

چندشکلی نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند نژاد کرمانی به روش PCR-SSCP و توالی‌یابی

رسول خدابخش‌زاده^۱ و محمدرضا محمدآبادی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۳۰

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۲ استاد گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر

*مسئول مکاتبه: Email: mmohammadabadi@yahoo.ca

چکیده

زمینه مطالعاتی: انتخاب به وسیله ژنتیک مولکولی روی ژن‌های منحصر بفرد یک روش مطمئن برای بهبود ژنتیکی صفات مهم اقتصادی در حیوانات اهلی می‌باشد. صفت چندقلوزایی یکی از صفات مهم اقتصادی در صنعت گوسفندداری می‌باشد که در سال‌های اخیر توجه متخصصین اصلاح نژاد را به خود جلب کرده است. ژن فاکتور رشد و تمایز شماره ۹ (GDF9) از مهم‌ترین ژن‌های کاندیدای موثر بر صفت چندقلوزایی در گوسفند می‌باشد. هدف: این آزمایش جهت بررسی وجود چند شکلی در جایگاه نیمه دوم (منتهی به 3) اگزون ۲ ژن GDF9 گوسفند نژاد کرمانی انجام شد. روش کار: در این مطالعه، از ۱۰۲ رأس گوسفند خونگیری شد. پس از استخراج DNA، تعیین ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش PCR-SSCP و توالی‌یابی محصولات PCR انجام شد و تغییرات تک نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار Bioedit بررسی شدند. نتایج: نتایج توالی‌یابی نشان دهنده وجود جهش‌های نقطه‌ای در موقعیت نوکلئوتیدهای ۹۷۸ و ۹۹۴ اگزون ۲ ژن GDF9 بود. نتایج آنالیز نرم افزار GenAlex در جایگاه مورد بررسی حاکی از عدم وجود تعادل هاردی واینبرگ در چندشکلی تک نوکلئوتیدی موقعیت ۹۷۸ بود. بالا بودن شاخص شانون در هر دو موقعیت جهش شناسایی شده نشان داد که میزان تنوع زیستی در جایگاه ژن GDF9 مربوط به جمعیت مورد بررسی بالا می‌باشد. با توجه به معیارهای برآورد شده و بالا بودن نسبی میزان هتروزیگوسیتی می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت مورد مطالعه دارای چند شکلی نسبتاً بالایی در جایگاه مورد بررسی می‌باشد.

واژگان کلیدی: چند شکلی، چندقلوزایی، نژاد کرمانی، ژن GDF9، PCR-SSCP

مقدمه

حفاظت از منابع ژنتیکی لازم و ضروری است (محمدآبادی و همکاران ۲۰۱۰). بالغ بر ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند (زمانی و همکاران ۲۰۱۵). در حال حاضر، تولید گوشت مهمترین دلیل پرورش گوسفند در ایران است و تولیدات دیگر مانند پشم، شیر و پوست در درجات بعدی اهمیت قرار دارند (محمدآبادی و ستایی مختاری ۲۰۱۳). به طور

استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (موسوی زاده و همکاران ۲۰۰۹). همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد به طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع می‌کند (جوانمرد و همکاران ۲۰۰۸). مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای

ژن *GDF9* بر صفت چندقلوزایی در نژادهای مختلف، انجام پروژه‌های تحقیقاتی جهت مطالعه این ژن کاندیدا مرتبط با صفت چندقلوزایی ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف از تحقیق حاضر بررسی چند شکلی نیمه دوم (منتهی به 3') اگزون ۲ ژن *GDF9* گوسفندان نژاد کرمانی به روش PCR-SSCP و توالی‌یابی محصولات PCR بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق از تعداد ۱۰۲ رأس گوسفند نژاد کرمانی خونگیری شد. استخراج DNA از ۵۰۰ میکرولیتر خون با استفاده از روش نمکی بهینه یافته انجام گرفت (آبادی و همکاران ۲۰۰۹).

