مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تجزیه و تحلیل توالی ناحیه اینترون ۵ ژن PIT-1 در مرغان گوشتی لاین آرین

امین شهابی[1]، مسعود علی پناه[2]، آرزو محمدهاشمی[1]، زهرا رودباری*[1]

[1]دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[2]دانشیار، دانشگاه تربت حیدریه.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۰۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۱۲

چکیده

توالی یابی و تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده یکی از بهترین و رایج ترین روش‌ها در مطالعات تنوع ژنتیکی می باشد. ژن PIT-1 به نام فاکتور ۱ ژن هورمون رشد معروف است. این ژن عضوی از خانواده فاکتورهای نسخه برداری است و در طیور روی کروموزوم ۱ با طول تقریباً ۱٤kb قرار دارد و دارای ۷ اگزون و ۵ اینترون می باشد. هدف از انجام این پژوهش تجزیه و تحلیل توالی **ناحیه اینترون ۵** ژن PIT-1 در مرغان گوشتی لاین آرین و ترسیم درخت فیلوژنی آن با سایر نژادهای مرغ بود. برای انجام این پژوهش از ۷ قطعه مرغ از هر دو جنس مرغان گوشتی لاین آرین نمونه خون جمع آوری شد . پس از استخراج DNA، ژن مورد نظر توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر و قطعات تکثیر شده پس از خالص سازی به صورت رفت و برگشت توالی یابی شدند. تعداد ۵ هاپلوتیپ مختلف بر اساس ٦ نوکلئوتید چند شکل موجود در توالی ها تعیین گردید و توالی های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ با طول تقریبی ۲٦۰ جفت باز که شامل ۲۱/۹۲ درصد آدنین، ۱۸/۰۸ درصد گوانین، ۳۲/٦۹ درصد سیتوزین،۲۷/۳۱ درصد تیمین بود. پس از اطمینان از صحت توالی یابی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن با شماره های دسترسی JQ946630-JQ946636 ثبت شدند. پس از اخذ توالی های مشابه ژن PIT-1 دیگر نژادهای موجود در بانک جهانی ژن درخت فیلوژنی با استفاده از آنها ترسیم شد. نتایج فیلوژنی مشخص کرد که مرغ آرین ایران با مرغان آمریکایی در یک گروه قرار دارند.

واژگان کلیدی: *فیلوژنی، ژن PIT-1، مرغان گوشتی ، توالی یابی*

* نویسنده مسئول: زهرا رودباری تلفن: ۰۳٤٤۳۲٦۰۸٤۱ Email:rodbari.zahra@gmail.com

مقدمه

از اوایل قرن بیستم جمعیت جهان روندی رو به افزایش داشته و تأمین نیازهای خوراکی به خصوص پروتئین حیوانی در جیره های غذایی خصوصاً در کشورهای در حال توسعه به مشکل پیچیده ای تبدیل شده است. نگهداری و پرورش مرغ در ایران به منظور تامین گوشت و تخم مرغ از سابقه طولانی برخوردار است. برای سال‌های زیادی متخصصین اصلاح نژاد ساختار ژنتیکی حیوانات را از طریق انتخاب فنوتیپی و بدون اینکه اطلاعاتی در مورد ژنهای انفرادی داشته باشند تغییر دادند (Groenen *et al*., 2000). در بین نشانگرهای ژنتیکی توالی یابی یکی از بهترین و رایج‌ترین روش‌ها در مطالعات تنوع ژنتیکی است که راهکاری مفید برای حفظ ذخایر ژنتیکی می باشد (Hiendleder *et al*., 2002).

