شناسایی چندشکلی اگزون ششم ژن Pit1 در مرغ بومی آذربایجان غربی با استفاده از روش PCR-SSCP

جواد برومند[۱]، علی هاشمی[۲]، کریم مردانی[۳] و محمد قادرزاده[۴*]

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۱۱

چکیده

ژن‌های بخش سوماتوتروپیک شامل عوامل رونویسی هستند که در تکامل و رشد جوجه نقش اساسی دارند. ژن Pit1 عامل ویژه رونویسی هیپوفیزی است که نقش عمده‌ای در تمایز هیپوفیز قدامی و تنظیم ژن‌های هورمون‌های پرولاکتین، رشد و محرک تیروئیدی دارد. ژن Pit1 به عنوان یک ژن کاندیدای کلیدی برای صفات تولیدی طیور مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش به منظور بررسی چندشکلی اگزون ششم ژن Pit1 با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مرغ بومی آذربایجان غربی صورت گرفت. در این طرح از ۱۰۰ پرنده به صورت تصادفی خون‌گیری شده و DNA نمونه‌های خون استخراج گردید. برای تعیین کیفیت DNA از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. ناحیه اگزون ششم جایگاه Pit1 به طول ۱۷۹ bp با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر و محصولات PCR توسط روش SSCP آنالیز شدند. محصولات PCR توسط الکتروفورز با ژل پلی آکریلامید ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره آشکار گردید. نتایج SSCP محصولات PCR با ژل پلی‌آکریل آمید سه ژنوتیپ AA، AB و BB را آشکار ساخت. ژنوتیپ‌های این جایگاه ژنی انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ را نشان دادند. شاخص شانون، شاخص Nie و هتروزیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۰/۵۹، ۱/۶۷ و ۰/۳۲ به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان داد که نشانگر Pit1 دارای چندشکلی نسبتاً بالایی است و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: چندشکلی، مرغ بومی آذربایجان غربی، PCR-SSCP

مقدمه

اصلاح دام در واقع به‌کارگیری دانش علمی برای بهبود ژنتیکی حیوانات است. اصولاً پرورش حیوانات اهلی دارای اهداف اقتصادی است و توصیه‌های به‌نژادی بایستی از نظر اقتصادی و ملاحظات ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرند . در این راستا به منظور به حداقل رساندن سرمایه‌گذاری و افزایش بازدهی برنامه‌های اصلاح نژادی می‌توان از روش‌های جدید ژنتیک مولکولی مؤثر در بخش اصلاح نژاد دام استفاده کرد. شناسایی ژن‌های مؤثر و محرک رشد در حیوانات اقدامی هدفمند در کارهای اصلاح نژاد می‌باشد. ژن‌های ناحیه‌ی سوماتوتروپیک، نقش‌های مختلفی در تنظیم پرولاکتین، هورمون رشد و ژن‌های هورمون محرک رشد بتا دارند و از میان ژن‌های این ناحیه Pit1 یکی از ژن‌های کاندیدا و مهم در صفات تولیدی است (Nie et al. 2008). این ژن، در واقع یک فاکتور ویژه نسخه‌برداری هیپوفیزی می‌باشد که باعث تظاهر مناسب ژن‌های هورمون پرولاکتین (PRL) و هورمون رشد (GH) در هیپوفیز قدامی می‌شود (Zwierzchowski et al. 2001, Chenht and Geldrmann

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه
[۲] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه
[۳] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
[۴*] دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه ارومیه
E-mail: mg.mahabad1365@gmail.com (نویسنده مسئول)

