بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
بخش علوم دامی
پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته علوم دامی- گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام

ارتباط ژن PIT1 با ترکیبات شیر در گاوهای هلشتاین استان خراسان رضوی

مؤلف :
زهرا ابراهیمی حسین زاده

استاد راهنما :
دکتر محمدرضا محمدآبادی

اساتید مشاور :
دکتر علی اسماعیلی زاده کشکوئیه
دکتر امین خضری

بهمن ماه۱۳۹۱

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

بخش علوم دامی
دانشکده کشاورزی
دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو : زهرا ابراهیمی حسین زاده

استاد راهنما : دکتر محمدرضا محمدآبادی

استاد مشاور اول : دکتر علی اسماعیلی زاده کشکوئیه

استاد مشاور دوم: دکتر امین خضری

داور اول : دکتر مسعود اسدی فوزی

داور دوم : دکتر امید دیانی

نماینده تحصیلات تکمیلی حاضر در جلسه دفاع: دکتر ابراهیم شکوهی

معاونت آموزشی و پژوهشی تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر مجید رحیم پور

معاون آموزشی و پژوهشی دانشکده :

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به پدر و مادرعزیزم

که از نگاهشان صلابت

از رفتارشان محبت

و از صبرشان ایستادگی را آموختم

و در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می زنم و با دلی مملو از عشق، محبت و خضوع، بر دستشان بوسه می زنم.
به برادر و خواهران عزیزم که سرمایه زندگیم هستند.
و به دوست عزیزم سمیرا جاویدان که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است.

بهترین سپاس مخصوص خداوندی است که حکم به تعلیم، اندیشه و قلم فرمود و انسان را به آموختن واداشت. به نام او که پدر و مادر را منت و نعمت قرار داد .

در ابتدا تشکر و قدردانی فراوان دارم خدمت پدر و مادر عزیزم به خاطر تمامی زحماتی که در دوران پر فراز و نشیب زندگی ام متحمل شدند. از برادر و خواهران عزیزم که مایه دلگرمی من هستند و از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد آبادی که توان علمی ام قطره کوچکی از علم و معرفت ایشان است کمال تشکر را دارم.

از اساتید مشاور جناب آقای دکتر اسماعیلی و دکتر خضری که در طول دوره آموزش و تحقیق، مرا از دانش ، تجربه و راهنمائیهای ارزنده خویش بهره مند ساخته اند و زحمت مشاوره پایان نامه را عهده دار شدند صمیمانه قدردانی و تشکر می نمایم. از داوران محترم که زحمت بازخوانی و داوری این مجموعه را به عهده داشتند، صمیمانه تشکر می کنم. از کلیه اساتید گرانقدر بخش علوم دامی که در دوران تحصیل از محضرشان کسب فیض نمودم، تشکر می کنم.

و در نهایت از دوستان عزیزم سمیرا جاویدان، سمیه گل محمدی وآمنه رهنما به پاس همکاریهای بی دریغشان سپاسگزارم.

