تحقیقات تولیدات دامی

سال هفتم/شماره سوم/پاییز ۱۳۹۷ (۳۴-۲۵)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

چند شکلی ژن *Kiss1* و ارتباط آن با تعداد بره به ازای هر زایش در گوسفند مهربان

احمد احمدی[1*]، ژیلا رجبی[2]، پویا زمانی[3]، علی اصغر بهاری[4]

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۲- دانش‌آموخته گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۳- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۴- دانشیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۱۳)

چکیده

ژن *Kiss1* به عنوان یکی از ژن‌های موثر بر باروری شناخته شده است. در مطالعه حاضر چندشکلی‌های یک قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون یک و یک قطعه ۲۸۶ جفت بازی از اینترون یک ژن *Kiss1* و ارتباط آن‌ها با صفت تولیدمثلی تعداد بره به ازای هر زایش در ۱۰۰ راس میش نژاد مهربان مورد بررسی قرار گرفت. روش‌های چندشکلی فضایی تک رشته‌ای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP) همراه با توالی‌یابی DNA برای شناسایی چندشکلی‌های احتمالی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده چندشکلی تک نوکلئوتیدی در سه جایگاه (g.102C>T، g.155G>C و g.272G>A) با چهار الگوی متفاوت SSCP (هاپلوژنوتیپ) در اگزون یک بود. برای اینترون یک، تمامی نمونه‌ها دارای الگوی باندی مشابه بودند و هیچ چندشکلی شناسایی نشد. مقایسه فراوانی‌های مشاهده شده با مورد انتظار برای هاپلوژنوتیپ‌های مورد مطالعه با کمک آزمون کای‌اسکور نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های مربوط به جهش‌های g.102C>T و g.272G>A در اگزون یک به‌طور معنی‌داری متفاوت و در تعادل هاردی- واینبرگ نبودند ($P<۰/۰۰۱$). در بررسی پیوستگی بین هاپلوژنوتیپ‌های شناسایی شده با صفت تعداد بره به ازای هر زایش، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد ($P<0.05$). نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان دادند که تنوع موجود در اگزون یک ژن *Kiss1* را می‌توان برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگرها در گوسفندان نژاد مهربان مورد توجه قرار داد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن *Kiss1*، صفات تولیدمثلی، گوسفند

* نویسندهٔ مسئول: Ahmadi@basu.ac.ir

مقدمه

گوسفند نژاد مهربان با جمعیتی حدود دو میلیون راس، بومی بخش وسیعی از استان همدان و قسمت‌های همجوار آن با استان‌های کردستان، زنجان، کرمانشاه، مرکزی و قزوین می‌باشد که منشاء این حیوان منطقه مهربان در قسمت شمال غربی استان همدان است. این گوسفند دنبه‌دار با تیپ گوشتی شیری، سازگار مراتع ضعیف و شرایط سخت با آب و هوای سرد و کوهستانی، با سرعت رشد بالا و ۸ تا ۲۰ درصد دوقولوزایی برای پرواربندی مناسب است (Aghaali Gamasaee *et al*., 2010; Bathaei and Leroy, 1996).

از سال ۱۹۸۰ تاکنون پیشرفت‌های زیادی در زمینه بهره-گیری از ژن‌های مرتبط با باروری در گوسفند بدست آمده و انجام آزمون‌های ژنتیکی یکی از مناسب‌ترین ابزارها برای شناسایی ارتباط ژنتیکی ژن‌های بزرگ اثر با صفات مرتبط با باروری از جمله بره‌زایی در میان نژادهای مختلف گوسفند دنیا است (Davis, 2004). از این‌رو به کار بردن نشانگرهای پربازده DNA و ژن‌های کاندیدا یکی از افق‌های تحقیقاتی در دهه اخیر است. ژن کیس پپتین ۱ (*Kiss1*) یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی تولید هورمون‌های آزادکننده گونادوتروپین‌ها (GnRH) است که روی کروموزوم شماره ۱۲ گوسفند قرار گرفته و دارای ۳ اگزون است (NCBI). مجموعه کیس پپتین‌ها در ابتدا به عنوان ژن‌های سرکوب‌کننده بیماری‌ها از جمله سرطان شناخته می‌شدند (Lee *et al*., 1996).

ژن *Kiss1*، پروتئینی ۱۴۵ اسیدآمینه‌ای را کد می‌کند که به یک پپتید ۵۴ اسیدآمینه‌ای شکسته می‌شود و کیس پپتین ۵۴ (*Kiss54*) نیز نامیده می‌شود. از آنجا که ژن *Kiss1* در ابتدا به عنوان ژن سرکوب‌کننده سرطان شناخته می‌شد، آن را متاستین نیز می‌نامند (Luan *et al*., 2007). ترشح GnRHها به وسیله استروئیدهای جنسی و از راه بازخوردهای مثبت و منفی تنظیم می-شوند، اما مکانسیم مولکولی و سلولی آن که متأثر از سیگنال‌های محیطی است، هنوز به طور کامل شناخته نشده است. نورون‌های GnRH مسیرهای نهایی هستند که مغز به وسیله آن‌ها تولید گنادوتروپین‌های هیپوفیزی را تنظیم می‌کند (Gottsch *et al*., 2004). این نورون‌ها اثرات بازخوردی مثبت و منفی گیرنده‌های واسط استرویید‌های جنسی (آندروژن و استروژن) را کنترل نمی‌کنند. بنابراین احتمالاً نورون‌های بالادستی وجود دارند که سیگنال‌های مربوط به استروئیدهای جنسی را دریافت کرده و آن‌ها را به محور تولیدمثلی و نورون‌های GnRH منتقل می‌کنند. نورون‌های کیس پپتین با فرض داشتن اثرات تحریک کنندگی، احتمالاً همین نورون‌های حساس به استروئیدهای جنسی هستند که بر نورون‌های GnRH تأثیر می‌گذارند. نورون‌های *Kiss1* در مغز پیشین جزء اهداف اصلی استروئیدهای جنسی در جوندگان هستند و تقریباً نورون‌های *Kiss1* در هیپوتالاموس، گیرنده‌های استروژن و آندروژن را بیان می‌کنند (Smith *et al*., 2005).