1996, Chen et al. 1997). فعالیت‌های زیستی دیگری مانند تنظیم توسعه‌ی بخش قدامی هیپوفیز (Li et al. 1990, Hoya et al. 1998)، تکثیر سلولی غده‌ی هیپوفیز (Castrillo et al. 1991)، خاموش کردن یا تأخیر در عوامل آزاد کننده در انسان (Taha et al. 2005) در ارتباط با فنوتیپ کوتولگی در موش (Camper et al. 1990) و همین‌طور القای سلول‌های کبدی به ترشح سلول‌های پرولاکتین (Lee et al. 2005)، از دیگر نقش‌های گزارش شده برای این ژن است. فعالیت ابتدایی این ژن تحت کنترل (PROP-1) است؛ ژن Pit1 ترشح خودکار دارد؛ mRNA این ژن در هر نوع سلول هیپوفیزی وجود دارد؛ به طوری که پروتئین Pit1 به صورت عمده در سلول‌های لاکتوتروف‌ها، سوماتوتروف‌ها و تیروتروف‌ها وجود دارد که به ترتیب PRL، GH و TSH را ترشح می‌کنند (Sornson et al. 1996). ژن Pit1 در گونه‌های مختلف شناسایی شده است؛ به طوری که در پستانداران دارای ۶ اگزون و در پرندگان و ماهی‌ها دارای ۷ اگزون است (Yamada et al. 1993, Tatsumi et al. 1992). ژن Pit1 ماکیان، اولین بار توسط Tanaka و همکاران در سال ۱۹۹۹ شناسایی شد. سه شکل مختلف این ژن Pit1، Pit1β و Pit1ω ، به ترتیب دارای ساختار ۳۳۵، ۳۶۳ و ۳۲۷ آمینواسیدی هستند (Van et al. 2000). توالی ژنوم مرغ در سال ۲۰۰۶ شناسایی گردید. بر اساس یافته‌های توالی‌یابی، ژن Pit1 روی کروموزوم شماره‌ی ۱ مرغ قرار گرفته و بیش از ۱۴Kb طول دارد (Nie et al. 2008). در تحقیقات مکرری که روی این ژن انجام گرفته، ثابت شده است که این ژن به عنوان یک ژن کاندیدا نقش کلیدی در صفات تولیدی و عملکرد دارد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تنوّع این ژن در ارتباط با رشد، صفات لاشه و چربی است (Brunsch et al. 2002, Franco et al. 2005, Song et al. 2005, Stancekova et al. 1999, Yu et al. 1995). در جوجه‌ها، در کل ۲۳ چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) و یک قطعه‌ی ۵۴ جفت بازی در ناحیه‌ی ۲۴۰۰ جفت بازی این ژن شناسایی شده است ولی اثرات ژنتیکی آن‌ها تاکنون بر صفات تولیدی مشخص نشده است (Nie et al. 2005). Nie و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه‌ی غیر کد کننده این ژن منجر به تغییر (A → T , Asn 229 Ile) شده است که ارتباط معنی‌داری با وزن بدن طیور در ۸ هفتگی داشت. با توجه به این که تحقیقی در مرغان بومی آذربایجان غربی در مورد ژن Pit1 صورت نگرفته است، از این رو، هدف از این تحقیق شناسایی تنوع و جهش‌های موجود در ناحیه‌ی اگزون ششم ژن Pit1 در مرغان بومی آذربایجان غربی بود.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری

از ۱۰۰ قطعه پرنده‌ی مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی استان آذربایجان غربی خون‌گیری، از ورید زیر بالی مرغ‌ها با استفاده از لوله‌های حاوی EDTA انجام گردید. نمونه‌های خون بلافاصله پس از خونگیری به فریزر منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از روش توصیف شده توسط Aljanabi و Martinez (۱۹۹۷) انجام گردید. ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی خون به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد؛ سپس به هر لوله‌ی حاوی نمونه‌ی خون ۴۰۰ میکرولیتر هموژنایزر بافر (NaCl ۰/۴ مولار، ۱۰ میلی‌مول Tris–HCl با pH=8 و ۲ میلی‌مول EDTA با pH=8) اضافه گردید و ۱۰ ثانیه به کمک شیکر مخلوط شدند؛ در ادامه به هر لوله ۴۰ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲۰ درصد به همراه ۸ میکرولیتر پروتئیناز K ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و به‌خوبی مخلوط شدند. نمونه‌ها به مدت

۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر (مدل *UNIOII*) ساخت کشور آلمان قرار گرفتند و پس از آن ۳۰۰ میکرولیتر NaCl ۶ مولار (اشباع شده با آب مقطر) به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به کمک شیکر (مدل *VORTEX 3* ساخت کمپانی *IKA* آلمان) مخلوط گردیدند. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ (RPM) در دستگاه سانتریفوژ (مدل *ROTINA 420 R* ساخت آلمان) قرار داده شدند. بعد از اتمام زمان سانتریفوژ، مایع رویی شفاف و متمایل به رنگ زرد در بالای لوله تشکیل شد که این مایع رویی، به وسیله‌ی سمپلر به لوله‌های استریل جدید منتقل شدند و در مرحله‌ی بعدی به میزان هم حجم مایع رویی هر لوله، به هر کدام از لوله‌ها ایزوپروپانول افزوده شد و با دست به خوبی تکان داده شدند و به مدت یک ساعت در فریزر با دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. لوله‌های شامل محتویات فوق‌الذکر در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس تمام مایع داخل لوله‌ها، بجز پلت ته لوله‌ها خالی گردید. متعاقباً به هر لوله مقدار ۲۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۵۰۰۰RPM سانتریفوژ شدند و سپس تمام الکل داخل لوله‌ها تخلیه شده و به مدت ۲۰ دقیقه به صورت در باز در فضای باز آزمایشگاه قرار داده شدند تا پلت‌ها خشک گردند و الکل کاملاً بخار شود و در نهایت به هر لوله ۱۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل اضافه شد و هر نمونه به منظور حل شدن پلت، به طور یکنواخت در آب دیونیزه به مدت ۴۵ ثانیه به کمک شیکر خوب مخلوط و هم زده شد و ۵ دقیقه با دمای ۱۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۵۰۰۰RPM سانتریفوژ شدند و نمونه‌های DNA استخراج شده تا زمان اجرای بقیه‌ی مراحل تحقیق به فریزر با دمای ۴- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

انتخاب آغازگرها

در این تحقیق به منظور تکثیر قطعه‌ی ۱۷۹ جفت بازی (تصویر ۱) ناحیه‌ی اگزون ششم ژن Pit1، از آغازگرهای Jiang و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید که ترتیب توالی آن‌ها به صورت زیر بود:

Forwad, 5′ -GGCACTTTGGAGAACAAAGC–3′

Reverse, 5′ –CTCGTGGTGCTCCTTGATAA–3′

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، با ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰mM)، ۴ میکرولیتر dNTPs (۱/۲۵ mM)، ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت (۲۵ µM)، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت (۲۵µM)، ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۳/۵ میکرولیتر آب دیونیزه در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. تکثیر قطعه‌ی مورد نظر، با استفاده از یک مرحله‌ی ابتدایی واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۸°C به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و یک دمای تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل *UNIOII*) ساخت کشور آلمان انجام گردید (Nie et al. 2008). محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن (مدل *IN GENIUS*) ساخت کشور انگلستان، مشاهده و عکسبرداری گردیدند. برای تعیین اندازه‌ی قطعات تکثیر شده از نشانگر مولکولی ۱۰۰bp (شرکت *سیناژن-ایران*) استفاده شد.

روش چند شکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)

برای تجزیه‌ی محصولات PCR، به کمک روش (SSCP) سه میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR با هفت میکرولیتر بافر دناچوره (فرمامید ۹۸٪، برومونفل بلو

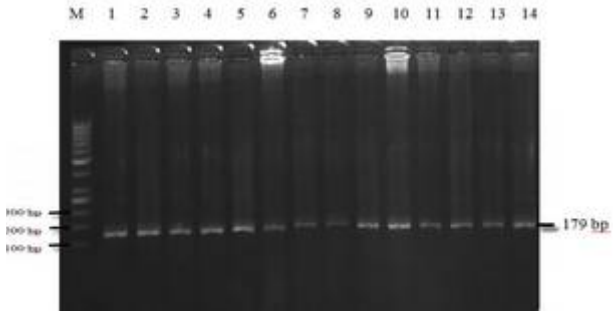
۰/۰۲۵٪، گزیلون سیانول ۰/۰۲۵٪، اتیلین‌دی‌آمین‌ترا استیک اسید EDTA (pH=8) ۱۰ میلی‌مول بر لیتر و گلیسرول ۱۰٪) مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ترموسایکلر (مدل *UNIOII*) ساخت کشور آلمان با دمای ۹۸ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند؛ سپس نمونه‌ها به سرعت به داخل یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن دوباره‌ی رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید (Genxi et al. 2012). به منظور مشاهده‌ی ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی (مدل *Clever*) ساخت کشور انگلستان با ابعاد ۲۰×۱۸×۰/۱ سانتی‌متر استفاده شد. محصولات پی سی آر تک رشته‌ای به مدت ۱۲ ساعت با ولتاژ ۱۰۰V/cm روی ژل آکریل آمید ۱۰٪ الکتروفورز و به وسیله‌ی نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند (Benbouza et al. 2006).