تکثیر ژن *GDF9* با استفاده از PCR

آغازگرها با استفاده از توالی ژن *GDF9* با شماره دستیابی AF078545 با استفاده از وب سایت NCBI^۳ به منظور تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۴۷ جفت باز از اگزون ۲ ژن *GDF9* گوسفند با استفاده از وب سایت primer3 plus طراحی شد.

توالی آغازگرها عبارت بودند از:

F: 5'-TCACTGCTTTTGTATCTGAACGA-3'
R: 5'-CCAAAGGCATAGACAGGGGC-3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از DNA، ۱۶/۷ میکرولیتر آب، ۳/ میکرولیتر آنزیم Tag پلی‌مرز (غلظت ۵ Unit/μl)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشتی (غلظت ۱۰ pM)، ۵/ میکرولیتر از dNTP (غلظت ۱۰ mM)، ۲/۵ میکرولیتر از PCR buffer (غلظت ۱۰x) و ۱ میکرولیتر از MgCl₂ (غلظت ۱،۵ mM) با برنامه حرارتی زیر به تعداد ۳۳ چرخه در دستگاه ترموسایکلر CLEMENS (مدل 22501-02V) ساخت کشور آلمان انجام شد. برنامه حرارتی به صورت تجربی بهینه سازی شد و عبارت بود از: ۱) ۵ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت

کلی در بیشتر کشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است (صوفی و همکاران ۲۰۰۹).

در سال‌های اخیر با کاهش مراتع طبیعی بسیاری از گوسفندداران به دلیل کاهش سودآوری گله‌های گوسفند مولد خود را حذف و یا تعداد گوسفندان مولد خود را به حداقل می‌رسانند. صفت چندقلوزایی یکی از عوامل مهم در سودآوری واحدهای پرورش گوسفند است که می‌تواند بسیاری از هزینه‌های موجود در واحدهای پرورش گوسفند را جبران کند و علاوه بر افزایش تولید گوشت برای عرضه به بازار موجب افزایش درآمد دامداران شود. از این جهت بهبود بازده تولیدمثل به عنوان یکی از مهمترین عوامل مؤثر برای توجیه اقتصادی بودن صنعت گوسفندداری و ادامه حیات آن شناخته می‌شود.

تاکنون سه ژن شناسایی شده که عبارتند از -BMPR1 یا بورولا^۲ که روی کروموزوم شماره ۶ جای دارد و تحت عنوان *FecB* نام‌گذاری می‌شود (اوتسکا و همکاران ۲۰۰۰ و لویس و همکاران ۲۰۰۹)، *GDF9* که روی کروموزوم شماره ۵ قرار دارد و نام دیگر آن *FecG* می‌باشد (صدیقی و همکاران ۲۰۰۲) و *BMP-15*^۳ که روی کروموزوم X جای دارد و نام دیگر آن *FecX* می‌باشد (داتگ و همکاران ۱۹۹۶ و چو و همکاران ۲۰۰۵). محققین در پژوهشی بر روی ژن *GDF9* درگوسفندان نژاد کمبریج و بلکلار وجود هشت جهش را گزارش کردند (هانراهان و همکاران ۲۰۰۴). در پژوهشی دیگر محققین در مطالعه جایگاه نیمه اول (منتهی به 5') اگزون ۲ ژن *GDF9* در نژاد کرمانی دو جهش در موقعیت ۴۷۷ و ۷۲۱ اگزون ۲ ژن *GDF9* شناسایی کردند (خدابخش زاده و همکاران ۲۰۱۶). گوسفند کرمانی طی نسل‌های متمادی به شرایط آب و هوایی گرم و خشک استان کرمان خو گرفته است و دارای جثه کوچک می‌باشد (محمدآبادی ۲۰۱۷). با توجه به نتایج گزارش شده در مطالعات اخیر مبنی بر تأثیر

³- Bone Morphogenetic Protein 15

⁴-National center for biotechnology information

¹- Bone morphogenetic protein receptor type-1B

²- Booroola (*FecB*)

شده، توالی هاپلوتایپ‌های تشکیل دهنده هر ژنوتیپ با استفاده از نرم‌افزار R پیش‌بینی شد.

