نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۱۱۵-۱۰۹

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 1, Spring 2018, p. 109-115

تعیین پلی مورفیسم رسپتور ژن دوپامین به کمک آنزیم محدودالاثر BseNI

مریم بازگیری[1*]- محمدتقی بیگی نصیری[2]- جمال فیاضی[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۱۶

چکیده

دوپامین در طیور ترشح پرولاکتین را در مغز مهار می‌کند. این پژوهش به منظور بررسی چندشکلی گیرنده‌یD1 ژن دوپامین با استفاده از روش PCR-RFLP در مرغ بومی خوزستان صورت گرفت. به منظور اجرای این آزمایش نمونه خون از ۱۰۰ قطعه مرغ بومی مرکز مرغ بومی خوزستان (شرکت نهاده‌های دامی جاهد) به صورت تصادفی اخذ گردید. DNA ژنومی با استفاده از روش نمکی بهینه شده، استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ۲۸۳ جفت بازی گیرنده‌ی D1 ژن دوپامین انجام گرفت. جهت تشخیص ژنوتیپ‌های گیرنده‌ی D1 ژن دوپامین، محصولات PCR با استفاده از آنزیم برشیBseNI هضم شدند. با مشاهده نتایج الگوی باندی ناشی از هضم مشخص شد که جهش مسئول گیرنده‌ی D1 ژن دوپامین به وسیله این روش قابل شناسایی نیست اما با تعیین توالی در Clastal W2، دو جهش در بازهای ۱۲۳ و ۱۹۸ (به ترتیب از نوع A به G و C به T) مشخص شد.

واژه های کلیدی: چندشکلی، دوپامین، کرچی، مرغ بومی، PCR-RFLP.

مقدمه

در پرورش مرغ تخمگذار، هدف کاهش کرچی و افزایش تولید تخم مرغ است. هورمون پرولاکتین عامل اصلی شروع کرچی و ادامه دوره آن در طیور می‌باشد. در طیور، دوپامین ترشح پرولاکتین در مغز را مهار می‌کند (۲۰). منشاء هورمون دوپامین هیپوتالاموس می‌باشد که از وظایف آن، جلوگیری از آزاد شدن پرولاکتین می‌باشد.دوپامین متعلق به گروهی از انتقال دهنده‌های عصبی به نام کاته کولامین‌ها است و از فراوان ترین آنها در مغز می‌باشد. نقش و اهمیت دوپامین به عنوان یک انتقال دهنده عصبی در تنظیم عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی درسیستم عصبی مرکزی به خوبی شناخته شده‌است (۲، ۳، ۶ و ۸). برای دوپامین،گیرنده‌های متعددی شناسایی شده است که هرکدام دراعمال خاصی دخالت دارند. گیرنده‌های دوپامین با بسیاری ازعملکردهای سلولی درارتباط هستند و با پروتئین‌های G جفت می‌شوند (۱). معمولا، فعالیت این گیرنده‌ها منجر به تغییرات سطوح آدنوزین مونوفسفات حلقوی داخل سلولی شده (۹) و آبشارهای پیام رسان را تحریک می‌کند که این خود باعث افزایش رونویسی در ژن می‌شود (۵). براساس الگوهای پروتئینG و نحوهٔ عملکرد پیام‌دهی داخل سلولی،گیرنده‌های دوپامین به دودسته تقسیم می‌شوند: گیرنده‌های D1 (متصل به پروتئینGαs) و گیرنده‌های شبهD2 (متصل به پروتئین Gαi) (۱۰ و ۱۴). همچنین بر اساس کدون ژنی، گیرنده‌های شبه D1 به D1 و D5 و گیرنده‌های شبه D2 بهD2، D3 و D4 تقسیم می‌شوند (۱۳). در مغز رایج‌ترین گیرنده‌ها D1 و D2 بوده و بیشترین بیان گیرنده‌های دوپامین را دارند (۱۶). درمان مرغ با آنتاگونیست گیرنده دوپامین سبب خاتمه کرچی در اثر مهار پرولاکتین می‌شود (۲۰). گیرنده‌ی D1 دوپامین نقش عمده ترشح پرولاکتین را از طریق وی آی پی روده‌ای انجام می‌دهد. دوپامین همچنین از طریق فعال کردن گیرنده دو، از ترشح پرولاکتین در سطح هیپوفیز جلوگیری می‌کند (۱۲). ژن گیرنده‌ی یک ژن دوپامین در مرغ که روی کروموزوم ۱۳ قرار دارد، شامل ۱۳۵۶ نوکلئوتید می‌باشد که ۴۵۶ اسید آمینه یک پروتئین را کد گزاری می‌کنند (۲۰).