آنالیز آماری

شاخص‌های آماری از قبیل هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، هموزیگوسیتی مشاهده شده، هموزیگوسیتی مورد انتظار، متوسط هتروزیگوسیتی، شاخص شانون، فراونی آللی و فراوانی ژنوتیپی، با استفاده از نرم‌افزار Popgene 1.31 محاسبه شدند (Yeh et al. 1999).

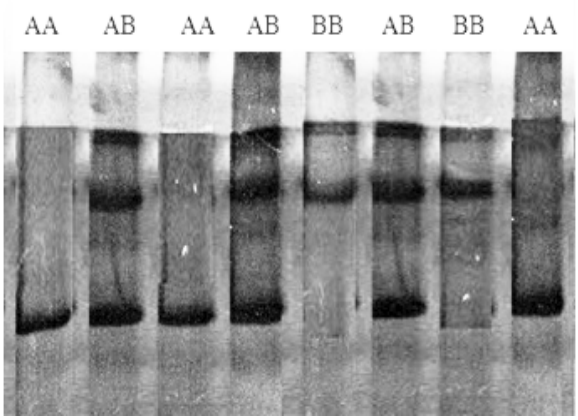
نتایج

کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده، با استفاده از ژل آگارز یک درصد تعیین شد که حاکی از کیفیت بسیار خوب نمونه‌ها بود. پس از تعیین کیفیت نمونه‌های DNA، به منظور تکثیر قطعه ۱۷۹ جفت بازی اگزون ششم ژن Pit1 ، واکنش زنجیره‌ی پلیمراز (PCR) به کار گرفته شد. کیفیت و اندازه‌ی محصولات PCR ، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد تعیین شدند و همان طور که در تصویر ۱ دیده می‌شود، قطعه‌ی مورد نظر به‌خوبی تکثیر گردیده است.



تصویر ۱: قطعات ۱۷۹ جفت بازی تکثیر شده به وسیله‌ی PCR، چاهک اول (M) از سمت چپ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن-ایران)، چاهک‌های ۱۴-۱ محصولات PCR تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

نمونه‌ها، با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) برای بررسی و تعیین ژنوتیپ تجزیه شدند. نتایج به دست آمده سه الگوی متفاوت ژنوتیپی را روی ژل آکریل‌آمید نشان دادند و آن بیانگر چندشکلی بودن این ناحیه از ژن Pit1 در مرغان بومی آذربایجان غربی بود (تصویر ۲).



تصویر ۲: الگوهای SSCP مختلف مشاهده شده برای اگزون ششم ژن Pit1 در مرغان بومی آذربایجان غربی روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰ درصد.

از مهم‌ترین خصوصیات یک نشانگر مولکولی تعداد آلل، فراوانی آللی، تعداد آلل‌های مؤثّر، هتروزیگوسیتی و محتوای اطلاعاتی چند شکل (PIC) آن نشانگر می‌باشد. فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها و فراسنجه‌های آماری جمعیت