چکیده

ژن PIT1 از جمله ژن های کاندیدا برای بهبود خصوصیات شیر تولیدی در دام های شیرده می باشد. لذا، هدف این پژوهش مطالعه چند شکلی ژن PIT1 و ارتباط آن با ترکیبات شیر در گاو هلشتاین استان خراسان رضوی است. برای این منظور ۱۰۰ نمونه خون از رگ زیر دم گاوهای هلشتاین استان خراسان رضوی گرفته شد و در لوله های حاوی EDTA ریخته شد. استخراج DNA به وسیله کیت استاندارد انجام شد. یک جفت پرایمر برای تکثیر ژن PIT1 استفاده و محصولات PCR به وسیله ژل آگارز جدا و مشخص شدند. سپس محصولات PCR در معرض آنزیم *Hinf*I قرار گرفت تا تشخیص آلل ها امکان پذیر گردد. فراوانی های آللی به وسیله نرم افزار PopGene برآورد شدند و فراوانی آللی A و B برای ژن PIT1 به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۷۵ به دست آمد. نتیجه آزمون کای اسکور نشان داد که در جمعیت تعادل هاردی- واینبرگ برقرار است. تعداد آلل های واقعی، آلل موثر، متوسط هتروزیگوسیتی، شاخص نئی و شاخص شانون به ترتیب ۲، ۱/۶۰، ۰/۳۷، ۰/۳۷ و ۰/۵۶ به دست آمد و نشان دهنده این هستند که گاوهای هلشتاین برای ژن PIT1 تنوع بالایی دارند. برای محاسبه ارتباط بین ترکیبات شیر و ژنوتیپ های مشاهده شده از نرم افزار SAS و رویه آماری GLM استفاده شد و نتایج نشان داد که اثر ژنوتیپ بر درصد چربی و درصد پروتئین معنی دار است ($P<۰/۰۵$). (ژنوتیپ AB بیشترین اثر را بر روی ترکیبات شیر دارد.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم، ژن PIT1 ، PCR-RFLP، گاو هلشتاین، ترکیبات شیر .

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه..... ۱

۱-۱ مقدمه..... ۲

فصل دوم: بررسی منابع..... ۵

۲-۱ تکنیکهای مولکولی و اصلاح دام..... ٦

۲-۲ کاربرد نشانگر ها در اصلاح دام..... ٦

۲-۳ تعیین چند شکلی در سطح DNA..... ۸

۲-۳-۱ کاربرد چند شکلی..... ۸

۲-٤ تعریف نشانگر..... ۹

۲-۴-۱ انواع نشانگرهای ژنتیکی..... ۹

۲-۵ RFLP ها (تفاوت طولی قطعات حاصل از هضم)..... ۹

۲-٦ ژن PIT1 ..... ۱۱

۲-۶-۱ساختمان ژن PIT1..... ۱۲

۲-۶-۲ باندشدن PIT1 به DNA و فعال سازی ژنهای هدف..... ۱۲

۲-۶-۳ اعمال بیولوژیکی PIT1 ..... ۱۳

۲-٦-٤ اثرات فیزیولوژیکی PIT1..... ۱۴

۲-۷ ساختمان ژن PIT1 در گاو..... ۱٤

۲-۸ مطالعات انجام شده در مورد پلی مورفیسم ژن PIT1..... ۱٤

فصل سوم: مواد و روش ها..... ۲۷

۳-۱ گرفتن خون از حیوان جهت استخراج DNA ۲۸
۳-۲ تعریف کیت و اساس کیت ۲۸
۳-۲-۱ شرایط نگهداری کیت ۲۹
۳-۲-۲ اجزاء کیت وترکیبات آنها ۲۹
۳-۳ تجهیزات مورد نیاز ۳۰
۳-٤ مراحل استخراج DNA ۳۱
۳-۵ تعیین کیفیت و کمیت DNA ی استخراج شده ۳۲
۳-٦ آگارز ژل الکتروفورز ۳۳
۳-۶-۱ تهیه ژل آگارز ۳۳
۳-۷ بافر TBE ۳٤
۳-۸ اتیدیوم بروماید ۳٤
۳-۹ رنگ بارگذاری ۳٤
۳-۱۰ پرایمر ۳٤
۳-۱۰-۱ رقیق سازی و آماده کردن پرایمر ۳۵
۳-۱۱ انجام PCR ۳۵
۳-۱۲ برخی واکنشگرهای PCR ۳۵
۳-۱۳ تهیه MASTER MIX برای انجام PCR ۳٦
۳-۱٤ برنامه مورد استفاده برای انجام PCR ۳۸
۳-۱۵ الکتروفورز فرآورده های تکثیر شده ۳۸