به طور مشابه در گوسفند بیشتر نورون‌های هیپوتالاموسی *Kiss1* گیرنده‌های استروژن آلفا و پروژسترون را بیان می‌کنند و mRNA کیس پپتین ۱ در مناطق مجزایی از قسمت قدامی مغز و در اندام‌هایی مانند جفت، تخمدان، بیضه، پانکراس و کبد یافت شده و به طور برجسته در این اندام‌ها بیان می‌شود و نقش حیاتی در تنظیم فعالیت‌های تولیدمثلی و شروع بلوغ دارد (Smith, 2009). به نظر می-رسد که کیس‌پپتین، نورون‌های GnRH را تنظیم می‌کند و سیگنال‌های بازخورد جنسی را به این نورون‌ها انتقال می‌دهد. علاوه بر این، بیان کیس‌پپتین به طور قابل توجهی در شروع فصل تولیدمثل تاثیرگذار است (Smith, 2012). علی‌رغم اینکه سایر ژن‌های مؤثر بر چندقلوزایی در نژادهای مختلف به وسیله محققین زیادی مورد بحث و بررسی قرار گرفته، اما مطالعات اندکی روی ژن *Kiss1* انجام گرفته است. هدف از پژوهش حاضر بررسی وجود چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در بخشی از پروموتور و اگزون ۱ ژن *Kiss1* و ارتباط آن با صفت تعداد بره در هر زایش در گوسفند مهربان بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد ۱۰۰ راس میش نژاد مهربان به طور تصادفی از گله مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بوعلی سینا انتخاب شدند. کل گله مورد نظر با مدیریت یکسان با برنامه بهداشتی و واکسیناسیون منطقه و تغذیه دستی در فصول سرد و تغذیه از مرتع و پس‌چر مزارع کشاورزی در فصول بهار تا اواسط پاییز به صورت یکسان نگهداری می-شود. وزن تولد و جنس بره‌های میش‌ها در زمان زایش

(در اواخر زمستان یا تابستان) هر ساله ثبت می‌شود. با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA)، به مقدار ۵ میلی‌لیتر از ورید وداج گردن میش-ها خون‌گیری به عمل آمد. نمونه‌های خون در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

برای استخراج DNA از کیت DNPTM Kit (شرکت سیناژن) استفاده شد. پس از استخراج DNA، جهت ارزیابی کیفی و کمی DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانودراپ آمریکایی (Thermo C one) استفاده شد.

برای بررسی چندشکلی ژن *Kiss1*، یک قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون یک همراه با یک قطعه ۲۸۶ جفت بازی از اینترون ۱ مورد تکثیر قرار گرفتند. توالی آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 و بر اساس توالی مربوط به ژن *Kiss1* طراحی شدند. ساخت آغازگرهای به کار برده شده به وسیله شرکت سینا کلون انجام شد. توالی آغازگرهای به کار برده شده در این پژوهش در جدول ۱ نشان داده شده است. برای انجام واکنش PCR، آغازگرها بر اساس مقدار جذب نوری (OD) با حجم مشخصی آب مقطر رقیق شدند تا غلظت نهایی ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر حاصل شود. پرایمرهای رقیق شده تا زمان انجام واکنش PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت Applied Biosystems) انجام شد، که مواد واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر بافر PCR حاوی آنزیم تک پلی‌مراز (Master Mix 2X: Tris-HCl pH 8.5, 3 mM Mgcl2, 0.2% Tween 20, 0.4 units/µl Ampiliqon Taq polymerase)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده (با غلظت ۱۰۰-۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۷ میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل واکنش PCR برای تکثیر قطعات DNA مورد نظر به ترتیب زیر بود: مرحله اول شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس به تعداد ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دماهای ۶۰ و ۵۸ درجه سانتیگراد (به ترتیب برای قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون یک و قطعه ۲۸۶ جفت بازی از اینترون یک) به مدت ۱ دقیقه، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه جهت بسط آغازگرها و در پایان چرخه‌ها بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد. برای آزمون صحت قطعات تکثیر شده و تعیین کیفیت محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ-آمیزی با اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر مولکولی استاندارد ۵۰ جفت بازی (شرکت سیناژن) استفاده شد.

انجام روش SSCP برای بررسی الگوهای باندی مختلف احتمالی قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون یک و قطعه ۲۸۶ جفت بازی از اینترون یک ژن *Kiss1* به شرح زیر بود: ابتدا ۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۵ میکرولیتر بافر مخصوص SSCP (برم‌فنل‌بلو ۰/۰۵ درصد، گزیلن سیانول ۰/۰۵ درصد، فرمامید ۹۵ درصد و EDTA ۲۰ میلی‌مولار) مخلوط شد. در ادامه به منظور تک‌رشته‌ای کردن محصولات PCR، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و برای جلوگیری از دو رشته‌ای شدن دوباره، نمونه‌ها به سرعت به مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی یخ قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با کمک الکتروفورز عمودی به مدت ۲۲ ساعت با ولتاژ ۲۴۰ ولت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی ژل پلی‌آکریلامید ۸ درصد الکتروفورز شدند. جهت انجام تکنیک SSCP از دستگاه الکتروفورز عمودی (پایا پژوهش پارس مدل PRO-21×22 cm) همراه با بافر TBE 1X استفاده شد. در پایان جهت مشاهده باندهای به‌دست آمده، رنگ‌آمیزی با نیترات نقره ۰/۱ درصد انجام شد (Sanguinetti *et al*., 1994).

