بررسی چندشکلی ناحیه‌ی اینترون چهارم و اگزون پنجم ژن گرلین برخی توده‌های مرغان بومی خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP

سعید رضایی‌یزدآبادی[۱*]، هدایت‌اله روشنفکر[۲]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۳] و جمال فیاضی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۶

چکیده

گرلین یک پپتید تحریک کننده‌ی هورمون رشد است که در طیور متشکل از ۲۶ اسیدآمینه بوده و نقش مهمی در تعادل انرژی، چاقی و رفتار دریافت غذا ایفا می‌کند. این پپتید باعث افزایش اشتها و اکتساب وزن می‌شود. تحقیق حاضر به منظور شناسایی چندشکلی موجود در ناحیه‌ی اینترون چهارم و اگزون پنجم ژن گرلین مرغان بومی استان خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP انجام شد. برای این منظور از تعداد ۱۰۰ قطعه مرغ بومی ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی نهاده‌های دامی جهاد استان خوزستان به صورت تصادفی خون‌گیری انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌ی خون با کمک روش نمکی انجام گرفت. سپس، برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از نانودراپ و ژل آگارز یک درصد استفاده شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعه‌ی ۲۲۸ جفت بازی از ناحیه‌ی اینترون چهارم و اگزون پنجم به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر شد. در نهایت نمونه‌های تکثیر شده با کمک آنزیم HaeIII مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند که پس از هضم قطعات ۱۷۳ و ۵۵ مشاهده شد. نتایج نشان داد که در تمامی نمونه‌ها بعد از هضم آنزیمی، تنها یک شکل باندی وجود داشت. لذا با توجه به یکسان بودن ژنوتیپ نمونه‌های بررسی شده در این تحقیق هیچ جهشی مورد تأیید قرار نگرفت. عدم مشاهده‌ی چندشکلی احتمالاً می‌تواند به علت بسته بودن محیط پرورش و کوچک بودن تعداد نمونه‌های بررسی شده باشد.

کلمات کلیدی: مرغ بومی خوزستان، ژن گرلین، PCR-RFLP

مقدمه

افزایش جمعیت کشور از یک سو و نیاز این جمعیت انبوه به غذا و پروتئین حیوانی از سوی دیگر متخصصان را بر آن داشته است تا به فکر تدوین برنامه‌های مدون در راستای تأمین این نیازها باشند. اصلاح نژاد طیور بومی کشور با توجه به سازگاری آن‌ها با محیط و شرایط اقلیمی کشور زمینه‌ی بسیار مناسب و مقرون به صرفه‌ای جهت سرمایه‌گذاری در این بخش فراهم آورده است (ترکاشوند ۱۳۸۴). لیگاندی که به طور عمده از معده و از سلول‌های غده‌ی اکسینتیک موکوس فوندوس ترشح شده و باعث ترشح هورمون رشد هم می‌گردد، در سال ۱۹۹۹ شناسایی و گرلین (Ghrelin) نامیده شد (Ariyasu et al. 2001, Kojima et al. 1999). گرلین یک هورمون پپتیدی (۲۸ اسید آمینه) است که جایگاه سه سرین آن توسط یک اسید چرب تعدیل می‌گردد. این تعدیل برای عبور از سد خون-مغز و فعالیت آن و همچنین برای تحریک ترشح هورمون رشد از طریق فعال کردن گیرنده‌ی ویژه (GHs-Rs)

