نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۳، زمستان ۱۴۰۰
ص‌ص: ۱۴۷~۱۵۶

شناسایی چندشکلی ژن FecB در گوسفند

با استفاده از روش سریع و کم هزینه Tetra-ARMS PCR

- **فهیمه محمدی**
دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح‌نژاد دام دانشگاه فردوسی مشهد.
- **داوود علی ساقی** (نویسنده مسئول)
دانشیار ژنتیک و اصلاح‌نژاد دام مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان، مشهد.
- **لیلی سیمایی سلطانی**
دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح‌نژاد دام دانشگاه فردوسی مشهد.

تاریخ دریافت : بهمن ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش : تیر ۱۴۰۰
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۵۰۶۴۶۱۳
Email: Davoudali@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2021.353180.2122

چکیده

ژن FecB یکی از ژن های بزرگ اثر در ارتباط با صفت دوقلوزایی درگوسفند است. برای شناسایی ژن FecB از آنزیم AvaII دارای جایگاه برشی جهش ژن FecB در روش PCR-RFLP استفاده می شود. استفاده از این آنزیم بدلیل سمی بودن ژل اکریل آمید و گران بودن آن مقرون به صرفه نمی باشد. بنابراین، این پژوهش به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت شناسایی سریع و کم هزینه ژن FecB انجام شده است. تکنیک Tetra ARMs PCR، باعث حذف آنزیم AvaII ، جایگزینی ژل ایمن آگارز با ژل اکریل آمید، صرفه جویی در هزینه و زمان لازم برای تعیین ژنوتیپ می شود. چهارآغازگر براساس روشTetra ARMs PCR طراحی شد. این آغازگرها بر روی ۳۰۰۰ نمونه آزمایش شدند. بعد از انجام PCR و الکتروفورز، سه قطعه به طول ۱۰۸، ۲۱۳ و ۲۷۶ جفت باز تکثیر و در نهایت سه ژنوتیپ برای ژن FecB مشاهده گردید. به منظور اعتبار سنجی آغازگرهای طراحی شده، ۲۰ نمونه بصورت تصادفی برای توالی یابی ارسال شد. پس از اعتبارسنجی، نتایج تعیین ژنوتیپ شده با استفاده از آغازگرهای بهینه شده ی روش Tetra ARMs PCR با روش PCR-RFLP مطابقت کامل داشت. این روش برای تشخیص ژن FecB در تعداد زیادی از نمونه ها، سریع و مقرون به صرفه است و می تواند جایگزین روش پر هزینه هضم آنزیمی شود.

واژه‌های کلیدی: دوقلوزایی، گوسفند، آنزیم AvaII ، ژن .FecB، Tetra ARMs PCR.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 133 pp: 147-156

Detection of FecB gene polymorphisms in sheep using rapid and low-cost tetra-ARMS PCR

By: Fahimeh mohammadi[1], Davoud Ali Saghi[2]*, leili simaie soltani[3]
1: PhD student in Genetics and Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad
2: Associate Professor of Animal Genetics and Breeding, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education center, AREEO, Mashhad, Iran
3:PhD student in Genetics and Animal Breeding, Ferdowsi University of Mashhad

Received: February 2021 **Accepted: July 2021**

The FecB gene is one one of the major genes associated with the twinning trait in sheep. AvaII enzyme has a restriction site containing FecB gene mutation is used for genotyping by PCR-RFLP method. Due to toxicity and expensive price, using this enzyme is not considered reasonable and economical. So, this research was performed to design specific primers for rapid and economical detection of FecB gene. Tetra ARMs PCR technique, caucuses elimination of AvaII enzyme, replacement of acrylamide gel by safe agarose gel, and of course saving time and money for genotyping. Four primers were designed, based of Tetra ARMs PCR method, and were tested on 3000 samples. After PCR and electrophoresis, three fragments with a length of 108, 213 and 276 bp were amplified and finally three genotypes were observed for FecB gene. In order to validate the designed primers, 20 samples were randomly sequenced. After validation, the result of this research indicates that the final obtained genotype in Tetra ARMs PCR method is same as the results from PCR-RFLP method. Tetra ARMs PCR method is rapid and economical for detection of FecB in a larger number of samples and can replace by enzyme digestion method which is all of more expensive.

Key words: Twinning, Sheep, AvaII enzyme, FecB gene, Tetra ARMs PCR.