جدول ۱- توالی آغازگرها برای تکثیر قطعات ۳۳۱ و ۲۸۶ جفت بازی از اگزون و اینترون یک ژن *Kiss1*

Table 1. Primer sequences for amplifying 331 and 286 fragments of the exon 1 and intron 1 of *Kiss1* gene

Exon 1	Forward	5′- GTTTCCATGCTGTGTCGGTT -3′
	Reverse	5′- TCCCAACCTTCTTCCCAGAC -3′
Intron 1	Forward	5′- GGAGACCTTGGAAAACGTGG -3′
	Forward	5′- CGAAGGAGCTCGGTGGTTA -3′

پس از انجام روش SSCP و مقایسه ژل‌های رنگ‌آمیزی شده، الگوهای متفاوت باندی شناسایی شدند. از هر الگوی متفاوت مشاهده شده، دو نمونه تصادفی از بین نمونه‌ها جهت تعیین توالی دوطرفه انتخاب شد. بدین منظور حجم مناسبی از محصول PCR هر نمونه به همراه پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول جهت تعیین توالی به واسطه شرکت تکاپوزیست به شرکت Bioneer در کشور کره جنوبی ارسال شد. نتایج بدست آمده از تعیین توالی نمونه‌ها با استفاده از بخش MegAlign موجود در نرم‌افزار DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI. USA) با استفاده از روش ClustalW و با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنی (NCBI) مقایسه شدند (شماره‌های ثبت ژن بانک NC_019469.1 گوسفند نژاد تکسل و KR065750.1 مربوط به توالی ژن *Kiss1* بز).

ارتباط بین هاپلوژنوتیپ‌ها و صفت تعداد بره به ازای هر زایش با کمک مدل خطی عمومی زیر مورد بررسی قرار گرفت:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + P_j + G_k + e_{ijkl}$$

که در این مدل Y_{ijkl} ارزش فنوتیپی صفت تولید مثلی تعداد بره متولد شده در هر زایش، μ میانگین جمعیت، S_i اثرات ثابت i_{th} فصل زایش (i=1, 2)، P_j اثر ثابت j_{th} شکم زایش (j=1, 2, 3, 4)، G_k اثر ثابت k_{th} ژنوتیپ (k=1, 2, 3, 4) و e_{ijkl} اثرات باقی‌مانده هستند. مقایسه میانگین‌های تصحیح شده براساس میانگین‌های حداقل مربعات با سطح خطای ۰/۰۵ انجام شد. تجزیه تحلیل داده‌ها در نرم افزار SAS 9.1 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تکثیر محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که قطعات ۳۳۱ و ۲۸۶ جفت بازی از اگزون و اینترون یک ژن *Kiss1* به خوبی و بدون هیچ‌گونه باند غیراختصاصی تکثیر شده‌اند. ژنوتیپ‌های متفاوت الگوهای SSCP برای قطعه مورد نظر از ژن *Kiss1* در شکل یک قابل مشاهده است که تنها چهار الگوی باندی متفاوت را برای اگزون یک نشان می‌دهد (شکل ۱). الگوهای باندی مشاهده شده برای اینترون یک مشابه و بدون چندشکلی بودند.

نتایج حاصل از توالی‌یابی الگوهای قطعه ۳۳۱ جفت بازی اگزون یک ژن *Kiss1* در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۲ مشخص شده توالی اول، توالی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI (شماره ثبت ژن بانک NC_019469.1) مربوط به گوسفند نژاد تکسل بوده و توالی‌های شماره یک تا چهار توالی‌های بدست آمده از ژنوتیپ‌های متفاوت (الگوهای متفاوت) در نژاد مهربان هستند. آخرین توالی نیز توالی ثبت شده در NCBI و مربوط به گونه بز (شماره ثبت ژن بانک KR065750) است که مرتبط با چندقلوزایی گزارش شده است. در شکل ۲، جهش‌ها و تغییرات توالی‌ها با علامت مربع در اطراف باز تغییر یافته نشان داده شده است. نتایج بدست آمده از تعیین توالی ۴ الگوی متفاوت قطعه ۳۳۱ جفت بازی از ژن *Kiss1* (شکل ۳) نشان داد که یک جهش تک نوکلئوتیدی C→T در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۰۲، یک جهش تک نوکلئوتیدی G→C در جایگاه نوکلئوتیدی ۱۵۵ و یک جهش تک نوکلئوتیدی G→A در جایگاه ۲۷۲ در مقایسه با توالی ژن بانک وجود دارد (شکل ۳).

