

بررسی و تکثیر ناحیه تنظیمی ژن میوستاتین و تعیین توالی آن در گاوهای بومی (نجدی) خوزستان

زینب محمدی^{۱*} - هدایت الله روشنفکر^۲ - محمدتقی بیگی نصیری^۳ - حمید رجبی معماری^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۱۹

چکیده

هدف از انجام این تحقیق تکثیر ناحیه تنظیمی در بر گیرنده جهش‌هایی که بیان ژن میوستاتین را تغییر می‌دهند و تعیین توالی آن بود. از ۱۲ رأس گاو نجدی واقع در ایستگاه پشتیبانی گاو نجدی شوشتر خونگیری به عمل آمد، DNA استخراج شده برای تکثیر دو قطعه ۵۶۱bp و ۷۳۰bp استفاده شد. بعد از اطمینان از صحت محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، توالی‌یابی انجام گردید و اجزای پروموتور ژن میوستاتین در گاو نجدی مشخص شد. نتایج بدست آمده در این بررسی، سه جهش جایگزینی، حذف و اضافه در قطعه ۵۶۱bp و دو جهش جایگزینی و حذف در قطعه ۷۳۰bp در ناحیه پروموتور ژن میوستاتین دیده شد. در نتیجه این جهش‌ها بر روی باکس‌ها و اجزای پروموتور تأثیر نداشتند.

واژه‌های کلیدی: ژن میوستاتین، 8-GDF، PCR، جهش، ماهیچه مضاعف.

مقدمه

میوستاتین مسیری است که اکنون در مطالعات *invitro* بهتر شناخته شده و آن شامل جلوگیری از پیشرفت میوبلاست در چرخه سلولی و جلوگیری از تمایز ناحیه انتهایی میوبلاست می‌باشد (۵).

گزارش شده که اولین تشخیص درباره جهش میوستاتین در انسان صورت گرفته است. اهمیت میوستاتین برای رشد و نگهداری ماهیچه با آتروفی ماهیچه‌ای در ارتباط است، به ویژه در انسانها سطوح بیان میوستاتین با اهمیت آتروفی ماهیچه در بیماران مبتلا به HIV همبسته است. در نهایت شناسایی پروتئین‌های باندشونده با میوستاتین که برای اتصال با گیرنده رقابت می‌کنند یا از فعالیت میوستاتین جلوگیری می‌کنند از جمله Follistatin، Gasp-1، FLRG یا propeptidemyostatin افزایش رشد قوی ماهیچه را برای انسان و برنامه‌های کاربردی کشاورزی فراهم می‌کند (۵).

جهش‌های طبیعی در ژن میوستاتین مسئول فنوتیپ ماهیچه مضاعف در چندین نژاد گاو اروپایی است (۶). ژن میوستاتینو آنالیز جهش‌ها در اسب و نژادهای مختلف آن توسط استفانیو همکاران (۱۰) بررسی و شناسایی شد، در این تحقیق توالی مناطق رمزدار، اینترونی و مناطق تنظیمی ژن میوستاتین بر روی ۱۲ نژاد اسب انجام گرفت. در ۱۰ نژاد از این اسبها ۷ جهش نشان داده شده است. ۲ تا در پروموتور، ۴ تا در اینترون ۱ و یکی در اینترون ۲. در نتیجه فراوانی آلی برای جهش‌های پروموتور و آنالیز واریانس

ژن میوستاتین به عنوان تنظیم کننده منفی رشد عضله شناخته شده است که در آن مجموعه‌ای از جهش‌های غیرفعال کننده ژن، رخ می‌دهد. در گاو جهش‌های غیرفعال کننده در این ژن منجر به فنوتیپ ماهیچه مضاعف می‌شود. چندشکلی ژن میوستاتین در گوسفند نیز بررسی شده است (۱). از زمان شناسایی ژن میوستاتین در سال ۱۹۹۷ این ژن به عنوان یک تنظیم کننده منفی جدید و منحصر به فرد برای رشد ماهیچه در نظر گرفته شده است. میوستاتین همچنین در هموستازی ماهیچه در بزرگسالان دخالت می‌کند، علاوه بر این به نظر می‌رسد که حذف ژن میوستاتین علاوه بر توده ماهیچه اسکلتی روی بافت چربی موش هم تأثیری گذارد جهش‌های طبیعی در ژن میوستاتین در نژادهای گاو مثل بلگین بلو توده ماهیچه‌ای را افزایش می‌دهد، اخیراً در انسان نیز این موضوع نشان داده شده است.

