

https://domesticj.ut.ac.ir/article_101181.html

مقاله علمی-ترویجی

بررسی چندشکلی ژن TNF-alpha و تأثیر آن در اندازه دنبه و چربی در گوسفندان نژاد ماکویی، قزل و رومانوف

دانیال نیکزاد^{۱*} ID، مجید کریمی^۱، علی هاشمی^۱ و مختار غفاری^۲^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ارومیه، ایران^۲ دانشیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام و طیور، گروه مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ارومیه، ایران<https://doi.org/10.22059/domesticj.2024.372764.1147> doi

چکیده

عامل نکروز تومور آلفا (TNF-alpha) یک سیتوکین پیش التهابی است که در تنظیم پاسخ ایمنی از جمله فعالیت ماکروفاژها و مرگ سلولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تحقیق حاضر به منظور بررسی وجود چندشکلی یا عدم وجود چندشکلی در گوسفندان نژاد قزل، ماکویی و رومانوف با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و تفاوت فرم فضائی رشته‌های منفرد (SSCP) انجام گرفت. برای این منظور برای تعیین چندشکلی ژن TNF-alpha در جمعیت گوسفندان نژاد ماکویی، قزل و رومانوف، از تعداد ۵۰ رأس از گوسفندان نژاد ماکویی، ۵۰ رأس از گوسفندان نژاد قزل و ۵۰ رأس از گوسفندان نژاد رومانوف خون‌گیری شد. برای استخراج DNA از روش بهینه یافته نمکی استفاده شد. کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز یک درصد و کمیّت آن با دستگاه اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. از دستگاه ترموسایکلر به منظور تکثیر قطعه‌های از ژن TNF-alpha استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعه ۲۷۳ جفت بازی از ژن شماره ۴ ژن TNF-alpha انجام گرفت. تعیین ژنوتیپ بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد صورت گرفت و نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد، در نهایت آن‌ها را در ژل پلی‌آکریل‌آمیدی که در دستگاه الکتروفورز عمودی جای گذاری گردیده، قرار گرفت. مرحله ظهور و رنگ آمیزی به وسیله محلول نیترات نقره انجام گرفت. تحلیل و بررسی الگوهای ژنی مشاهده شده در ژن TNF-alpha بر روی آکریل‌آمید نشان داد که الگوهای ایجاد شده در نژاد قزل، رومانوف و ماکویی تک شکل بوده، که نشان‌دهنده عدم وجود چندشکلی در این جایگاه می‌باشد.

کلمات کلیدی: چندشکلی، چربی و دنبه، ژن TNF-alpha، PCR-SSCP

*نویسنده مسئول: danielnikzad8@gmail.com

بخش: ژنتیک و اصلاح دام و طیور دبیر تخصصی: دکتر معصومه ناصرخیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۵ تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۰۳/۱۲

فرنس‌دهی: نیکزاد، د.، کریمی، م.، هاشمی، ع.، غفاری، م. بررسی چندشکلی ژن TNF-alpha و تأثیر آن در اندازه دنبه و چربی در گوسفندان نژاد ماکویی، قزل و رومانوف. علمی-ترویجی (حرفه‌ای) دامستیک، ۱۴۰۳؛ ۲۴(۱): ۳۹-۴۶.



AnimSSAUT

مقدمه

تأمین غذا همیشه از دغدغه های بشریت بوده است به همین دلیل گوسفند نیز نقش مهمی در تأمین غذا داشته است و همواره نیز از منابع مهم پروتئین و انرژی و ... بوده است. علاوه بر این، گوسفند جایگاه خاصی در اشتغال زایی برای خانواده ها دارد؛ به طوری که در ایران صدها هزار خانواده به صورت مستقیم و غیر مستقیم از طریق پرورش گوسفند و شغل های جانبی آن روزگار می گذرانند. همچنین، نیاز روز افزون جامعه به فرآورده های پروتئینی با منشأ حیوانی، استفاده از روش های نوین تولید و افزایش محصول را ضروری کرده است (هدایتی فر و همکاران، ۱۳۹۴). نژادهای حیوانات بومی هر کشور به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می شود و حفظ و تکثیر آن ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است (سید شریفی و همکاران، ۲۰۱۸). شناسایی مناطق ژنومی گوسفند از لحاظ اقتصادی بسیار مهم است و منابع اطلاعاتی مهمی برای استفاده در برنامه های اصلاح نژادی مبتنی بر اطلاعات ژنومی به شمار می روند (Hiendleder, 2009).