پس از انجام توالی‌یابی الگوهای مختلف مشاهده شده SSCP برای قطعه ۳۳۱ جفت بازی از اگزون یک ژن *Kiss1* در نژاد مهربان، فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی برای هر کدام از جهش‌ها در جایگاه‌های ۱۰۲، ۱۵۵ و ۲۷۲ محاسبه و نتایج در جدول ۲ ارائه شده است. در جایگاه جهشی ۱۰۲، فراوانی ژنوتیپ CT بیشترین مقدار (۰/۷۳) و آلل C دارای بیشترین فراوانی آللی (۰/۶۲۵) بود. برای جهش در جایگاه ۱۵۵، ژنوتیپ GG بیشترین فراوانی ژنوتیپی (۰/۸۳) را نشان داد و آلل G دارای بیشترین فراوانی آللی (۰/۹۱۵) بود. در جایگاه جهشی ۲۷۲ نیز ژنوتیپ AG دارای بیشترین فراوانی (۰/۷۳) و آلل G بیشترین فراوانی (۰/۶۲۵) را از خود نشان داد. همچنین، مقایسه فراوانی‌های مشاهده شده با مورد انتظار برای هاپلوژنوتیپ‌های مورد مطالعه با کمک آزمون کای‌اسکوئر نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های مربوط به جهش‌های g.102C>T و g.272G>A در اگزون یک به طور معنی‌داری ($P<$۰/۰۰۱) متفاوت و در تعادل هاردی-واینبرگ نبودند (جدول ۲).

نتایج بدست آمده از ارزیابی ارتباط ژنوتیپ‌های حاصل از اگزون یک با صفت تولیدمثلی تعداد بره در هر زایش در نژاد مهربان نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ دارای

اثرات افزایشی معنی‌داری روی این صفت نسبت به ژنوتیپ‌های ۱ و ۴ هستند (جدول ۳).

بحث

پژوهشگران گزارش کرده‌اند که ژن *Kiss1* از ژن‌های مؤثر بر باروری در بز است (Maitra, 2014). در این پژوهش نیز مشخص شد که در گوسفندان نژاد مهربان قطعه اگزون ۱ ژن مورد نظر دارای چندشکلی تک نوکلئوتیدی بود. در این مطالعه سه نوع جانشینی تک نوکلئوتیدی در قطعه ۳۳۱ جفت بازی اگزون ۱ این ژن مشاهده شد که شامل جانشینی تک نوکلئوتیدی (C→T) در جایگاه ۱۰۲، جانشینی تک نوکلئوتیدی (G→C) در جایگاه ۱۵۵ و جانشینی تک نوکلئوتیدی (G→A) در جایگاه ۲۷۲ بود. در مطالعه‌ای که در گوسفندان نژادهای اسمال تیل هان، تکسل، دورست وکوریدال انجام شده است، قطعه ۱۰۶ جفت بازی از اگزون یک این ژن با شماره دسترسی GU142847 با استفاده از تکنیک PCR-SSCP مورد مطالعه قرار گرفته است که چهار نوع ژنوتیپ برای این قطعه و شش نوع جانشینی تک نوکلئوتیدی که پنج نوع آن موجب تغییرات اسیدآمینه شده‌اند گزارش شده است (Chu *et al*., 2012). از میان این شش جهش تک نوکلئوتیدی یافت شده در مطالعه فوق، فقط یک جهش (G→A) در جایگاه ۱۰۳۵ این ژن با جهش ایجاد شده در جایگاه نوکلئوتیدی ۲۷۲ در پژوهش حاضر مشترک است. این جهش موجب جایگزینی اسیدآمینه والین با متیونین شده و از جمله جهش‌های یافت شده در نژادهای اسمال تیل هان و هو است که با قدرت باروری بالا در ارتباط بوده و گوسفندان حامل این جهش در مطالعه انجام شده دارای ۰/۸۸ تعداد بره بیشتر از نژادهای دیگر بودند (Chu *et al*., 2012). در پژوهشی دیگر روی میش‌های نژاد سارادا ایتالیا یک جهش در جایگاه ۱۰۳۵ یافت شده است، اما رابطه چندشکلی‌های مشاهده شده در جایگاه مورد مطالعه با صفات تعداد بره در هر زایش و شروع فعالیت تولیدمثلی گوسفندان تحت آزمایش معنی‌دار نبوده است که دلیل ممکن برای این امر را فراوانی کم آلل A جهش‌یافته و تعداد کم گوسفندان مشاهده شده با ژنوتیپ AA دانسته‌اند (Luridiana *et al*., 2014).

در تحقیقی روی توالی و تنوع ژن *Kiss1* در ۹ نژاد بز بومی هندی که در صفات بلوغ جنسی و میزان باروری متفاوت بودند، در اینترون یک و دو ژن *Kiss1* به ترتیب پنج و چهار SNP گزارش شد که چهار مورد از آنها جهش جدید بودند و چندشکلی‌های سه جهش G296C، G2510A و C2540T با صفت چندقلوزایی ارتباط داشته است (Maitra *et al*., 2014). در بررسی دیگر با تکثیر ناحیه‌ای از ژن *Kiss1* در دو نژاد بز یک SNP (G1384A) مرتبط با چندقولوزایی گزارش شده است (An *et al*., 2015) و در تحقیقی دیگر روی سه نژاد بز با تکثیر دو قطعه ۱۱۸۹ و ۴۴۹ ژن مذکور، دو جایگاه SNP و یک ایندل که ارتباط چندشکلی یک جایگاه از آنها را با صفت چندقولوزایی گزارش کرده‌اند (Hou *et al*. 2011) و در مورد دیگر برای شناسایی تنوع ژن *Kiss1* در بز نژاد جینینگ خاکستری چینی، سه SNP و یک ایندل در اینترون یک، و دو SNP در اگزون سه گزارش شده است که چندشکلی مشاهده شده در جایگاه G296C با صفت چندقلوزایی ارتباط معنی‌دار داشته است، به طوری که ژنوتیپ CC نسبت به ژنوتیپ‌های GG و GC به ترتیب ۰/۸ و ۰/۷۷ واحد چندقلوزایی بیشتری داشت (Cao *et al*., 2010). همچنین در تحقیقی روی بزهای نژاد چینی با روش PCR-RFLP و توالی‌یابی DNA، تعداد یازده SNP تشخیص و گزارش شده است که تنوع ژنوتیپ چند-شکلی‌های شناسایی شده چهار جایگاه G384A، T2489C، G2510A و C2540T با صفت چندقلوزایی ارتباط معنی‌دار داشت (An *et al*., 2013). در تحقیقی برای بررسی تنوع ژن *Kiss1* در دو نژاد از بزهای اتیوپی پرورش یافته در دو شرایط آب و هوایی و مدیریتی مختلف، با تکثیر دو قطعه ۱۲۱۰ و ۳۲۵ بازی اگزون یک و دو ژن مذکور، بیست جایگاه SNP گزارش شده است که چندشکلی چهار مورد از آنها با صفت چندقولوزایی ارتباط داشته است (Mekuriaw *et al*., 2017). در مطالعه‌ای دیگر برای تعیین چندشکلی ژن *Kiss1* در سه نژاد بز مصری با روش PCR-RFLP و توالی‌یابی یک قطعه ۳۷۷ بازی (از نقطه ۲۰۰۰ تا ۲۳۷۶ ژن) یک جهش SNP در باز ۱۲۱ قطعه مورد نظر (T2120A) در هر سه نژاد شناسایی شد که ارتباط چندشکلی جهش فوق با صفت چندقلوزایی در دو نژاد از بزها معنی‌دار گزارش شد (El-Tarabany *et al*., 2017).