۱- کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین،

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی رامین،

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی رامین،

۴- استادیار گروه زراعت، دانشگاه چمران.

*- نویسنده مسئول: (Email: mohamadyzainab@yahoo.com)

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۱۲ رأس گاو نجدی واقع در ایستگاه پشتیبانی گاو نجدی شوشتر که در ۱۵ کیلومتری جاده شوشتر- اهواز قرار دارد، استفاده شد. با سورنگ از سرخرگ و داج گردن آنها به مقدار ۵ میلی-لیتر خونگیری به عمل آمد. نمونه های خون در فلاسک یخی گذاشته شد و به آزمایشگاه مرکزی در دانشگاه انتقال یافت.

استخراج دی.ان.ای از خون کامل با استفاده از کیت DIAAtomDNA Prep 100 (شرکت ژن فن‌آوران ایران) انجام گرفت. برای بررسی کیفیت DNA از روش الکتروفورز استفاده شد.

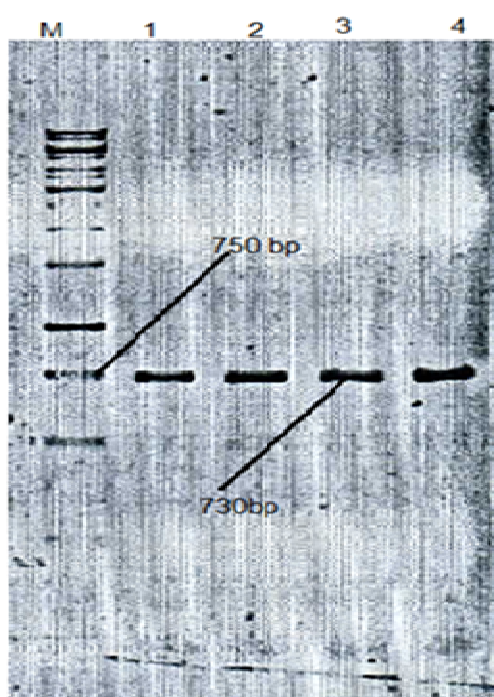
واکنش پی.سی.آر برای تکثیر اختصاصی دو قطعه مشخص با طولهای ۵۶۱ و ۷۳۰ جفت بازی انجام گرفت که جفت پرایمر اول برای تکثیر قطعه ۵۶۱ جفت بازی و جفت پرایمر دوم برای تکثیر قطعه ۷۳۰ جفت بازی بکار گرفته شد. (برای اینکه نتیجه کار بهتر باشد، از دو قطعه استفاده شده است). جهت بررسی اندازه قطعات تکثیر شده از سایز مارکر ۱kb استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، تکثیر قطعات مورد نظر را تأیید کرد. به دلیل نیاز به محصولات PCR برای توالی‌یابی، باید محصولات PCR بر روی ژل آگارز فاقد هر گونه باند کاذب یا smear باشند.

مولکولی (ANOVA) روی هاپلوتایپ‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان دادند لذا اینپلی مورفیسیم‌ها می‌توانند با تغییرپذیری صفات مورفولوژیکی (شکل ظاهری) در نژادهای اسب همراه شوند (۱۱).

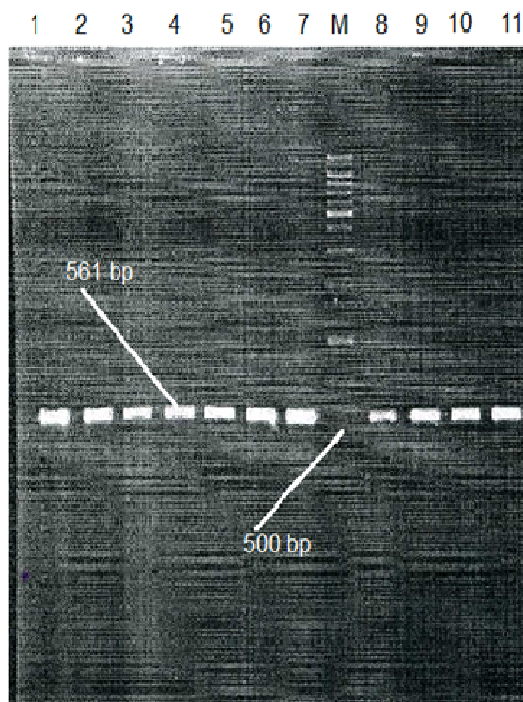
میوستاتین یک تنظیم‌کننده منفی رشد و توسعه ماهیچه اسکلتی در پستانداران است اما توالی این ژن در گربه ناشناخته است. به منظور بهتر فهمیدن ساختار و عملکرد این ژن در گربه، کلونینگ و توالی‌یابی میوستاتین توسطرانگ و همکاران (۹) انجام شده است.