مقدمه

هدف از اصلاح‌نژاد دام، تغییر شایستگی ژنتیکی حیوانات در نسل‌های آینده با استراتژی‌های اصلی اصلاح‌نژاد یعنی انتخاب داخل‌نژادی، بین‌نژادی، آمیخته‌گری و تکنولوژی ژنتیک مولکولی است (رشیدی، ۱۳۹۳). در این میان، اصلاح نژاد دام سبک مخصوصا گوسفند یکی از مهمترین مباحث اقتصادی در دامپروری و از عوامل تاثیرگذار در تولید پروتئین و امنیت غذایی است و دامداران باید به افزایش هر چه بیشتر تعداد دام مرغوب و اصلاح شده ترغیب شوند. از جمله صفات مهم و اقتصادی در گوسفند که نیاز به توجه در این زمینه را دارد، دوقلوزایی است (خان احمدی و همکاران، ۱۳۹۵). تا کنون چندین ژن بزرگ‌اثر[1] در ارتباط با صفت دوقلوزایی در گوسفند شناسایی شده‌است که این ژن‌های بزرگ‌اثر، قابلیت افزایش معنی‌داری بر عملکرد تولیدمثلی گله‌های گوسفند دارند.

ژن FecB یا ژن گیرنده پروتئین مورفوژنتیک استخوان[2] به‌عنوان مؤثرترین ژن در بروز صفت دوقلوزایی شناخته شده‌است (Etlik و همکاران، ۲۰۱۱). ژن FecB یک ژن اتوزومی است که بر میزان تخمک‌گذاری اثر افزایشی دارد و موجب بروز صفت دوقلوزایی می‌شود. یک نسخه از این ژن باعث افزایش میزان تخمک‌گذاری تقریباً به میزان ۱/۵ و دو نسخه از آن باعث افزایشی حدود سه تخمک در هر بار تخمک‌گذاری می‌شود. این افزایش تخمک‌گذاری باعث افزایش تعداد بره‌ها در هر فصل بره‌زایی به‌ترتیب به میزان یک و ۱/۵ می‌شود (Findlay و همکاران، ۲۰۰۲). این ژن بر روی کروموزوم ۶ گوسفند مکان‌یابی شده‌است (Montgomery و همکاران، ۱۹۹۳). مطالعات نشان داده‌است که بروز جهش A به G در نوکلئوتید ۷۴۶ ناحیه کد شونده این ژن منجر به تبدیل اسیدآمینه گلوتامین به آرژنین در

موقعیت ۲۴۹ و در نتیجه بروز صفت دوقلوزایی می‌شود (Kumar وهمکاران، ۲۰۰۶ و Souza و همکاران، ۲۰۰۱). در واقع عمده‌ترین تأثیرات فیزیولوژیکی لوکوس FecB بر نرخ تخمک-گذاری، اندازه و تعداد فولیکول‌های تخمک‌گذار در تخمدان‌ها است (Davis و همکاران، ۲۰۰۲). در حیوانات هموزیگوت (BB) و هتروزیگوت (+B) در مقایسه با تیپ وحشی (++)، فولیکول‌ها در اندازه کوچکتر بالغ شده و تخمک‌گذاری می‌کنند (Edwards و همکاران، ۲۰۰۸).