در یک تحقیق ارتباط بین پلی‌مورفیسم گیرنده‌ی چهار دوپامین با رفتارهای مختلف اسب‌ها در شرایط افسردگی مطالعه شد که وجود یا عدم آلل A چند شکلی را مشخص می‌کرد که در این بررسی چند

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، خوزستان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: m.bazgiri92@gmail.com
DOI: 10.22067/ijasr.v1397i1.50752

شکلی مشاهده شد (۱۱). در یک پژوهش گیرنده‌ی یک ژن دوپامین در غاز به وسیله آنزیم برشی TspRI مورد هضم قرار گرفت که دو الگوی ژنوتیپی را نشان داد (۱۸). در نتایج یک پژوهش نشان داده شد که ارتباط بین جهش‌های موجود در گیرنده‌ی چهار دوپامین با کرچی معنی دار است (۱۹).

هدف از پژوهش حاضر، شناسایی چندشکلی گیرنده‌ی یک ژن دوپامین به روش PCR-RFLP و همچنین تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی آن در جمعیت مرغ بومی خوزستان بود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۱۰۰ قطعه مرغ بومی به صورت کاملاً تصادفی از مرکز مرغ بومی استان خوزستان (شرکت نهاده‌های دامی جاهد) خونگیری صورت گرفت. خونگیری از ورید بال به میزان ۳-۴ سی سی در لوله‌های خلاء دار حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام شد. نمونه‌های خون همراه با یخ به آزمایشگاه مرکزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان انتقال داده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون کامل پس از تغییر و بهینه‌سازی روش استخراج نمکی میلر و همکاران (۷) انجام گرفت.کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ و ژل آگارز ارزیابی شد.

واکنش زنجیره‌ای‌پلی‌مراز (PCR)

در این تحقیق از آغازگرهای پیشنهادی زوا و همکاران (۲۰) استفاده شد که ترتیب توالی آن‌ها به صورت زیر بوده:

F:5′-CACTATGGATGGGGAAGGGTTG -3′
R:5′-GGCCACCCAGATGTTGCAAAATG-3′

طول آغازگر رو به جلو و برگشتی به ترتیب ۲۲ و ۲۳ نوکلئوتید بود.