۳-۱۶ هضم محصولات PCR به کمک آنزیم های برشی..... ۳۸
۳-۱۶-۱ آنزیم برشی..... ۳۹
۳-۱۷ تعیین فراوانی ژنی، ژنوتیپی، شاخص های شانون و نئی..... ٤۰
۳-۱۸ تعیین ژنوتیپ افراد جمعیت..... ٤۰
۳-۱۹ تعیین ارتباط ژنوتیپها با صفات ترکیب شیر..... ٤۰
۳-۲۰ خلاصه آماری داده های مورد استفاده..... ٤۱
فصل چهارم: نتایج و بحث..... ٤۲
٤-۱ استخراج DNA..... ٤۳
٤-۲ انجام PCR..... ٤۳
٤-۳ الکتروفورز محصولات حاصل از هضم PIT1 با استفاده از آنزیم *Hinf-1*..... ٤٤
٤-٤ خواندن آلل ها..... ٤٥
٤-٥ فراوانی ژنوتیپی و آللی..... ٤٥
٤-٦ تعادل هاردی واینبرگ..... ٤٦
٤-۷ تنوع ژنتیکی..... ٤۷
٤-۸ بررسی ارتباط ژنوتیپ ها با ترکیبات شیر..... ٤۸
نتیجه گیری..... ٥۱
پیشنهادات..... ٥۲

فهرست جداول

جدول۲-۱ فراوانیهای آللی و ژنوتیپی در ۶ گاو ایرانی برای ژن PIT1..... ۲۲

جدول ۲-۲ فراوانی های آللی ژن PIT1 در نژادهای مختلف گاو..... ۲۳

جدول ۲-۳ فراوانی های آللی ژن PIT1 در نژادهای مختلف..... ۲۴

جدول ۳-۱ مشخصات پرایمر..... ۳۵

جدول۳-۲ مواد استفاده شده در هر واکنش PCR..... ۳۷

جدول۳-۳ برنامه PCR..... ۳۸

جدول ۳-۴ آنزیم *HinfI* برای ژن PIT1..... ۳۹

جدول۳-۵ خلاصه آماری داده های مورد استفاده در این تحقیق..... ۴۱

جدول ۴-۱ فراوانی های ژنوتیپی و ژنی محاسبه شده..... ۴۶

جدول ٤-۲ نتایج آنالیز کای اسکور..... ٤٦

جدول۴-۳ نتایج به دست آمده برای شاخص های تنوع..... ۴۷

جدول۴-۴ نتایج آنالیز ارتباط بین ژنوتیپ ها و درصد چربی شیر..... ۴۸

جدول۴-۵ نتایج آنالیز ارتباط بین ژنوتیپ ها و درصد پروتئین شیر..... ۴۸

جدول ۴-۶ نتایج آزمون توکی برای مقایسه اثر سه ژنوتیپ با درصد چربی شیر..... ۴۹

جدول ۴-۷ نتایج آزمون توکی برای مقایسه اثرسه ژنوتیپ با درصدپروتئین شیر..... ۵۰

فصل اول

مقدمه

۱- ۱مقدمه

پرورش گاو شیری یکی از بخش های مهم صنعت دامپروری است و برای پرورش دهندگان گاو شیری، تولید شیر و چربی منابع اصلی درآمد بوده و مهم ترین صفات در شاخص انتخاب محسوب می شوند. نژاد گاو شیری بدلیل تنوع محصولات و فرآورده های لبنی و تبدیل مواد خوراکی خشبی و علوفه به مواد غذایی مطلوب انسان با راندمان بالا از اهمیت خاصی برخوردار می باشد (هنگ و همکاران ۱۹۹۰).

