تحصیلات تکمیلی دانشگاه
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
در رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام

چند شکلی در ژن PEPCK-C مرغان بومی سیستان

اساتید راهنما:
دکتر مسعود علی‌پناه
دکتر آدم ترکمن زهی

اساتید مشاور:
دکتر قاسم جلیلوند
دکتر محمد رضا نصیری

تهیه و تدوین :
جلال عمرانی بیدی

مهرماه 1388

بسم الله الرحمن الرحيم

صفحه الف

این پایان نامه با عنوان: «چند شکلی در ژن PEPCK-C مرغان بومی سیستان» قسمتی از برنامه آموزشی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی گرایش ژنتیک و اصلاح نژاد دام توسط دانشجو جلال عمرانی بیدی تحت راهنمایی اساتید پایان نامه آقایان دکتر مسعود علی پناه و دکتر آدم ترکمن زهی تهیه شده است. استفاده از مطالب آن به منظور اهداف آموزشی با ذکر مرجع و اطلاع کتبی به حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه زابل مجاز می باشد.

امضا دانشجو

این پایان نامه 6 واحد درسی شناخته می شود و در تاریخ 1388/7/29 توسط هیئت داوران بررسی و نمره و درجه به آن تعلق گرفت.

نام و نام خانوادگی **امضاء** **تاریخ**

1- استاد راهنما : دکتر مسعود علی پناه

2- استاد راهنمای دوم : دکتر آدم ترکمن زهی

3- استاد مشاور اول : دکتر قاسم جلیلوند

4- استاد مشاور دوم : دکتر محمد رضا نصیری

5- استاد داور: دکتر مصطفی یوسف الهی

6- نماینده تحصیلات تکمیلی : دکتر مصطفی حیدری

6- مدیر گروه : دکتر قاسم جلیلوند

تقدیم به پدر مهربان و عزیزم

و روح پاک مادرم که جسم پاکش چه زود در نقاب خاک کشید

و

به برادران خوب و ارجمندم

جواد و علی

تقدیر و سپاس

در انتها بازگردان سپاس آغازینم، بر نادیده و ناشنیده ای که هر دیدو دیده و هر شنید و نشنیده، خود آفریده اوست. بزرگ بخشاینده ای که استوار پایه ای نهاد، آنچنان که هر جوینده را راهی و هر شناسنده را گواهی بر او باشد. بی نیاز، هیچ دیر و دور و گیر و دار، هیچ واسطه ای.

و دیگر آنکه....

در آتش ریز آفتاب و تبخیر خشک سراب مانده، برگذاری که بیراهه هایش به راه می ماند و راهش به بیراهه، آنجا که گام در دام واره خاک می ماند و تردید، چگونه می توان از نیک سرشتان و مهرورزان، پایمردان به عشق و بزرگواران: اساتید راهنمای فرهیخته و مهربانم آقایان دکتر مسعود علی پناه و دکتر آدم ترکمن زهی، اساتید مشاور ارجمندم: آقایان دکتر قاسم جلیلوند و دکتر محمد رضا نصیری و همچنین مدیر گروه محترم علوم دامی: جناب دکتر مصطفی یوسف الهی، انسان گوهرین سرشت جناب دکتر سید ابوالفضل حسینی مدیر گروه محترم زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم سبزوار، دوستان مهربان و عزیزم آقای دکتر شاهرخ قوتی و مهندس امیر طاهری و تمامی اعضای خوب پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل و....

آنانکه ابر وار سایه بر دشت های خستگی گستراندند و گام در گام، رهنمون یگانه مقصد آبادیمان شدند، شایسته سپاسی گفت،