ژن TNF-alpha یکی از مباحث مهم در رابطه با چربی دنبه در گوسفند می باشد؛ هرچند اساس ژنتیکی رسوب چربی در دنبه گوسفند هنوز به طور کامل مشخص نشده است. اما شناسایی ژن ها و عملکرد آن ها سبب درک بهتر مکانیسم های ژنتیکی کنترل کننده اندازه دنبه می شود و می تواند استراتژی های اصلاح نژادی را برای تعدیل چربی بهبود بخشد (Bakhtiarzadeh and Alamouti, 2020). در این بین یکی از ژن های مرتبط با چربی دنبه ژن TNF-alpha می باشد که اولین بار توسط مرادی و همکاران (۲۰۲۱) با استفاده از مطالعات ژنومی شناسایی شد. در بررسی حاضر به شناسایی تک شکلی یا چند شکلی در این ژن و تأثیر احتمالی آن در فنوتیپ گوسفندان نژادهای ماکویی، قزل و رومانوف پرداخته می شود. مطالعه حاضر جزو محدود مطالعات انجام گرفته بر روی شناسایی ژن TNF-alpha برای اندازه دنبه بوده و دارای اهمیت علمی زیادی است. از آنجایی که ژن های زیادی در اندازه دنبه گوسفند تأثیر می گذارند، شناسایی ژن TNF-alpha می تواند تأثیر زیادی بر دنبه بگذارد (Mcrae et al., 2014). در این تحقیق وجود و یا عدم وجود چند شکلی در ژن TNF-alpha در گوسفند بررسی خواهد شد. ژن عامل نکروز تومور آلفا (TNF-alpha) در ناحیه کلاس (III) در مکان ژنی مجموعه اصلی سازگاری بافتی (MHC) روی کروموزوم ۲۰ گوسفند قرار گرفته است. گزارش شده است که بیان ژن TNF-alpha در

زمان ابتلا به لوکوز گاوی و بیماری یون در گوسفندان افزایش می یابد (Kabeya et al, 2007). در دهه ۱۹۹۰، ژن TNF-alpha گوسفند توسط سه گروه مختلف تکثیر و توالی یابی شد. این توالی ها در دو مطالعه کاملاً مشابه بودند که در آن ها ژن TNF-alpha گوسفند، کد کننده یک توالی هدایتگر ۷۶ آمینواسیدی و یک پروتئین بالغ ۱۵۷ آمینواسیدی بود. این توالی ها بالای ۸۸ درصد مشابه پروتئین TNF-alpha انسان بودند. آنالیز SSCP قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR برای ژن TNF-alpha مفید گزارش شده است. بنابراین، برای بررسی تنوع ژنتیکی در این ژن روش PCR-SSCP مناسب و دقیق به نظر می رسد (Goto et al., 2002).

بر اساس داده های پایگاه داده NCBI این ژن با شماره دسترسی NC_048566.1 روی کروموزوم شماره ۲ قرار دارد و دارای ۴ اگزون می باشد. فاکتور نکروز توموری آلفا (Tumor necrosis factor alpha) نام یکی از شناخته شده ترین عوامل نکروز تومور است. فاکتورهای نکروز تومور گروهی از سیتوکین ها هستند که موجب مرگ سلولی یا آپوپتوز (Apoptosis) می شوند. عملکرد فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF α) که بصورت عمده در مونوسیت ها و ماکروفاژها تولید و آزاد می شود (Jang et al., 2021). فاکتور نکروز تومور (TNF α) یک سیتوکاین قوی چند اثری پیش التهابی است که توسط ماکروفاژها، نوتروفیل ها، فیبروبلاست ها، سلول های کراتینی، سلول های NK، سلول های B، T و سلول های توموری تولید می شود (Postal, 2011).