شاخص‌های ژنتیک جمعیت در محل هر SNP

شاخص تنوع ژنتیکی شانون و تعادل هاردی‌واینبرگ در محل هر SNP با استفاده از نرم‌افزار 6.41GenAlex محاسبه شد.

نتایج و بحث

قطعه تکثیر شده ۶۴۷ جفت بازی (شکل ۱) حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 مورد آزمون SSCP قرار گرفت. پس از انجام SSCP، ۴ الگوی بانندی متفاوت برای این جایگاه (شکل ۲) مشاهده شد. فراوانی الگوهای بانندی برای الگوهای CD، CC، DD و AC به ترتیب ۰/۱۳۷، ۰/۴۱۱، ۰/۲۶۵ و ۰/۱۸۷ بود. در جایگاه نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 مورد بررسی در این مطالعه، دو SNP متفاوت در ناحیه‌ای به طول ۶۴۷ جفت باز شامل نیمه دوم منتهی به ۳' اگزون ۲ ژن GDF9 مشاهده شد. SNP‌های مشاهده شده شامل جایگزینی نوکلئوتید G به جای A در موقعیت نوکلئوتید ۹۷۸ و جایگزینی نوکلئوتید A به جای G در موقعیت نوکلئوتید ۹۹۴ در طول توالی ژن GDF9 بود (شکل ۳). در جمعیت مورد بررسی، برای جایگاه نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 چهار ژنوتیپ و سه هاپلوتایپ مختلف شناسایی شد. همانطور که از جدول ۱ و ۲ ملاحظه می‌شود ژنوتیپ ۲ و هاپلوتایپ ۱ در جمعیت مورد بررسی دارای بیشترین فراوانی هستند.

سازی اولیه DNA، ۲) انجام سه مرحله زیر با ۳۳ چرخه تکرار: الف- ۲۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور تک رشته‌ای شدن DNA، ب- ۵۰ ثانیه دمای ۶۳/۶ درجه سانتی‌گراد به منظور اتصال آغازگر به DNA تک رشته، پ- ۵۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور بسط آغازگر، ۳) پایان چرخه‌ها، ۴) ۸ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با یک چرخه تکرار برای بسط نهایی جهت ارزیابی محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۱ درصد استفاده شد.

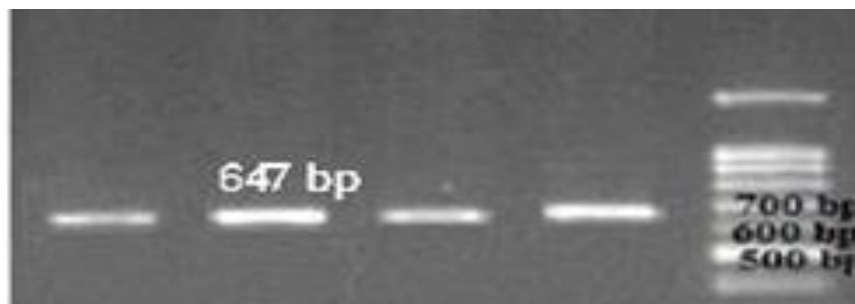
استفاده از روش PCR-SSCP جهت تعیین ژنوتیپ حیوانات

جهت الکتروفورز محصولات از سیستم الکتروفورز عمودی دارای سیستم خنک کننده با آب استفاده شد. جهت انجام SSCP، از محلول اکریل‌آمید ۳۸/۵ درصد استفاده شد که در آن نسبت اکریل‌آمید به بیس اکریل‌آمید ۳۷/۵ به ۱ بود. مقدار ۱۰-۷ میکرولیتر از بافر بارگذاری با محصولات تک رشته‌ای شده PCR مخلوط و بعد از گذشت ۵ دقیقه مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه با استفاده از الکتروفورز عمودی روی ژل اکریل‌آمید ۸ درصد بارگذاری و الکتروفورز شدند. برای مشاهده الگوهای بانندی از رنگ آمیزی نیترا نقره استفاده شد (خدابخش زاده و همکاران ۲۰۱۶).