گاوهای با ماهیچه مضاعف دارای درصد بیشتری از فیبرهای ماهیچه‌ای سفید هستند و مقدار کلاژن کمتری دارند، هم چنین گزارش شده که گاوهای با ماهیچه مضاعف دارای بافت‌های همبند کمتری هستند که به افزایش تردی گوشت کمک می‌کند. از معایب ماهیچه مضاعف می‌توان به کاهش باروری، کاهش بقای گوساله، افزایش حساسیت به استرس و بیماریهای تنفسی اشاره نمود (۲).

هدف از انجام این تحقیق که بر روی گاوهای نجدی بومی خوزستان انجام گرفت، تکثیر ناحیه تنظیمی ژن میوستاتین و تعیین توالی آن و همچنین تعیین واریانت‌های احتمالی ژن میوستاتین در ناحیه تنظیمی ژن که منجر به کاهش یا افزایش بیان ژن می‌شود، می‌باشد.



شکل ۲- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای قطعه ۷۳۰ bp



شکل ۱- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد برای قطعه ۵۶۱ bp

M، سایز مارکر ۱ kilo base و اعداد نشان دهنده محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز

جدول ۱- آنالیز توالی پرموتور ژن میوستاتین در گاوهای نجدی

Animal	Template	Change	Mutation Kind	Box
F۱۲-	G	-	D	-
F۱۲-	T	C	S	-
F۱۲-	A	T	S	-
F۱۲-	A	T	S	-
F۱۲-	G	A	S	-
F۱۲-	-	G	I	-
F۱۲-	-	G	I	-
F۱۲-	-	A	I	-
F۱۲-	-	T	I	-
F ۱۵-	A	G	S	-
F ۱۵-	A	G	S	-
F۲۲-	A	G	S	-
F۲۲-	A	G	S	-
F۲۲-	T	-	D	-
F۲۲-	C	G	S	-
F۲۲-	T	C	S	-
F۲۲-	T	C	S	-
F۲۲-	T	C	S	-
F۲۲-	G	A	S	-
F۲۳-	A	G	S	-
F۲۳-	A	G	S	-
F۲۳-	T	C	S	-
F۲۳-	T	C	S	-
F۲۳-	T	C	S	-
F۲۳-	C	G	S	-
F۲۳-	G	A	S	-
F۲۳-	T	-	D	-
F۱۹-	T	C	S	-
F۲۱-	A	T	S	-
F۲۴-	T	C	S	-

توالی و اجزای پرموتور ژن میوستاتین شامل جعبه‌های TATA, CAAT, E-boxes (E3, E5, E7) و همچنین Enhancer و کدون شروع (ATG) مشخص شدند، با قرار دادن توالی اصلی در نرم‌افزار NCBI و وکتور NTI موقعیت این اجزا و پرایمرها مشخص شدند. جهش‌های گزارش شده در این مطالعه در هیچکدام از این باکس‌ها مشاهده نشدند و بنابراین تأثیری بر روی آنها نداشتند.

در این بررسی فاکتورهای رونویسی در ژن میوستاتین گاو مشخص شدند، این فاکتورها شامل (TFIID, NF-) Y, GR, SP1, GATA-1, MyoD, WAP-US6, LBP-1, NF-1, Pit-1, CACCC-BF, CAP, MEF-2 بودند. توالی اصلی این فاکتورها با توالی مورد بررسی در این تحقیق مقایسه شدند.