مواد و روش ها

خون گیری

در این مطالعه از ۱۵۰ رأس گوسفندان نژاد قزل، رومانوف و ماکویی (شامل ۵۰ رأس قزل، ۵۰ رأس رومانوف و ۵۰ رأس ماکویی) نمونه گیری شد. نمونه های خون گرفته شده از هر گوسفند در ونوجکت ۴ میلی لیتری حاوی EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) که از شرکت پیشگام تهیه شده بود، قرار گرفت. نمونه های خون در محیط سرد بلافاصله پس از استحصال به آزمایشگاه دانشگاه ارومیه منتقل و در فریزر (-۲۰) درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری گردید.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از بافر شماره یک، بافر شماره دو، SDS (Schwachman-Diamond syndrome)، پروتئیناز K، نمک اشباع شده، الکل خالص سرد شده و الکل ۷۰ درصد (شرکت

(قطعات کوتاه DNA) که دارای توالی مکمل ناحیه هدفاند به همراه یک DNA پلیمراز، اجزای اصلی واکنش PCR برای انتخاب و تکثیر قطعه مورد نظر را تشکیل می‌دهند. در فرآیند PCR الگوی DNA به صورت لگاریتمی تکثیر می‌شود و DNA تکثیر شده خود به عنوان الگوی برای همانندسازی استفاده می‌شود. PCR می‌تواند به شکل گسترده‌ای برای انجام مراحل مختلف در دستکاری‌های ژنتیکی استفاده شود (دهنوی و همکاران، ۲۰۱۲). با استفاده از این روش DNA کافی برای آنالیز جزئیات یا دستکاری ژن تکثیر شده به دست می‌آید (Williams, 2005). PCR (واکنش زنجیره پلیمراز) یک ناحیه خاص از رشته DNA هدف را تکثیر می‌کند. به‌طور معمول بیشتر روش‌های PCR این قابلیت را دارند تا قطعات DNA بین ۰/۱ و ۱۰ کیلوگفت باز (kbp) را تکثیر کنند. هر چند تکنیک‌های دیگر می‌توانند قطعاتی با اندازه‌های بالاتر از ۴۰ کیلوگفت باز را نیز تکثیر کنند (Cheng *et al*, 1994). این واکنش برای هر دو جایگاه در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری با استفاده از مواد اشاره شده در جدول ۲ انجام گرفت. جهت انتخاب بهترین دما و بهترین زمان برای انجام واکنش PCR در هر دو جایگاه برنامه‌های دمایی و زمانی گوناگونی بکار برده شد و بهترین برنامه‌ها برای ژن TNF-alpha طبق جدول (شماره ۳) به شرح زیر می‌باشد.

DNA Biotech) استفاده شد. استخراج DNA کل ژنوم با روش بهینه یافته نمکی انجام گرفت. برای بررسی پلی‌مورفیسم ژن TNF-alpha قطعه ۲۷۳ جفت بازی اگزون ۴ تکثیر گردید (بیابانی و همکاران، ۱۳۹۱). این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار primer3 طراحی شده و توسط شرکت پیشگام سنتز گردیدند. توالی این آغازگرها در جدول (شماره ۱) نشان داده شده است.

انجام واکنش واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) یک تکنیک متداول و اغلب ضروری در آزمایشگاه‌های بالینی و آزمایشگاه‌های پژوهشی است و در موارد گوناگونی کاربرد دارد. این کاربردها شامل کلون کردن DNA برای توالی‌یابی، فیلوژنی بر پایه DNA، تحلیل کارکرد ژن‌ها، تشخیص بیماری‌های ارثی، شناسایی اثر انگشت ژنتیکی (مورد استفاده در علم پزشکی قانونی) و تشخیص عوامل بیماری‌زا در آزمایش‌های نوکلئیک اسید برای تشخیص بیماری‌های عفونی است. در سال ۱۹۹۳ مولیس همراه با مایکل اسمیت جایزه نوبل شیمی را برای کار روی PCR دریافت کردند (Diffenbach *et al*, 2003).