[۱*] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

E-mail: rezaeisaeed64@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

[۳] استاد گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

Growth hormone secretagogue receptors واقع در هیپوفیز ضروری است (Miller et al. 1988, Murphy and Bloom 2006). گرلین مصرف غذا را افزایش داده و اشتها را زیاد می‌کند و غلظت آن قبل از غذا زیاد و بعد از آن کم می‌شود (Kojima and Kangawa 2005, Drazen and woods 2003, Cummings et al. 2001, Tschöp et al. 2001). مطالعات نشان داد که سطح سرمی گرلین در برخی شرایط تغذیه‌ای و تعادل انرژی تغییر می‌کند. در حقیقت سطح سرمی گرلین در شرایط تعادل مثبت انرژی کاهش و در شرایط تعادل منفی انرژی افزایش می‌یابد (Ariyasu et al. 2001, Nakazato et al. 2001). ژن این هورمون جزء کاندیدای چاقی در انسان نیز هست. بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که گرلین اثرات زیادی در ترشح هورمون رشد، قدرت ماندگاری، ازدیاد سلول و تنظیم مصرف خوراک دارد (Kojima and Kangawa 2005). این هورمون از یک پیش هورمون ۱۱۷ اسیدآمینه‌ای به نام پروپروگرلین جدا شد (Paul et al. 2005, Seim et al. 2009). گرلین مرغی برای اولین بار توسط Kaiya و همکاران در سال ۲۰۰۲ کلون شده و نشان داده شده که پیش‌ماده‌ی این هورمون در مرغ دارای ۱۱۶ اسیدآمینه است که از آن پپتید ۲۶ اسیدآمینه‌های بالغ جدا می‌شود. ژن گرلین در مرغ روی کروموزوم شماره‌ی ۱۲ قرار داشته و از چهار اینترون و پنج اگزون تشکیل شده به طوری که اولین اگزون آن هیچ اسیدآمینه‌ای را کد نمی‌کند (Kaiya et al. 2002). بررسی توالی کامل ژن گرلین نشان داده که در کل توالی ژن گرلین ۱۹ چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی وجود دارد که بیش‌تر آن‌ها روی جایگاه اینترون چهارم این ژن واقع شده‌اند (Nie et al. 2004). Li و همکاران ۲۰۰۶ با بررسی جایگاه‌های متفاوت از ژن گرلین در ۱۲ نژاد مرغ بومی، آلل‌ها و ژنوتیپ‌های متفاوتی را در این ژن شناسایی کردند. قادرزاده و همکاران ۱۳۹۲ با بررسی اینترون سوم و چهارم ژن گرلین مشاهده کردند که اینترون سوم دارای سه نوع آلل A، B و D می‌باشد و اینترون چهارم این ژن شامل آلل A و B می‌باشد. در پژوهشی که شریفی‌نژاد و همکاران ۱۳۹۳ روی اینترون چهارم ژن گرلین در جوجه‌های گوشتی انجام دادند هشت الگوی ژنوتیپی مشاهده نمودند.

فلاحتی و همکاران ۱۳۹۰ سه ناحیه از این ژن را مورد بررسی قرار دادند که در اگزون (۱ و ۲) سه نوع آلل مشاهده و همچنین در ناحیه‌ی اینترون سوم یک نوع آلل و در ناحیه‌ی اینترون چهارم و اگزون پنجم این ژن دو نوع آلل مشاهده نمودند. با توجه به این که در پژوهش-های گذشته شکل‌های مختلف آللی و ژنوتیپی از ژن گرلین در طیور شناسایی و بررسی شد، لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی مولکولی چندشکلی نواحی اینترون چهارم و اگزون پنجم ژن گرلین مرغان بومی خوزستان و شناسایی شکل‌های مختلف آللی و ژنوتیپی با استفاده از روش RFLP مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بود.

مواد و روش کار

در این پژوهش از ۱۰۰ قطعه پرنده‌ی ایستگاه تکثیر و اصلاح نژاد مرغ بومی نهاده‌های دامی جهاد کشاورزی استان خوزستان، واقع در شهرستان باوی خون‌گیری شد. خون‌گیری از ورید زیر بال مرغ‌ها با سرنگ ۲ میلی‌لیتری صورت گرفت. جهت جلوگیری از انعقاد لوله‌های حاوی EDTA استفاده شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از خون‌گیری در فلاسک یخ نگهداری و سپس به آزمایشگاه انتقال داده و تا زمان استخراج DNA ژنومی در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA از خون کامل پس از تغییر و بهینه-سازی روش استخراج نمکی میلر و همکاران ۱۹۹۸ به شرح زیر انجام شد: مقدار ۳ سی‌سی خون کامل داخل لوله‌ای پلاستیکی موسوم به فالکون ریخته شد. دو برابر حجم خون، بافر جدا کننده (Triton X-100 1%، 10mM Tris-HCl pH=7.5، 0.32 M Sucrose، 5 mM $MgCl_2$) اضافه گردید و سپس ورتکس شد. محلول فوق به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل

Biometrra GMBH ساخت کشور آلمان) شد. مایع رویی به آرامی جدا و رسوب حاصله نگه داشته شد. سه میلی‌لیتر بافر جداکننده به رسوب حاصله اضافه و عمل سانتریفیوژ و جداسازی رسوب تکرار شد تا زمانی‌که یک رسوب کاملاً سفید حاصل شد. سه میلی‌لیتر بافر لیزکننده (10mM Tris-HCl pH=8.2، 400mM NaCl و 2mM Na_2EDTA) اضافه و به خوبی ورتکس شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر SDS[1] ده درصد و ۱۰ میکرولیتر آنزیم پروتئیناز K[2] (با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول حاصله اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در حمام آب گرم (بن ماری) قرار داده شد تا هضم محتویات گلبول‌های سفید کامل گردد. یک میلی‌لیتر محلول NaCl اشباع (۴ مولار) به محلول اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد. محلول مزبور به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل Biometrra GMBH ساخت کشور آلمان) شد. هم حجم محلول، کلروفرم اضافه شد و با تکان دادن با محلول مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آبی که در بالای لوله‌ها تشکیل شد حاوی DNA بود که با احتیاط به لوله‌ی پلاستیکی جدیدی انتقال داده شد. به اندازه‌ی ۰/۱ حجم محلول استات سدیم ۳ مولار (pH=5.2) اضافه شد. دو برابر حجم محلول به دست آمده، اتانول مطلق اضافه شد و لوله‌ی پلاستیکی به آرامی تکان داده شد تا رشته DNA تشکیل گردد. کلاف DNA با میله‌ی شیشه‌ای که دارای بار مثبت می‌باشد جمع‌آوری شد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در مجاورت هوا خشک شد. DNA حاصله دوبار با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و نهایتاً در ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر حل شد. تیوب‌های حاوی DNA، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا DNA به خوبی حل شود. سپس در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

در این پژوهش از آغازگرهای پیشنهادی توسط Li و همکاران ۲۰۰۶ برای تکثیر قطعه‌ی ۲۲۸ جفت بازی در هر دو ناحیه‌ی اینترون چهارم و اگزون پنجم استفاده شد. جفت آغازگرهای انتخابی توسط شرکت زیست فناوران رنا ساخته و ترتیب توالی آن‌ها به صورت زیر بود:

GhreF:5'-TATCTTTTGCCTTTTTAGAAACTTA-3'

GhreR:5'-GCCTACACGTCAGCCTGTGAT-3'

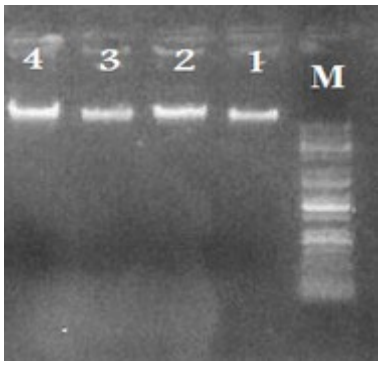
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۲ میکرولیتر از DNA (به غلظت ۲۰۰ نانوگرم)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰x)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت ۲۵mM)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (با غلظت ۱/۲۵mM)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگر (به غلظت ۱۰ پیکومول) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (با غلظت ۵ U/ µl) انجام شد.