آغازگرهای مورد استفاده از مقاله کریسا و همکاران (۳) گرفته شده و با توالی الگو توسط نرم‌افزار وکتور NTI (biologyusb.blogfa.com) مقایسه شدند و بعد از اطمینان از اینکه هر چهار پرایمر با توالی الگو همخوانی دارند، این پرایمرها مورد استفاده قرار گرفتند. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای قطعات ۵۶۱ و ۷۳۰ جفت بازی به ترتیب عبارتند از:

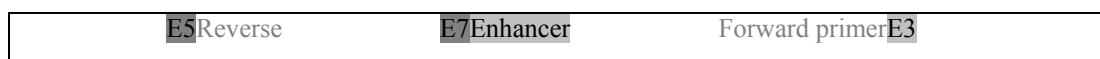
GDF8-F 5'-CTGAGGGAAAAGCATATCAAC-3'
 GDF8-R 5'-CCAGCAACAATCAGCATAAATAG-3'
 GDF8-F 5'-GCTCCCAGACCTTACCCCAAATC-3'
 GDF8-R 5'-GTTGA TATGCTTTTCCCTCAG-3'

پس از حصول اطمینان از صحت توالی تکثیر شده، بخش پرموتور ژن میوستاتین توالی یابی گردید. ۲۴ نمونه برای توالی‌یابی بدون خلص سازی به شرکت بایونیر کره جنوبی فرستاده شد. اجزای پرموتور ژن میوستاتین هم توسط نرم‌افزار NCBI و وکتور NTI مشخص شدند.

نتایج و بحث

نتایج واکنش PCR برای دو قطعه ۵۶۱ و ۷۳۰ جفت بازی در تصاویر زیر نشان داده شده است، این دو قطعه به صورت جداگانه تکثیر شدند و نتایج پی سی آر آنها جداگانه می‌باشد.

نتایج توالی‌یابی در این مطالعه برای قطعه اول یک جهش Deletion در موقعیت ۱ (منظور از موقعیت ۱ در اینجا اولین مکانی است که جهش در آنجا دیده شده است و موقعیت‌های بعد هم مکانهایی بعد از موقعیت ۱ هستند که در آنها جهش مشاهده شده است)، یک جهش Insertion در موقعیت ۱۷ و ۱۸ و ۱۹ و ۴۹ و یک جهش Substitution در موقعیت ۴ و ۱۲ و ۱۵ و ۱۶ و ۲۶ و برای قطعه دوم یک جهش Deletion در موقعیت ۱۶۹، یک جهش Substitution در موقعیت ۵۹ و ۹۳ و ۶۲ و ۹۷ و ۱۰۲ و ۳۶۱ و ۱۳۳ و ۲۱۴ نشان داد. در جدول ۱، ستون اول نمونه‌هایی را نشان می‌دهد که برای توالی‌یابی و به خاطر صرفه‌جویی در هزینه‌ها از یک سمت یعنی سمت F (Forward) فرستاده شدند. ستون دوم مربوط به توالی الگو (توالی مورد توافق در تمامی نمونه‌ها) می‌باشد و ستون سوم نوکلئوتیدهای تغییر یافته نسبت به توالی الگو را نشان می‌دهد و نشانه وجود جهش می‌باشد و ستون بعد نوع جهش‌ها را نشان می‌دهد که علامت اختصاری S نشان دهنده جهش جایگزینی (Substitution) و D جهش حذف (Deletion) و I جهش اضافه (Insertion) می‌باشد. Box همان جعبه‌ها است که در این مقاله به آن‌ها اشاره شده است و جهش‌های مشاهده شده در هیچکدام از این باکس‌ها مشاهده نشد.



GCTCCCAGACCTTACCCCAAATCCTGCCAGGTGTCTGCCTCCGGTCAAATGAGAACTGGCAAAGGAAG
 TACTAGGAGGTGCACAGTACTAGGAAGTAGAAAAATGGACTAGCACACTACTGAGAAGCAGAAAAATGG
 GCACCCCTCATGATGGTGTTCCTTTCTGTGTTCAACAATGCTCCGATATAATTTACAGAGGGTAG
 ATAACACATTTTTTTCTTTTACCAC**TGGAAA**GCTGAGGAAAACCTTTGTTACCCATCAAAAATCTACTA
 TCTTCTAAGTCATTGTATTCTAAGATCAAATAGCTGACAATATCCTCTTTGTAATAAACAATGAA
 AAAACACATCCTCTSAGCAATATTAATCTGCAACTTTAGGATAGGAAGTAACTTAATAGTAGTCAATTGA
 AACTGAAATACAATTTTCATAT**GAATAAAAAGATATTA**TTTAAAAAGTAATCCATGAGCAATTTAATATTA
 AAGTAGGATTTTCATTATGTGTTAAGAAATTTATCAGGAAACAAGTTTCTCAAATTATAGCAGAAAATC
 TTTTACTAGTATCACAGTCTTTTCATTTAAGTCTTCTGAATAAATCTGTATTTTCTAATTATACAAGAC
 TAAAAATAATTTAATAACAATAAAATTTTACTTCAAATGCTTACTTAAATAGTATAAAAATCAT
 TTTATTTT**CTGAGGGAAAAGCATATCAAC**TTTTAAGTATAAGGTGAAAATTAAGATTTATTCCTTAA
 TTATAATTTTTAAAGTTTACATATAAAGATGAATAAGATCTAAGTGTAATG**TTATTGTTAATAAAAGTT**
TTTAATTTTTCGAATGTCACATACAGCCTTTATTATTCATAGATTTATTCCTTTAAGAAGTAGTCAAAT
GAATCAGCTCACCCCTTGACTGTAACAAAATACTGTTTGGTGACTTGTGACAGACAGGGTTTTAACCTCTG
 ACAGCGAGATTCATTGTGGAGCAAGAGC**CAAT**CACAGATCCCGACGACTTGTCTCATCAAAGTTGGAA
TATAAAAAGCCACTTGAATAACAGTATAAAAAGATTCACTGGTGTGGCAAGTTGTCTCAGACTGGGCAG
 GCATTAACGTTTGGCTTGGCGTACTCAAAGCAAAGAAAAGTAAAAGGAAGAAGTAAGAACAAGGGAA
 AAGATTGTATTGATTTTAAA**ACCATG**CAAAAACCTGCAAATCTCTGTTTATATTTAC**CTATTATGCTGAT**
TGTTGCTGG