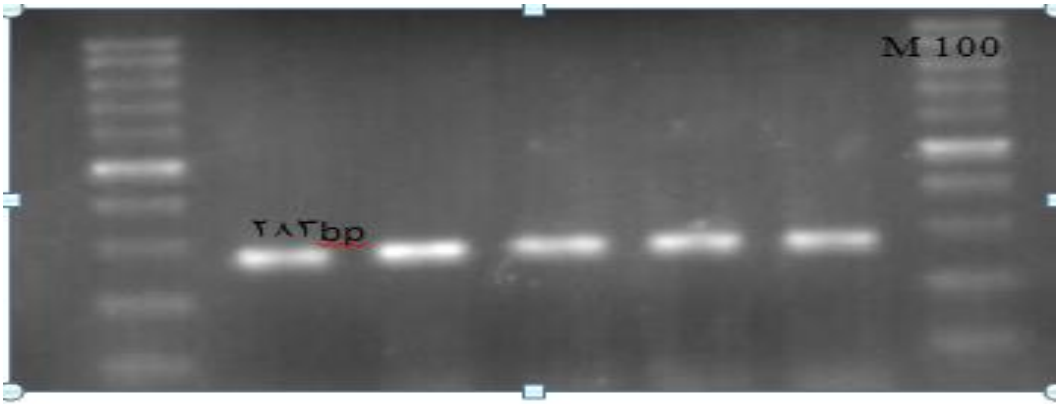
واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل بافر 1X، ۲۰۰میلی مولارdNTP، یک واحد انزیم تک پلی مراز، ۱۵۰ نانو گرم از DNA ژنومیک، ۲/۵ میلی مولار MgCl2، ۰/۲۵ میکرومول از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت و آب استریل دو بار تقطیر تا رسدن به حجم مورد نظر انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله ابتدایی واسرشته سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه (واسرشته سازی در دمای۹۵°C به مدت۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۸/۴°C به مدت ۴۵ ثانیه و تکثیر در۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه) و تکثیر نهایی در۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Bio rad) جهت گسترش زنجیره DNA استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز، الکتروفورز شدند. هضم آنزیمی محصولات حاصل از واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل: ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱ میکرولیتر آنزیم برشی BseNI (در حجمU ۱۰۰۰ توسط شرکت ندای فن تهیه گردید)، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۶ ساعت در دمای۶۵ °C در داخل بن ماری انجام شد. سپس محصولات هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شدند. بعد از اتمام PCR همه‌ی نمونه‌ها، ۶ نمونه از PCR ها برای توالی یابی به شرکت ژن فن آوران ارسال شدند.

نتایج و بحث

برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از نانودراپ و ژل آگارز استفاده شد، نتایج نشان داد که DNA استخراج شده برای ادامه پژوهش مناسب می‌باشد. پس از تعیین کمیت و کیفیت، نمونه‌های DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کار رفتند. قطعه ۲۸۳ جفت بازی گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین تکثیر و برای تایید صحت قطعه تکثیر شده از نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد. با توجه به تصویر نمونه‌های تکثیر شده بر روی ژل آگارز مشخص گردید که نمونه‌های مورد بررسی فاقد آلودگی و باند اضافه بوده‌اند و برنامه دمایی برای تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر مناسب طراحی شده است (شکل۱).

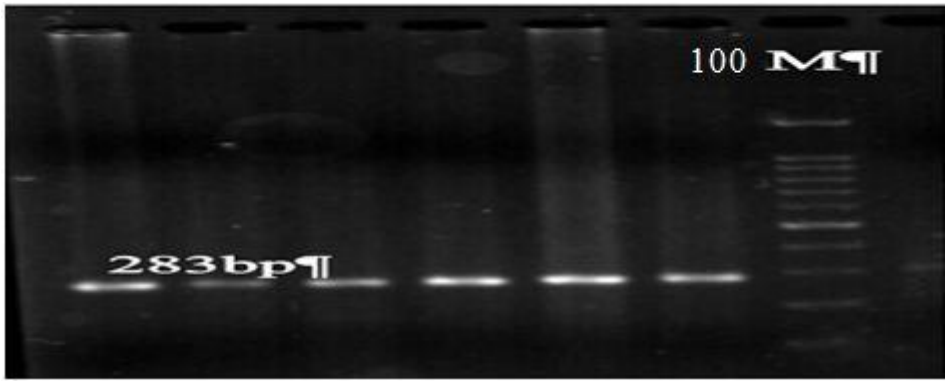
با مشاهده نتایج الگوی باندی حاصل ازهضم آنزیم BseNI مشخص شد که تمامی قطعات فاقد برش بوده و هیچ جهشی در گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین با استفاده از این آنزیم، در مرغ بومی خوزستان مشاهده نشده و تمامی نمونه‌ها فقط یک نوع ژنوتیپ را نشان دادند (شکل ۲). از آنجایی که تمامی ۱۰۰ نمونه با این آنزیم مورد آزمایش قرار گرفتند و نیز آنزیم در شرایط مناسبی حمل و نگهداری گردید و نیز از شاهد برای مقایسه نمونه ها استفاده گردید می توان گفت آنزیم عملکرد صحیحی داشته است. در مطالعه انجام شده بر روی مرغ زرد مجارستان به روش PCR-RFLP علاوه بر اینکه سه ژنوتیپ AA، GG و AG در جایگاه گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین مشاهده شد بیان گردید که ژنوتیپ مشاهده شده روی تولید تخم مرغ‌ها و وزن بدن در هفته ۴۵ تاثیر دارد (۱۵).در مطالعه‌ای که بر روی گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین در شش جمعیت مرغ صورت گرفت، سه ژنوتیپ AA، GG وAG مشاهده شد و بیان شد که جهش در ناحیه G+123A با تولید تخم مرغ و کرچی ارتباط دارد و نیز گزارش شد که شاید بتوان از چندشکلی در فرکانس‌های G+123A و C+1107T به عنوان مارکری برای کاهش صفت کرچی و بهبود

