامل در ناحیه 5'-UTR ژن HSP70 در گاوهای نژاد مغولی Sanhe بومی اقلیم سرد و خشن مغولستان شناسایی کردند که ارتباط معنی‌دار ($p < 0.01$) را با سطح هورمون‌های تیروکسین خون از قبیل T3 و T4 داشت. آن‌ها پیشنهاد کردند ژن HSP70 می‌تواند احتمالاً به عنوان ژن کاندیدای مقاومت گاوها در مقابل تنش‌های سرمایی بطور کاربردی مورد بررسی قرار بگیرد. همچنین در تحقیق دیگر بر روی گاو، ژیانگ و همکاران (۳۹) تعداد پنج چندشکلی نوکلئوتیدی را در ناحیه '3 جانبی و سه چند شکلی تک نوکلئوتیدی را در ناحیه کدکننده از ژن HSP70A1A در نژادهای گاو چینی شناسایی کردند که یک ترکیب هاپلوتایپی معنی‌دار را با صفات مرتبط با تحمل به تنش‌های گرمایی نشان داد. همچنین ارتباط بین چندشکلی‌های موجود در ژن HSP70 با صفات تولید مثلی در پرندگان نیز اثبات شده است. به طوریکه راستی دوست و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اگزون ۱ ژن HSP70 تعداد سه الگوی SSCP و یک چندشکلی c.211G>A را شناسایی کردند که ارتباط معنی دار را با افزایش تعداد تخم و وزن توده تخم در بوقلمون نشان داد. لذا این موضوع اهمیت چند شکلی در ژن‌های خانواده HSP70 و ارتباط آن با صفات تولیدی و تولیدمثلی را در حیوانات مزرعه‌ای نشان می‌دهد (۲۶).

جدول ۳- فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده در ناحیه اگزون ژن HSP70A1A (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) گوسفند نژاد مهربان، و بررسی تعادل یا عدم تعادل ژنوتیپ‌ها با آزمون مربع کای

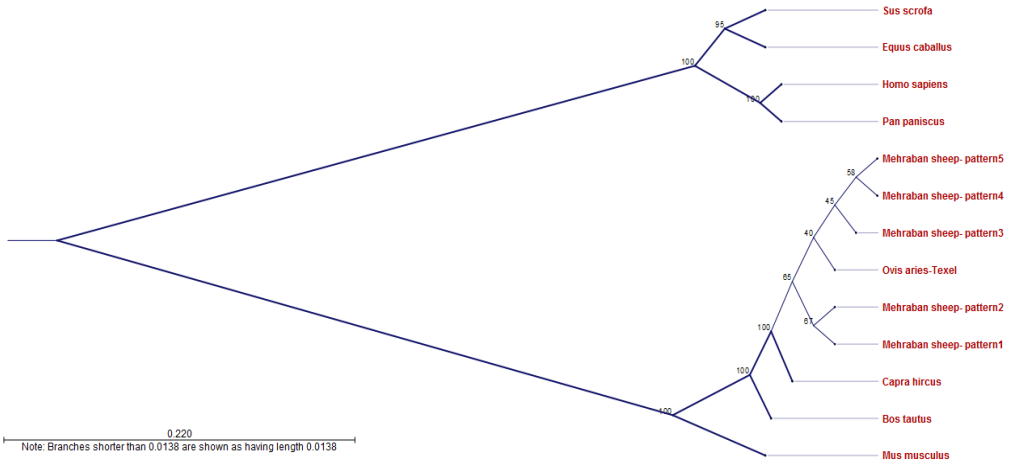
Table 3. Genotypic frequencies observed in exon region of ovine HSP70A1A gene (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2) in Mehraban sheep, and evaluation of equilibrium and disequilibrium of genotypes frequency using chi-square test