Position 709-729	=	Forward primer 1
Position 1247-1269		Reverse primer 1
Positin 1-23		Forward primer 2
Positin 709-729		Reverse primer 2
Position 237-242		Enhancer
Position 1008-1011		CAAT signal
Position 1051-1057		TATA signal
Position 1075-1081		TATA signal
Position 1214-1216		MSTN gene start codon
Position 912-929	E3-box	AATCAGCTCACCCCTTGAC
Position 443-457	E7-box	GAATAAAAAGATATTA
Positon 824-841	E5-box	TTATTGTTAATAAAAGTTT

شکل ۳- توالی و اجزای پروموتور ژن میوستاتین

شامل چندین مکان باند شده برای فاکتورهای رونویسی است که در دیگر ژن‌های میوزنیک نیز پیدا می‌شود. این می‌تواند یک نقش مهم در تنظیم ماهیچه و توسعه عضلانی داشته باشد. در تعدادی از نژادهای گاو فنوتیپ ماهیچه مضاعف با عملکرد جهش همراه نمی‌شود (۴). برای مثال در نژاد سات‌داون حیوانات برای جهش گزارش شده هموزایگوس‌اند و فنوتیپ ماهیچه مضاعف به وجود نمی‌آید (۱۲). جولیا و جرارد (۵) نشان دادند که جهش‌های طبیعی در ژن میوستاتین در نژادهای گاو مثل بلگین بلو به وضوح توده ماهیچه‌ای را افزایش می‌دهد.

در تحقیقات مختلفی که بر روی ژن میوستاتین انجام شده اکثراً به بررسی نواحی اگزون و اینترون ژن میوستاتین پرداخته شده است و پژوهشی که پروموتور این ژن و جهش‌های احتمالی را در این ناحیه مورد بررسی قرار دهد، در ایران ثبت نشده است و هیچ داده‌ای از مطالعات بیشتر بر روی این بخش از ژن میوستاتین در دسترس نیست. بنابراین نمی‌توان مقایسه قابل توجهی را در این خصوص بیان

طبق این مقایسه همه این فاکتورها در توالی مورد بررسی وجود داشتند و با توالی اصلی‌شان تفاوتی نداشتند. تنها تفاوت مربوط به Enhancer بود که در یک نوکلئوتید در موقعیت‌های متفاوت با توالی اصلی آن تفاوت داشت. که این با نتایج کریسا و همکاران (۲۰۰۳) مغایرت داشت (۳). ارزیابی ژن میوستاتین در گاو پیدمانتس و بلگین‌بلو جهش‌های آشکاری را نشان می‌دهد. توالی‌یابی ژن میوستاتین در گاو پیدمانتس شامل یک جهش missense می‌باشد که باعث جایگزینی سیستئین با تیروزین می‌شود، در حالی که توالی‌یابی ژن میوستاتین در گاو بلگین‌بلو شامل حذف ۱۱ نوکلئوتید است که باعث جهش frame-shift می‌شود (۷). کریسا و همکاران در تحقیقی که در سال ۲۰۰۳ بر روی سکونس ۳۵۳ حیوان از ۹ نژاد گاو اروپایی با هدف جستجوی جهش‌ها انجام دادند، جهش T/A در موقعیت ۳۷۱ و جهش G/C در موقعیت ۸۰۵ (نسبت به ATG) را مشاهده کردند. همچنین آزمایش PCR-RFLP را بر روی بیش از ۳۵۳ حیوان از ۹ نژاد گاو اروپایی مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که منطقه پروموتور ژن