چگونه می توان؟

جلال عمرانی

پاییز 88

چکیده

ژن فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز سیتوزولی (PEPCK-C) یکی از ژنهای کاندیدای مهم می باشد که آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز را رمزگذاری می کند که آنزیمی مهم در چرخه گلیکونئوژنسیز می باشد. در ژنوم موجودات زنده دو شکل متفاوت از این ژن وجود دارد: ژن فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز سیتوزولی (PEPCK-C) و ژن نوع میتوکندریایی (PEPCK-M). در این تحقیق به طور تصادفی 100 نمونه از دو جمعیت بومی منطقه سیستان و بلوچستان به نامهای خزک و دشتیاری مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از فولیکول انتهایی پر DNA استخراج و با استفاده از PCR و پرایمرهای F_1R_1 ، F_2R_2 ، F_3R_3 و F_4R_4 قطعه ای به طول 3792 bp از فاصله پروموتر تا اگزون شماره 3 از ژن PEPCK-C تکثیر و سپس قطعات تکثیر شده با استفاده از آنزیم های BsteII و AciI مورد هضم قرار گرفت. محصول هضم روی ژل آگارز 1/5 درصد تعیین ژنوتیپ شد و فراوانی های ژنوتیپی و آللی با استفاده از نرم افزار POPGENE 3.2 مورد آنالیز قرار گرفت. فراوانی آللی برای نمونه های خزک در جایگاه BsteII، A=0/98 و B=0/02 و در جایگاه AciI، A=0/86 و B=0/14 و برای نمونه های دشتیاری در جایگاه BsteII ، A=0/92 و B=0/08 و برای جایگاه AciI، A=0/98 و B=0/02 بود. تجزیه هاپلوتایپ برای دو SNP نشان داد که چهار هاپلوتایپ A, B, C, D در دو جمعیت مرغ وجود دارد و فراوانی آنها به ترتیب برای مرغان خزک 0/02، 0/14،0/84 و 0 و برای مرغان دشتیاری 0، 0/02، 0/9 و 0/08 بود. از نه ژنوتیپ ممکن تنها چهار ژنوتیپ CC، CD، AC و BC در دو نمونه مشاهده گردید که در این میان ژنوتیپ CC فراوانی بیشتری داشت. مطالعه حاضر نشان می دهد که در هر دو نمونه چند شکلی وجود دارد.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم، ژن فسفوانول پیروات کربوکسی کینازسیتوزولی، مرغان بومی، استان سیستان و بلوچستان.

عنوان ..... صفحه
فصل اول: مقدمه 1
1- 1- مقدمه و اهداف 3
2- 1- **اهمیت نقش ژن PEPCK-C در بیولوژی طیور** 4
فصل دوم: بررسی منابع 5
2-1- مارکرهای ژنتیکی 6
2-1-1- مزایا و کاربردهای مارکرهای مولکولی 11
2-2- چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) 13
2-3- SNP در حیوانات اهلی 13
2-4- شناسایی SNP ها : استراتژی های اصلی 15
2-5- روش های تعیین ژنوتیپ SNP ها 18
2-6- تشخیص آللی 22
2-7- توصیف صفات اختصاصی ژن PEPCK 22
2-7-1- ژن PEPCK-C 23
2-7-2- ژن PEPCK-M 25
2-8- کنترل فیزیولوژیکی ژن PEPCK-C در بافت های پستاندارن 27
2-9- تنظیم نسخه برداری ژن PEPCK-C 28
2-10- عوامل تنظیمی در ناحیه ´5 ژن 29
2-11- آنالیز عملکردی از عوامل تنظیمی CIS 30
2-12- نقش C/EBP در تنظیم نسخه برداری ژن PEPCK-C 33
2-13- عوامل درگیر در تنظیم هورمونی نسخه برداری ژن PEPCK-C 35
2-13-1- تنظیم بوسیله گلوکوکورتیکوئید، CAMP و هورمون تیروئید 35
2-14- تنظیم نسخه برداری ژن PEPCK-C در کلیه بوسیله اسیدوزیس 38
2-15- مهار نسخه برداری ژن PEPCK-C بوسیله انسولین و فوربل استر 38
2-16 اثر حجم و توده سلولی و ازدیاد مزمن قند خون بر میزان نسخه برداری ژن PEPCK-C 40
2-17- بررسی SNP ها و تنوع در ژن PEPCK-C در طیور تجاری 41
فصل سوم: مواد و روش‌ها 43
3-1- جمعیت های طیور مورد مطالعه 44
3-2- مراحل آزمایش 44
3-3- نمونه گیری 45
3-4- استخراج DNA 45
3-5- استخراج DNA از پر به روش کیت (تیوسیانات گوانیدین - سیلیکاژل) 46
3-6- استخراج DNA از پر به روش فنل کلروفرم 47
3-7- تعیین غلظت DNA و خلوص آن 48
3-8- محلول های لازم برای الکتروفورز 49
3-8-1 محلول TBE (بافر تریس بورات) 49
3-8-2- محلول TAE (بافر تریس استات) 49