| چندشکلی نوکلئوتیدی (SNP) شناسایی شده | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| g.26562252C>A | | g.26562261G>C | | g.26562270T>C | | g.26562273C>T | | g.26562279C>T | | g.26561745T>C | | g.26561784C>T | | g.26561877G>A | |
| ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی | ژنوتیپ | فراوانی |
| CC | ۰/۶۴ | GG | ۰ | TT | ۰ | CC | ۰/۳۶ | CC | ۰/۶۴ | TT | ۰ | CC | ۰/۶۶ | GG | ۰/۹۱ |
| CA | ۰/۳۶ | GC | ۱ | TC | ۱ | CT | ۰/۶۴ | CT | ۰/۳۶ | TC | ۰/۰۹ | CT | ۰/۳۴ | GA | ۰/۰۹ |
| AA | ۰ | CC | ۰ | CC | ۰ | TT | ۰ | TT | ۰ | CC | ۰/۹۱ | TT | ۰ | AA | ۰ |
| Chi-square | ۴/۸۲ | | ۱۰۰ | | ۱۰۰ | | ۲۲/۱۵ | | ۴/۸۲ | | ۰/۲۲ | | ۴/۲۰ | | ۰/۲۲ |
| P-Value | ۰/۰۳* | | ۰/۰۰** | | ۰/۰۰** | | ۰/۰۰** | | ۰/۰۳* | | ۰/۶۴$^{ns}$ | | ۰/۰۴ * | | ۰/۶۴$^{ns}$ |

1- Flanking

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

از آنجاییکه ارتباط تکاملی و عملکردی مولکول‌های زیستی (ژن‌ها، پپتیدها و غیره) را می توان بر اساس همسانی توالی و ساختار آن‌ها در گونه‌های مختلف درک کرد (۳۶) لذا در تحقیق حاضر درخت تبارزایی توالی ژنی HSP70A1A بر اساس الگوهای SSCP شناسایی شده و اطلاعات توالی این ژن از گوسفند نژاد تکسل و سایر پستانداران برگرفته از پایگاه NCBI به روش UPGMA ترسیم شد (شکل ۵). مقادیر Bootstrap ذکر شده در محل انشعاب شاخه‌های درخت حاکی از اعتمادپذیری بالا به درخت تبارزایی ترسیم شده در این پژوهش بود. بر اساس این درخت تبارزایی گونه‌های مختلف پستانداران بر اساس اطلاعات توالی ژن HSP70A1A آن‌ها گروه بندی شدند. بطوریکه این گونه‌ها در ابتدای ریشه درخت به دو دسته تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل گونه‌های خوک، اسب، انسان و شامپانزه بودند. گروه دوم شامل الگوهای یافت شده از چندشکلی ژن HSP70A1A بر روی گوسفند نژاد مهربان (و همچنین رومانف) در مطالعه حاضر و در مقایسه با گونه گوسفند نژاد تکسل، و گونه‌های بز، گاو و موش بودند. همچنین بر اساس شکل ۵، گونه بز با مقدار Bootstrap درصد ۱۰۰ در انشعاب نزدیک به شاخه‌های مرتبط با گونه گوسفند قرار گرفت (شکل ۵). این یافته‌ها در تأیید نتایج گید و همکاران (۱۴) در بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی HSP70-1 در گونه‌ی بز نژاد هندی و روند تکاملی آن در مقایسه با سایر پستانداران بود.




شکل ۵- درخت تبارزایی توالی ژن HSP70A1A بر اساس رویه UPGMA بین الگوهای SSCP مختلف شناسایی شده از این ژن در تحقیق حاضر با اطلاعات توالی این ژن از گوسفند و سایر گونه‌های پستانداران. مقادیر Bootstrap درخت بر حسب درصد در محل شاخه‌های درخت نشان داده شده است. شاخه های برجسته (آبی پررنگ) به معنی Bootstrapping بزرگتر یا مساوی ۹۵٪ می باشند. مقدار ۰/۲۲ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدهای هر جایگاه می‌باشد.

Figure 5. Phylogenetic tree of HASP70A1A gene based on UPGMA procedure among the SSCP patterns identified in present research compared to its sequences in sheep and the different mammalians species. Numbers outside the branches indicate the bootstrap values obtained using 1,000 replicates. Highlighted branches (bold blue) represents equal or higher to 95% bootstrapping value. Amount of 0.22 revealed the nucleotide substitution ratio within each locus.

در تحقیق حاضر تعداد ۸ چند شکلی نوکلئوتیدی (SNP) در ژن HSP70A1A گوسفندی در دو نژاد گوسفند مهربان و رومانف شناسایی شده است که هردوی این نژادها بومی اقلیم‌های سردسیر محسوب می شوند. از آنجاییکه به نقش ژن HSP70 در ارتباط با سازگاری با تنش‌های سرمایی در گونه‌های مختلف دامی اشاره شده است لذا تنوع یکسان در الگوهای SSCP ژن HSP70A1A در دو نژاد گوسفند مهربان و رومانف در تحقیق حاضر می‌تواند احتمالاً نشان‌دهنده‌ی سازگاری این نژادها با اقلیم‌های سرد باشد. در ضمن اطلاعات این چند شکلی‌ها می‌تواند در ساخت تراشه‌های اختصاصی تعیین ژنوتیپ گوسفند برای نژادهای بومی گوسفندان ایرانی نیز مؤثر واقع بشود. همچنین توصیه می‌شود یک بررسی ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی‌های یافت شده در تحقیق حاضر با تحمل سرمایی در گوسفند نژاد مهربان و یا سایر نژادهای گوسفندان ایرانی از اقلیم‌های مختلف انجام شود تا در نهایت بتوان بیومارکرهای مولکولی ارزشمندی را در راستای بهنژادی در نژادهای گوسفندان بومی ایران معرفی نمود.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