اساس تکنیک PCR (واکنش زنجیره پلیمراز) چرخه‌های حرارتی است. این چرخه‌ها شامل چرخه‌های گرمایی و سرمایی تکراری، ذوب DNA و تکثیر آنزیمی DNA می‌باشد. پرایمرها

جدول ۱- توالی پرایمرهای به کار برده شده جهت تکثیر قطعه ۲۷۳ جفت بازی اگزون ۴ ژن TNF-alpha

CTGCCGGAATACCTGGACTA	پرایمر رفت
TCCAGTCCTTGGTGATGGTT	پرایمر برگشت

جدول ۲- مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

نام ماده	غلظت به کار برده شده	مقدار استفاده (میکرولیتر)
مستر میکس	-	۱۲
پرایمر رفت	۱۰ پیکومول در میکرولیتر	۱
پرایمر برگشت	۱۰ پیکومول در میکرولیتر	۱
نمونه DNA	۵۰-۱۰۰ نانوگرم	۲
آب مقطر	-	۹
جمع	-	۲۵

جدول ۳- برنامه زمانی و دمایی PCR جهت تکثیر قطعه ۲۷۳ جفت بازی ژن TNF-alpha

زمان	مراحل	دما (درجه سانتیگراد)
۵ دقیقه	واسرشت سازی اولیه	۹۴
۴۵ ثانیه	واسرشت سازی ثانویه	۹۴
۴۵ ثانیه	اتصال پرایمر	۵۶
۴۵ ثانیه	تکثیر	۷۲
۱۰ دقیقه	بسط نهایی	۷۲

نتیجه گیری و بحث

DNA ژنومی استخراج شده از کیفیت خوبی برخوردار بود. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، صحت قطعات ۲۷۳ جفت بازی تکثیر شده از ژن TNF-alpha در گوسفندان رومانوف، قزل و ماکویی را توسط نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی مورد تأیید قرار داد (تصویر ۱).

بررسی الگوهای ایجاد شده در ژل آکرل آمید

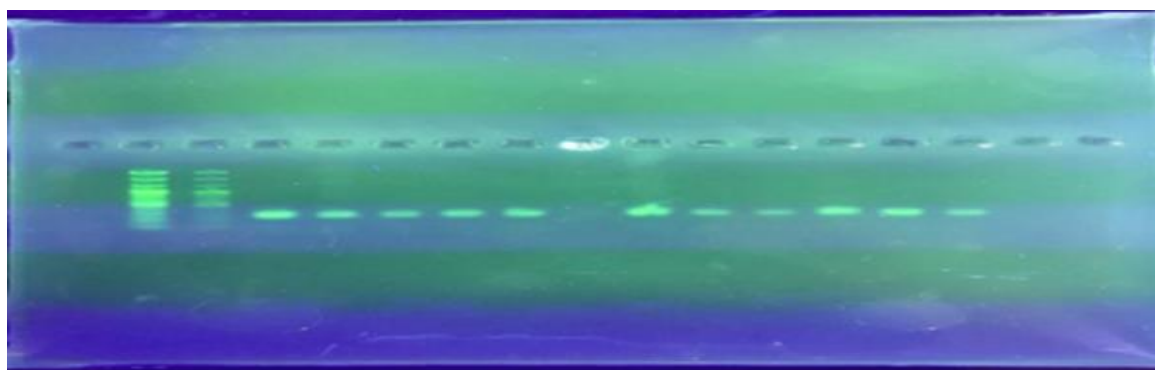
بررسی نتایج و آنالیز الگوهای ایجاد شده برای اگزون ۴ ژن TNF-alpha مشخص شد که هیچ گونه چندشکلی در این ناحیه در حیوانات مورد بررسی (گوسفندان رومانوف، قزل و ماکویی) وجود نداشت (تصویر ۲).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آکرل آمید مبتنی بر تک شکل بودن فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) برای گوسفندان رومانوف، قزل و ماکویی بود. در این مطالعه، بعد از انجام الکتروفورز تمامی محصولات PCR ژن TNF-alpha گوسفندان رومانوف، قزل و ماکویی به روش SSCP مشاهده گردید که ژن TNF-alpha در تمامی گوسفندان بررسی شده مونومورفیک بوده و چندشکلی در این ژن در گوسفندان رومانوف، قزل و ماکویی مشاهده نگردید. تاکنون پلی مورفیسم در این ژن در نژادهای ایرانی، فقط در نژادهای لری بختیاری و زل توسط بزاز پریخانی و همکاران (۱۳۹۶) بررسی شده است که با نتایج به دست آمده ما در مورد نژادهای ماکویی، قزل و رومانوف مطابقت نمی کند. نتایج به دست آمده از این آزمایش برای ژن TNF-alpha در نژاد ماکویی با نتایج به دست آمده از مطالعه Negahdary و همکاران (۲۰۱۴) همخوانی دارد. ولی این نتایج در نژادهای رومانف و قزل نیز همانند نتایج Negahdary و همکاران (۲۰۱۴) بود که بر روی گوسفندان نژاد ماکویی انجام شده است. نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز و بررسی باندهای ایجاد شده در ژل آکرل آمید نشان داد که جایگاه اگزون