ژن PIT-1[1] که با نام فاکتور ۱ ژن هورمون رشد معروف است و در بسیاری از موجودات اعم از پرندگان، ماهی، انسان و سایر پستانداران شناسایی شده است، عضوی از خانواده فاکتورهای نسخه برداری است و به نام های Pou1f1 و GHF1 نیز معروف است و در طیور روی کروموزوم ۱ با طول تقریباً ۱٤kb قرار دارد (Nie *et al*., 2008). این ژن در طیور و ماهی دارای ۷ اگزون و ۵ اینترون می باشد، اما در پستانداران ٦ اگزون و ۵ اینترون دارد. (Nie *et al.*, 2008; Parmentier *et al*., 1999). تجزیه و تحلیل مولکولی جمعیتی از مرغ بومی مازنداران با استفاده از توالی ناحیه HVR-I ژنوم میتوکندری انجام شده است و توالی این ناحیه از ژنوم مرغ در بانک جهان ژن ثبت شده و گزارش کردند که مرغ بومی مازندران با مرغ های نژاد پلیموتراک، ابریشمی، جنگلی خاکستری، مرندی،لگهورن سفید و بومی کشور آذربایجان در یک دسته قرار دارند (Pirani *et al* 2009). هدف از این پژوهش تعیین توالی ناحیه اینترون ۵ ژن PIT-1 در مرغان گوشتی نژاد آرین و مقایسه توالی ژن PIT-1 در این نژاد با نژادهای دیگر مرغان برای بررسی میزان تنوع ایجاد شده بود. همچنین با ثبت توالی این ژن در بانک جهانی کمکی به معرفی این نژاد به انجمن های بین المللی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق خطوط پدری و مادری لاین گوشتی آرین که در آنها بر روی صفات مختلف تولیدی و تولیدمثلی انتخاب انجام شده است (خط A و B: برای صفت رشد و ضریب تبدیل غذائی، خط C و D: برای صفات تولید مثلی) مورد مطالعه قرار گرفت. به این منظور تعداد ۷ پرنده نر و ماده از چهار خط پدری و مادری با شرایط پرورش یکسان به طور تصادفی انتخاب شدند. در جمعیت مورد مطالعه، خونگیری از سیاهرگ ناحیه مثلثی زیر بال انجام گرفت. نمونه های خون در میکروتیوپ های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه شده و در داخل یخ به

[1]- pituitary-specific transcription factor

آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انتقال داده شد. در طی مدت استخراج DNA، نمونه ها در آزمایشگاه در دمای ٢٠- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه های خون کامل به روش بهینه شده و تغییر یافتهٔ استخراج نمکی انجام گردید (Javanrouh *et al* ., 2006). کمیت و کیفیت نمونه های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر-نانودراپ (Nano-Drop2000) بررسی گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش شامل یک جفت آغازگر بود (Nie *et al*., 2008) ، که توسط شرکت ژن فن آوران سنتز گردیده شد. توالی آغازگرهای های مورد استفاده در این پژوهش به صورت زیر بود:

Forward 5´- GGA CCC TCT CTA ACA GCT CTC- 3´
Reverse 5´- GGG AAG AAT ACA GGG AAA GG- 3´

واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ٥٩٩ جفت بازی ناحیه اینترون ٥ ژن PIT-1 توسط دستگاه ترموسایکلر براساس روش استاندارد انجام شد. اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر و غلظت مواد به شرح زیر بود:

١ واحد mM Tris-HCL(PH 8.8)100، آنزیم Taq پلیمراز، ٠/٢mM از هر dNtp، ١/٥mM از $MgCl_2$، ٥ pmol از پرایمر اختصاصی ژن و ١٠٠ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی واسرشت سازی در دمای ٩٤ درجه سانتیگراد برای ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای ٦١درجه برای ٤٥ ثانیه، تکثیر در دمای ٧٢ درجه برای ٦٠ ثانیه، یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ٩٤ درجه سانتیگراد برای ٣ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ٧٢ درجه برای ٥ دقیقه در ٣٥ سیکل تکثیر شد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز٢درصد و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید صورت گرفت.جهت تجزیه و تحلیل توالی های بدست آمده از برنامه های نرم افزاری Bio 7 Edit، Sequin ، MEGA 5 وArlequin3.5 استفاده شد. جهت تعیین بالاترین همولوژی توالی مرغ آرین از رویه BLAST تحت پایگاه NCBI استفاده گردید و جهت بررسی کیفیت توالی های بدست آمده از برنامه BioEdit7 (Hall,1999) استفاده شد و توالی ها توسط نرم افزار BioEdit7 ویرایش شده و به صورت رشته توافقی ٢٦٠ جفت بازی در آمدند. کلیه توالی های مربوط مرغان گوشتی لاین آرین توسط نرم افزار MEGA 5 (Tamura *et al*., 2011) در یک فایل ادغام و پس از همردیف کردن توالی های بدست آمده، نوکلئوتیدهای جایگزین، حذف و یا اضافه شده تعیین و هاپلوتیپ ها نیز مشخص شدند. تنوع هاپلوتیپی (هتروزیگوسیتی) و تنوع نوکلئوتیدی به ترتیب با استفاده از روابط (١-١) (١-٢) و توسط نرم افزار Arlequin3 (Excoffier *et al*., 2005) محاسبه شد و به منظور انجام مقایسات فیلوژنی از توالی ژن PIT-1 چندین نژاد مختلف مرغ موجود در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن استفاده شد و در نهایت درخت فیلوژنی توالی

مرغ آرین ایران با سایر نژادها توسط رویه NJ[2] بر پایه ML[3] به کمک نرم افزار MEGA 5 (Tamura *et al*., 2011) رسم گردید. توالی های نهایی بدست آمده از هر هاپلوتیپ با طول تقریبی۲٦۰ جفت باز با استفاده از نرم افزار Sequin پس از اطمینان از صحت توالی یابی در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن با شماره های دسترسی JQ946630-JQ946636 ثبت شدند.

رابطه (۱-۱)

$$h = \frac{N}{N-1}\sum_i X^2$$

رابطه(۱-۲)

$$\pi = \sum_{ij} XiXj\pi ij = \sum_{i=1} n \sum_j^i XiXj\pi ij$$

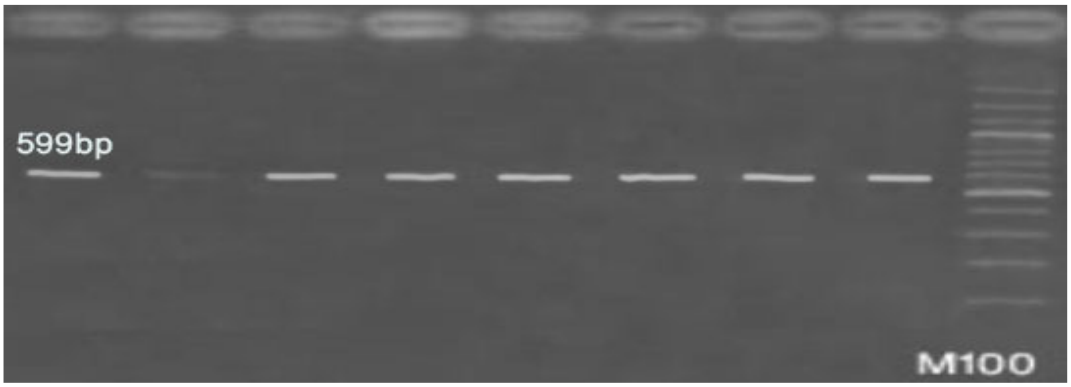
نتایج و بحث

تکثیر قطعه ۵۹۹ جفت بازی از ژن PIT-1 به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت. با استفاده از برنامه حرارتی مناسب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط آزمایشگاهی قطعه ۵۹۹ جفت بازی بدون قطعات غیر اختصاصی بدست آمد که با نتایج (Nei *et al*., 2008) مطابقت داشت.