## منابع


1. Abdoli, R., P. Zamani, A. Deljou and H. Rezvan. 2013. Association of BMPR-1B and GDF9 genes polymorphisms and secondary protein structure changes with reproduction traits in Mehraban ewes. Gene, 524: 296-303.
2. Ahmadi, A., F. Afraz, R. Talebi, A. Farahavar and S.M.F. Vahidi. 2016. Investigation of GDF9 and BMP15 polymorphisms in Mehraban sheep to find the missenses as impact on protein. Iranian Journal of Applied Animal Science, 6(4): 863-872.
3. Akbarinejad, V., R. Kazempoor, M. Shojaei, M. Rezaee and R. Oji. 2014. Atlas of Iranian sheep breeds. Noorbakhsh Press, Tehran, Iran (In Persian).
4. Boonkum, W., I. Misztal, M. Duangjinda, V. Pattarajinda, S. Tumwasorn and J. Sanpote. 2011. Genetic effects of heat stress on milk yield of Thai Holstein crossbreds. Journal of Dairy Science, 94: 487-492.
5. Cartegni, L., S.L. Chew and A.R. Krainer. 2002. Listening to silence and under-standing nonsense: exonic mutations that affect splicing. Nature Reviews Genetics, 3: 285-298.
6. Christians, E.S., Q. Zhou, J. Renard and I.J. Benjamin. 2003. Heat shock pro-teins in mammalian development. Seminars in Cell and Developmental Biology, 14: 283-290.
7. Connell, P., C.A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L.J. Thompson, J. Hohfeld and C. Patterson. 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triagedecisions mediated by heat-shock proteins. Nature Cell Biology, 3: 93-96.
8. Dix, D.J., J.W. Allen, B.W. Collins, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E.H. Goulding and E.M. Eddy. 1996. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93: 3264-3268.
9. Elliott, R.M., R.E. Lloyd, A. Fazeli, E. Sostaric, A.S. Georgiou, N. Satake, P.F. Watson and W.V. Holt. 2009. Effects of HSPA8, an evolutionarily con-served oviductal protein, on boar and bull spermatozoa. Reproduction, 137: 191-203.
10. Etemadi Dindarloo, P., H. Moradi-Shahrebabak, S.R. Miraei Ashitiani and M. Moradi-Shahrebabak. 2012a. Study of polymorphism in the HSP90AA1 gene intron 10 region in the Iranian Lori-Bakhtiari and Balouchi sheep in different climate of Iran. First National Conference of Dessert (Science, Technology and Sustainable Development), International Research Institute of Desert, University of Tehran (In Persian).
11. Etemadi Dindarloo, P., S.R. Miraei Ashitiani, H. Moradi-Shahrebabak and M. Moradi-Shahrebabak. 2012b. Study of polymorphism in the HSP90AA1 gene 5′ Flanking region in the Iranian Kermani and Zel sheep breeds in different climate of Iran. First National Conference of Dessert (Science, Technology and Sustainable Development), International Research Institute of Desert, University of Tehran (In Persian).
12. Faustino, N.A and T.A. Cooper. 2003. Pre-mRNA splicing and human disease. Genes and Development, 17: 419-437.
13. Finocchiaro, R., J.B. van Kaam, B. Portolano and I. Misztal. 2005. Effect of heat stress on production of Mediterranean dairy sheep. Journal of dairy science, 88(5): 1855-1864.
14. Gade, N., R.K. Mahapatra, A. Sonawane, V.K. Singh, R. Doreswamy and M. Saini. 2010. Molecular characterization of heat shock protein 70-1 gene of goat (Capra hircus). Molecular Biology International, 2010: 108429.
15. Hansen, P.J. 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 364(1534): 3341-3350.
16. Huang, S.Y., M.Y. Chen, E.C. Lin, H.L. Tsou, Y.H. Kuo, C.C. Ju and W.C. Lee. 2002. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5' flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. Animal Reproduction Science, 70: 99-109.
17. Huang, S.Y., Y.H. Kuo, Y.P. Lee, H.L. Tsou, E.C. Lin, C.C. Ju and W.C. Lee. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. Animal Reproduction Science, 63: 231-240.
18. Hu, L., Y. Ma, L. Liu, L. Kang, L.F. Brito, D. Wang, H. Wu, A. Liu, Y. Wang and Q. Xu. 2019. Detection of functional polymorphisms in the hsp70 gene and association with cold stress response in Inner-Mongolia Sanhe cattle. Cell Stress and Chaperones, 24:409-418.
19. Komar, A.A. 2007. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. Pharmacogenomics, 8(8): 1075-1080.
20. Kristensen, T.N., P. Løvendahl, P. Berg and V. Loeschcke. 2004. Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable acros days and age classes. Cell Stress and Chaperones, 9(2): 143.
21. Majd, S.A., A. Ahmadi, R. Talebi, P.M. Koohi, S. Fabre and S. Qanbari. 2019. Polymorphism identification in ovine KISS1R/GPR54 gene among pure and crossbreeds of Iranian sheep. Small Ruminant Research, 173: 23-29.