۴ ژن TNF-alpha در نژاد قزل، رومانوف و ماکویی فقط یک نوع باند سه خطی را نشان می دهد. بنابراین، در تفسیر نتایج مورد استفاده قرار نمی گیرد. هرچند که مرور منابع از وجود اثرات این ژن بر صفت چربی در گوسفند گزارش دارد (Moradiet al., 2021).

در نژادهای مختلف گوسفند اطلاعات کمی در مورد چندشکلی ژن TNF-alpha وجود دارد. در دهه ۱۹۹۰ ژن TNF-alpha گوسفند به وسیله سه گروه مختلف کلون شد که توالی دو cDNA کاملاً یکسان ولی cDNA کلون شده سوم فاقد یک اسید آمینه در توالی هدایتگر بود. Alvarez-busto و همکاران (۲۰۰۴) تنوع آلی در لوکوس TNF-alpha گوسفندان نژادهای LATXA و RASA را با استفاده از روش PCR-SSCP مطالعه کردند که آنالیزهای SSCP و تکثیر یک قطعه ۲۷۳ جفت بازی در قسمتی از اگزون ۴ و ۳'UTR، منجر به شناسایی سه آل (O.R.E) و پنج ژنوتیپ (ER.OE.OR.RR.OO) گردید. این آل ها در یک حذف و یک چندشکلی تک نوکلئیدی (SNP) باهم اختلاف داشتند و هیچ تفاوتی در توالی آن ها در دو نژاد پیدا نشد. نتایجی که از مطالعه حاضر بدست آمده مشابه نتایجی بود که Alvare-bousto و همکاران (۲۰۰۴) ارائه داده بودند.

تاکنون تلاش های دیگر برای شناسایی چندشکلی در این لوکوس از ژن TNF-alpha با به کار بردن روش های دیگر ناموفق بوده است. نتایج این تحقیقات نشان دهنده تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا برای این جایگاه در ژن TNF-alpha در نژادهای مختلف گوسفند می باشد (do prado et al., 2022). مرادی شهربابک و همکاران (۱۳۹۵) با مطالعه روی ژن PPP2CA بر روی کروموزوم شماره ۵، ۱۶۵ رأس گوسفند نژاد لری-بختیاری و ۱۴۰ رأس گوسفند نژاد زل، دو الگوی باندی متفاوت و دو جهش را مشاهده کردند و نتیجه مطالعات و آزمایشات آن ها تأییدگذار بودن این ژن بر صفات چربی گزارش شد.



تصویر ۱- کیفیت DNA استخراج شده



تصویر ۲- الگوهای مشاهده شده در سه نژاد قزل، ماکویی و رومانوف

در ناحیه ژنومی مورد مطالعه اشاره کرد. در تحقیقاتی که توسط بزاز پریخانی و همکاران (۱۳۹۶) در گوسفندان نژاد لری بختیاری و زل صورت گرفت، جایگاه مورد مطالعه اینترون شماره ۳ ژن TNF-alpha بود و چند شکلی (پلی مورف) گزارش شد. در صورتی که جایگاه مورد مطالعه و آزمایش در این تحقیق اگزون شماره ۴ ژن TNF-alpha بود که نتیجه آن مشاهده تک شکلی (مونومورفیک) بود. از دیگر دلایل تک شکل گزارش شدن ناحیه مورد بررسی در نژاد ماکویی خلوص بالای این نژاد و همچنین همخوانی شدید در گله و کاهش هتروزیگوسیتی در بین نسل‌های متوالی به علت استفاده از یک قوچ به عنوان والد نسل بعد را می‌توان نام برد.