توالی‌یابی محصولات PCR

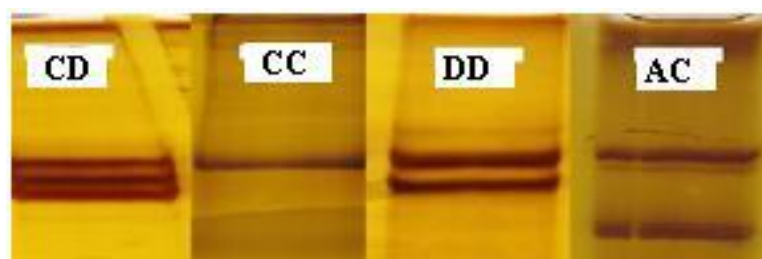
در این مطالعه بر اساس الگوهای بانندی متفاوت، از هر الگو یک نمونه انتخاب و از محصولات PCR به صورت مستقیم برای توالی‌یابی ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی‌یابی و شناسایی و اعمال جهش‌ها در توالی هر هاپلوتایپ با استفاده از کدهای نوکلئوتیدی پیشنهادی IUPAC^۱، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN و Bioedit جهت تعیین جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی به همراه توالی‌های گزارش شده در NCBI هم‌تراز شده و مقایسه شدند. با بررسی و ارتباط شکل الگوهای بانندی در ژل اکریل‌آمید و سپس مراجعه به توالی ژنوتیپ‌های مشاهده

^۱ - International Union of Pure and Applied chemistry



شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از نشانگر ژنتیکی ۱۰۰ bp (سینا ژن، ایران)

Figure 1- Electrophoresis of PCR products using 100 bp genetic marker

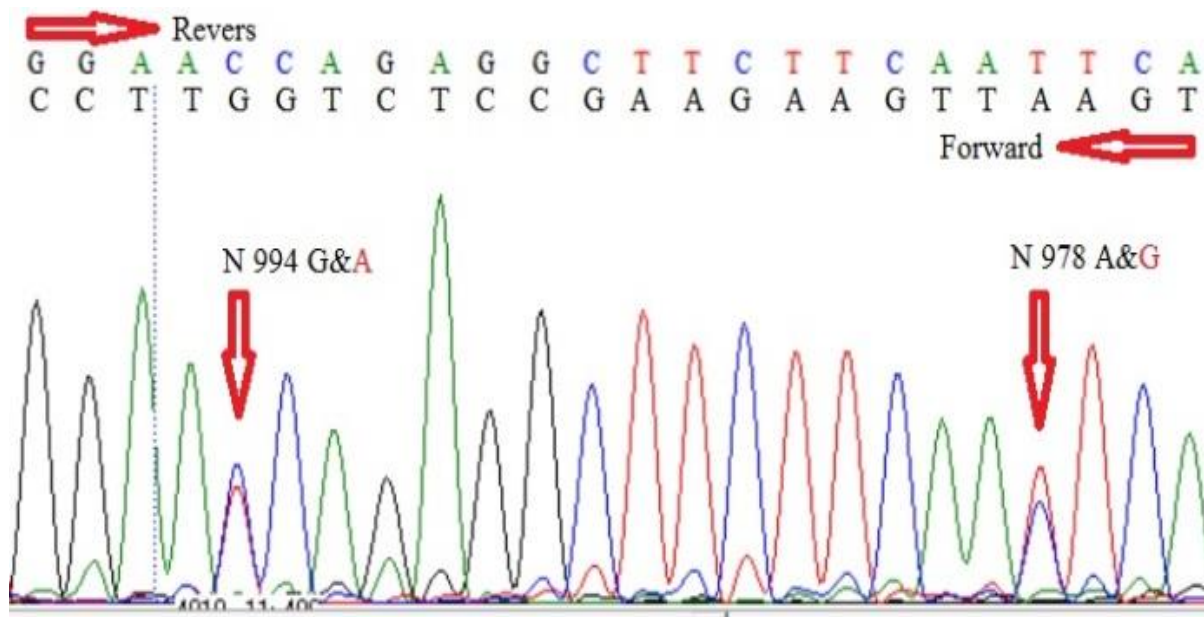


شکل ۲- الگوهای SSCP جایگاه نیمه دوم اکزون ۲ ژن GDF9

Figure 2- SSCP patterns for second half of exon 2 of GDF9 gene

جدول ۱- ژنوتیپ‌ها و هاپلوتیپ‌های شناسایی شده نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 در جمعیت مورد بررسی
 Table 1- Detected genotypes and haplotypes for second half of exon 2 of GDF9 gene in studied population