از آنجا که هدف اصلی از برنامه های اصلاح نژاد در گاوهای شیری، افزایش تولید، بهره وری سیستم های تولیدی، انتخاب و دستیابی به پیشرفت ژنتیکی است، محققین اصلاح نژاد دام اطلاعاتی را مورد توجه قرار می دهند که بتوانند ارزش ژنتیکی دام را بخوبی نشان دهند. در طی دهه های اخیر با پیشرفت علم ژنتیک موفقیتهای زیادی در زمینه اصلاح نژاد دامها و در نتیجه افزایش تولیدات دامی به دست آمده است. صفات تولیدی در گاوهای شیری (مقدار شیر، درصد چربی و پروتئین) جزء صفات کمی بوده که تعداد زیادی ژن مسئول کنترل آنها می باشند (ادریس، ۱۳۷۷).

شیر و فرآورده‌های لبنی حاصل از آن، مهمترین منابع غذایی مورد استفاده درتغذیه هستند که احتیاجات انرژی وپروتئین باکیفیت بالا و انواع ویتامین ها و موادمعدنی را برآورده می‌کنند (چنت، ۱۹۹۶). شیر نقش عمده ای در غذای اطفال در حال رشد دارد و می تواند منبع با ارزشی از مواد برای انسانهای بالغ به ویژه افراد مسن باشد. شیر به دلیل غنی بودن از نظر پروتئین، کلسیم و ریبوفلاوین از ارزش استثنایی برخوردار است. پایین بودن تولید شیر به ازای هر رأس گاو در کشورهای در حال توسعه را می توان به عواملی نظیر شرایط آب و هوایی، منابع خوراک، تیپ گاو و مدیریت مرتبط دانست و جهت بروز حداکثر توان تولیدی باید شرایط مطلوب را فراهم کرد. بررسی های انجام شده نشان می دهد که میزان تولید شیر و در صد چربی گاوهای هلشتاین ایران هم در گله های مختلف و هم در بین حیوانات یک گله متفاوت است (شریف لو و همکاران، ۱۹۹۸).

طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاوداری با ظرفیت ۲۰۴۸۵۶۳ راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال های۸۳ تا ۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است. با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور ما، هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هر نفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می باشد در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا

برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال می باشد (دفتر آمار، ۱۳۸۷). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر درکشور برنامه ریزی گردد. لذا مطالعه و بررسی ژن هایی که روی تولید و ترکیب شیر نقش موثری دارند اهمیتی دو چندان می یابد.

مقالات مختلفی وجود همبستگی ژنتیکی منفی بین توازن انرژی، تولید شیر و شروع فعالیت تولید مثلی را گزارش کرده اند. لذا شناخت ژنهای عمده موثر بر این صفات از علاقه مندیهای محققان در سالهای اخیر بوده است (بلبی و همکاران، ۱۹۹۸؛ لوسی و همکاران، ۲۰۰۰؛ ویر کمپ و همکاران، ۲۰۰۰). استفاده از تکنیک های ژنتیک ملکولی از طریق انتخاب صحیح افراد، باعث افزایش پیشرفت ژنتیکی می شود. کاربرد تکنولوژی تعیین ژنوتیپ اولا برای ژنهای ترکیبات اصلی شیر و ثانیا برای سایر ژنهای مهم اقتصادی، لازم و ضروری به نظر می رسد (گلیم و همکاران، ۱۹۹۶).

تولید شیر از صفات مهم اقتصادی در صنعت پرورش گاوهای شیری می باشدکه تحت تاثیر عوامل محیط، تغذیه و ژنتیک قرار می گیرد و توسط تعداد زیادی ژن کنترل می شود. به علاوه بیشتر صفات اقتصادی در حیوانات اهلی به عنوان صفات کمی شناخته شده اند که تحت تأثیر تعداد بسیار زیادی ژن قرار دارند، اما تحقیقات اخیر نشان داده است که این صفات تحت کنترل تعدادی ژنهای اصلی می باشند که شناسایی آنها در حیوانات مزرعه ای از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. در صنعت گاو شیری ژنهای هورمون رشد، PIT1[1] و بتالاکتوگلوبولین سه نمونه از این ژنها می باشند و با توجه به نقش مهم آنها در بروز صفات اقتصادی، تحقیقات متعددی در زمینه ی تعیین چند شکلی این ژنها و نیز بررسی ارتباط آنها با صفات مربوط به تولید و ترکیب شیر انجام گرفته است (واوکیک و همکاران، ۱۹۸۲؛ تیل و همکاران، ۱۹۸۹؛ صبور و همکاران، ۱۹۹۳؛ رایس و همکاران، ۲۰۰۱؛ زکی زاده و همکاران، ۲۰۰۷؛ داریو و همکاران، ۲۰۰۸؛ کریمی و همکاران، ۲۰۰۹).