همچنین، چند شکل (پلی مورف) گزارش شدن ژن TNF-alpha و تأثیر آن در چربی و دنبه در گوسفندان ایرانی تا کنون فقط در گوسفندان نژاد لری بختیاری و زل توسط بزاز پریخانی و همکاران در سال (۱۳۹۶) گزارش شده است و مطالعات بسیار اندکی در این جایگاه از ژن TNF-alpha در مورد تأثیر آن در چربی و دنبه در گوسفندان نژاد رومانوف، قزل و ماکویی صورت گرفته است.

زمانی افشار و همکاران (۱۳۹۷) با مطالعه برروی اگزون سوم و قسمتی از اینترون دوم ژن Wnt10a و اگزون سوم ژن Wnt10b، برروی ۹۶ رأس از گوسفندان نژاد آمیخته افشاری-برولامرینو یک پلی مورف و سه مونومورف در جایگاه ژن Wnt10a مشاهده کردند، اما تفاوتی بین نمونه‌ها برای ژن Wnt10b مشاهده نکردند که نتیجه آن‌ها از مطالعه و آزمایش، تأثیرگذار بودن جایگاه مورد مطالعه در ژن Wnt10a برروی صفات مربوط به چربی لاشه در این نژاد بود. با این حال، در این تحقیق تنوعی برای نژادهای رومانوف، قزل و ماکویی مشاهده نشد. با ظهور تکنیک‌های آنالیز ژنومی (DNA)، جهش‌های تأثیرگذار برروی بیان ژن را می‌توان علاوه بر نواحی کدکننده چربی و دنبه، در نواحی غیر کدکننده که در آن تنوع‌های فردی بصورت الکتروفورزی قابل شناسایی هستند را نیز مشخص نمود. این تکنیک‌ها شناسایی افراد حامل آلل‌های مطلوب را آسان و سریع نموده و بهبود ژنتیکی گله‌های دامی را سرعت می‌بخشد (Zhao *et al.*, 2020).

از دلایل عدم تطابق نتیجه این مطالعه با برخی از آزمایشات که جایگاه این ژن را در بعضی از نژادها به خصوص در نژادهای لری بختیاری و زل پلی مورف گزارش کرده‌اند، می‌توان به تفاوت

نتیجه گیری کلی

این مطالعه که با استفاده از نشانگر های ژنتیکی SSCP و PCR-SSCP انجام شد، جایگاه آلی ژن TNF-alpha در گوسفندان نژاد ماکویی، قزل و رومانوف را آشکار ساخت. روش های ژنومی به خصوص نشانگرهای DNA روش بسیار ایده آلی است که می تواند در زمینه های مختلف اصلاح نژاد دام مورد استفاده قرار گیرد و عمل انتخاب دام را برای صفات مورد نظر در حداقل زمان میسر سازد. در این مطالعه چند شکلی ژن TNF-alpha در سه نژاد قزل، رومانوف و ماکویی و تأثیر آن در دنبه و چربی بررسی شد. مارکرهای مورد استفاده برای مطالعه-PCR (SSCP)، مارکرهای مناسبی جهت بررسی اگزون ۴ ژن TNF-alpha بودند. تک شکل بودن جایگاه اگزون ۴ ژن TNF-alpha در نژادهای ماکویی، قزل و رومانوف با نتایج مطالعات انجام شده در این جایگاه مطابقت داشت. با ظهور تکنیک های آنالیز ژنومی (DNA)، جهش های تأثیر گذار بر روی بیان ژن را می توان علاوه بر نواحی کدکننده چربی و دنبه، در نواحی غیر کدکننده که در آن تنوع های فردی به صورت الکتروفورزی قابل شناسایی هستند را نیز مشخص نمود. این تکنیک ها شناسایی افراد حامل آلل های مطلوب را آسان و سریع نموده و بهبود ژنتیکی گله های دامی را سرعت می بخشد.