شماره نوکلئوتید در توالی گزارش شده در NCBI			
Nucleotide number for reported sequence in NCBI			
شماره هاپلوتیپ	978	994	فراوانی
Haplotype number			Frequency
1	A	G	0.362
2	G	A	0.338
3	A	A	0.300
شماره ژنوتیپ	978	994	فراوانی
Genotype number			Frequency
1(CC)	AA	GG	0.137
2(DD)	GG	AA	0.411
3(CD)	GA	GA	0.265
4(AC)	AA	GA	0.187



شکل ۳- کروماتوگرام حاصل از نتایج توالی‌یابی برای SNPهای شناسایی شده جایگاه نیمه دوم اگزون ۲ ژن GDF9 از دو SNP مشاهده شده در جایگاه نیمه دوم، SNP موقعیت نوکلئوتید ۹۹۴ منجر به تغییر اسید آمینه والین (Val) به ایزولوسین (Ilu) می‌شود. همچنین SNP موقعیت نوکلئوتید ۹۷۸ برای اسید آمینه گلوتامین (Glu) بدون تغییر اسید آمینه همراه بود.

Figure 3- Chromatogram achieved from sequencing results for detected SNPs in second half of exon 2 of GDF9 gene

From 2 observed SNP in second half, SNP of nucleotide in 994 position changes Val to Ilu amino acid. SNP of nucleotide in 978 position does not change Glu amino acid.

جدول ۲- فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های هر SNP در جمعیت مورد مطالعه
Table 2- Allele and genotype frequencies for SNP in studied population

موقعیت SNP SNP position	فراوانی آللی Allele frequency	سطح معنی‌داری Significant level	شاخص شانون Shanon index
***978	<u>A</u> 0.456	G 0.544	0.689
ns994	<u>G</u> 0.363	A 0.637	0.655
فراوانی ژنوتیپی Genotype frequency			
***978	AA 0.323	AG 0.265	GG 0.412
ns994	GG 0.137	GA 0.450	AA 0.411

***: عدم وجود تعادل هاردی-واینبرگ در سطح معنی‌داری یک هزارم ($P < 0.001$): ns: وجود تعادل هاردی واینبرگ. آلل‌هایی که زیرشان خط کشیده شده و با قلم درشت برجسته شده است، آلل وحشی (آلل مربوط به هاپلوتایپ ۱) است.

***: Hardy-Weinberg disequilibrium in 0.001 significant level ($P < 0.001$). ns: Hardy-Weinberg equilibrium. Underlined and bolded alleles are wild alleles (allele corresponds to haplotype number 1).

هموزیگوت جهش یافته باعث ناباروری می‌گردد. حاملین هموزیگوت دارای تخمدان‌های کوچک و پهن می‌باشند و فولیکول در این تخمدان تا مرحله اولیه رشد نمی‌کند و در نتیجه باعث عقیمی آنها می‌گردد (هانزاهان و همکاران ۲۰۰۴ و مونتگری و همکاران ۲۰۰۹). همچنین مطالعات انجام شده دیگر نیز نشان می‌دهند که این جهش (G8) در گوسفندان چندقلوزا دیگر وجود ندارد (دیویس و همکاران ۲۰۰۵؛ پلی و همکاران ۲۰۱۰؛ محمدی و همکاران ۱۳۹۰) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت دارد.