توالی یابی در ۷ نمونه به خوبی انجام گرفت و قطعه ۵۹۹ بدست آمده از توالی یابی، ویرایش و قطعه ۲٦۰ جفت بازی در همه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند که ترکیب آن از ۲۱/۹۲ درصد آدنین(A)، ۱۸/۰۸ درصد گوانین(G)، ۳۲/٦۹ درصد سیتوزین(C)،۲۷/۳۱ درصد تیمین(T) تشکیل شده و بیشترین تغییرات نوکلئوتیدی در آن ناحیه قرار داشتند. تعداد ۵ هاپلوتیپ از بین توالی های مورد بررسی تعیین شدند که دارای ٦ جایگاه چند شکل[4] بودند. از بین ٦جایگاه چند شکل حاصله، ٤ جایگاه جهش جانشینی که حاصل تبدیل به نوکلئوتید دیگر[5] بود و در دو جایگاه هم حذف نوکلئوتیدی[6] رخ داده بود. این تغییرات به طور عمده از نوکلئوتید ۲۵ تا ۲۱۳ مشاهده شدند. ویژگی های نمونه های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است. نتایج جایگزینی نوکلئوتیدها در این پژوهش از نسبت جهش ها در میان چهار نوکلئوتید موجود در ساختمان DNA که توسط (Li *et al*., 1984) گزارش شده پیروی می کند. تعدادی از جایگاههای چندشکل مشاهده شده در این پژوهش هم از نظر محل و هم از نظر نوع جایگزینی مطابق با گزارش (Nei *et al*., 2008) در رابطه با مرغان چینی بود. این مشابهت می تواند دلیلی بر صحت توالی های بدست آمده و همچنین وجود جد و یا اجداد مشترک بین جمعیت های مورد بررسی باشد.

[2]- Neighbor- Joining
[3]- Maximum Likelihood

[4] Single Nucleotide Polymorphism
[5] Transversion
[6] Deletion



شکل ١- الکتروفورز محصولات PCR به طول٥٩٩ جفت باز روی ژل آگارز دو درصد.

Figure 1- Electrophoresis of 599 bp PCR Products on 2% Agarose gel.

جدول ١- SNPهای به دست آمده برای هاپلوتیپ های مرغان لاین آرین.

Table 1- SNP position of Arian line chicken haplotypes.

هاپلوتیپ Haplotype	فراوانی frequency	درصد فراوانی Frequency Percentage	موقعیت SNP SNP Position					
			25	43	54	193	212	213
1	1	14.286	T	T	T	G	T	T
2	3	42.856	A	.	G	.	.	.
2	1	14.286	A	.	G	.	deletion	G
4	1	14.286	A	G	G	.	.	.
5	1	14.286	A	.	G	deletion	.	.

از آنجائیکه تعداد جایگاهای چند شکل به تعداد نمونه وابسته می باشند، لذا از پارامتر دیگر یعنی تنوع نوکلئوتیدی (π) یا هتروزیگوسیتی در سطح نوکلئوتید استفاده شد که به طول DNA و اندازه نمونه بستگی ندارد و عبارت از متوسط تفاوت نوکلئوتیدی بین دو توالی در هر جایگاه می باشد (Nei and Kumar, 2000). تنوع نوکلئوتیدی (π) در جمعیت مرغان گوشتی آرین ٠/٠٠٥ تخمین زده شد. مقدار تنوع نوکلئوتیدی حاضر در محدوده مقداری است (٠/٠١٩-٠/٠٠٢) که برای موجودا یوکاریوت ذکر شده است (Nei and Kumar, 2000). مقدار تنوع هاپلوتیپی در جمعیت حاضر ٠/٨١ برآورد شد که نشان از تنوع متوسط و پایین در این جمعیت دارد. فراوانی نسبی نوکلئوتیدها در توالی تک رشته ناحیه اینترون٥ ژن PIT-1 و توالی کلی[7]