قطعات تکثیر شده برای بررسی چندشکلی در جایگاه ۲۳۵۵ توسط آنزیم محدودگر HaeIII (BsuRI) تهیه شده از شرکت Fermentase هضم شدند. واکنش برش آنزیمی در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم ۱۰x، ۱ میکرولیتر از آنزیم برشی (با غلظت ۱۰ U/ µl) و ۱۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر آماده گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت ۱۳ ساعت مورد برش آنزیمی قرار گرفت. این آنزیم توالی ´۳ –GGCC–´۵ را در طول قطعه شناسایی کرده و محصول را در این ناحیه برش می‌دهد. محصول هضم آنزیمی به همراه ۱ میکرولیتر بافر بارگیری در چاهک ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری شد. ۱ میکرولیتر مارکر لدر نیز در کنار نمونه‌ها جهت بررسی استاندارد بودن طول قطعات بارگیری شدند.

1- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
2- Proteinase-K

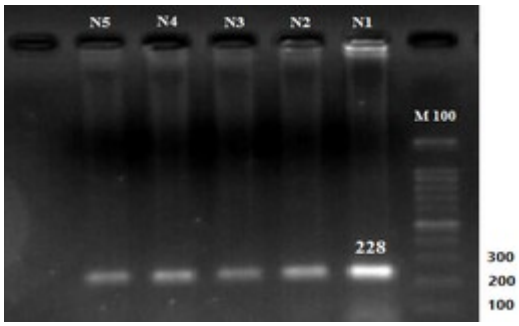
نتایج

نمونه‌های DNA استخراج شده از خون مرغان بومی استان خوزستان با استفاده از دستگاه نانودراپ (ThermoScientific, Nanodrop. 2000c, USA) و ژل آگارز یک درصد تعیین کمیت و کیفیت شدند. با توجه به ارزیابی دستگاه نانودراپ برای نمونه‌های دی. ان. اِی نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر برابر ۱/۸ قابل قبول است و زمانی که این غلظت پائین‌تر از ۱/۸ باشد عموماً نشان‌دهنده‌ی وجود آلودگی پروتئینی در نمونه می‌باشد و غلظت برای نسبت ۲۶۰ به ۲۳۰ باید کم‌تر از ۲/۴ باشد و زمانی که این نسبت پایین‌تر باشد نشان‌دهنده‌ی آلودگی به پلی‌ساکارئیدها می‌باشد. با توجه به این که نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ ارزیابی شد و تمام نمونه‌ها از غلظت‌های قابل قبولی برخوردار بودند که نشان‌دهنده‌ی کمیت خوب نمونه‌ها می‌باشد. همچنین نمونه‌ها تعیین کیفیت شدند (شکل ۱) و با توجه به شکل دارای کیفیت خوب و مناسب برای ادامه‌ی مراحل پژوهش بودند.



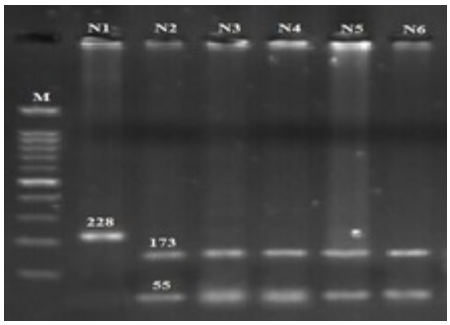
شکل ۱: شماره ۱ تا ۴ غلظت DNA استخراج شده روی ژل آگارز یک درصد

پس از انجام واکنش PCR، به منظور اطمینان از صحت قطعه‌ی تکثیر شده (۲۲۸ جفت باز)، اینترون ۴ و اگزون ۵ ژن گرلین از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (شکل ۲). با توجه به تصویر نمونه‌های پی.سی.آر شده روی ژل آگارز می‌توان گفت نمونه‌های مورد بررسی فاقد آلودگی و باند اضافه می‌باشند و برنامه‌ی دمایی برای تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر مناسب طراحی شده است (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج N_1 تا N_5 محصولات حاصل از PCR نمونه‌های مختلف