در جدول ۱ ارائه شده‌اند. در این تحقیق سه ژنوتیپ AA، AB و BB ، با استفاده از روش Jiang و همکاران در سال ۲۰۰۴ تعیین و شناسایی شدند که، به ترتیب دارای فراوانی‌های ۵۶٪، ۳۲٪ و ۱۲٪ بودند. فراوانی آلل A و B به ترتیب ۷۲ و ۲۸ درصد بودند. در این تحقیق به ترتیب ژنوتیپ AA بیشترین و ژنوتیپ BB کم‌ترین فراوانی را نشان دادند. تعداد آلل مؤثر یکی دیگر از معیارهای چند شکلی است که با استفاده از نرم‌افزار Popgene محاسبه گردید. تعداد آلل مؤثّر (تعداد آلل‌های مؤثر در تنوع درون جمعیت) و شاخص شانون (بیانگر میزان تنوع در جمعیت) در این تحقیق به ترتیب ۱/۶۷۵۶ و ۰/۵۹۳۲ به دست آمد. با استفاده از نرم‌افزار Popgene سایر فراسنجه‌های آماری مؤثّر در تنوع درون جمعیتی محاسبه شد و مورد بررسی قرار گرفت. شاخص شانون[1] شاخص اطلاعاتی است که به عنوان معیاری از تنوع ژنی در جمعیت برآورد می‌شود. در این مطالعه شاخص شانون ۰/۵۹۳۲ به دست آمد که نشان دهنده‌ی تنوع نسبتاً بالای ژن Pit1 در نمونه‌های مورد بررسی در مرغان بومی آذربایجان غربی است (جدول ۲). مطالعه تنوع ژنتیکی درون جمعیت در تحقیق حاضر از طریق اندازه‌گیری معیارهایی مانند هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و هتروزیگوسیتی Nie (متوسط هتروزیگوسیتی) اندازه‌گیری گردید . در این تحقیق فقط یک نوع ژنوتیپ هتروزیگوت AB (با فراوانی ۰/۳۲) به دست آمد . هم‌چنین در این پژوهش هتروزیگوسیتی Nie، ۰/۴۰۳۲ برآورد گردید. که این ارقام میزان قابل توجهی از هتروزیگوسیتی را در جمعیت نشان می‌دهند. با توجه به این نتایج، می‌توان گفت مقادیر نسبتاً بالای شاخص‌های شانون و Nie، نشان‌دهنده‌ی وجود تنوّع ژنتیکی نسبتاً بالا در جمعیت مورد مطالعه است.

جدول ۱: فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی ژن Pit1 مرغان بومی آذربایجان غربی

ژنوتیپ	AA	AB	BB
فراوانی ژنوتیپی (درصد)	۵۶	۳۲	۱۲
آلل	A	-	B
فراوانی آللی (درصد)	۷۲	–	۲۸

جدول ۲: پارامترهای آماری و ژنتیکی برآورد شده‌ی ژن Pit1 در مرغان بومی آذربایجان غربی

ژن Pit1	هموزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هموزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی Nie	متوسط هتروزیگوسیتی
اگزون ششم	۰/۶۸	۰/۳۲	۰/۵۹۴۸	۰/۴۰۵۲	۰/۴۰۳۲	۰/۴۰۳۲
دیگر شاخص‌ها	شاخص شانون	۰/۵۹۳۲	تعداد آلل مؤثر	۱/۶۷۵۶	مقدار مربع کای χ^2	۴/۴۸۹۹

بحث

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی چند شکلی اگزون ششم ژن Pit1 در مرغان بومی استان آذربایجان غربی، با استفاده از تکنیک SSCP انجام گرفت. همان طور که در تصویر ۱ دیده می‌شود، قطعه‌ی مورد نظر (اگزون ششم ژن Pit1) به‌خوبی تکثیر گردیده و نشان می‌دهد که آغازگرهای طراحی شده برای ناحیه‌ی اگزون ششم، کاملاً اختصاصی عمل کرده‌اند؛ زیرا هیچ گونه باند غیر اختصاصی و اسمیر در شکل دیده نمی‌شود. می‌توان گفت تکثیر اختصاصی قطعات در تکنیک SSCP بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا وجود باندهای غیر اختصاصی روی ژل، باعث اشتباه در تفسیر نتایج می‌شود. به احتمال

1- Shannon Index

قوی برنامه‌ی دمایی و آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق می‌توانند در تکثیر این ناحیه‌ی ژن Pit1 در سایر گونه‌های طیور بومی کشور کارآمد و موفق عمل کنند. در این مطالعه چندشکلی ژن Pit1 در مرغان بومی آذربایجان غربی شناسایی و فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های این ژن در ناحیه‌ی مورد مطالعه برآورد گردید. Cheng و همکاران در سال ۲۰۰۹ تنوع ژنتیکی ژن Pit1 را در پنج نژاد غاز بومی چینی و یک نژاد غاز غربی به روش PCR-SSCP بررسی کردند و نتایج آزمایش‌های آن‌ها سه SNP را در موقعیت‌های A57G در اینترون ژن، G161A و T282G در اگزون ژن و T282G که منجر به تغییر آمینواسیدی (سیستئین به تریپتوفان) شده است، نشان داد. در تحقیق دیگری Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن Pit1 در غاز نژاد وانکسی چینی به روش PCR-SSCP دو ژنوتیپ را شناسایی کردند که دارای ارتباط معنی‌داری با وزن بدن بودند.