ژن PIT1 از جمله ژن های کاندیدا برای بهبود خصوصیات شیر تولیدی در دام های شیرده می باشد که در دهه اخیر زمینه بسیاری از تحقیقات ژنتیک مولکولی در زمینه اصلاح نژاد گله های شیرده را به خود اختصاص داده است (مودی و همکاران، ۱۹۹۵؛ پفافل و همکاران، ۱۹۹۲).

1– Pituitary Specific Transcription Factor

بسیاری از تحقیقات انجام گرفته بر روی شناسایی نقشه ژنتیکی در گاوهای شیری، در زمینه تعیین مکان های ژنی مرتبط با تولید شیر می باشد.

در گاوهای نژاد ایرانی مانند سرابی و گلپایگانی فراوانی شکل های مختلف آللی در ناحیه اگزون شش این ژن بررسی شده است. لذا هدف این مطالعه تعیین چند شکلی احتمالی موثر بر اگزون شش ژن PIT1 و بررسی رابطه آن با صفات ترکیبات شیر در گاو هلشتاین ایران در استان خراسان رضوی بود.

فصل دوم
بررسی منابع

۲-۱ تکنیکهای مولکولی و اصلاح دام

استفاده از تکنیکهای ملکولی به رفع برخی محدودیتها از روشهای رایج در اصلاح دام کمک می کند. گسترش استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز[1] (PCR)، توسعه تکنیکهای توالی یابی ژنوم، امکان شناسایی و کشف انواع نشانگرهای ملکولی در سطح ژنوم، ارائه نقشه های ژنتیکی متراکم از گونه های مختلف حیوانات اهلی و پیشرفتهای حاصله در علوم آمار و کامپیوتر از جمله تکنیکهایی است که امروزه در اصلاح دام از آنها استفاده های زیادی می شود (مونتالدو و همکاران، ۱۹۹۸؛ گاپتا و همکاران، ۲۰۰۰).

با توسعه تکنیکPCR توسط کری مولیس[2] در سال ۱۹۸۶ امکان تکثیر و مطالعه مناطق ویژه ای از سطح ژنوم فراهم شد و بدین ترتیب اشکال جدیدی از چند شکلی های موجود در سطح ژنوم همانند ماهوارکها و ریز ماهواره ها شناسایی گردید.

امروزه با بکار گیری تکنیکهای توالی یابی ژنوم امکان شناسایی ساختار اصلی سیستمهای ژنی وجود دارد. بطور معمول تجزیه و تحلیل های مبتنی بر توالی یابی در شناسایی تنوع موجود در سطح ژنوم حیوانات کاربردی ندارند اما از جمله ابزارهای حیاتی در تحلیل ساختار و بیان ژنها به شمار می روند (درینک واتر و اروهتزل، ۱۹۹۱).

ارائه نقشه های ژنتیکی متراکم از هر گونه حیوانی این امکان را بوجود می آورد که بتوان ژنوم را به طور کامل برای جایگاههای کنترل صفات کمی[3] (QTL) بررسی نمود. سپس این اطلاعات را می توان در برنامه های بهبود ژنتیکی مورد استفاده قرار داد (کینگ هورن و کلارک، ۱۹۹۷).