قطعات تکثیر شده‌ی ۲۲۸ جفت بازی در اثر هضم آنزیمی توسط آنزیم *HaeIII* به قطعات ۱۷۳ و ۵۵ جفت بازی تفکیک شدند. برای مشاهده‌ی قطعات هضم شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت زمان ۷۰ دقیقه استفاده شد. پس از عکس‌برداری با ژل داک (مدل UVITEC cambridge ساخت کشور فرانسه)، اندازه‌ی دقیق قطعه‌ی تکثیر شده با استفاده از نرم‌افزار Uvdoc ارزیابی شد (شکل ۳). محصولات آنزیمی تمامی نمونه‌های ژن گرلین تنها یک نوع ژنوتیپ BB را نشان دادند که حاکی از مونومورف بودن ژن گرلین در این جایگاه‌ها می‌باشد.



شکل ۳: N1 محصول PCR، N2 تا N6 نمونه‌های هضم شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک شده، M نشان‌گر اندازه (۱۰۰ bp)

بحث

Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ تحقیقی روی ۱۲ نژاد مرغ چینی و یک نژاد تجاری با استفاده از تکنیک RFLP،

انجام دادند و ۳ جایگاه برشی را بررسی کردند. در جایگاه ۲۳۵۵ (اینترون ۴ و اگزون ۵) قطعه‌ای با طول ۲۲۸ جفت باز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد که پس از هضم سه نوع ژنوتیپ AA، AG و GG مشخص شد که فراوانی ژنوتیپی AA بیش‌تر از ژنوتیپ‌های دیگر بود. در جایگاه ۱۲۱۵ (اینترون سوم) سه نوع ژنوتیپ AA، AG و GG مشخص شد که فراوانی ژنوتیپی AA حداکثر بود. فلاحتی و همکاران در سال ۱۳۹۰ در مورد چندشکلی ژن گرلین با استفاده از تکنیک PCR- RFLP روی مرغان بومی مازندران انجام دادند. در این پژوهش، توالی‌های آغازگر بر اساس مقاله Li و همکاران ۲۰۰۶ انتخاب شد. در این تحقیق سه جایگاه بررسی شد که در جایگاه ۷۱ (اگزون ۱ و ۲) سه نوع آلل C، B و T و چهار ژنوتیپ (TC، CC، TB و CB) شناسایی نمودند. همچنین در جایگاه ۲۳۵۵ (اینترون ۴ و اگزون ۵) که قطعه‌ای با طول ۲۲۸ جفت باز در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر نموده پس از هضم قطعه‌ی مورد نظر دو نوع آلل B و A و دو ژنوتیپ (AB و BB) را مشخص نمودند که در این جایگاه فراوانی ژنوتیپی BB بیش‌تر و حدود ۷۵ درصد بود و در جایگاه ۱۲۱۵ پس از بررسی یک نوع آلل و یک ژنوتیپ (AA) را مشخص نمودند. بر خلاف این تحقیقات در پژوهش حاضر، در جایگاه ۲۳۵۵ چند شکلی مشاهده نشد و همه‌ی نمونه‌ها مونومرف شدند که از دلایل مغایرت این پژوهش با تحقیقات گذشته می‌توان به تفاوت نژادی و محیط پرورش مرغان با سایر تحقیقات اشاره کرد. همچنین تعداد کم نمونه موجب عدم شناسایی جهش‌های