افزایش تولید تخم مرغ استفاده کرد(۲۰).



شکل ۱- قطعه ۲۸۳ جفت بازی تکثیر شده گیرنده‌ی یک ژن دوپامین در پنج نمونه مرغ بومی خوزستان

Figure 2- Fragment 283 bp reproduced dopamine D1 receptor gene in five samples of Khuzestan native chicken



شکل ۲- محصول PCR هضم شده گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین توسط آنزیم محدودالاثر *BseNI* در شش نمونه از مرغ بومی خوزستان

Figure 2- PCR products digested dopamine D1 receptor gene use restriction enzyme BseNI in six samples of Khuzestan native chickens

در یک پژوهش بر روی اردک گزارش شد که علاوه بر اینکه چند شکلی در گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین مشاهده می‌شود، این گیرنده با برخی از صفات تولیدمثلی در اردک ارتباط دارد که می‌توان اظهار کرد، گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین می‌تواند به عنوان ژن کاندیدا جهت انتخاب برای بهبود صفات تولید مثلی در اردک باشد(۱۷). ونگ[1]و همکاران (۱۸)، چند شکلی و بیان گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین غاز را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق که به روش RFLP مورد مطالعه قرار گرفت از آنزیم TspRI برای هضم استفاده گردید و در نهایت دو ژنوتیپ GG و GA مشاهده گردید. نینومیا[2] و همکاران (۱۱)، ارتباط بین پلی‌مورفیسم گیرنده‌ی ۴ دوپامین را با رفتارهای مختلفی که اسب‌ها در شرایط افسردگی از خود نشان می‌دهند را بررسی کردند که در این مطالعه وجود یا عدم وجود آلل A چند شکلی را مشخص می‌کرد که در این بررسی چند شکلی مشاهده شد.

در پژوهشی زوا و همکاران (۱۹) ، برای نشان دادن ارتباط بین چند شکلی گیرنده ۲ ژن دوپامین با کرچی، جمعیتی از مرغ قرمز جنگلی، مرغ Xinghua، مرغ بایر هوانگ و لگهورن مورد مطالعه قرار دادند. فرکانس آللی و توزیع ژنوتیپ در ۵ جمعیت نشان داد که، A-65436G، I-38463D، A-38600، T-32751C، A-16105G-C، 6539T و A+2794G با کرچی رابطه دارد که دلیلی بر وجود چند شکلی می‌باشد. فیدلر[3] و همکاران (۴)، ارتباط بین چندشکلی گیرنده‌ی ۴ ژن دوپامین (DRD4) با تغییر شخصیت در پرندگان را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق دو دسته پرنده به صورت تصادفی در ۱۷ گله‌ی مختلف در هلند که به صورت سنتی پرورش داده می‌شدند، جمع آوری گردید و در آخر ۷۳ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی مشاهده گردید. در تمامی مطالعاتی که بر روی مرغ با روش PCR-RFLP صورت گرفته است نشان داده که چندشکلی در گیرنده‌ی ۱ دوپامین وجود داردکه با مشاهدات این تحقیق مطابقت

1- Wang
2- Ninomiya
3- Fidler

نداشت که از دلایل عدم تطابق می‌تواند آنزیمی که برای شناسایی جهش از آن استفاده شده ربط داد. نتایج به دست امده از این تحقیق با نتایج پژوهشگران در متن ذکر گردید هم خوانی نداشت چونکه از آنزیمی که این پژوهشگران در تحقیقات خود استفاده کردند در این تحقیق به کار برده نشده بود و همینطور نمونه های تحقیق نیز با هم تفاوت داشتند.