میانگین درصد صفت دوقلوزایی در گوسفندان نژاد ایرانی تقریبا پایین است به همین دلیل در سال‌های اخیر ژن FecB از نژاد خارجی برولا مرینو که درصد دوقلوزایی بالایی دارد توسط دانشگاه زنجان و جهاد کشاورزی در قالب طرح تحقیقاتی به نژاد افشاری ایرانی وارد و سپس تثبیت شده است، از این رو از نژاد برولا افشار بعنوان پایه در آمیخته‌گری و انتقال این ژن به گله‌های بومی استفاده می‌شود. اما به دلیل کاهش هزینه‌های داشتی گوسفند، تعیین ژنوتیپ آمیخته‌ها برای شناسایی این ژن در سنین پایین (بره یک ماهه به بالا) با کمک آنزیم AvaII انجام می‌شود. بدین صورت که مراحل کار شامل خونگیری، استخراج DNA از خون، واکنش PCR جهت تکثیر ژن FecB و هضم آنزیمی است. درواقع روش عمده مورد استفاده برای شناسایی گوسفندان حامل آلل دوقلوزایی، تکنیک PCR-RFLP با استفاده از آنزیم برشی AvaII است که جایگاه برشی این آنزیم منطبق بر حالت وجود جهش در ژن FecB می‌باشد (Davis و همکاران، ۱۹۸۲). تکنیک Tetra-ARMs PCR با نام کامل Tetra-primer Amplification Refractory Mutation system–polymerase chain که یک روش مبتنی بر PCR برای تشخیص وجود پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی[1] در ژنوم می‌باشد، می‌تواند جایگزین روش PCR-RFLP شود. مهم‌ترین اصل در این روش، در تفکیک آلل دارای جهش و آلل فاقد جهش، تکثیر شدن و یا عدم تکثیر یک توالی در واکنش PCR می‌باشد که بدین منظور از دو آغازگر مخصوص آلل موتانت (آلل جهش یافته) و آغازگر مخصوص آلل وحشی (آلل فاقد جهش) استفاده می‌شود. بنابراین تکثیر یک قطعه توسط آغازگر مخصوص آلل موتانت به مفهوم وجود جهش در آلل و تکثیر شدن یک قطعه توسط آغازگر مخصوص آلل وحشی به مفهوم عدم وجود جهش در آن توالی می‌باشد (Ye و همکاران، ۲۰۰۱). لازم به ذکر است که مهم‌ترین نوکلئوتید در آغازگرها باز انتهای ۳پریم (' ۳) آن می‌باشد، به این صورت که اگر باز انتهای ۳پریم یک آغازگر با رشته الگو جفت نشود، آنزیم پلیمراز قادر به تکثیر آن قطعه نخواهد بود و در واکنش PCR محصولی تکثیر نخواهد شد. در اینصورت اگر باز انتهای ۳پریم یک آغازگر برای جهش مورد نظر طراحی شود، این آغازگر تنها به توالی الگوی حاوی جهش (آلل موتانت) متصل خواهد شد و تنها با این توالی واکنش PCRصورت می‌پذیرد. در حالیکه اگر باز انتهای ۳پریم یک آغازگر برای توالی فاقد جهش طراحی شود، این آغازگر تنها به توالی الگوی فاقد جهش (آلل وحشی) متصل خواهد شد و تنها با این توالی واکنش PCR صورت می‌پذیرد (Medrano و همکاران، ۲۰۱۴).

همان طور که گفته شد روش متداول برای شناسایی جهش در ژن FecB، استفاده از آنزیم AvaII در تکنیک PCR-RFLP است منتها علاوه بر قیمت بالا، این آنزیم و همچنین ایزوشیزومرهای آن وارداتی است، روند ثبت سفارش و وارد کردن آن ماه‌ها طول می‌کشد و این موارد باعث مختل شدن کار آزمایشگاه‌های تشخیص ژنوتیپ که حجم آنزیم مصرفی بالایی دارند می‌گردد. همچنین علاوه بر اینکه روشی زمان‌بر و هزینه‌بر است، چون محصول PCR بر روی ژل اکریل آمید ران می‌شود به شدت سمی و خطرناک است. باتوجه به موارد ذکر شده، هدف از انجام مطالعه حاضر، حذف این آنزیم از مراحل فرآیند تعیین ژنوتیپ است تا علاوه بر کاهش قیمت، تعیین ژنوتیپ در کوتاهترین زمان و با مواد ایمن‌تر و کم خطرتر انجام شود. در واقع هدف این است که با صرف هزینه و زمان خیلی کمتر و بدون نیاز به آنزیم اساسی و وارداتی AvaII که در روش معمول استفاده می‌شود؛ ژنوتیپ دام موردنظر از نظر دوقلوزایی تعیین شود. بنابراین در این مطالعه، تکنیکTetra-ARMs PCR با استفاده

از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی جهش در ژن مذکور بهینه سازی گردید.

مواد و روش

در این پژوهش از ۳۰۰۰ راس گوسفند (از گله‌های افشاری واقع در خراسان رضوی که چند نسل با قوچ‌های هتروزیگوت اصلاح-نژاد شده بودند) با استفاده از ونوجکت‌های حاوی EDTA خونگیری شد. نمونه‌ها بلافاصله با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از کیت استخراج DNA از خون دنا زیست مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در ادامه برای تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

توالی ژن FecB از پایگاه NCBI با شماره دسترسی AF312016 دریافت شد. سپس جهش مورد نظر با نرم-افزار CLC Main Workbench شناسایی شد. در ادامه طراحی آغازگرها با نرم‌افزار Primer Primier 5 انجام شد. لازم به ذکر است که جهش موردنظر در نوکلئوتید ۷۴۶ و در قسمتی از ژنوم که حاوی توالی‌های تکراری زیادی است قرار گرفته است و از این رو طراحی جفت آغازگرها را اندکی با مشکل روبرو کرد که با صرف وقت زیاد، بهترین ناحیه برای طراحی آغازگرها شناسایی شد.