احتمالی در این جایگاه شده باشد و می‌توان چنین بیان کرد که ممکن است در این جمعیت شدت انتخاب به نفع آلل B و ژنوتیپ BB بوده باشد. در تحقیق دیگری که به بررسی چندشکلی در ناحیه‌ی اینترون چهارم ژن گرلین با تکنیک PCR-SSCP صورت گرفت از نمونه‌های جوجه‌های گوشتی سویه‌ی راس و کاب استفاده شد که در این جایگاه هشت آلل و هشت ژنوتیپ (AA، AB، AC، AD، AE، AF، AG و AH) مشاهده شد، ژنوتیپ AA بیش-ترین فراوانی را نسبت به بقیه داشت (شریفی‌نژاد و همکاران ۱۳۹۳). همچنین در تحقیقی که به بررسی چند-شکلی روی اینترون چهارم ژن گرلین در مرغ بومی آذربایجان‌غربی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تکثیر قطعه‌ای با طول ۴۵۸ جفت باز صورت گرفت دو آل A و B و سه ژنوتیپ (AA، AB و BB) شناسایی شد (قادرزاده و همکاران ۱۳۹۱). در تحقیقی که به بررسی چندشکلی این ژن بر روی اینترون سوم در مرغ بومی آذربایجان غربی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP و تکثیر قطعه‌ای با طول ۴۱۷ جفت باز صورت گرفت سه آلل A، B و D و سه ژنوتیپ (AB، AA و AD) شناسایی شد (قادرزاده و همکاران ۱۳۹۱). نتایج پژوهش حاضر با نتایج شریفی‌نژاد و همکاران در سال ۱۳۹۳ و قادرزاده و همکاران ۱۳۹۱ مطابقت نداشت از دلایل عمده‌ی آن می-توان به تفاوت تکنیک‌ها اشاره داشت به این صورت که در تکنیک تفاوت فرم فضایی منفرد (SSCP) از آنزیم‌های محدود کننده استفاده نمی‌شود و DNA در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد واسرشته شده و سپس سریعاً روی یخ قرار می‌گیرد و برای شناسایی باندها از ژل عمودی استفاده می‌شود. در تکنیک RFLP محصولات پی‌سی‌آر در معرض هضم آنزیمی قرار گرفته و برای شناسایی باندها از ژل افقی استفاده شده و اندازه‌ی قطعات مشخص می‌شود. از جمله دلایل دیگر می‌توان به متفاوت بودن تعداد نمونه، جامعه و نژاد مورد مطالعه اشاره کرد. Li و همکاران در سال ۲۰۰۹ چندشکلی‌های اگزون ۳ ژن گرلین و ارتباط آن‌ها را با صفات رشد بدن در اردک نژاد Chaohu را با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی نمودند. یک جایگزینی تک نوکلئوتیدی (گوانین به جای آدنین) در موقعیت ۵۴ جفت بازی اگزون ۳ شناسایی و سه ژنوتیپ (AA، AB و BB) مشاهده کردند. مطالعات آماری نشان داد که جایگاه جهش یافته ارتباط معنی‌داری با وزن بدن، عمق قفسه‌ی سینه و عرض سینه دارد. He و همکاران در سال ۲۰۰۷ چندشکلی‌های جایگاه C2100T ژن گرلین