جدول ۲- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی جهش‌های مشاهده شده در اگزون یک ژن *Kiss1*

Table 2. Allelic and genotypic frequencies of observed mutations in the first exon of *Kiss1* gene

Mutation	Number	Genotypic frequency	Allelic frequency	X^2	*P* Value
g.102C>T	CC(26)	0.26	C=0.625	29.130	0.0000
	CT(73)	0.73	T=0.375		
	TT(1)	0.01			
g.155G>C	GG(83)	0.83	G=0.915	0.368	0.3685
	GC(17)	0.17	C=0.085		
	CC (0)	0			
g.272G>A	GG (26)	0.26	G=0.625	12.909	0.0003
	AG (73)	0.73	A=0.375		
	AA (1)	0.01			

جدول ۳- ارتباط هاپلوژنوتیپ‌های اگزون یک ژن *Kiss1* با صفت تعداد بره در هر زایش

Table 3. Association of the *Kiss1* gene haplogenotypes of exon 1 with litter size

Haplotype	Litter size
CT/GG/AG (haplogenotype 1)	1.30^{b}
CC/GC/GG (haplogenotype 2)	1.98^{a}
TT/GG/AA (haplogenotype 3)	1.80^{a}
CC/GG/GG (haplogenotype 4)	1.48^{b}
P value	<0.05

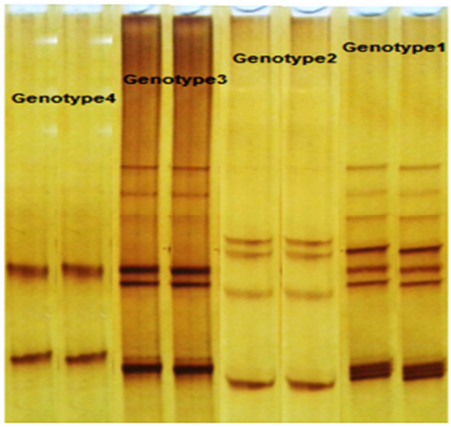


Fig. 1. Four different SSCP patterns of the 331 bp fragment of exon 1for *Kiss1* gene

شکل ۱- چهار الگوی متفاوت SSCP قطعه ۳۳۱ جفت بازی اگزون یک ژن *Kiss1*

در بررسی روی گوسفندان چینی نژادهای تان و هان دم کوتاه با روش توالی‌یابی، طول mRNA کامل ژن *Kiss1* به ترتیب ۸۹۴ و ۱۱۴۵ باز گزارش شده است که با وجود تفاوت طول mRNA کامل ژن مذکور، طول پروتئین کیس‌پپتید کد شده با ۱۳۵ اسیدآمینه در هر دو نژاد یکسان ولی با نقطه شروع کدگذاری متفاوت بوده است (He *et al*., 2018).

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است قطعه مورد بررسی در جمعیت گوسفند مهربان در جایگاه‌های ۱۰۲ و ۲۷۲ انحراف معنی‌داری را از تعادل هاردی-واینبرگ نشان داد ($P<0.001$). از جمله دلایل عدم تعادل در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق می‌تواند انتخاب، جهش و اندازه جمعیت باشد. انتخاب مهم‌ترین عامل تغییر فراوانی ژن‌ها در جمعیت‌ها است. هنگامی‌که انتخاب صورت می‌گیرد یک سری از افراد (ژنوتیپ‌ها) امکان تولیدمثل و انتقال ژن‌های خود را به نسل بعد از دست می‌دهند. جهش یکی دیگر از عوامل تغییر در فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی است. جهش‌ها ایجادکننده آلل‌های جدید هستند و در بلند مدت نقش مؤثری در ایجاد تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها دارند. به طورکلی فراوانی جهش‌ها پایین است، اما به علت انتخاب، آلل‌های جهش‌یافته می‌توانند حفظ شوند و فراوانی آن‌ها در نسل‌های بعدی افزایش

یابد. در این مطالعه علت اصلی عدم مشاهده برخی از ژنوتیپ‌ها را می‌توان به پایین بودن اندازه جمعیت نسبت داد، زیرا هنگامی که تعداد افراد جمعیت پایین باشد فراوانی‌های ژنی به طور تصادفی و در جهت غیر قابل پیش‌بینی تغییر می‌کنند و در نهایت می‌توانند منجر به حذف و یا تثبیت یک آلل در جمعیت شوند. بنابراین لازم است که بخش‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر، در مطالعات آینده با تعداد افراد بیشتری مورد بررسی قرارگیرد.