از دو جفت آغازگر طراحی شده، یک جفتِ آن بعنوان آغازگر کنترل (Outer) است که در واقع صحت انجام واکنش تکثیر قطعه موردنظر را نشان می‌دهد. جفتِ دیگر، آغازگر اختصاصی (Inner) است که برای ناحیه حاوی جهش و عدم وجود جهش طراحی شده است و بطور دقیق و بدون اشتباه در ناحیه مورد نظر نشسته و آن را تکثیر می‌کند. این دقت و عدم اشتباه بخاطر شرطی کردن نشستن آغازگر به کمک mismatch ها یا همان بازهای غیرمنطبق است. بدین صورت که با وجود یک باز اشتباه هم آغازگر روی DNA نشسته و آن را تکثیر می‌کند اما اگر دو باز اشتباه بلافاصله در کنار هم باشند (باز انتهایی ۳پریم و باز یکی مانده به آخر)، آغازگر قادر به تکثیر نبوده و عمل رونوشت برداری خاتمه می‌یابد. در طراحی آغازگر در کنار آغازگر عمومی، یک جفت آغازگر اختصاصی شامل آغازگر رفت برای حالت وجود باز جهش یافته (G) به همراه یک mismatch در کنارش و آغازگر برگشت برای حالت عدم وجود جهش (A) به همراه یک mismatch در کنار آن طراحی شد. در این صورت اگر در نمونه‌ی مورد نظر جهش A به G رخ داده باشد، آغازگر رفت که برای حالت جهش طراحی شده با وجود mismatch هم قادر به تکثیر قطعه خواهد بود چون همانگونه که گفته شد با وجود یک باز غیر منطبق هم تکثیر صورت خواهد گرفت اما در صورتیکه جهش رخ نداده باشد دو باز غیر منطبق در کنارهم خواهند بود و پرایمر قادر به نشستن روی توالی و تکثیر نخواهد بود. در طرف مقابل، آغازگر برگشت برای حالت عدم وجود جهش در کنار یک mismatch طراحی شده است که در این صورت اگر در نمونه مورد نظر جهش رخ نداده باشد با وجود یک باز غیر منطبق هم آغازگر روی توالی نشسته و تکثیر صورت می گیرد اما اگر نمونه حاوی جهش باشد در آن صورت دو باز غیر منطبق در کنارهم قرار می‌گیرد و آغازگر برگشت قادر به تکثیر نخواهد بود.

توالی آغازگرهای موردنظر در جدول ۱ نشان داده شده است:

جدول ۱- توالی و مشخصات آغازگرهای طراحی شده

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (درجه)	طول قطعه (bp)
Outer-F	5'- ACGCACTAACAGTGTGTTGG -3'	۵۹	۲۰
Outer-R	5'- GAGAGGAAAGCTAGGAAACCCTG -3'	۶۰	۲۳
Inner-F	5'- GGTTCCGAGAGACAGAAATATATGG -3'	۵۹	۲۵
Inner-R	5'- CATGCCTCATCAACACCGTTT -3'	۵۹	۲۱

پس از طراحی آغازگرها، این توالی‌ها به شرکت سیناکلون سفارش داده شد.

با داشتن DNA استخراج شده مربوط به هر نمونه، آغازگرهای اختصاصی و عمومی طراحی شده، مواد واکنش PCR (مستر میکس(AMPLICON-180301)، آب مقطر، دستگاه ترموسایکلر(TERMOCICLADOR MultiGene™ OptiMax- TC9610)، ژل آگارز و دستگاه ژل الکتروفورز(NogenHU-150)) و طی یک واکنش PCR به راحتی ژنوتیپ دوقلوزایی بررسی خواهد شد. جدول ۲ نسبت آغازگرها و مواد مورنیاز برای انجام واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر را نشان می‌دهد:

جدول ۲- مواد و مقدار و غلظت مورد نیاز آن ها برای واکنش pcr

مواد	مقدار (میکرولیتر)	غلظت
آب مقطر	۶	-
مسترمیکس	۱۰	2x
Outer-F	۰.۴	۵ پیکومول
Outer-R	۰.۴	۵ پیکومول
Inner-F	۲.۶	۵ پیکومول
Inner-R	۲.۶	۵ پیکومول
DNA	۳	میکرولیتر/ ۵۰ نانوگرم

برنامه دمایی بصورت واسرشت‌سازی اولیه در $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۴ دقیقه ، سپس ۳۵ چرخه دمایی به‌ترتیب $^{\circ}C$ ۹۴ به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال در $^{\circ}C$ ۵۴ به مدت ۳۵ ثانیه و $^{\circ}C$ ۷۰ به مدت ۴۰ثانیه و در انتها یک مرحله بسط نهایی با دمای $^{\circ}C$ ۷۰ به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید.