۲-۲ کاربرد نشانگر ها در اصلاح دام

درگذشته عمده برنامه های اصلاح نژاد گاوهای شیرده برآزمون نتاج یا انتخاب نرهای ممتاز براساس رکود تولیدی دختران استوار بود و درجمعیت دختران این گاوهای نرنیز رکوردگیری برای صفت تولید شیرصورت می پذیرفت و نهایتا نرهایی با ارزش ژنتیکی افزایشی مناسب برای تولید شیرانتخاب می گردید. چنین انتخابی به این دلیل انجام می شد که تنها صفت تولید شیرارزش اقتصادی داشت. امروزه ارزش گاوهای ماده منحصرا به وسیله تولید شیرمشخص

1– Polymerase Chain reaction
2 – Mullis
3 –Quantitative Trait Loci

نمی شود بلکه چربی و پروتئین نیز درآمد ناشی از فروش شیر را تحت تاثیرقرار می دهند. درصد چربی و پروتئین شیر از نظر ارزش اقتصادی در قیمت گذاری شیر ضروری می باشد و بنابراین در کنار سایر اهداف اصلاحی این صفات نیز از اهمیت خاصی برخوردارند.

علی رغم اینکه انتخاب فنوتیپی با استفاده از مدلهای حیوانی همواره توانسته پیشرفت ژنتیکی مناسبی را در نسلهای آتی به وجود آورد، اما نیاز به روشهایی که منجر به کاهش فاصله نسلی شده (زیرا طراحی برنامه های انتخاب ژنتیکی دامها برای بهبود خصوصیات تولید شیر علاوه بر اینکه به زمان طولانی نیاز دارد، از سوی دیگر در گاوهایی که به سن تولید شیر رسیده اند قابل ارزیابی می باشد) و همچنین دقت ارزیابی های ژنتیکی را بیش از پیش افزایش دهد، همواره احساس شده است. یکی از راهکارهای مناسب موجود برای دستیابی به این اهداف، کاربرد نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با صفات اقتصادی است که به طور مستقیم و یا غیر مستقیم بر تولید شیر و خصوصیات آن تأثیرگذار می باشند (زویر چووسکی و همکاران، ۲۰۰۱).

امروزه کاربرد توأم نشانگرهای ژنتیکی و اطلاعات فنوتیپی، برآورد دقیقتری از ارزشهای اصلاحی دامها را فراهم نموده است. شناسایی چندشکلی های موجود در ژنهای کاندیدای رشد و بررسی ارتباط آن با این صفات، اطلاعات مناسبی را برای متخصصین اصلاح نژاد مهیا می سازد. همچنین استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی ازابزارهای کمکی مناسب می باشد که ویژگی بارز آن ایجاد اطلاعات مناسب ژنوم و ا مکان استفاده این اطلاعات در مدلهای حیوانی در کنار رکوردهای فنوتیپی است (نقوی و همکاران، ۲۰۰۹).

از جمله کاربردهای ژنتیک مولکولی در زمینه اصلاح نژاد دام، بررسی چند شکلی های ژنهای مرتبط با صفات مهم واقتصادی می باشد. انتخاب بر اساس نشانگرهای ژنتیکی، بهبود دقت وصحت پیش بینی پاسخ به انتخاب و میزان پیشرفت ژنتیکی مورد انتظار در برنامه های اصلاح نژاد دام را افزایش می دهد. شناخت نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با صفات اقتصادی، اولین و مهمترین گام درطراحی برنامه های نوین اصلاح نژاد می باشد (حائری و همکاران، ۱۳۹۰).

نشانگرهای ژنتیکی برای ژنهای کاندیدا که نقشهای مهمی در توسعه و رشد دام بازی می کنند در انتخاب به کمک مارکر[1] (MAS) می توانند اهمیت داشته باشند.