منابع

بازارپرخانی، ا.، صادقی، م.، و مرادی شهربابک. ح. (۱۳۹۶). "ارتباط چندشکلی های اگزون ۲ ژن فاکتور رونویسی ۷ با صفات چربی خون و دنبه در گوسفندان لری بختیاری و زل." *پژوهش های تولیدات دامی*، ۸(۱۷)، ۸۸-۹۲.

بیابانی، پ.، هاشمی، ع.، خاکپور، ک.، پوربایرامیان، ف. و برومند، ج. (۱۳۹۱). "بررسی تنوع آلی ژن فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-alpha) در گوسفند نژاد ماکویی." *پنجمین کنگره علوم دامی، شهریور (۱۳۹۱)*.

زارع، م.، صادقی، م.، و مرادی شهر بابک م. (۱۳۹۵). "شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی ژن CA۲PPP و اثر آن بر صفات لاشه، رشد و ذخیره چربی در گوسفندان لری بختیاری و زل." *تحقیقات تولیدات دامی*، ۵(۴)، ۷۰-۷۸.

زمانی افشار، س.، هرکی نژاد، ط.، بهاری، ع.، و شهیر، م. ح. (۱۳۹۷). "بررسی چندشکلی ژن های Wnt ۱۰a و Wnt ۱۰b

در گوسفند آمیخته افشاری برونلامرینو." *تولیدات دامی*، ۲۰(۲)، ۲۱۳-۲۲۴.

سید شریفی، ر.، بادبرین، ن.، بهمنی، ا.، و مجتهدین. ع. (۱۳۹۶). "بررسی چند شکلی ژن GDF9 در گوسفند قره گل و ارتباط آن با چند قلوزایی." *فیزیولوژی و تکوین جانوری*، ۱۰، ۲۳-۲۹.

هدایتی فر، ر. (۱۳۹۶). "بررسی میزان ایزومرهای ترانس و درصد اسیدهای چرب در روغن های حیوانی و دنبه مصرفی در استان لرستان." *مجله علمی پژوهشی یافته*، ۱۹(۲)، ۸-۱.

Alvarez-Busto, J., Ruiz-Nuñez, A., Mazon, L.I., and Jugo, B.M. (2004). "Detection of polymorphisms in the tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep." *European Journal of Immunogenetics*, 31(4), 155-158.

Bakhtiarzadeh, M.R., and Alamouti, A.A. (2020). "RNA-Seq based genetic variant discovery provides new insights into controlling fat deposition in the tail of sheep." *Scientific Reports*, 10(1), 13525.

Chessa, B., Pereira, F., Arnaud, F., Amorim, A., Goyache, F., and et al. (2009). "Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations." *Science*, 324(5926), 532-536.

Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M., and Higuchi, R. (1994). "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5695-5699.

Goto, R.M., Afanassieff, M., Ha, J., Iglesias, G.M., Ewald, S.J., and et al. (2002). "Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens." *Poultry Science*, 81(12), 1832-1841.

Kabeya, H., Ohashi, K., and Onuma, M. (2001). "Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection." *Journal of Veterinary Medical Science*, 63(7), 703-708.

do Prado Paim, T., dos Santos, C.A., de Faria, D.A., Paiva, S.R., and McManus, C. (2022). "Genomic selection signatures in Brazilian sheep breeds reared in a tropical environment." *Livestock Science*, 258, 104865.

Erlich, H.A. (1989). "PCR Technology." Stockton Press, New York.

Flamant, J.C. (1998). "The impact of socio-economic aspects on the development and outcome of animal recording systems." *ICAR Technical Series*, 1, 267-318.