از نقطه نظر اصلاح دام، اثر متقابل ژنوتیپ و محیط نقش حیاتی در تعیین عملکرد صفات اقتصادی حیوانات دارد. لذا، با توجه به عوامل استرس‌زا در مناطق گرمسیر استان کرمان (گرما، حشرات و انگل‌ها) و اثر متقابل این عوامل بر صفت چندقلوزایی، اهداف و برنامه‌های اصلاح نژادی گوسفندان کرمانی را باید در جهتی پیش برد که تمام عوامل محیطی مؤثر بر این صفت در نظر گرفته شود. بنابراین، شاید بتوان از نتایج چنین پژوهش‌هایی در

در SNP موقعیت ۹۷۸ بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل وحشی بود، اما در SNP موقعیت ۹۹۴ بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل جهش یافته بود. SNP موقعیت ۹۹۴ در تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشت، اما SNP موقعیت ۹۷۸ در عدم تعادل هاردی-واینبرگ قرار داشت که به این معناست که در این جمعیت عوامل برهم زنده‌ی تعادل مانند انتخاب، مهاجرت، رانش ژنتیکی، جهش و غیره وجود دارد که موجب شده جمعیت از تعادل خارج شوند. از شاخص شانون برای بیان میزان تنوع زیستی استفاده می‌شود. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود میزان تنوع زیستی در جایگاه ژن GDF9 مربوط به جمعیت مورد بررسی بالا می‌باشد.

نیکول و همکاران (۲۰۰۹) در یک نژاد گوسفند در ایسلند بنام توکا وجود SNP‌های موقعیت ۴۷۷، ۷۲۱، ۹۷۸ و ۹۹۴ را در این نژاد گزارش کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت می‌کند. جهش در موقعیت نوکلئوتید ۱۱۸۴ ژن GDF9 باعث افزایش در میزان تخم‌گذاری در گوسفندان هتروزیگوت می‌گردد، اما در گوسفندان

برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاح نژاد صفات تولیدمثلی استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

- Abadi MRM, Askari N, Baghizadeh A and Esmailizadeh AK, 2009. A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. *Small Ruminant Research* 81: 146-151.
- Chu MX, Cheng GH, Chen L, Fang and Ye SC, 2005. Study on morphogenetic protein 15 as a candidate gene for prolificacy of Small Tailed Han sheep and Hu sheep. *Journal Anhui Agriculture University* 32: 278-282.
- Davis GH, 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genetics Selection Evolution* 37: 11-23.
- Dong J, Alvertini DF, Nishimori K, Rajendra Kumar T, Lu N and Matzuk MM, 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculog-ensis. *Nature Genetics* 383: 531-535.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R and Galloway SM, 2004. Mutations in the genes for Oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis Aries*). *Biology of Reproduction* 70: 900-909.
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmash A and Asadzadeh N, 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (*Iranian Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics* 44: 495-497.
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh A, Moradi Shahrehabak H, Bordbar F and Ansari Namin S, 2016. Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish Journal of Veterinary Science* 19: 281-289.
- Luis V, Ricardo P, Tejedor MT, Adolfo L and Isidro S, 2009. A 17 bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. *Animal Reproduction Science* 110: 139-146.
- Mohammadabadi MR, 2017. Inter-Simple Sequence Repeat loci associations with predicted breeding values of body weight in Kermani sheep. *Genetics in the 3rd Millennium* 14: 4383-4390.
- Mohammadabadi MR and Sattayimokhtari R, 2013. Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in kermani sheep. *Slovak Journal of Animal Science* 46: 45-51.
- Mohammadabadi MR, Torabi A, Tahmourespoor M, Baghizadeh A, Esmailizadeh Koshkoie A and Mohammadi A, 2010. Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *African Journal of Biotechnology* 9: 6848-6852.
- Mohammadi Gh, Beigi Nassiry M, Gouraninejad S and Barati S, 2011. Study of FecGH mutation of GDF9 in Lori-Bakhtiari and Arabi Khoozestan sheep breeds using PCR-RFLP. *Iranian Veterinary Journal* 7: 84-89 (In Persian).
- Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH and McNatty KP, 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. *Biology of Reproduction* 121: 843-852.
- Mousavizadeh A, Mohammadabadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi and Esmailizadeh AK, 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Iranian Journal of Biotechnology* 7: 51-53.
- Nicol L, Bishop SC, Pong-Wong R, BendixenCh, Holm LE, Rhind SM and McNeilly AS, 2009. Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocytespecific GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Society for Reprodction and Fertility* 38: 921-933.
- Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF and Shimasaki S, 2000. Bone morphogenetic Protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biology Chemistry* 50: 39523-39528.