Jiang و همکاران در سال ۲۰۰۴ جهشی را در موقعیت A980T این ژن در ماکیان گزارش کردند که دارای ارتباط معنی‌داری با وزن بدن ۸ هفتگی جوجه‌ها بود. Nie و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش HPLC، ۲۳ چندشکلی تک نوکلئوتیدی را در ژن Pit1 جوجه‌ها شناسایی کردند. Nie و همکاران در سال ۲۰۰۸ ارتباط بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی این ژن و صفات تولیدی را در جوجه‌ها شناسایی نمودند. در اگزون ششم ژن pit1 در مرغ بومی آذربایجان غربی سه نوع ژنوتیپ مختلف شناسایی شد و نتایج تحقیق حاضر مطابق با یافته‌های پژوهش‌های قبلی بود. Bhattacharya و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی این ژن در جوجه‌ها با روش PCR-SSCP ، ۱۰ هاپلوتیپ مختلف را شناسایی کردند که، ارتباط معنی‌داری با وزن بدن و میزان رشد جوجه‌ها داشتند.

در تحقیق حاضر روش چندشکلی فضایی رشته منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کار رفته که با توجه به تصویر ۲ و نحوه‌ی قرارگیری تک رشته‌ای‌های DNA ، به نظر می‌رسد این روش دارای دقت مناسب در شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف این جایگاه ژنی باشد. چندشکلی و تنوّع ژنوتیپی این ژن، در سایر حیوانات هم مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی این ژن به روش PCR-RFLP در ارتباط با صفات رشد در گاو منجر به شناسایی دو شکل مختلف برای ژن Pit1 و هم‌چنین بررسی آن در بز و ارتباط آن با صفات تولیدی منجر به شناسایی سه شکل مختلف ژنوتیپی گردید (Lan et al. 2009, Pan et al. 2008). تفاوت بین فراوانی‌های ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2) در جمعیت طیور بومی استان آذربایجان غربی، برای ناحیه‌ی اگزون ششم معنی‌دار نبوده که نشان می‌دهد جمعیت در حالت تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد. بنابراین ممکن است که آلل‌های موجود در این جایگاه ژنی، تحت تأثیر عوامل تغییر دهنده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی قرار نگرفته باشند؛ به عبارت دیگر، با وجود این که نمونه‌های خون از یک مرکز اصلاح نژاد اخذ شده‌اند، تنها دلیلی که برای وجود تعادل هاردی واینبرگ وجود دارد این است که احتمالاً روی این ناحیه (اگزون ششم) انتخاب، جهش، مهاجرت یا سایر عوامل بر هم زننده‌ی تعادل صورت نگرفته است. با توجه به نقش‌های این ژن، در صفات تولیدی و اقتصادی و هم‌چنین وجود چندشکلی و هتروزیگوسیتی نسبتاً بالا در جمعیت، از مرغان با رکورد بالای تولید، می‌توان به عنوان والدین نسل بعدی استفاده کرد. هم‌چنین پیشنهاد می‌شود در صورت در دست داشتن رکورد صفات تولیدی و اقتصادی مرغان دارای بهترین ژنوتیپ، با توجه به صفات تولیدی شناسایی و در کارهای اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند. بررسی هم‌زمان سایر جایگاه‌های ژن pit1 در مرغان بومی آذربایجان غربی و سایر نژادهای مرغان بومی ایران، ممکن است کمک بیشتری به کامل کردن یافته‌های این تحقیق نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان محترم مرکز پرورش و اصلاح نژاد مرغ بومی آذربایجان غربی به جهت همکاری صمیمانه‌ای که داشتند، قدردانی می‌گردد.

منابع

Aljanabi, S. and Martinez, L. (1997). Universal and rapid salt–extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, 25 (22): 4692-4693.

Benbouza, H.; Jacquemin, J. M.; Baudoin, J. P. and Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment, 10 (2):77-81.

Bhattacharya, T. K.; Chatterjee, R. N. and Priyanka, M. (2012). Polymorphisms of Pit-1 gene and its association with growth traits in chicken. Poultry Science, 91 (5): 1057-1064.