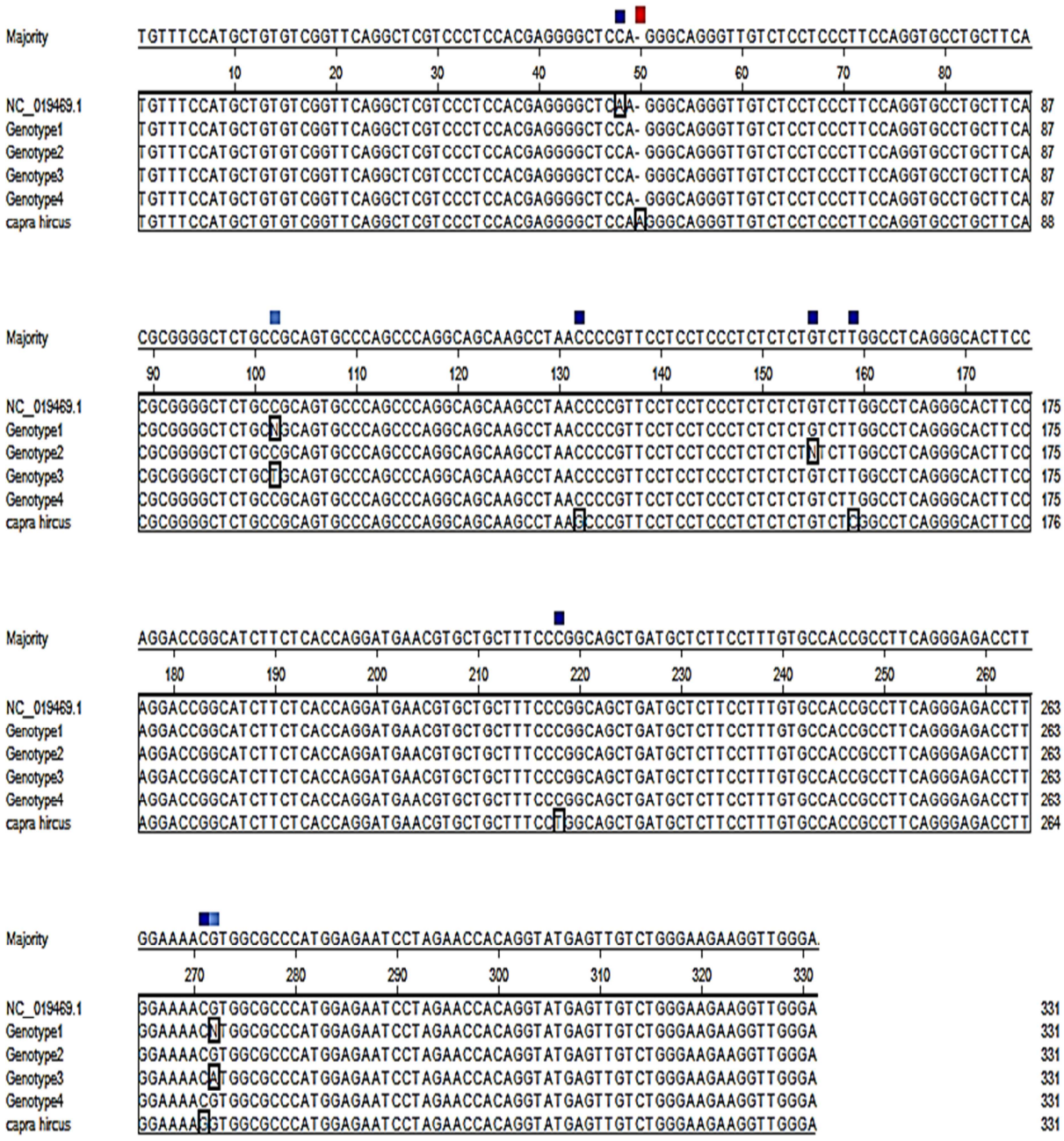
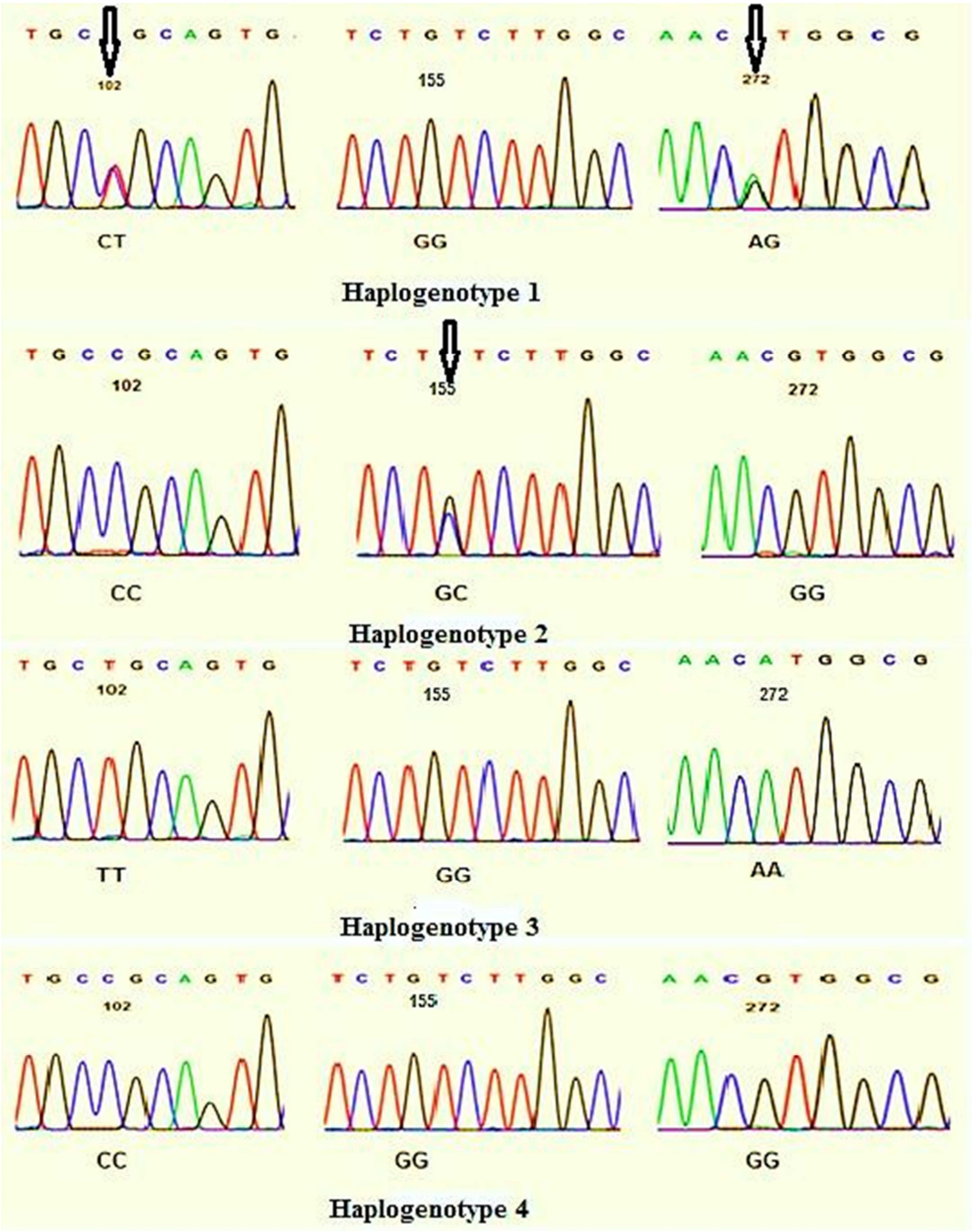