مرغی را در یک جمعیت شامل ۴۷۰ جوجه با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی نموده و در این پژوهش دو آلل T و C و همچنین سه ژنوتیپ (TT، TC و CC) را مشاهده نمودند. همچنین پژوهش‌هایی روی گاو صورت گرفته که در این پژوهش‌ها گیرنده‌ی ژن گرلین مورد بررسی قرار گرفته و چندین چندشکلی تک نوکلئوتیدی در نواحی مختلف شناسایی شد (Zhang et al. 2007). در تحقیقی دیگر روی گاو گوشتی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (A/G) در ژن گرلین شناسایی شده است (Sherman et al. 2008). بررسی ناحیه‌ی اگزون اول ژن گرلین در گوسفند بلوچی با استفاده از روش PCR-SSCP الگوهای یکسان ژنوتیپی را به صورت مونومورف نشان داد (طهمورث‌پور و همکاران ۱۳۸۸).

در پژوهش‌های مختلف روی ژن گرلین نتایج متفاوت، همچنین آلل‌ها و ژنوتیپ‌های گوناگونی مشاهده شد، که از جمله آن‌ها می‌توان به پژوهش Li و همکاران ۲۰۰۶ و پژوهش فلاحتی و همکاران ۱۳۹۰ اشاره نمود که هر کدام نتایج متفاوتی را نشان دادند. با توجه به متفاوت بودن نتایج گذشته و همچنین نتایجی که از این پژوهش به دست آمده از جمله دلایل عدم مغایرت نتایج با یکدیگر می‌توان به تفاوت نژادی، اندازه‌ی جمعیت و محیط پرورشی اشاره کرد، که اندازه‌ی جمعیت یکی از مهم‌ترین دلایل می‌باشد و باعث افزایش تلاقی خویشاوندی شده و یک جمعیت پلی‌مورف تبدیل به مونومورف می‌شود. با توجه به نتایج به دست آمده توصیه می‌شود در تحقیقات بعدی از تعداد نمونه‌ی بیش‌تری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدرانی خود را از سرکار خانم صدر مسئول آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رامین و مسئولان محترم مرکز اصلاح نژاد نهاده‌های دامی جهاد استان خوزستان به خاطر همکاری صمیمانه در اخذ نمونه‌های خون اعلام می‌دارند.

منابع

ترکاشوند، رضا (۱۳۸۴). مروری بر تحولات مرغ بومی ایران. مجموعه مقالات اولین همایش مرغ بومی کشور. موسسه تحقیقات علوم دامی کشور ، کرج.

شریفی‌نژاد، حامد؛ منتظرتربتی، محمدباقر و فرهنگ‌فر، همایون (۱۳۹۳). بررسی چندشکلی ژن گرلین و ارتباط آن با صفات رشد در جوجه‌های گوشتی سویه راس و کاب با استفاده از تکنیک PCR-SSCP، ششمین کنگره علوم دامی، دانشگاه تبریز.

طهمورث‌پور، مجتبی؛ طاهری، امیر؛ وفایی‌واله، مهدی و کریمی، داوود (۱۳۸۸). بررسی چندشکلی ژن گرلین با استفاده از روش PCR-SSCP در گوسفند بلوچی، ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

فلاحتی، فخرالدین؛ رحیمی میانجی، قدرت‌اله و فرهادی، امیر (۱۳۹۰). ارتباط چندشکلی ژن گرلین با صفات مرتبط با رشد در مرغان بومی مازندران، مجله ژنتیک نوین، دوره ۶، شماره ۳، صفحه ۴۷-۴۱.

قادرزاده، محمد؛ مردانی، کریم و هاشمی، علی (۱۳۹۲). مطالعه چندشکلی اینترون چهار ژن Ghrelin در مرغ بومی آذربایجان غربی با استفاده از روش PCR-SSCP، مجله ژنتیک نوین، دوره ۸، شماره ۴، صفحه ۴۱۰-۴۰۳.

قادرزاده، محمد؛ مردانی، کریم و هاشمی، علی (۱۳۹۱). تنوع آللی موجود در ناحیه اینترون سوم ژن گرلین مرغ بومی آذربایجان غربی، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۹۴، صفحه ۵۰-۴۵.

Ariyasu, H.; Takaya, K.; Tagami, T.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Akamizu, T. et al. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in human. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86: 4753-4758.

Cummings, D.E.; Purnell, J.Q.; Frayo, R.S.; Schmidova, K.; Wisse, B.E. and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes, 50(8): 1714-1719.

Drazen, D.L. and Woods, S.C. (2003). Peripheral signals in the control of satiety and hunger. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 6(6): 621-629.

He, D.; Fang, M.; Nie, Q.; Peng, J.; Deng, Y. and Zhang, X. (2007). Association of ghrelin gene C2100T polymorphism with chicken growth and fat traits Guangdong Agricultural Sciences, 4.

Kaiya, H.; Van der Geyten, S.; Kojima, M.; Hosoda, H.; Kitajima,Y. and Matsumoto, M. (2002). Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. Endocrinology, 143(9): 3454-3463.

Kojima, M. and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. Physiological Reviews, 85: 495-522.

Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H. and Langawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature, 402 (6762): 656-660.