- Polley S, De S, Brahma B, Mukherjee A, Vinesh PV and Batabyal S, 2010. Polymorphism of BMP1B, BMP15 and GDF9 fecundity genes in prolific Garole sheep. *Tropical Animal Health Production* 42: 985–993.
- Sadighi M, Bodensteiner KJ, Beattie AE and Galloway SM, 2002. Genetic mapping of ovine growth differentiation factor 9 (GDF9) to sheep chromosome 5. *Animal Genetic* 33: 244–245.
- Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N and Dayani O, 2009. Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. *Animal Science Reserches* 19: 81-89 (In Persian).
- Zamani P, Akhondi M and Mohammadabadi MR, 2015. Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research* 132: 123-127.

Polymorphism at second half of exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep breed using PCR-SSCP and sequencing

R Khodabakhshzadeh¹ and MR Mohammadabadi^{2*}

Received: June 3, 2016

Accepted: February 18, 2017

¹ MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

² Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

*Corresponding Author: mmohammadabadi@yahoo.ca

Introduction: Applications of molecular genetics have many important advantages (Mousavizadeh et al. 2009). Using genetic markers in animal selection and breeding may also dramatically expedite genetic improvement (Javanmard et al. 2008). Study of native breeds is necessary for conservation of genetic resource in livestock (Mohammadabadi et al. 2010). There are more than 26 sheep breeds in Iran adapted to different environmental circumstances (Zamani et al. 2015). One of the most important breeds of Iranian sheep is Kermani sheep. This local breed lives in the south-eastern of Iran and is a fat-tail breed and well adapted to a wide range of harsh environmental conditions in Kerman province (Mohammadabadi 2017). Growth differentiation factor (GDF) 9 is a member of the transforming growth factor β superfamily that is secreted from oocytes during folliculogenesis (Aaltonen et al. 1999) and is essential for folliculogenesis and female fertility (Khodabakhshzadeh et al. 2016). Hanrahan et al. (2004) revealed eight single nucleotide polymorphisms across the entire coding region (G1–G8) and these differences correspond to one SNP in exon 1, one SNP in the intron, and five SNPs in exon 2. It is proven that exon 2 is more important than exon 1 and intron.

Material and methods: The blood samples were randomly collected from Kermani sheep (102 animals) from both sexes and with different ages (Kerman, Iran), using vacuum tubes with 0.25% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA). The blood samples were transferred in dry ice to the laboratory and stored at -20°C pending assays. Blood samples of the animals were used to extract genomic DNA using the salting out procedure described by Abadi et al. (2009). The quality of DNA was checked by spectrophotometry taking ratio of optical density (OD) value at 260 and 280 nm. The sheep GDF9 gene was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) with designed specific primers. These primers were used to amplify fragment 647 bp of the exon 2 for the sheep GDF9 gene. The PCR reaction was performed in a 25 μL reaction volume containing 2 μL of genomic DNA (50 ng/ μL), 1 μL of MgCl_2 (3 mM), 1 μL of each forward and reverse primers (10 pmol each), 0.5 μL of dNTPs (500 μM each), 0.3 unit of Taq DNA polymerase (Cinna Gene, Iran) and 10X PCR buffer. DNA amplifications were performed using thermo cycler (CLEMENS, Germany) programmed for a preliminary step of 5 min at 94°C , followed by 33 cycles of 30 s at 94°C , 50 s at 62.5°C for the first primer pair and 63.6°C for the second primer pair and 50 s at 72°C , with a final extension of 8 min at 72°C . Amplification was verified by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel in 1 x TBE buffer (2 mM of EDTA, 90 mM of Tris-Borate, pH 8.3), using a 100bp ladder as a molecular weight marker for confirmation of the length of the PCR products. Gels were stained with ethidium bromide (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The SSCP technique was used to allow the sequence variants to be detected from the migration shift in PCR amplified fragments of the gene. For SSCP analysis, 6 μL of each PCR product was mixed with 12 μL of denaturing loading buffer (19 mL formamide, 0.98 gr NaOH (3% NaOH solution), 0.01 gr xylene cyanol and 0.01gr bromophenol blue). The samples were denatured by heating at 95°C for 10 min, then immediately chilled on ice and loaded onto 8% polyacrylamide gel (37.5:1). Gels were run at 170-180 V for 7-8 hours at 4°C . The electrophoresis was carried out in a vertical unit in 1x TBE buffer (Tris 100 mM, boric acid 9 mM, EDTA 1mM). The gels were stained with silver nitrate to observe the conformational patterns. After revealing the single stranded