Brunsch, C.; Sternstein, I.; Reinecke, P. and Bieniek, J. (2002). Analysis of associations of Pit1 genotypes with growth, meat quality and carcass composition traits in pigs. Journal of Applied Genetics, 43 (1): 85-91.

Camper, S.; Saunders, T. L.; Katz, R. W. and Reeves, R. H. (1990). The Pit-1 transcription factor gene is a candidate for the murine Snell dwarf mutation. Genomics, 8 (3): 586-590.

Castrillo, J.; Theill, L. E. and Karin, M. (1991). Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation. Science, 253 (5016): 197-199.

Chen, H. T.; Schuler, L. A. and Schultz, R. D. (1997). Growth hormone and Pit-1 expression in bovine fetal lymphoid cells. Domestic Animal Endocrinology, 14 (6): 399-407.

Cheng, J. H.; Qiao, N.; Zhao, W. M.; Xu, Q.; Zhang, H. B.; Duan, X. D.; et al. (2009). Genetic variation of Pit-1 gene in Chinese indigenous and Western goose populations. African Journal of Biotechnology, 8 (14): 3147-3153.

de la Hoya, M.; Vila, V.; Jiménez, O. and Castrillo, J. L. (1998). Anterior pituitary development and Pit-1/GHF-1 transcription factor. Cellular and Molecular Life Sciences, 54 (10): 1059-1066.

Franco, M. M.; Antunes, R. C.; Silva, H. D. and Goulart, L. R. (2005). Association of Pit1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. Journal of Applied Genetics, 46 (2): 195-200.

Genxi, Z.; Guojun, D.; Jinyu, W.; Yue, W.; Fuxiang, D.; Zhang, L.; et al. (2012). Polymorphisms in 5'-upstream region of the myostatin gene in four chicken breeds and its relationship with growth traits in the Bian chicken. African Journal of Biotechnology, 11 (40): 9677-9682.

Hecht, C. and Geldrmann, H. (1996). Variants within 5- Flanking region and the intron I of bovine growth hormone gene. Animal Genetic, 27 (5): 329-332.

Jiang, R.; Li, J.; Qu, L.; Li, H. and Yang, N. (2004). A new single nucleotide polymorphism in the chicken pituitary-specific transcription factor (POU1F1) gene associated with growth rate. Animal Genetics, 35 (4): 344-346.

Lan, X. Y.; Shu, J. H.; Chen, H.; Pan, C. Y.; Lei, C. Z.; Wang, X.; et al. (2009). A PstI polymorphism at 3'UTR of goat POU1F1 gene and its effect on cashmere production. Molecular Biology Reports, 36 (6): 1371-1374.

Lee, E.; Russell, T.; Hurley, L. and Jameson, J. (2005). Pituitary transcription factor-1 induces transient differentiation of adult hepatic stem cells into prolactin-producing cells in vivo. Molecular Endocrinology, 19 (4): 964-971.

Li, S.; Crenshaw, E. B.; Rawson, E. J.; Simmons, D.; Swanson, L. and Rosenfeld, M. G. (1990). Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature, 347: 528-533.

Nie, Q.; Lei, M.; Ouyang, J.; Zeng, H.; Yang, G. and Zhang, X. (2005). Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in 12 chicken growth-correlated genes by denaturing high performance liquid chromatography. Genetics Selection Evolution, 37 (3): 339-360.

Nie, Q.; Fang, M.; Xie, L.; Zhou, M.; Liang, Z.; Luo, Z.; et al. (2008). The Pit1 gene polymorphisms were associated with chicken growth traits. BMC Genetics, 9 (20): 1-5.

Pan, C. Y.; Lan, X. Y.; Chen, H.; Yang, D. Y.; Hual, L. S.; Yang, X. B.; et al. (2008). A DdeI PCR-RFLP detecting a novel missense mutation of the POU1F1 gene showed no effects on growth traits in cattle. Czech Journal of Animal Science, 53 (12): 523-527.

Song, C.; Gao, B.; Teng, Y.; Wang, X.; Wang, Z.; Li, Q.; et al. (2005). MspI polymorphisms in the 3rd intron of the swine POU1F1 gene and their associations with growth performance. Journal of Applied Genetics, 46 (3): 285-289.