Li, C.C.; Li, K.; Li, J.; Mo, D.L.; Xu, R.F.; Chen, G.H. et al. (2006). Polymorphism of ghrelin gene in twelve Chinese indigenous chicken breeds and its relationship with chicken growth traits. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 19: 153-159.

Li, H.F.; Zhu, W.Q.; Xu, W.J.; Song, W.T.; Gao, Y. and Chen, K.W. (2009). Single Nucleotide Polymorphism Analysis of duck ghrelin gene. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 25(3): 576-582.

Miller, S.A.; Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16(3): 1215-1219.

Murphy, K.G. and Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. Nature, 444(7121): 854-859.

Nakazato, M.; Murakami, N.; Date, Y.; Kojima, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. et al. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature, 409: 194-198.

Nie, Q.; Zeng, H.; Lei, M.; Ishag, N.; Fang, M. and Sun, B. (2004). Genomic organisation of the chicken ghrelin gene and its single nucleotide polymorphisms detected by denaturing high-performance liquid chromatography. British Poultry Science, 45(5): 611-618.

Paul, D.R.; Kramer, M.; Rhodes, D.G. and Rumpler, W.V. (2005). Preprandial ghrelin is not affected by macronutrient intake, energy intake or energy expenditure. Journal of Negative Results in BioMedicine, 4: 2-10.

Seim, I.; Carter, S.L.; Herington, A.C. and Chopin, L.K. (2009). The proximal first exon architecture of the murine ghrelin gene is highly similar to its human orthologue. BMC Research Notes, 2: 85-92.

Sherman, E.L.; Nkrumah L.; Murdoch, B.M.; Li, C.; Wang, Z.; Fu, A. et al. (2008). Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2 and Uncoupling Protein 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency and carcass merit in beef cattle. Journal Animal Scince, 86: 1-16.

Tschöp, M.; Wawarta, R.; Riepl, R.L.; Friedrich, S.; Bidlingmaier, M. and Landgraf, R. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. Journal of Endocrinological Investigation, 24(6): Rc19-Rc21.

Zhang, B.; Chen, H.; Guo, Y.; Zhang, L.; Hua, L.; Zhao, M. et al. (2007). Five novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the ghrelin receptor (GHSR) gene in cattle. Archives Animal Breeding, 50: 630-631.

Study of polymorphism in intron 4 and exon 5 of ghrelin gene in some masses of Khuzestan native chickens using PCR-RFLP

Rezaei Yazd Abadi, S.[1]; Roshanfekr, H.[2]; Beigi Nasiri, M.T.[3] and Fayazi, J.[2]

Received: 08.12.2015 Accepted: 06.05.2016

Abstract

Ghrelin is a stimulating peptide for growth hormone in poultry, which is composed of 26 amino acids. With the release of growth hormone, ghrelin stimulates food intake and body weight gain leads to energy balance. This study was performed in order to identify polymorphism in fourth intron and fifth exon in Khuzestan province native chicken's ghrelin gene using the PCR-RFLP method. Therefore, random blood sampling from 100 chickens of native chickens in Khuzestan province breeding and Jihad livestock inputs was performed. DNA extraction from blood samples was performed using the salt method. The quantity and quality of the extracted DNA were determined using gel electrophoresis (1%) and nanodrop. Then, 228 bp fragment of fourth intron and fifth exon region were amplified using polymerase chain reaction (PCR). Finally, the amplified samples were digested with *HaeIII* enzyme, and the digestion products of 173 and 55 bp were found. The results showed that in all samples after enzymatic digestion there was only one band form. Therefore, with respect to the similarity of studied genotypes in this study, mutations were not verified. The absent of polymorphism in the studied mass (population) could be due to the environmental conditions and relatively low number of samples.

Key words: Khouzestan native chickens, Ghrelin gene, PCR-RFLP

1- MSc Gradueted of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

3- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Iran

Corresponding Author: Rezaei, S., E-mail: rezaeisaeed64@gmail.com