بعد از تکثیر و سپس مشاهده نتایج بر روی ژل آگارز، برای اعتبارسنجی نتایج، محصول PCR ۲۰ نمونه بصورت تصادفی انتخاب و با کیت gene all و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص شد. در ادامه مقدار ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR تخلیص شده به شرکت 1st BASE کشور مالزی ارسال شد تا

با دستگاه ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer توالی یابی صورت گیرد.

نتایج و بحث

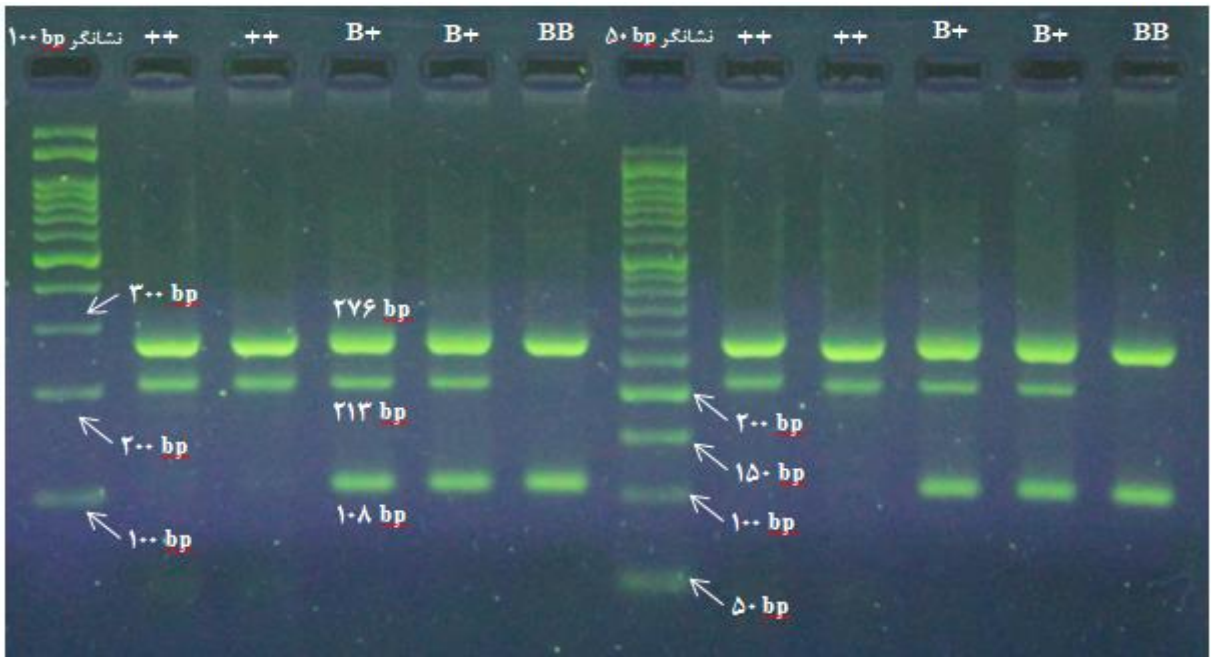
قطعات تکثیری شامل یک قطعه حاوی جهش موردنظر (موتانت)، یک قطعه فاقد جهش (وحشی) و یک قطعه که طول بزرگتری دارد و حاوی ناحیه جهش است جهت کنترل صحت انجام PCR است. در واقع در مرحله تکثیر ژن FecB با PCR، تعیین ژنوتیپ هم انجام می‌گیرد. در جدول ۳ قطعات تکثیری با جزئیات نشان داده شده‌اند:

جدول ۳- نام، توالی آغازگر و طول قطعات تکثیری

طول قطعه (**bp**)	توالی آغازگر	قطعه تکثیری
۲۷۶	Outer-F: 5'- ACGCACTAACAGTGTGTTGG – 3' Outer-R: 5'- GAGAGGAAAGCTAGGAAACCCTG -3'	کنترل
۲۱۳	Outer-F: 5'- ACGCACTAACAGTGTGTTGG -3' Inner-R: 5'- CATGCCTCATCAACACCGTTT -3'	وحشی
۱۰۸	Inner-F: 5'- GGTTCCGAGAGACAGAAATATATGG -3' Outer-R: 5'- GAGAGGAAAGCTAGGAAACCCTG -3'	موتانت

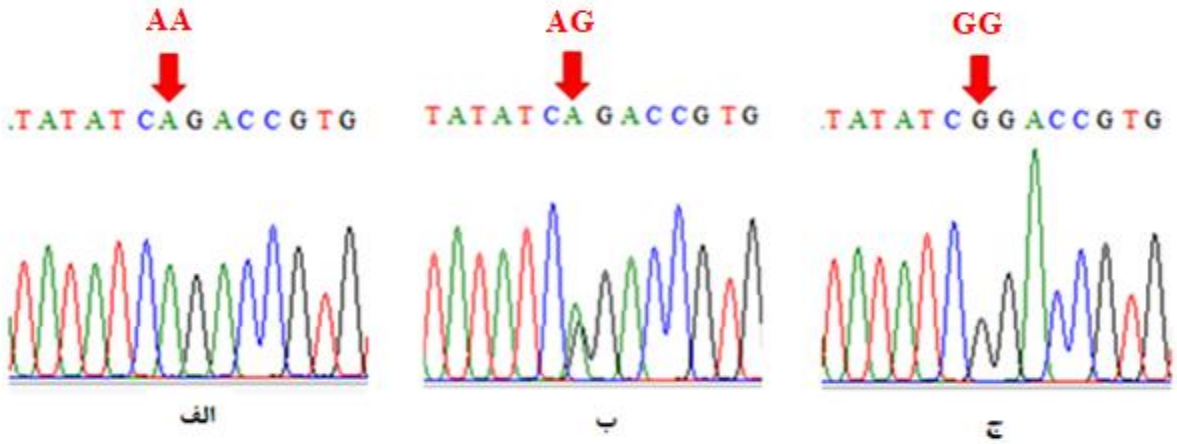
بعد از انجام PCR، ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد ران شد و تعیین ژنوتیپ انجام شد.

تصویر تعیین ژنوتیپ در شکل ۱ نشان داده شده است. تعیین ژنوتیپ بدین صورت است که باند ۲۷۶ جفت بازی که بعنوان کنترل انجام واکنش PCR هست برای کلیه دام‌های مورد آزمایش مشاهده می‌شود اما باند ۲۱۳ جفت بازی نشاندهنده عدم وجود جهش و باند ۱۰۸ جفت بازی نشاندهنده وجود جهش می‌باشد. حال دامی که هر سه باند مورد نظر را داشته باشد هتروزیگوت (B+) است اما چنانچه دوباند ۱۰۸ و ۲۷۶ جفت بازی مشاهده شود، هموزیگوت (BB) است و دامی که دو باند ۲۱۳ و ۲۷۶ جفت بازی را داشته باشد، وحشی (++) و فاقد آلل دوقلوزایی است.



شکل ۱- تصویر ژل آگارز جهت تعیین ژنوتیپ با آغازگرهای طراحی شده به روش Tetra ARMs PCR.-چاهک‌ها به ترتیب از سمت چپ شامل : نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، ژنوتیپ وحشی (++)، ژنوتیپ وحشی (++)، ژنوتیپ هتروزیگوت (B+)، ژنوتیپ هتروزیگوت (B+)، ژنوتیپ هموزیگوت (BB)، نشانگر ۵۰ جفت بازی، ژنوتیپ وحشی (++)، ژنوتیپ وحشی (++)، ژنوتیپ هتروزیگوت (B+)، ژنوتیپ هتروزیگوت (B+)، ژنوتیپ هموزیگوت (BB).

در ادامه برای اعتبارسنجی نهایی این آغازگرها، ۲۰ نمونه بصورت تصادفی انتخاب و بعد از تخلیص نمونه‌ها برای توالی‌یابی به کشور مالزی ارسال شد. پس از بررسی نتایج توالی‌یابی، تطابق کامل بین نتایج آغازگرهای بهینه شده روش Tetra ARMs PCR، روش PCR-RFLP و نتایج توالی‌یابی مشاهده شد. نتایج توالی یابی در شکل ۲ نشان داده شده‌است.