---

1 - Marker Assisted Selection

۲-۳ تعیین چند شکلی در سطح DNA

بررسی تغییرات ژنتیکی در سطح DNA با تکامل فناوری DNA نوترکیب امکان پذیر شد. پیش از کشف PCR، نیاز بود تا قطعه های DNA همسانه سازی شوند تا میزان بسنده DNA به دست آید و پیچیدگی نمونه کاهش یابد. آنزیم های محدودگر و هیبریدیزاسیون ساترن بلات (ساترن، ۱۹۷۵) برای تعیین تغییرات تک نوکلئوتیدی در DNA ژنومی که موجب ایجاد و یا از بین رفتن جایگاه محدودگر می شوند، به کار گرفته می شوند. این گوناگونی (واریانت) های نوکلئوتیدی RFLP[1] نامیده می شوند و در پژوهش های آغازین در زمینه پیوستگی ژنی به کار می رفتند (بوت استین و همکاران، ۱۹۸۰).

توانایی تکثیر قطعه هایی ویژه از DNA ژنومی به وسیله PCR امکان تعیین موتاسیون های نقطه ای را در مقیاس گسترده ای فراهم کرده است (مولیس و فالونا، ۱۹۸۷). امروزه، DNA پلیمراز Thermus aquaticus (Taq) به گونه ای گسترده برای تکثیر DNA به کار گرفته می شود. بسته به اندازه قطعه مورد تکثیر و شرایط واکنش (غلظت منیزیم کلراید و dNTP ها، pH و دما)، نرخ خطای پلیمراز Taq در دامنه ۱۰-۴ تا ۱۰-۵ در نوکلئوتید است (رایس و همکاران، ۱۹۹۰).

روش های تعیین موتاسیون دو دسته هستند. دسته نخست، روش هایی هستند که برای جستجوی موتاسیون ناشناخته در یک ناحیه هدف به کار گرفته می شوند و دسته دیگر، روش هایی هستند که برای جستجوی چندشکلی هایی به کار می روند که پیش از این در نمونه های دیگر گزارش شده اند.

روش های جستجو و بررسی برای تعیین و شناخت ویژگی های موتاسیون، معمولا پرکار و پرهزینه هستند و تفسیر یافته ها دشوار است. زمانی که یک موتاسیون کشف شود، با روش های ژنوتیپ کردن و فناوری های کارآمد، می توان این گوناگونی را در تعداد زیادی از نمونه ها بررسی کرد.

۲-۳-۱ کاربرد چند شکلی

بررسی چند شکلی دارای کاربردهایی از قبیل تشخیص پیوستگی ژنی، تشخیص بیماری های ژنتیکی، تشخیص افراد هتروزیگوت حامل بیماری، ارزیابی افرادی که در معرض بیماری های

---

1 – Restriction Fragment Length Polymorphism

قلبی و سرطانی هستند، تست والدی و کاربرد در موارد پزشکی قانونی و غیره می باشد (زاغلول و همکاران، ۲۰۰۶).

۲-۴ تعریف نشانگر

یک نشانگر مولکولی توالی از DNA است که به راحتی در بین دو فرد قابل تشخیص باشد و الگوی توارث آن نیز معلوم باشد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۲-۴-۱ انواع نشانگرهای ژنتیکی

یک نشانگر ژنتیکی باید حداقل دو ویژگی زیر را داشته باشد: ۱ـ در بین افراد متفاوت باشد، یعنی پلی مورف باشد. ۲ـ به توارث برسد.

نشانگرهای ژنتیکی چند نوع هستند که شامل موارد زیر می باشند:

۱ـ نشانگرهای ریخت شناسی (مورفولوژیکی)

۲ـ نشانگرهای فیزیولوژیکی

۳ـ نشانگرهای سیتوژنتیکی

۴ـ نشانگرهای پروتئین

۵ـ نشانگرهای DNA

یکی از انواع نشانگرهای مولکولی RFLP ها می باشند که در این تحقیق از این نشانگر استفاده نمودیم.