در این تحقیق برای اولین بار گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین در مرغ بومی خوزستان توالی یابی شد. همترازسازی توالی‌های مرغ بومی خوزستان با توالی‌های گرفته شده در (NCBI) و آنالیز داده ها در ClastaW2، دو جهش در جایگاه ۱۲۳ که نوکلئوتید آدنین (A) را جایگزین گوانین (G) و در جایگاه ۱۹۸ سیتوزین (C) را جایگزین تیمین (T) شناسایی کرد (شکل۳). نتایج حاصله با تمپفلای و همکاران (۱۵) و زوا و همکاران (۲۰) که نیز این دو جهش را در گیرنده ۱ ژن دوپامین شناسایی کردند مطابقت داشت.

شکل ۳- نتایج Alignment توالی‌ها در ClastaW2

Figure 4- Sequence Alignment results in ClastaW2

نتایج به دست آمده از توالی یابی نشان داد که جهش در مرغ بومی خوزستان وجود دارد که با نتایج به دست آمده از روش PCR-RFLP متفاوت بود. در واقع می‌توان بیان کرد گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین مونومورف نیست و دارای جهش می‌باشد که آنزیم برشی BseNI قادر به شناسایی جهش‌ها نبوده است. پیشنهاد می شود برای شناسایی جهش‌های صورت گرفته دراین توالی از نشانگرهای دیگر مرتبط با این بررسی استفاده شود. در واقع نمی‌توان گفت که گیرنده‌ی ۱ ژن دوپامین مونومورف بوده بلکه آنزیم بکار رفته مناسب نبوده است. با توجه به عملکرد آنزیم مورد استفاده در این تحقیق می‌توان به اهمیت آنزیم‌های برشی در تعیین چند شکلی پی برد.

نتیجه گیری کلی

گیرنده‌ی ۱ دوپامین در جمعیت مرغ بومی خوزستان به روش RFLP چند شکلی ژنتیکی نشان نداد. توالی یابی نشان داد که جهش و چندشکلی وجود دارد. از آنجایی که دوپامین یکی از عوامل اصلی کاهش پرولاکتین و کاهش کرچی شناخته شده و نیز طی گزارشاتی بیان شد که جهش در گیرنده‌ی ۱ دوپامین و ایجاد ژنوتیپ‌های مختلف ارتباط معنی داری با افزایش تولید تخم مرغ و کاهش کرچی دارد لذا لازم است این گیرنده به خوبی مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین با توجه به نقش مهم آنزیم‌های برشی در شناسایی جهش‌ها از آنزیم‌های مختلفی برای پیدا کردن جهش‌ها به کار گرفته شود.

منابع

1- Araki, K. Y., J. R. Sims, and P. G. Bhide. 2007. Dopamine receptor mRNA and protein expression in the mouse corpus striatum and cerebral cortex during pre-and postnatal development. Brain Research, 1156: 31-45.

2- Baskerville, T. A., and A. J. Douglas. 2010. Dopamine and oxytocin interactions underlyingbehaviors potential contributions to behavioral disorders. CNS Neuroscience and Therapeutics, 16(3): 92-123.

3- Blasi, G., L. Bianco, P. Taurisano, B. Gelao, R. Gelao, L. Fazio, A. Papazacharias, A. Di Giorgio, G. Caforio, A. Rampino, R. Masellis, A. Papp, G. Ursini, L. Sinibaldi, T. Popolizio, W. Sadee, and A. Bertolino. 2009. Functional variation of the dopamine D2 receptor gene is associated with emotional control as well as brain activity and connectivity during emotion processing in humans. Journal of Neuroscience, 29: 14812–14819

4- Fidler, A., K. Van Oers, P. Drent, S. Kuhn, J. Mueller, and B. Kempenaers. 2007. Drd4 gene polymorphisms are associated with personality variation in a passerine bird. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 274(1619): 1685-1691.