شکل ۲- ژنوتیپ وحشی (شکل الف)، ژنوتیپ هتروزیگوت (شکل ب) و ژنوتیپ هموزیگوت (شکل ج)

Tetra-primer ARMS PCR دارای مزایای بسیاری نسبت به PCR-RFLP ، Real-time PCR و توالی‌یابی DNA از نظر هزینه، زمان موردنیاز و کاربرد در یک آزمایشگاه با امکانات معمولی است (Etlik و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین با این تکنیک تعیین ژنوتیپ ۳ پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (Lajin و همکاران، ۲۰۱۲) و تعیین ژنوتیپ ۶ پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (Zhang و همکاران، ۲۰۱۳) همزمان و بصورت Mutiplex نیز گزارش شده است که برای تعیین ژنوتیپ ۶ پلی‌مورفیسم تک-نوکلئوتیدی ۲۴ آغازگر و برای شناسایی ۳ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ۱۲ آغازگر با چهار درجه حرارت مختلف در یک میکروتیوب ادغام شدند و نتایج با تعیین‌توالی DNA یکسان بود. تکنیک Tetra-ARMs PCR برای شناسایی جهش FecB در گوسفند نژاد مرینو، Hu و آمیخته مرینو-Hu قبلا به کار برده شده است اما به دلیل کم بودن اختلاف سایز قطعه‌های تکثیری آلل موتانت (۱۲۰ جفت بازی) و وحشی (۱۶۰جفت بازی) ، برای تعیین ژنوتیپ از ژل سمی و جهش‌زای اکریل‌آمید استفاده شده-است (Guan و همکاران، ۲۰۱۴). باندهای تکثیری توسط این آغازگرها نسبتا ضعیف بود و کیفیت کمی داشت اما اختلاف سایز قطعه تکثیری آلل موتانت و وحشی در آغازگرهای بهینه‌سازی شده در مطالعه حاضر نزدیک به ۱۰۰ جفت باز است که به راحتی بر روی ژل آکارز با غلظت کم هم با کیفیت بالا قابل شناسایی است. همچنین این روش برای شناسایی جهش ژن‌های FecB ، GDF9 و BMP15 در بز نژاد بنگال سیاه نیز استفاده شده است (Ahlawat و همکاران، ۲۰۱۴).

از این رو هدف ما طراحی و بهینه‌سازی آغازگرهای جدیدی جهت کاهش هزینه و زمان تعیین ژنوتیپ است تا در اختیار سایر پژوهشگران و مراکز خدمات بیوتکنولوژی قرا گیرد.

قابل ذکر است که برای تایید این آغازگرهای بهینه سازی شده، مطالعه‌ی موردی شاهدی بر روی بیش از ۳۰۰۰ نمونه در کنار روش آنزیمی PCR-RFLP و توالی‌یابی تست شد و دقت برابر، کافی و لازم این آغازگرها برای جایگزینی با آنزیم تایید شد. این روش علاوه بر پژوهش‌های پایان نامه‌ای، در آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی که روزانه بالغ بر ۳۰۰ نمونه خون گوسفند برای صفت دوقلوزایی تعیین ژنوتیپ می‌شوند، کاربرد فراوان خواهد داشت. کاهش هزینه و زمان صرف شده در این روش از یک سو و ایمن بودن این روش و حذف مشکل واردات آنزیم از دیگر سو، این تکنیک را برای استفاده قابل قبول نموده و در حال حاضر در اختیار چندین آزمایشگاه در مشهد قرار گرفته‌است که رضایت کامل را به همراه داشته است. لذا با بالا گرفتن تب استفاده از نژاد اصلاح شده برولا افشار و اصلاح گله‌های بومی با این نژاد، هدف از انتشار این مقاله در اختیار گذاشتن این آغازگرها برای سایر محققان و آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی است تا در زمان وجود تحریم‌ها که روند واردات آنزیم با مشکل مواجه است و همچنین افزایش قیمت دلار که باعث افزایش قیمت سرسام‌آور این آنزیم شده است، وقفه ای در روند کار پژوهشگران ما و خدمات‌رسانی به مردم ایجاد نشود.

نتیجه‌گیری

امروزه اعتبار و دقت تکنیک Tetra-ARMs PCR بر کسی پوشیده نیست. نتایج توالی‌یابی نیز اعتبار پرایمرهای طراحی شده را تایید نمود. لذا با شرایط کنونی که واردات آنزیم مشکلات خاص خود را دارد و هزینه‌بر و زمان‌بر است، جایگزینی این آغازگرها با آنزیم وارداتی AvaII بهترین روش خواهد بود تا ضمن کاهش هزینه و زمان صرف شده برای تعیین ژنوتیپ، کیفیت و ایمنی کار نیز افزایش یابد.