[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

22. Marcos-Carcavilla, A., M. Mutikainen, C. González, J.H. Calvo, J. Kantanen, A. Sanz and M. Serrano. 2010. A SNP in the HSP90AA1 gene 5′ flanking region is associated with the adaptation to differential thermal conditions in the ovine species. Cell Stress and Chaperones, 15(1): 67-81.
23. Nikbin, S., J.M. Panandam, H. Yaakub, M. Murugaiyah and A.Q. Sazili. 2014. Novel SNPs in heat shock protein 70 gene and their association with sperm quality traits of Boer goats and Boer crosses. Animal Reproduction Science, 146(3-4): 176-181.
24. Nissim-Rafinia, M. and B. Kerem. 2002. Splicing regulation as a potential genetic modifier. Trends in Genetics, 18: 123-127.
25. QIAGEN CLC Genomics Workbench, https://digitalinsights.qiagen.com.
26. Rastidoust, N., S. Nikbin, B. Navidshad and G. Elyasi. 2018. Investigation of polymorphisms in promoter and exon regions of HSP70 gene and their associations with reproduction traits of indigenous turkeys of Iran. Research on Animal Production (Scientific and Research), 9(21): 113-119 (In Persian).
27. Rojas-Downing, M.M., A.P. Nejadhashemi, T. Harrigan and S.A. Woznicki. 2017. Climate change and livestock: impacts, adaptation, and mitigation. Climate Risk Management, 16: 145-163.
28. Romero, R.D., A. Montero-Pardo, H.H. Montaldo, A.D. Rodríguez and J. Hernández-Cerón. 2013. Differences in body temperature, cell viability, and HSP-70 concentrations between Pelibuey and Suffolk sheep under heat stress. Tropical Animal Health and Production, 45(8): 1691-1696.
29. Rosenkrans, J.C., A. Banks, S. Reiter and M. Looper. 2010. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with heat shock protein 70 genetic polymorphisms. Animal Reproduction Science, 119: 178-182.
30. Sanguinetti, C.J., E. Dias Neto and A.J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. BioTechniques, 17: 914-921.
31. Sejian, V., M. Bagath, G. Krishnan, V.P. Rashamol, P. Pragna, C. Devaraj and R. Bhatta. 2019. Genes for resilience to heat stress in small ruminants: A review. Small Ruminant Research, 173: 42-53.
32. Shrum, K., T. Lester, R. Rorie, S. Reiter, M. Looper and Jr. C. Rosenkrans. 2010. Effects of heat shock protein 70 haplotype and tall fescue variety on bull sperm characteristics. Arkansas Agricultural Experiment Station Research Series, 584: 39-44.
33. Singh, K.M., S. Singh, I. Ganguly, R.K. Nachiappan, A. Ganguly, R. Venkataramanan, A. Chopra and H.K. Narula. 2017. Association of heat stress protein 90 and 70 gene polymorphism with adaptability traits in Indian sheep (Ovis aries). Cell Stress Chaperon, 22: 675-684.
34. Spinaci, M., S. Volpe, C. Bernardini, M. De Ambrogi, C. Tamanini, E. Seren and G. Galeati. 2005. Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp 70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. Molecular reproduction and development, 72(4): 534-541.
35. Svozil, D., J. Kalina, M. Omelka and B. Schneider. 2008. DNA conformations and their sequence preferences. Nucleic Acids Research, 36(11): 3690-3706.
36. Talebi, R., A. Ahmadi, F. Afraz and S.Z. Mirhoseini. 2014. In Silico analysis of cytochrome P-450 between the human and camel for resistivity to hypertension and environmental toxins. Genetics in the Third Millennium, 1: 3386-3399 (In Persian).
37. Talebi, R., A. Ahmadi, F. Afraz, J. Sarry, F. Woloszyn and S. Fabre. 2018. Detection of single nucleotide polymorphisms at major prolificacy genes in the Mehraban sheep and association with litter size. Annals of Animal Science, 18(3): 685-698.
38. Verma, N., I.D. Gupta, A. Verma, R. Kumar, R. Das and M.R. Vineeth. 2016. Novel SNPs in HSPB8 gene and their association with heat tolerance traits in Sahiwal indigenous cattle. Tropical Animal Health and Production, 48(1): 175-180.
39. Xiong, Q., J. Chai, H. Xiong, W. Li, T. Huang, Y. Liu, X. Suo, N. Zhang, X. Li, S. Jiang and M. Chen. 2013. Association analysis of HSP70A1A haplotypes with heat tolerance in Chinese Holstein cattle. Cell Stress and Chaperones, 18(6): 711-718.
40. Yeh, F.C., R. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE. Version 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
41. Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen and T.L. Madden. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 13: 134.
42. Yurchenko, A.A., T.E. Deniskova, N.S. Yudin, A.V. Dotsev, T.N. Khamiruev, M.I. Selionova, S.V. Egorov, H. Reyer, K. Wimmers, G. Brem, N.A. Zinovieva and D.M. Larkin. 2019. High-density genotyping reveals signatures of selection related to acclimation and economically important traits in 15 local sheep breeds from Russia. BMC Genomics, 20: 294.