3-8-3- محلول اتیدیوم برماید 50
4-8-3- بافر لودینگ برای الکتروفورز DNA 50
3-9- پرایمر ها 50
3-10- کیت PCR 51
1-10-3- اجزای کیت 51
2-10-3- شرایط نگهداری کیت 51
3-11- تکثیر اختصاصی مولکول DNA 52
1-11-3- واکنشهای زنجیره ای پلیمراز 52
3-12- مواد و مراحل انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز PCR 53
1-12-3- DNA ی الگو 53
2-12-3- آغازگر ها (جلودارها) 53
3-12-3- دمای جفت شدن آغازگرها 53
3-13- راه اندازی واکنش های PCR 54
1-13-3- مراحل PCR 54
3-14- چرخه PCR برای پرایمرها 55
3-15- الکتروفورز فراورده های تکثیر شده 58
3-16- برش آنزیمی DNA توسط آنزیم های برش دهنده اختصاصی 58
3-17- هضم محصولات PCR به کمک آنزیم های برشی 59
3-18- مراحل هضم آنزیمی 60
3-19- روی ژل بردن محصولات آنزیم 60
3-20- تجزیه و تحلیل داده ها 61
3-21- معیارهای چند شکلی یا پلی مورفیسم 61
فصل چهارم: نتایج و بحث 63
4-1- کمیت و کیفیت DNA 64
4-2- تکثیر محصولات PCR 64
4-3- بررسی ساختار ژنتیکی در موقعیت 3792 bp از ژن PEPCK-C 67
4-4- هضم محصولات PCR برای پرایمر F_2R_2 به کمک آنزیم برشیBSTE П 68
4-5- هضم محصولات PCR برای پرایمر F_4R_4 به کمک آنزیم AciI 69
4-6- تقسیم بندی ژنوتیپی برای محصولات آنزیم BSTEП 70
4-7- فراوانی ژنی و ژنوتیپی محصولات هضم آنزیم BSTEП 71
4-8- تقسیم بندی ژنوتیپی برای محصولات هضم آنزیم AciI 73
4-9- فراوانی ژنی و ژنوتیپی محصولات هضم آنزیم AciI 73
4-10- تعادل هاردی واینبرگ 76
4-11- بررسی هاپلوتایپ های ژن PEPCK-C در دو جمعیت دشتیاری و خزک 78
4-12- نتیجه گیری و بحث 80
4-13- پیشنهادات 82
فهرست منابع 89

فهرست جداول

عنوان ..... صفحه

جدول 1-2: دسته بندی مارکرهای DNA بر اساس مبتنی بر کارکرد PCR و عدم کاربرد آن 7
جدول 2-2- نوعی دیگر از طبقه بندی مارکرهای مولکولی مورد استفاده در اصلاح دام 8
جدول 3-2- نیازمندی های تکنیکی و خصوصیات مارکرهای مورد استفاده در اصلاح دام 10
جدول 4-2- روش های شناسایی جهش های نقطه ای 21
جدول 1-4- تغییر توالی و هاپلوتایپ ها 68
جدول 2-4- فراوانی ژنوتیپی برای جمعیت خزک 71
جدول 3-4- فراوانی ژنوتیپی برای جمعیت دشتیاری 71
جدول 4-4- فراوانی ژنوتیپی برای هر دو جمعیت 71
جدول5-4- فراوانی آللی برای توده نژادی خزک 72
جدول6-4- فراوانی آللی برای توده نژادی دشتیاری 72
جدول 7-4- فراوانی آللی برای هر دو توده نژادی خزک و دشتیاری 72
جدول 8-4- فراوانی ژنوتیپی برای جمعیت دشتیاری 73
جدول 9-4- فراوانی ژنوتیپی برای جمعیت خزک 74
جدول 10-4- فراوانی ژنوتیپی برای هر دو جمعیت 74
جدول 11-4- فراوانی آللی برای جمعیت دشتیاری 75
جدول 12-4- فراوانی آلی برای جمعیت خزک 75
جدول 13-4- فراوانی آللی برای هر دو جمعیت 75
جدول 14-4- توده نژادی خزک (BSTEΠ) 76
جدول 15-4- توده نژادی دشتیاری (BSTEΠ) 76
جدول 16-4- دو توده نژادی خزک و دشتیاری (BSTEΠ) 77
جدول 17-4- توده نژادی دشتیاری(AciI) 77
جدول 18-4- توده نژادی خزک(AciI) 77
جدول 19-4- دو توده نژادی خزک و دشتیاری(AciI) 78
جدول 20-4- انواع و فراوانی هاپلوتایپ های ژن PEPCK-C 79
جدول 21-4- بررسی هاپلوتایپ های ژن PEPCK-C در دو جمعیت دشتیاری و خزک 79