پانویس

۱- Major Gene

۲-BMPR1B

۳- Single Nucleotide Polymorphisms (SNP)

منابع

خان احمدی، ع.ر.، رحیمی میانجی، ق.، حافظیان، ح.، خاتمی نژاد، ر.، مامی زاده، ن.ب.ب. و موسوی، م. (۱۳۹۵). بررسی اثر چند شکلی برخی از ژن‌های کاندید بر چند قلوزایی در گوسفندان آمیخته حاصل از تلاقی نژادهای شال ایرانی و رومانوف روسی. *پژوهشهای تولیدات دامی*, *۷*(۱۴), ۱۹۲-۱۸۶.

رشیدی، ا. (۱۳۹۳)، ارزیابی استراتژی های اصلاح نژاد در گوسفند و بز، *ششمین کنگره علوم دامی ایران*، ایران، تبریز.

Ahlawat, S., R., Sharma, A., Maitra, M., Roy, and M. S, Tantia, (2014). Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes. *Meta gene*, *2*, 439-449.

Davis, G. H., Galloway, S. M., Ross, I. K., Gregan, S. M., Ward, J., Nimbkar, B.V. and Tiesnamurti, B. (2002). DNA tests in prolific sheep from eight countries provide new evidence on origin of the Booroola (FecB) mutation. *Biology of reproduction*, 66(6), 1869-1874.

Davis, G. H., Montgomery, G. W., Allison, A. J., Kelly, R. W. and Bray, A. R. (1982). Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 25(4), 525-529

Edwards, S. J., Reader, K. L., Lun, S., Western, A., Lawrence, S., McNatty, K. P. and Juengel, J. L. (2008). The cooperative effect of growth and differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein (BMP)-15 on granulosa cell function is modulated primarily through BMP receptor II. *Endocrinology*, 149(3), 1026-1030.

Etlik, O., Koksal, V., Arican-Baris, S. T. and Baris, I. (2011). Development and validation of a cost-effective in-house method, tetra-primer ARMS PCR assay, in genotyping of seven clinically important point mutations. *Molecular and cellular probes*, 25(4), 177-181.

Findlay, J. K., Drummond, A. E., Dyson, M. L., Baillie, A. J., Robertson, D. M. and Ethier, J. F. (2002). Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-β superfamily. *Molecular and cellular endocrinology*, 191(1), 35-43.

Guan, F., Shi, G., Wan, P., Dai, R., Tang, H., Wang, H. and Luo, Y. (2014). Development of cost-effective tetra-ARMS PCR for detection of FecB genotype in sheep. *Animal Science Papers and Reports*, 32(3), 229-237.

Kumar, S., Kolte, A. P., Mishra, A. K., Arora, A. L. and Singh, V. K. (2006). Identification of the FecB mutation in Garole× Malpura sheep and its effect on litter size. *Small Ruminant Research*, 64(3), 305-310.

Lajin, B., Alachkar, A. and Sakur, A. A. (2012). Triplex tetra-primer ARMS-PCR method for the simultaneous detection of MTHFR c. 677C> T and c. 1298A> C, and MTRR c. 66A> G polymorphisms of the folate-homocysteine metabolic pathway. *Molecular and cellular probes*, 26(1), 16-20.

Medrano, R. F. V. and de Oliveira, C. A. (2014). Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. *Molecular biotechnology*, 56(7), 599-608.

Montgomery, G. W., Crawford, A. M., Penty, J. M., Dodds, K. G., Ede, A. J., Henry, H. M. and Sise, J. A. (1993). The ovine Booroola fecundity gene (FecB) is linked to markers from a region of human chromosome 4q. *Nature genetics*, 4(4), 410-414.

Souza, C. J. H., MacDougall, C., Campbell, B. K., McNeilly, A. S. and Baird, D. T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPR1B) gene. *Journal of Endocrinology*, 169(2), R

Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R. and Day, I. N. (2001). An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic acids research*, 29(17), e88-e88.

Zhang, C., Liu, Y., Ring, B. Z., Nie, K., Yang, M., Wang, M. and Ma, X. (2013). A novel multiplex tetra-primer ARMS-PCR for the simultaneous genotyping of six single nucleotide polymorphisms associated with female cancers. *PloS one*, 8(4), e62126