[7] Consensos

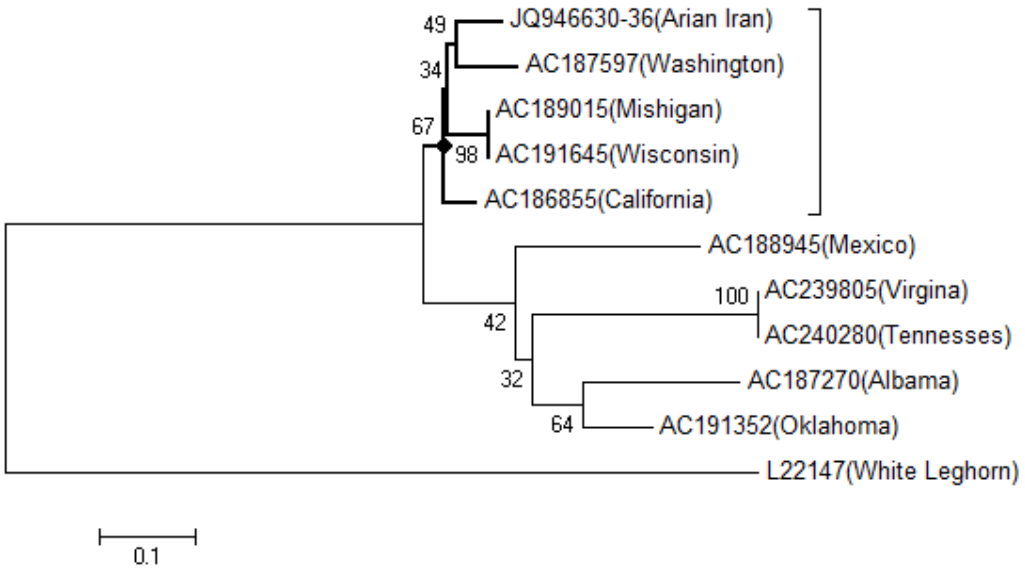
مرغ آرین به طول ۲۶۰ نوکلئوتید در جدول ۳ آورده شده است.

با توجه به اینکه در اواخر دهه پنجاه یک شرکت خارجی اقدام به انتقال اولین گله‌های لاین به ایران کرد، همانطور که انتظار می رفت مرغان گوشتی لاین آرین ایران قرابت ژنتیکی بسیار نزدیکی با مرغان واشنگتون نشان دادند و همچنین با مرغان واشنگتون ، میشیگان، ویسکانسین و کالیفرنیا در یک گروه قرار دارند که این نشان دهنده داشتن جد مشترک با مرغان آمریکایی می باشد اما با مرغان لگهورن سفید هیچ شباهتی ندارند و در یک شاخه جداگانه قرار گرفته اند و بیشترین فاصله ژنتیکی را با این نژاد دارند (شکل ۳). در نهایت توالی های بدست آمده از این منطقه با طول ۲۶۰ جفت باز برای اولین بار در بانک ژن با کدهای دسترسی JQ946636 -JQ946630 ثبت شدند.

جدول ۳- تعدا هاپلوتیپ، درصد فراوانی نسبی نوکلئوتیدها، تنوع نوکلئوتیدی و هاپلوئیدی ژن PIT-1 در مرغان لاین آرین.

Table 3- Number of haplotypes, nucleotides relative frequency percentage, nucleotide and haplotype diversities of Arian line chickens.

		درصد فراوانی نوکلئوتیدی **Nucleotides Relative Frequency Percentage**							
جمعیت Population	تعداد هاپلوتیپ Number of Haplotype	A+T	G+C	A	T	G	C	تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide Diversity	تنوع هاپلوتیپی Haplotype Diversity
مرغ آرین Arian Chicken	5	49.23	50.77	21.92	27.30	18.08	32.69	0.005	0.81



شکل ٣- نمودار فیلوژنی (نمودار درختیNJ) براساس توالی بدست آمده از ناحیه اینترون ٥ ژن PIT-1 مرغ آرین و سایر توالی های این ناحیه موجود در بانک جهانی ژن به همراه کد دسترسی آنها. اعداد روی گره مربوط به درصد مشابهت درون گروهی حاصل از ١٠٠٠ مرتبه نمونه گیری می باشد.