Hiendleder, S., Mainz, K., Plante, Y., and Lewalski, H. (1998). "Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for

- contributions from urial and argali sheep." *Journal of Heredity*, 89(2), 113-120.
- Jang, D.I., Lee, A.H., Shin, H.Y., Song, H.R., Park, J.H., and et al. (2021). "The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics." *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2719.
- Moradi, M.H., Nejati-Javaremi, A., Moradi-Shahrabak, M., Dodds, K.G., Brauning, R. and et al. (2021). "Fine mapping of candidate regions associated with fat deposition in thin and fat tail sheep breeds suggests new insights into molecular aspects of fat tail selection."
- McRae, K.M., McEwan, J.C., Dodds, K.G., and Gemmell, N.J. (2014). "Signatures of selection in sheep bred for resistance or susceptibility to gastrointestinal nematodes." *BMC Genomics*, 15, 1-13.
- Negahdary, M., Majdi, S., Biabani, P., and Hajihosseini, A. (2014). "Relationship of TNF- α Gene Polymorphism with fat-tail measurements (fat-tail dimensions) and wool weights in fat-tail Makooei breed of Iranian sheep." *Journal of Biology and Today's World*, 3(4), 77-82.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. (1989). "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2766-2770.
- Postal, M., and Appenzeller, S. (2011). "The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." *Cytokine*, 56(3), 537-543.
- Williams, T.L., Monday, S.R., Feng, P.C., and Musser, S.M. (2005). "Identifying new PCR targets for pathogenic bacteria using top-down LC/MS protein discovery." *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 16(2), 134.
- Zhao, F., Deng, T., Shi, L., Wang, W., Zhang, Q., and et al. (2020). "Genomic scan for selection signature reveals fat deposition in Chinese indigenous sheep with extreme tail types." *Animals*, 10(5), 773.

Publisher Note

Animal Science Students Scientific Association, Campus of Agriculture and Natural Resources at the University of Tehran

Submit Your Manuscript:

https://domesticj.ut.ac.ir/contacts?_action=loginForm



Scientific-Extensional Article

Investigating polymorphism of TNF-alpha genes and their effect on tail fat trait in Makoi, Qezel and Romanov sheep

Danial Nikzad^{1*}, Majid Karimi¹, Ali Hashemi² and Mokhtar Ghaffari²

¹ M.Sc. Student of Animal and Poultry Breeding & Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at the Urmia University, West Azerbaijan, Urmia, Iran

² Associate Professor of Animal and Poultry Breeding & Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at the Urmia University, West Azerbaijan, Urmia, Iran

<https://doi.org/10.22059/domesticsj.2024.372764.1147>

Abstract

Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) is a pro-inflammatory cytokine that is particularly important in regulating the immune response, including macrophage activity and cell death. The present research was conducted in order to investigate the presence or absence of polymorphism in Qezel, Makoi and Romanov sheep by using the polymerase chain reaction (PCR) method and the spatial form difference of single strands (SSCP). For this purpose, to determine the TNF-ALPHA gene polymorphism in Makoi, Qezel and Romanov sheep population, blood was taken from 50 Makoi sheep, 50 Qezel sheep and 50 Romanov sheep. An optimized saline method was used for DNA extraction. The quality of DNA was checked using 1% agarose gel and its quantity was checked with a spectrophotometer. A thermocycler was used to amplify a fragment of the TNF-alpha gene. Polymerase chain reaction was performed to amplify the 273 bp fragment of exon number 4 of TNF-alpha gene. Genotyping was done on a 12% polyacrylamide gel and the samples were placed in a thermocycler, finally they were placed in a polyacrylamide gel placed in a vertical electrophoresis machine. The appearance and coloring stage was done by silver nitrate solution. The analysis and analysis of the gene patterns observed in the TNF-alpha gene on acrylamide showed that the patterns created in Qezel, Romanov and Makoi breeds were monomorphic, which indicates the absence of polymorphism in this locus.

Keyword(s): Fat and tail, PCR-SSCP, Polymorphism, TNF-alpha gene



*Corresponding Author E-mail: danielnikzad8@gmail.com

Section: Animal Breeding and Genetics

Associate Editor: Dr. Masoumeh Naserkheil

Received: 27 Feb 2024

Revised: 04 May 2024

Accepted: 14 May 2024

Published online: 01 Jun 2024

Citation: Nikzad, D., Karimi, M., Hashemi, A., Ghaffari, M. Investigating polymorphism of TNF-alpha genes and their effect on tail fat trait in Makoi, Qezel and Romanov sheep. *Professional Journal of Domestic*, 2024; 24(1): 39-46.