5- Gerfen, C. R. 2000. Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways. Trends Neurosci, 23: S64 S70.

6- Korchounov, A., M. F. Meyer, and M. Krasnianski. 2010. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. Journal of Neural Transmission, 117: 1359–1369.

7- Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Pole sky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from

human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215-1219.
8- Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber, and M. G. Caron. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. Physiological Reviews, 78: 189–225.
9- Monsma, F. J., L. C. Mahan, L. D. McVittie, C. R. Gerfen, and D. R. Sibley. 1990. Molecular cloning and expression of a D1dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 87(17): 6723-7.
10- Neve, K. A., J. K. Seamans, and H. Trantham-Davidson. 2004. Dopamine receptor signaling. Journal of Receptors and Signal Transduction, 24(3): 165-205.
11- Ninomiya, S., A. Anjiki, Y. Nishide, M. Mori, Y. Deguchi, and T. Satoh. 2013. Polymorphisms of the Dopamine D4 Receptor Gene in Stabled Horses are related to Differences in Behavioral Response to Frustration. Animals, 3(3), 663-669.
12- Sartsoongnoen, N., S. Kosonsiriluk, N. Prakobsaeng, T. Songserm, I. Rozenboim, M. E. Halawani, and Y. Chaiseha. 2008. The dopaminergic system in the brain of thenative Thai chicken, Gallus domesticus: localization and differential expression across the reproductive cycle. Gen Comp Endocrino, 159: 107-115.
13- Sibley, D. R., and Jr. FJ. Monsma. 1992. Molecular biology of dopamine receptors. Trends in Pharmacological Sciences, 13: 61-9.
14- Sillivan, S. E., and C. Konradi. 2011. Expression and function of dopamine receptors in the developing medial frontalcortex and striatum of the rat. Neuroscience, 199: 501-14.
15- Tempfli, K., S. Konrád, K. K. Gaál, L. Pongrácz, and A. B. Papp. 2015. Prolactin, dopamine receptor D1 and Spot14α polymorphisms affect production traits of Hungarian yellow hens. Livestock Science, 174: 26-30.
16- Vallone, D., R. Picetti, and E. Borrelli. 2000. Structure and function of dopamine receptors. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 24(1): 125-132.
17- Wang, C., S. Li, C. Li, Y. Feng, X. Peng, and Y. Gong. 2012. Molecular cloning, expression profile, polymorphism and the genetic effects of the dopamine D1 receptor gene on duck reproductive traits. Molecular Biology Reports, 39(9): 9239-9246.
18- Wang, C., Y. Liu, H. Wang, H. Wu, S. Gong, and D. He. 2014. Molecular characterization, expression profile, and polymorphism of goose dopamine D1 receptor gene. Molecular Biology Reports, 41(5): 2929-2936.
19- Xu, H. P., X. Shen, M. Zhou, C. L. Luo, L. Kang, Y. Liang, H. Zeng, Q. H. Nie, D. X. Zhang, and X. Q. Zhang. 2009. The dopamine D2 receptor gene polymorphisms associated with chicken broodiness. Poultry Science, 89(3): 428-38.
20- Xu, H. P., X. Shen, M. Zhou, M. Fang, H. Zeng, Q. Nie, and X. Zhang. 2010. The genetic effects of the dopamine D1 receptor gene on chicken egg production andbroodiness traits. BMC Genetics, 11(1): 17.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 10, No. 1, Spring 2018, p. 109-115

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷، ص. ۱۱۵-۱۰۹

Determination of Dopamine Receptor Gene Polymorphism by *BseNI* Restriction Enzyme