فهرست اشکال

عنوان ..... صفحه

شکل 1-2- شناسایی SNP ها بوسیله ردیف کردن توالی های بدست آمده از تعیین توالی مستقیم محصولات PCR 16

شکل 2-2- نماینده کاهش یافته چهار پاره ای (RRS) برای شناسایی SNP 17

شکل 3-2- عوامل تنظیم نسخه برداری پروموتر ژن PEPCK-C 30

شکل 1-4- DNA استخراج شده توسط کیت دیاتوم 64

شکل 2-4- محصول PCR برای پرایمر F_2R_2 65

شکل 3-4- محصول PCR برای پرایمر F_4R_4 65

شکل 4-4- محصول PCR برای پرایمر F_3R_3 66

شکل 5-4- محصول PCR برای پرایمر F_1R_1 66

شکل 6-4- موقعیت جهش ها و پرایمرها در فاصله 3792 bp از ژن PEPCK-C 67

شکل 7-4- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم BSTEII 69

شکل 8-4- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم توسط آنزیم AciI 70

فهرست ضمائم

عنوان ..... صفحه
ضمیمه 1: Primer F_2R_2 107
ضمیمه 2: Primer F_1R_1 108
ضمیمه 3: Primer F_3R_3 109
ضمیمه 4: Primer F_4R_4 110
ضمیمه 5: محدودیت های روش ژنتیک کمی و مزایای کاربرد اطلاعات مولکولی 111

فصل اول

مقدمه

1-1- مقدمه و اهداف

ژنتیک مولکولی، بخش مهم و شاید عمده زیست شناسی مولکولی است که با کشف ساختار مولکولی DNA در سال 1953 تولد یافته و در طول مدت زمان کوتاهی که از عمر آن می گذرد با سرعتی شگفت انگیز پیشرفت کرده است. مهندسی ژنتیک که یکی از دستاوردهای این علم است، ابزار قدرتمندی است که نه تنها بخش عظیمی از پژوهش های زیست شناسی را به عهده دارد، بلکه توانسته است جایگاه ویژه ای را در تکنولوژی به خود اختصاص دهد. بیوتکنولوژی، با بهره گیری از فنون مهندسی ژنتیک و اصول ژنتیک مولکولی چنان تاثیر ژرفی را بر روندهای علمی و اقتصادی نهاده است (آل محمد 1387) که آن را «انقلاب سوم علمی» نام نهاده اند. ژنومیکس نیز که به بررسی و مطالعه کل ژنوم موجودات می پردازد در پیشبرد این علم تاثیر بسزایی داشته است(ابطحی و همکاران، 1384).

پیشرفت های قابل توجهی در زمینه بهبود ژنتیکی حیوانات اهلی از طریق انتخاب مصنوعی بر روی صفات کمی، صورت گرفته است. بیشتر این انتخاب ها بر اساس فنوتیپ بدون اطلاع از ساختار ژنتیکی خصوصیات انتخاب شده، بوده است. با این وجود مطالعات مولکولی ژن های موثر بر صفات در جمعیت های دامی منجر به درک بهتر ژنتیک صفات کمی است. می توان از ژن ها و مارکرهای ژنتیکی که تاکنون کشف شده اند برای افزایش پیشرفت ژنتیکی گله های اصلاحی از طریق انتخاب بر اساس مارکر[1] استفاده کرد (Lizardi, 1998).