Figure 3- Phylogenetic Tree (NJ) based on intron region sequence of PIT-1 gene of Arian chicken and other sequences of this region are taken from GenBank along with their accession number. The number at the nods represented the percentage bootstrap values for interior branches after 1000 replications.

منابع

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.

Groenen MA, Cheng HH, Bumstead N, Benkel BF, Briles WE, Burke T, Burt DW, Crittenden LB, Dodgson J, Hillel J, Lamont S, Ponce de Leon A, Soller M, Takahashi H, Vignal A. (2000). A consensus linkage map of the chicken genome. Genome Research 10: 137–147.

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Serise 41: 95-98.

Hiendleder S, Kaupe B, Janke A (2002). Molecular analysis of wild and domestic sheep questions curret nomenclature and provides evidence for domestication from tow different subspecies. Royal society 269: 893-904.

Javanrouh A, Banabazi M.H, Esmaeilkhanian S, Amirinia C, Seyedabadi H.R, Emrani H. (2006). Optimization onsalting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Antalya, Turkey.

Li WH, Wu CI, Luo CC (1984). Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. Journal of Molecular Evolution 21: 58-71.

Nei M, Kumar S (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nie Q, Fang M, Xi L, Zhou M, zhang X (2008). The PIT-1 Gene Polymorphisms were associated with Chicken Growth Traits. BMC GENETIC 9: 20 – 39.

Parmentier I, Portelle D, Gengler N, Prandi A, Bertozzi C, Vleurick L, Gilson R (1999). Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. Domestic Animal Endocrinology 17: 139- 148.

Pirani N, Mohammadhashemi A, Alijani S, Rezazadeh Goli R, Ghanbari S (2009). Molecular Analysis of Mazandrani native chicken population based on HVR-I region of Mitochondrial DNA. Journal of Agriculture Biotecnology 2:53-65.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Analysis region of intron 5 sequence of PIT-1 gene in broiler chickens Arian line

Shahabi A.[1], Alipanah M.[2], Mohammadhashemi A.[1], Roudbari Z.[*1]

[1] Ph.D Student , Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
[2] Associate Professor, Torbat Heydarieh.

Abstract

Sequencing and analysis of the data obtained are best and most common methods in studies of genetic diversity. PIT-1gene is known as growth hormone IGF-1 gene .this gene is a member of family of transcription factors in the poultry is located on chromosome 1, with a length of approximately 14 kb. This gene has seven exons and five introns in poultry. The purpose of this study was analysis region of intron 5 sequence of PIT-1 gene in broiler chickens Arian lines and determining its phylogenetic relationship with other chicken breeds. For this study, blood samples were collected of seven broiler chickens of both sex Arian lines. After extracting DNA from them, target gene was amplified with specific primers and after purification was sequenced. Five different haplotypes were determined based on six single nucleotide polymorphism sequence and the final sequences of each haplotype with length approximate 260 bp which includes 21/92 % adenine, 18/8 % guanine, 32/69 % cytosine and 27/31 % thymine. After ensuring the accuracy of sequencing, submitted to gene bank database (NCBI) with accession number of JQ946630- JQ946636.The phylogenic tree was drawn with consensus sequence of PIT-1 gene of Arian line chicken and other similar sequences of different chicken breeds obtained from gene bank. Results the phylogeny indicated that Arian line chicken and American Chickens are on a lineages

Key Words: *Phylogeny, PIT-1 Gene, Broiler Chickens, Sequencing.*

[*] Corresponding Author: Roudbari Z. Tel: 03443260841 Email: rodbari.zahra@gmail.com