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]
[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]
[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]

# Identification of Polymorphism in HSP70A1A Gene in Mehraban and Romanov Sheep Breeds using PCR-SSCP Technique

**Ahmad Ahmadi[1], Mahaya Mohammadizade[2], Pouya Zamani[3], Abbas Farah-avar[4] and Reza Talebi[5,6]**

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran (Corresponding author: ahmadi@basu.ac.ir)

2- Graduated M.Sc. Student in Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3 and 4- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

5- Graduated PhD. in Animal Breeding, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

6- Department of Systems and Synthetic Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: November 19, 2020 Accepted: December 31, 2020

## Abstract

The heat shock proteins (HSPs) are a family of proteins contributing to cellular resistance against a variety of thermal stresses in different climates. In this study we aimed to characterize polymorphisms of the ovine HSP70A1A gene in Mehraban indigenous sheep breed and Romanov imported sheep breed, because they are well adapted to the cold climate. Blood samples were collected from a total of 141 sheep (100 Mehraban and 41 Romanov), and then genomic DNA was extracted according to conventional instructions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the 247 bp and 298 bp of the exon region of the HSP70A1A gene (Oar_v4.0; Chr 20, NC_019477.2). Also, polymorphisms of the studied fragments were explored using single strand conformational polymorphism (SSCP) technique and then the amplified DNA fragments were sequenced by Sanger sequencing method. In both Mehraban and Romanov breeds, five distinct SSCP patterns were identified that two and three electrophoretic patterns were respectively related to 247 bp segment and 298 bp segments. Furthermore, frequencies of SSCP patterns showed no differences between breeds. Five single nucleotide polymorphisms (SNPs) including g.26562252C>A, g.26562261G>C, g.26562270T>C, g.26562273C>T and g.26562279C>T were identified in 247 bp segment, and also, three SNPs including g.26561745T>C, g.26561784C>T and g.26561877G>A were identified in 298 bp segment of PCR products. Results revealed that all SNPs were in Hardy–Weinberg disequilibrium ($p < 0.05$), except of g.26561745T>C and g.26561877G>A. Considering the role of HSPs in resistance to the environmental stresses, it can be conclude that the identification of these SNPs can play an important role on understanding the mechanism of adaptation to temperature tolerance among the Iranian indigenous sheep breeds.

**Keywords:** Cold tolerance, HSP70A1A gene, Mehraban sheep, Polymorphism, Romanov sheep

[ Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-30 ]

[ DOR: 20.1001.1.22518622.1400.12.31.19.0 ]

[ DOI: 10.52547/rap.12.31.169 ]