Fig. 2. Sequencing results of the 331 bp fragment of the *Kiss1* gene. Four different haplogenotypes and comparing with sequences reported in NCBI databases for sheep (NC_019469.1) and *Capra hircus* (KR065750.1). N is abbreviation for heterozygote mutations

شکل ۲- نتایج حاصل از توالی یابی قطعه ۳۳۱ جفت بازی ژن *Kiss1*. چهار هاپلو ژنوتیپ متفاوت و مقایسه با توالی گزارش شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI برای گوسفند (NC_019469.1) و گونه بز (KR065750.1). N علامت اختصاری برای جهش‌های هتروزیگوت است



شکل ۳- کروماتوگرام هاپلو ژنوتایپ‌های متفاوت قطعه ۳۳۱ جفت بازی ژن *Kiss1*

Figure 3. Different haplogenotypes chromatogram for 331 bp fragment of the *Kiss1* gene

سایر جهش‌های یافت شده در اگزون ۱ این ژن در این مطالعه تا به حال گزارش نشده‌اند. ممکن است یکی از دلایل مشاهده چند شکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی قطعه مورد بررسی در پژوهش حاضر و عدم مشاهده آن در نژادهای یاد شده، تفاوت‌های نژادی باشد. از این رو به نظر می‌رسد اگزون یک این ژن در نژادهای مختلف دارای تنوع بالایی است. با توجه به نتایج این تحقیق (شکل ۲) و تحقیقات دیگر علی‌رغم وجود گزارش‌های زیاد مبنی بر وجود تنوع زیاد در ژن *Kiss1*، همولوژی بالای این ژن و کیس‌پپتید ۱۳۵ اسیدآمینه‌ای بیان شده آن در بز با گوسفند و دیگر پستانداران را تایید کرده‌اند. که با در نظر گرفتن نتایج همه گزارش‌های ذکر شده و نتایج این بررسی ژن *Kiss1* را به عنوان ژن کاندیدای مرتبط با چندقولوزایی می‌توان معرفی کرد. بنابراین لازم است که بخش‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر و بقیه قسمت‌های ژن *Kiss1*، در مطالعات آینده با تعداد افراد بیشتری و در نژادهای مختلف گوسفند و بز بومی ایران مورد بررسی قرارگیرد.

فهرست منابع

Aghaali Gamasaee V., Hafezian S. H., Ahmadi A., Baneh H., Farhadi A. and Mohamadi A. 2010. Estimation of genetic parameters for body weight at different ages in Mehraban sheep. African Journal of Biotechnology, 9(32): 5218-5223.

An X., Ma T., Hou J., Fang F., Han P., Yan Y., Zhao H., Song,Y., Wang J. and Cao,B. 2013. Association analysis between variants in *KISS1* gene and litter size in goats. BMC Genetics, 14: 63.

An X. P., Hou J. X., Lei Y. N., Gao T. Y. and Cao B. Y. 2015. Polymorphism and DNA methylation in the promoter modulate *KISS1* gene expression and are associated with litter size in goats. Animal Reproduction Science, 155: 36–41.

Bathaei S. S. and Leroy P. L. 1996. Growth and mature weight of Mehraban Iranian fat-tailed sheep. Small Ruminant Research, 22: 155-162.