Sornson, M.; Wu, W.; Dasen, J.; Flynn, S. E.; Norman, D. I.; O'Connell, S. M.; et al. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature, 384 (6607): 327-333.

Stancekova, K.; Vasicek, D.; Peskovicova, D.; Bulla, J. and Kubek, A. (1999). Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (Pit1) on carcas traits in pigs. Animal Genetics, 30 (4): 313-315.

Taha, D.; Mullis, P.; Ibanez, L. and de Zegher, F. (2005). Absent or delayed adrenarche in Pit-1/POU1F1 deficiency. Hormone Research, 64 (4): 175-179.

Tanaka, M.; Yamamoto, I.; Ohkubo, T.; Wakita, M.; Hoshino, S. and Nakashima, K. (1999). cDNA cloning and developmental alterations in gene expression of the two Pit-1/GHF-1 transcription factors in the chicken pituitary. General and Comparative Endocrinology, 114 (3): 441-448.

Tatsumi, K.; Notomi, T.; Amino, N. and Miyai, K. (1992). Nucleotide sequence of the complementary DNA for human Pit-1/GHF-1. Biochimica et Biophysica Acta, 1129 (2): 231-234.

Van, A.; Buys, N.; Onagbesan, O. and Decuypere, E. (2000). Complementary DNA cloning and ontogenic expression of pituitary-specific transcription factor of chickens (Gallus domesticus) from the pituitary gland. General and Comparative Endocrinology, 120 (2): 127-136.

Yamada, S.; Hata, J. and Yamashita, S. (1993). Molecular cloning of fish Pit-1 cDNA and its functional binding to promoter of gene expressed in the pituitary The Journal of Biological Chemistry, 268 (32): 24361-24366.

Yeh, C.; Boyle, T. and Yang, R. (1999). Popgene version 1.31. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University Alberta. Canada.

Yu, T. P.; Tuggle, C. K.; Schmitz, C. B. and Rothschild, M. F. (1995). Association of Pit1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. Journal of Animal Science, 75 (3): 1282-1288.

Zhao, W.; Zhao, R.; Qiao, N.; Xu, Q.; Huang, Z.; Zhang, H.; et al. (2011). Association of 5-Flanking region of Pit-1 gene polymorphisms with growth traits in goose. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10 (5): 651-655.

Zwierzchowski, L.; Oprzadek, J.; Dymnicki, E. and Dzierzbicki, P. (2001). An association of growth hormone, kappa-casein, beta-lactoglobulin, leptin and Pit-1 loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. Animal Science Papers and Reports, 19 (1): 165-177.

Detection of polymorphism of Pit1 gene exon 6 in West Azerbaijan native chickens using PCR-SSCP technique

Borumand, J.[1]; Hashemi, A.[2]; Mardani, K.[3] and Ghaderzadeh, M.[4]

Received: 22.08.2012 Accepted: 1.05.2013

Abstract

Somatotropical genes are as transcription factors that have crucial role in chicken growth. Pit1 gene is a pituitary specific transcription factor that has major roles on the differentiation of anterior pituitary and the regulation of the prolactin, growth hormone and thyroid-stimulating hormone-β genes. Pit1 gene is regarded as a key candidate gene for productive traits of chickens. This study was conducted to determine the polymorphism of Pit1 gene exon 6 of west Azerbaijan native chickens using Polymerase chain reaction - Single-strand conformation polymorphism. Blood samples were randomly collected from 100 birds and DNA was extracted from the blood samples. Exon 6 of Pit1 gene encompassing 179 bp was amplified. The PCR products were electrophoresed in 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Based on SSCP analyze of PCR products, three genotypes including AA, AB and BB were identified. The genotypes in this locus deviated from Hardy-Weinberg equilibrium. Shanon index, Nie index and observed heterozygosity were 0.59, 1.67 and 0.32 respectively. On the basis of obtained results it was revealed that the Pit1 gene had high degree of polymorphism which can be considered for future breeding programs.

Key words: Polymorphism, West Azerbaijan native chickens, PCR-SSCP

1- MSc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
2- Assistant Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
3- Associate Professor Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University
4- MSc. Graduated from Faculty of Agriculture, Urmia University
Corresponding Author: Ghaderzadeh, M., E-mail: mg.mahabad1365@gmail.com