conformation polymorphism (SSCP) patterns for this locus, from each of the ovine *GDF9* variants identified by PCR-SSCP, one sample was sequenced (Mahan Gene, Iran). The raw sequence data were edited using Bioedit 7.0 software. Multiple sequence alignments were performed with Bioedit 7.0 and DNAMAN software to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the exon 2 of the *GDF9* gene in Kermani sheep. The nucleotide sequence of exon 2 was translated to amino acid sequence for each particular allelic variant. The BLAST algorithm was used to search the NCBI GenBank databases for comparison of the ovine *GDF9* sequences with homologous sequences of other animals to determine similarity percentage and detect the novel SNPs in the studied locus. Population genetic parameters were obtained using GenAlex6.41 software.

Results and discussion: As expected, PCR amplification of the ovine *GDF9* gene for Kermani sheep gave uniform fragment 647 bp by running on 1% agarose gel and the amplified fragment size were consistent with the expected size and subsequently sequencing of the ovine *GDF9* amplicons confirmed them to be 647 bp in size (Fig 1). The SSCP analysis revealed four unique banding patterns for the second half of the exon representing different allelic variants (Fig 2). In the studied population, four different genotypes and three haplotypes were observed for the second half of the exon 2 (Table 1). Frequencies of the detected genotypes and haplotypes in the studied population are provided in Table 2. In total, in this population, genotype 2 in the second half of the exon 2 were most common with a frequency of 0.411. The sequencing results were representative of the point mutations at nucleotide positions 994 and 978 in exon 2 of the *GDF9*. The analysis results of the GenAlex software in the studied position revealed the lack of Hardy-Weinberg equilibrium in single nucleotide polymorphism (SNP) at position 978. The high level of Shannon index in both positions of the identified mutations indicated that the level of Biodiversity in *GDF9* gene position associated with the sample population was high. Hanrahan et al. (2004) discovered eight variants (G1 to G8) of *GDF9* gene in Cambridge and Belclare sheep breeds using PCR-SSCP and sequencing. However, G8 variant caused serine to phenylalanine substitution at residue 395 which replaced an uncharged polar amino acid with a nonpolar one at residue 77 of the mature coding region and may change the function of *GDF9* in sheep (Hanrahan et al. 2004). Nikol et al. (2009) discovered 4 variants (G3, G4, G5 and G6) of *GDF9* gene in Icelandic Thoka sheep that is in agreement with the result of the present study. The high level of genetic variability observed in the coding region of the ovine *GDF9* gene in this study suggests that this region of the *GDF9* gene probably affects folliculogenesis and female fertility in sheep; hence further association studies using appropriate populations are needed to identify genetic variants that can be used as markers related to fertility.

Conclusion: Regarding the estimated criteria and relatively high level of heterozygosity, it can be concluded that the studied population has a relatively high polymorphism in the examined locus. The discovered alleles and genotypes can also be used as markers in marker-assisted selection of sheep for economic traits in future.

Keywords: *GDF9* gene, Kermani sheep, PCR-SSCP, polymorphism, Prolificacy