۲-۵ RFLP ها (تفاوت طولی قطعات حاصل از هضم)

در اوایل دهه ۱۹۸۰ بوتساین و همکارانش روش تفاوت طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی یاRLFP را برای مطالعه مستقیم DNA و یافتن نشانگرهای ژنتیکی جدید پیشنهاد کردند این تحول از پیامدهای منطقی کشف آنزیمهای محدود گر بود. این آنزیم ها،آنزیمهای بسیار اختصاصی هستند که ردیف های ویژه ای (نقاط برش) را در ملکول DNA شناسایی کرده و آنها را از محل خاصی قطع می نمایند (هاگو و مونتولد، ۲۰۰۴).

PCR-RFLP، امکان تعیین سریع موتاسیون های نقطه ای را می دهد و پس از اینکه توالی ژنومی به وسیله PCR تکثیر می شود، موتاسیون به وسیله هضم با اندونوکلئاز محدودگر و با الکتروفورز ژل و در پی آن رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین می شود.

تکنیک PCR-RFLP روشی مناسب برای شناسایی جهش تک نوکلئوتیدی شناخته شده در مولکول DNA می باشد. در این روش باید جایگاه جهش و نوع آن کاملا شناخته شده باشد تا آنزیم برشی مناسب برای شناسایی جهش ایجاد شده مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از این روش می توان افراد جمعیت را برای جایگاه مورد نظر تعیین ژنوتیپ نمود و تصویری از تنوع موجود در جمعیت را به دست آورد. با توجه به ساده بودن انجام روش PCR-RFLP و هزینه نسبتا پایین آن می توان در هر آزمایشگاهی از آن بهره برد. این روش ساده و ارزان بوده و برای ژنوتیپ کردن SNP[1] دارای دقت بالایی است و به گونه ای ویژه در پژوهش های کوچک پایه برای بررسی بیماری های ژنتیکی پیچیده سودمند است. انجام پروتکل کامل آن تنها یک روز زمان می برد. محدودیت های این پروتکل در حالت هایی مانند زمانی است که توالی SNP هدف برای آنزیم های محدودگر تجاری مناسب نیست و یا زمانی که توالی دارای چند جایگاه شناسایی برای یک آنزیم محدودگر است. یکی از بارزترین معایب این تکنیک وقت بری آن در هنگام هضم آنزیمی است. برخی از آنزیمهای برشی مورد استفاده در این تکنیک برای هضم قطعه مورد نظر و شناسایی جهش، نیاز به دما و زمان زیادی دارند (بیوزن و همکاران، ۲۰۰۰).

RFLP ها دارای محاسن زیر می باشند:

۱ـ تکرار پذیری در حد متوسط است (کارپ و همکاران، ۱۹۹۷).

۲ـ دقت و قابلیت اعتماد به این نشانگرها فوق العاده زیاد است (کارپ و همکاران، ۱۹۹۷).

۳ـ همبارز هستند و امکان تشخیص افراد هموزایگوت از هر یک از انواع افراد هتروزایگوت وجود دارد.

۴ـ فراوانی این نشانگرها در حد بالایی است.

۵ـ تحت تأثیر محیط داخلی و خارجی نبوده و صد در صد ژنتیکی است.

RFLP ها همچنین دارای معایب زیر می باشند (قره یاضی، ۱۳۷۵):

۱ـ دشواری، پیچیدگی و وقت گیر بودن روش کار با آنها.

۲ـ هزینه اولیه آن (کارپ و همکاران، ۱۹۹۷).

با اصلاح تکنیک RFLPS امکان تشخیص آللهای چندگانه وجود دارد اما هنوز به طور عملی موانعی وجود دارد که ترجیح داده می شود از میکروساتلایتها استفاده شود (چیکونی و همکاران،

---

1 – Single Nucleotide Polymorphism