روش ژنتیک کمی [2] برای انتخاب دام ها، بر اساس اطلاع از فراسنجه های ژنتیک جمعیت برای صفات

[1] - Marker- assisted selection
[2] - The quantitative genetic approach

مورد نظر مثل وراثت پذیری[1] و همبستگی های ژنتیکی می باشد. این پارامترها را می توان با استفاده از آنالیز آماری اطلاعات فنوتیپی حاصل از شجره ها بدست آورد (Lizardi *et al*., 1998). با این وجود، ساختار ژنتیکی صفت مورد مطالعه همچون جعبه سیاهی است، که هیچ علمی در مورد ژن های موثر بر آن صفت وجود ندارد و در آن اثر هر کدام از ژن ها یا جایگاه های آنها در ژنوم مورد مطالعه قرار نمی گیرد. به طور اختصاصی تر، تئوری ژنتیک کمی بر اساس مدل ژنتیکی بی نهایت کوچک فیشر[2] می باشد که در این مدل فرض است که صفت مورد مطالعه به وسیله تعداد نامحدودی ژن و هر کدام با یک اثر بی نهایت کوچک، کنترل می شود. بر اساس این مدل، افزایش مورد انتظار در عملکرد هر جمعیت از طریق انتخاب ژنتیکی، با دقت برآورد ارزش ارثی[3] فشار انتخابی و تنوع ژنتیکی جمعیت، متناسب است (Bern, 1975).

2-1- اهمیت نقش ژن PEPCK-C در بیولوژی طیور

ژن PEPCK-C یک ژن بزرگ با طولی در حدود 8Kb در روی کروموزم 20 قرار دارد و کد کننده آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز سیتوزولی بوده که آنزیمی کلیدی در چرخه گلیکونئوژنسیز بوده (محمدی، 1386) و سنتز گلوگز را از ترکیباتی چون اگزالواستات، اسیدهای آمینه و سایر ترکیبات حیاتی دیگر بر عهده دارد (Ash *et al*., 1989). این آنزیم، پروتئینی به طول 622 اسید آمینه و دارای وزن مولکولی 69522 دالتون می باشد(Hod *et al*., 1984 , Sato *et al*., 1997). فرآورده آنزیمی این ژن در فرایند سنتز گلوکز دخالت دارد که می تواند نقش بسیار حیاتی در تامین کالری بدن ایفاء کند. همچنین، نقش آن در ایجاد بیماری های توموری و نیز بیماری مارک در طیور به اثبات رسیده است (Li *et al*., 1998) و چون تنها ماده مصرفی مغز، گلوگز می باشد اثر این آنزیم برای تامین مواد

[1] - Heritability
[2] - Fisher's infinitesimal
[3] - Breeding value

غذایی، و عملکرد مغز در تمامی موجودات بسیار حیاتی می باشد (محمدی، 1386). همچنین، در رابطه با تاثیر این ژن بر روی صفات تولیدی چون ضریب تبدیل غذایی، درصد جوجه درآوری، میزان تولید تخم مرغ و رشد ماهیچه نیز تحقیقاتی صورت گرفته است و اثر آن بر روی صفات تولیدی مهم در طیور (Parsanejad *et al*., 2002) و دام به اثبات رسیده است.

هدف از این تحقیق شناسایی پلی مورفیسم ژن فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز سیتوزولی (PEPCK-C) می باشد. در این مطالعه یک قطعه 1000bp در فاصله پروموتر تا اگزون شماره 2 این ژن مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق روی دو توده مرغان بومی خزک و دشتیاری استان سیستان و بلوچستان انجام گرفت.