های فنوتیپی که در انواع مختلف سلول‌های یوکاریوتی عالی دیده می‌شود، به دلیل اختلاف در بیان ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سلولی است. برای اطمینان کامل باید مطالعات تکمیلی انجام شود و ارتباط این فنوتیپ در تعامل با جایگاه‌های دیگر ژنی بررسی شود. با توجه به جهش‌های مشاهده شده در پروموتور ژن میوستاتین و عدم وقوع ماهیچه مضاعف باید توجه داشت، که فقط جهش‌های بخش تنظیمی بررسی شده است، در حالی که جهش‌های متفاوتی در بخش‌های دیگر ژن می‌تواند باعث ماهیچه مضاعف شود.

کرد. توالی و اجزای پروموتور ژن میوستاتین در گاو مشخص شد و تأثیر جهش‌های گزارش شده بر روی این قسمت بررسی شد. جهش‌های گزارش شده در اجزای پروموتور ژن میوستاتین در گاو تأثیری نداشت.

با توجه به موارد فوق بررسی یک منطقه به تنهایی نمی‌تواند گواه بر عملکرد مطلوب و یا نامطلوب یک صفت در یک نژاد باشد و بالطبع بررسی وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر نیز مورد نیاز است، زیرا تفاوت-

منابع

- ۱- صوفی، ب.، م. محمدآبادی، ک. شجاعیان، ا. باقی زاده، س. فراستی، ن. عسگری، و ا. دیانی. ۱۳۸۸. ارزیابی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از روش PCR-RFLP. مجله پژوهش‌های علوم دامی. جلد ۱۹. ش ۱. ص: ۷۹-۸۸.
- 2- Arthur, P.F., M. Makarechian, and M.A. Price. 1988. Incidence of dystocia and prenatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. *Canadian Veterinary Journal*. 29: 163-167.
- 3- Crisa, A., C. Marchitelli, M.C. Savarese, and A. Valentini. 2003. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenet Genome Res*. 102: 48-52.
- 4- Grobet, L., D. Poncelet, J.L. Royo, B. Brouwers, D. Pirottin, C. Michaux, F. Ménessier, M. Zanotti, S. Dunner, and M. Georges. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double muscling in cattle. *Mamm Genome*. 9:210-213.
- 5- Joulia-Ekaza, D, and G. Cabello. 2006. Myostatin regulation of muscle development: Molecular basis, Natural mutations, Physiopathological aspects. *Exp Cell Res*. 312: 2401-2414.
- 6- Mcpherron, A. C., A.M. Lawler, and S.J. Lee. 1997. New regulation of skeletal muscle mass in mice by a TGF-beta superfamily member. *Nat*. 387: 83-90.
- 7- Masumi, N., Y. Akihiro, N. Shinichiroum, Y. Tsutomu, N. Takashi, I. Mitsuo, M. Keiji, O. Hideyo, and N. Sumihare. 2002. A missense mutant myostatin causes hyperplasia without hypertrophy in the mouse muscle. *BiochemBioph Res Co*. 293: 247-251.
- 8- Pamela, W., A. S. Judith, M. L. Alyson, W. J. Arthur, and W. J. Lewis. 2001. The role of the myostatin gene in the South Devon Breed. *Genet. Sel. Evol*. 34: 221-232.
- 9- Rong, D., D. Juan, Q. Jian, C. Li-Chun, H. Jian, J. Hong, and A. Xiao-Rong. 2011. Molecular cloning and sequence analysis of the cat myostatin gene 5' regulatory region. *Afr J Biotechnol* vol. pp: 10366-10372.
- 10- Stefania, D., F. Luca, N.C. Leonardo, T. Marco, M. Laura, and F. Adalberto. 2010. Analysis of Horse myostatin gene and identification of single nucleotide polymorphisms in breeds of different morphological types. *Journal Biomed Biotechnol* Vol 2010. Article ID 542945, p: 11-15.
- 11- Smith, J.A., A. M. Lewis, P. Wiener, and J. L. Williams. 2000. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle. allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. *Anim Genet*. 31:306-309.