M. Bazgiri[1*]- M. T. Beigi Nassiri[2]- J. Fayazi[3]

Received: 20-10-2015
Accepted: 06-06-2017

Introduction This research was conducted at the Department of Animal Science in the Ramin Agriculture and Natural Resources University in 2014-2015. The elevation of egg production and the inhibition of incubation behavior are the aims of modern poultry production . Prolactin is postulated to play a critical role in the onset and maintenance of incubation behavior in birds .In avian, dopamine inhibits prolactin secretion in the brain. So far, at least five distinct dopamine receptor subtypes, DRD1-DRD5, have been identified and classically divided into two classes referred to as D1-like (DRD1 and DRD5) and D2-like (DRD2,DRD3, and DRD4) .DRD1 is located on chromosome 13 and contains an open reading frame of 1356 nucleotides encoding a protein of 451 amino acids. Dopamine stimulates prolactin secretion via activating DRD1 at the hypothalamus level by operating through vasoactive intestinal peptide and the inhibition effect of dopamine on Prolactin secretion is mediated through DRD2 receptors at the pituitary level.This study aimed at identification of the variants of dopamine D1 receptor gene and detection of the allelic frequency in the Khuzestan native chicken at Ramin Agriculture and Natural Resources of Khuzestan province.

Materials and Methods For this research 100 laying hens from Khuzestan native chicken Breeding Center (Jahed Livestock Input Corporation) were randomly selected. DNA was extracted from whole blood using salting-out procedure. The PCR-RFLP method was used for allelic differentiation. Dopamine D1 receptor gene was amplified by a specific set of primer for this gene to produce 283 bp fragment. The PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µL containing 150 ng of genomic DNA, 1 µL of each primer, .5 µL dNTP, 1 µL MgCl2, 2.5× PCR buffer and 1 U of Taq DNA polymerase. The amplification was performed in a Eppendorf Mastercycler under the following conditions: 95°C for 3 min; 35 cycles of 95°C for 30 s, 58/4°C for 45 s and 72°C for 30 s; and 72°C for 10 min. The amplified fragment was digested with *BseN I* restriction enzyme. The digestion mixture was composed of 10µL PCR products, 2µL digestion buffer, and 1µL of each enzyme, and then subjected to electrophoresis separation in 2.5% Agarose gel.

Results and Discussion The results of the enzyme Restrictive *Bse*N*I* showed only one A allele and AA genotype and polymorphism was not observed. To determine the quality and quantity of DNA, Nanodrop and Agarose gel was used and the results showed that the extracted DNA was suitable to continue the research. The results of this study were not in par with those of the previous research. Such non-compliance could be due to the kind of population studied, the sample size and the type of marker based on which polymorphic was examined. Due to the limited number of cutting sites in restriction enzymes, various DNA fragments were not produced. Therefore, RFLP markers may have not been able to identify all mutations in this sequence. Dopamine receptor gene in Khuzestan native chicken was sequenced for the first time in the present study. Hence, alignment sequences of Khuzestan native chicken and alignment sequence in ClastaW2 were saved in the gene bank. The results of sequencing in ClastaW2 recorded two mutations of type A to G in the base 123 and C to T in the base 198.

Considering the results of gene sequencing, it cannot be stated that a dopamine receptor in this research is monomorphic. However, the enzyme used for dopamine gene could not be able to recognize the restriction sites. Sequencing of dopamine D1 receptor gene in the native chicken population of Khuzestan showed mutation which normally causes genetic polymorphism. However, in this study due to the ineffective choice of the enzyme, monomorphism was detected. These results show the importance of restriction enzyme in detecting genetic variation. Since dopamine is one of the main factors known to reduce prolactin and decrease broodiness as well as the reports indicated that mutations in dopamine D1 receptor different genotypes were significantly

1,2,3- MSc Graduated, Professor and Assistant professor, Department of animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agriculture Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Iran, respectively.
(*-Corresponding author email: m.bazgiri92@gmail.com)

associated with increased dopamine.

Conclusion Due to the important role of restriction enzymes in identification of different mutations, selection of the suitable enzyme is recommended.

Keywords: Broodiness, Dopamine, Native chicken, Polymorphism, PCR-RFLP.