Cao G. L., Chu M. X., Fang L., Di R., Feng T. and Li N. 2010. Analysis on DNA sequence of KiSS-1 gene and its association with litter size in goats. Molecular Biology Reports, 37: 3921–3929.

Chu M., Xiao C., Feng T., Fu Y., Cao G., Fang Li., Di Ran., Tang Q., Huang D., Ma Y., Li K. and Li N. 2012. Polymorphisms of *KiSS-1* and *GPR54* genes and their relationships with litter size in sheep. Molecular Biology Reports, 39: 3291-3297.

Davis G. H. 2004. Fecundity genes in sheep. Reproduction Animal Science, 82: 247-253.

El-Tarabany M. S., Zaglool A. Z., El-Tarabany A. A. and Awad A. 2017. Association analysis of polymorphism in *KiSS1* gene with reproductive traits in goats. Animal Reproduction Science, 180: 92–99.

Gottch M. L., Cunningham M. J., Smith J. T., Popa M. S., Acohido B. V., Crowley W. F., Seminara S., Clifton D. K. and Stoiner R. A. 2004. A role for Kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. Endocrinology, 145: 4073-4077.

Lee J. H., Miele M. E., Hicks D. J., Phillips K. K., Trent J. M., Weissman B. E. and Welch D. R. 1996. *KiSS-1*, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. Journal of the National Cancer Institute, 88: 1731-1737.

Luan X., Zhou Y., Wang W., Yu H., Li P., Gan X., Wei D. and Xiao J. 2007. Association study of the polymorphisms in the *KISS1* gene with central precocious puberty in Chinese girls. Endocrinology, 157: 113-118.

Luridiana S., Mura M. C., Daga C., Cosso G., Bodano S., Farci F. and Carcangiu V. 2014. Influences of melatonin treatment, melatonin receptor 1A (*MTNR1A*) and kisspeptin (*KiSS-1*) gene polymorphisms on first conception in Sarda ewe lambs. Reproduction, Fertility and Development, 47: 154-187.

He X., Liu O., Li X., Guo X., Wang X., Hu W., Di R. and Chu M. 2018. Molecular cloning and epigenetic change detection of *Kiss1* during seasonal reproduction in Chinese indigenous sheep. Reproduction, Fertility and Development, 30(5): 734-743.

Hou J. X., An X. P., Wang J. G., Song Y. X., Cui Y. H., Wang Y. F., Chen Q. J. and Cao B.Y. 2011. New genetic polymorphisms of KiSS-1 gene and their association with litter size in goats. Small Ruminant Research, 96: 106–110.

Mekuriaw G., Mwacharo J. M., Dessie D., Mwai O., Djikeng A., Osama S., Gebreyesus G., Kidane A., Abegaz S. and Tesfaye T. 2017. Polymorphism analysis of kisspeptin (*KISS1*) gene and its association with litter size in Ethiopian indigenous goat populations. African Journal of Biotechnology, 16(22): 1254-1264.

NCBI Web Page. Address: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_019469.1.

Maitra A., Sharma R., Ahlawat S., Tantia M. S., Roy M. and Prakash V. 2014. Association analysis of polymorphisms in caprine *KiSS1* gene with reproductive traits. Animal Reproduction Science, 151: 71-77.

Sanguinetti C. J., Dias Neto E. and Simpson A. J. G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques, 17: 914-921.

SAS Institute. 2003. Users Guide, Version 9.1. SAS Institute, Cary, NC.

Smith J. T. 2009. Sex steroid control of hypothalamic *Kiss1* expression in sheep and rodents: Comparative aspects. Reproduction, 11: 60-67.

Smith, J. T. 2012. The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. Domestic Animal Endocrinology, 43(2): 75-84.

Smith J. T., Dungan H. M., Stoll E. A., Gottsch M. L., Braun R. E., Eacker S. M., Clifton D. K. and Steiner R. A. 2005. Differential regulation of *KiSS-1* mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. Endocrinology, 146: 2976-2984.

Animal Production Research

Vol. 7, No. 3, 2018 (25-34)

University of Guilan

Polymorphism of *KiSS-1* gene and its association with litter size in Mehraban sheep

A. Ahmadi [1*], Zh. Rajabi[2], P. Zamani[3], A. A. Bahari[4]

1. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Former MSc. Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
3. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
4. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: 08-01-2018 – Accepted: 03-06-2018)

Abstract

Kiss1 gene is known as one of the genes affecting fertility. In the present study, DNA polymorphisms were investigated in gene 331 bp exon one and 286 bp of intron one of *Kiss1* and their associations with reproduction trait (liter size) in 100 Mehraban sheep. Polymerase chain reaction based single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and DNA sequencing methods were used to identify eventual polymorphisms. The results showed single nucleotide polymorphism at three sites (g102C> T, g.155G> C and g.272G> A) with four different band patterns (four haplogenotypes) in exon one. All samples were detected with the same SSCP banding patterns and no polymorphism in intron one. The Chi-square test was used to compare the observed and expected genotypic frequencies. It was shown that the frequency of genotypes were significantly different in g.102C> T and g.272G> A mutations in exon one and they weren't in the Hardy-Weinberg equilibrium ($P< 0.01$). In the association analysis, the identified haplogenotypes were significantly associated with litter size, the number of lambs per parturition ($P< 0.05$). The results of this study showed that the variation in exon one of the *Kiss1* gene can be considered in marker assistance selection programs in Mehraban sheep breed.

Keywords: Polymorphism, *Kiss1* gene, Reproduction trait, Sheep

[*]Corresponding author: Ahmadi@basu.ac.ir