فصل دوم

بـــررسی منابع

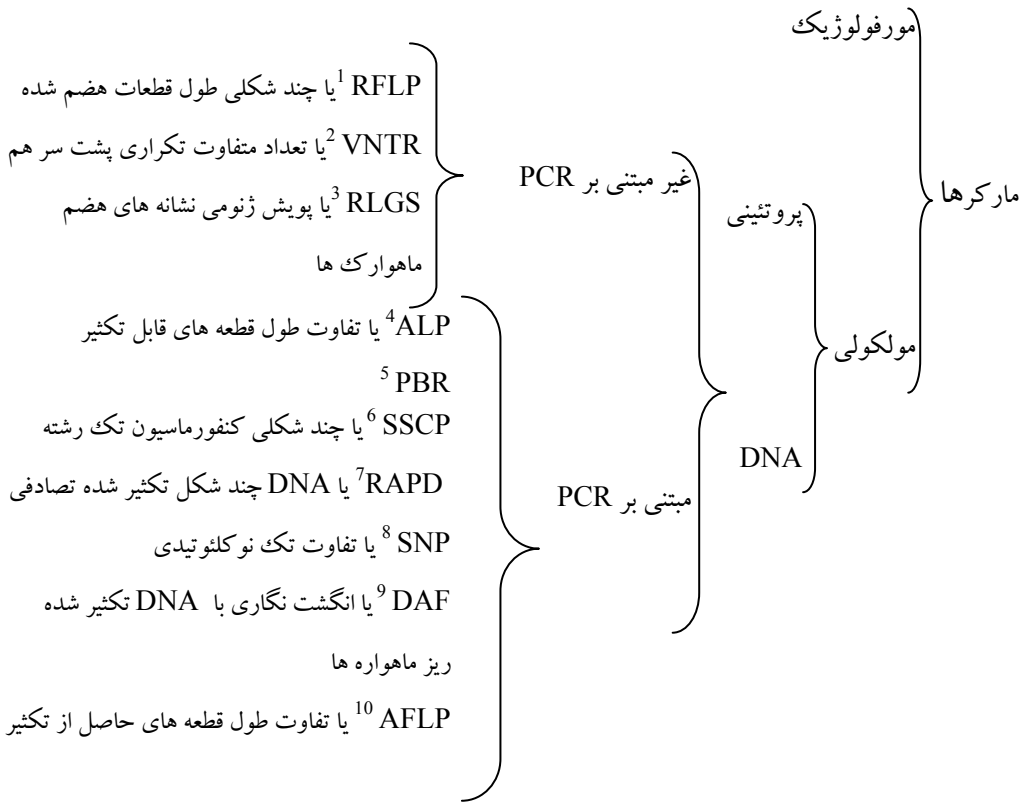
2-1- مارکرهای ژنتیکی

به طور کلی هر صفتی که بین افراد متفاوت باشد، ناشی از تفاوت موجود بین ترتیب های نوکلئوتیدی DNA کروموزومی آنها است که به نتاج نیز منتقل می شود. حتی صفاتی که تحت شرایط محیطی یکسان به صورت متفاوت بروز می کنند، بازتاب تفاوت های موجود در توالی های نوکلئوتیدی می باشد، این تفاوت ها می توانند به عنوان نشانه یا مارکر ژنتیکی به کار گرفته شوند. به طور کلی برای آن که صفتی به عنوان مارکر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد، باید دست کم دو ویژگی زیر را داشته باشد:

الف) در بین دو فرد متفاوت باشد (چند شکلی نشان دهد).

ب) به توارث برسد.

به طور کلی مارکرهای ژنتیکی را به سه دسته مارکرهای مورفولوژیک، پروتئینی و مولکولی DNA و RNA تقسیم می کنند. در رابطه با مارکرهای مولکولی DNA طبقه بندی های گوناگونی وجود دارد که دو نمونه از آنها در شکل 2-1 و جدول 2-1 آورده شده است. همچنین خصوصیات برخی از مارکرهای ملکولی مورد استفاده در اصلاح دام در جدول 2-2 ارائه شده است.



جدول 1-2- دسته بندی مارکرهای DNA بر اساس مبتنی بر کاربرد PCR و عدم کاربرد آن

[1] - Restriction Fragment Length Polymorphism
[2] - Variable Number of Tandem Repeat
[3] - Restriction Landmark Genomic Scaning
[4] - Amplicon Length Polymorphism
[5] - PCR based RFLP
[6] - Single Strand Conformation Polymorphism
[7] - Random Amplified Plymorphism DNA
[8] - Single Nucleotide Polymorphism
[9] - DNA Amplified Fingerprinting
[10] - Amplified Fragment length Polymorphism

جدول 2-2 – نوعی دیگر از طبقه بندی مارکرهای مولکولی مورد استفاده در اصلاح دام(Vignal et al., 2002)

نام مارکر	نوع تنوع			نوع اطلاعات		
	SNP[1]	Indel[2]	VNRT[3]	د و آ ل ل ی غ ا ل ب	د و آل ل ی ه م با رز	چ ند ال ل ی ه م با رز
RFLP	+	+[4]	+	−	+	+[5]
PCR-RFL	+	+[4]	+	−	+	−