بهینه‌سازی شرایط PCR برای دو ژن CHD-W و CHD-Z جهت تفکیک جنسیت در قناری

فاطمه اعتمادی[۱]، زینب فتح‌خانی[۲]، احمد ابراهیمی[۳]، خسرو حسینی‌پژوه[۴*]

چکیده

در گونه‌های بسیاری از پرندگان من جمله قناری‌ها، جنس نر و ماده قبل از بلوغ فاقد هر گونه تفاوت در شکل ظاهری می‌باشند. از آنجاییکه صدای دلنشین قناری توسط جنس نر ایجاد می‌شود، لذا تفکیک جنسیّت قناری‌ها قبل از بلوغ از لحاظ اقتصادی بسیار حائز اهمیّت می‌باشد. ژن‌های موجود بر کروموزوم‌های جنسی به خاطر منحصر به جنس بودنشان می‌توانند برای تفیین جنسیت به روش مولکولی مورد استفاده قرار گیرند. با استفاده از روش PCR و بر اساس دو ژن CHD-W و CHD-Z تفکیک جنسیّت در قناری‌ها صورت گرفته است. هدف از این مطالعه بهینه سازی PCR بر اساس دو ژن CHD-W و CHD-Z در تفکیک جنسیّت در قناری بود. در این مطالعه از ۲٤ قناری دو پر حاوی ریشه تهیه گردید و استخراج DNA از بالب پرها صورت پذیرفت و از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر توالی ژن W-CHD استفاده شد و با بهینه سازی شرایط PCR برنامه بهینه به صورت زیر به دست آمد: واسرشته سازی اوّلیه ۹٤ درجه سانتیگراد به مدّت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با شرایط : ۹٤ درجه سانتیگراد به مدّت ٦۰ ثانیه ،۵۸ درجه سانتیگراد به مدّت ۳۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدّت ۵۰ ثانیه و در نهایت دمای۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه. این مطالعه نشان داده شد که روش بهینه شده PCR می‌تواند با دقت صد درصد جنسیت قناری را تعیین کند و لذا مناسب‌ترین روش برای تعیین جنسیّت قناری است.

واژگان کلیدی: *قناری، تفکیک جنسیّت، PCR*

تاریخ دریافت: ۹٤/٤/٦ تاریخ پذیرش: ۹٤/۷/۵

مقدمه

در گونه‌های بسیاری از پرندگان من جمله قناری‌ها، جنس نر و ماده قبل از بلوغ فاقد هر گونه تفاوت در شکل ظاهری می‌باشند (۱۱و ۸). به همین خاطر تعیین جنسیّت برای صاحبان و پرورش دهندگان پرندگان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. شاخص‌هایی که افراد را به سمت تعیین جنسیت پرندگان می‌کشاند شامل: تشخیص نوع رفتار قابل پیش‌بینی پرنده برای ایجاد و حفظ روابط بلند مدت بهتر با آن، امکان پرورش و یا نگهداری تعداد متعادل پرندگان نر و ماده، پرورش پرندگان صنعتی و نوع استفاده از آنها در زمینه‌های مختلف، تحقیقات علمی بر روی صفات متفاوت گونه‌های مختلف در مطالعات اصلاح نژاد، آموزش پرندگان با توجه به توانایی متفاوت پرندگان نر و ماده، می‌باشند. تعیین جنسیت پرندگانی که قبل از بلوغ مونورف می‌باشند، مانند گونه قناری که جنس نر از لحاظ اقتصادی دارای ارزش بیشتری است(۲). تعیین جنسیّت قناری برای خیلی از افراد تازه وارد در زمینه پرورش حتّی بسیاری از افراد متبحّر در این زمینه امری بسیار دشوار است. طبق دسته بندی سیستماتیک، قناری (*Serinus canaria canaria*) متعلّق به راسته گنجشک‌ها (*Passeriformes*) و به خانواده فنچ‌ها (*Fringillidae*) می‌باشد. با توجّه به اینکه قناری از سن بلوغ شروع به آواز می‌کند و بیشتر صدای دلنشین قناری توسّط جنس نر ایجاد می‌شود، لذا تفکیک جنسیّت قناری‌ها از لحاظ اقتصادی اهمّیّت بسیار زیادی دارا می‌باشد. (۱۱ و۸) در پرندگان، بر خلاف انسان کروموزوم جنسی ماده، تعیین کننده جنسیت می‌باشد. پرنده نر هوموگامتیک (ZZ) معادل XY در انسان و پرنده ماده هتروگامتیک (ZW) معادل XX در انسان است(۱۰ و ۷).

تعیین جنسیّت قناری به روش‌های مختلفی شامل: ۱. تعیین جنسیّت از روی مشخصات ظاهری ۲. تعیین جنسیت از روی سنجش استروئید ۳. تعیین جنسیّت از روی کاریوتایپینگ.

۱- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی-ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- هیئت علمی مرکز غدد و متابولیسم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*٤- پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران، تهران، ایران pajhooh@yahoo.com

٤.تعیین جنسیت از طریق PCR انجام می‌شود. تعیین جنسیت پرندگان با استفاده از روش‌های قدیمی مانند لمس کلواک، سنجش میزان استروئید، کاریوتایپینگ و... دشوار و زمانبر و پرهزینه می‌باشد و حتی در برخی موارد به دلیل نیاز به خون گیری ممکن است موجب مرگ پرنده شود (٤). از آنجا که ژنوتیپ پرنده ماده ZW و ژنوتیپ پرنده نر ZZ می‌باشد، لذا کروموزوم W فقط در جنس ماده پرندگان وجود دارد و بر اساس آن می‌توان مارکر ژنتیکی مناسبی برای تفکیک جنس‌های نر و ماده از هم یافت. این ویژگی همانند کروموزوم Y در انسان است با این تفاوت که در انسان و سایر پستانداران، جنس نر هتروگامتیک است و جنس ماده هموگامتیک می‌باشد ولی در پرندگان وضعیت دقیقا عکس است. تفاوت این توالی در کروموزوم W و Z در ۳۹ نوکلئوتید است و بنابراین از تفاوت اینها می‌توان جنس نر و ماده را تفکیک نمود (٦ و٢). دوستی و همکاران از ژن W-CHD مربوط به پرنده‌ای با نام علمی فرونتالیس همیسپینگوس (Hemispingus frontalis) که از خانواده فرینجیلده (Fringillidae) می‌باشد و قرابت فیلوژنتیکی بالایی با کاناریا سرینوس (canaria Serinus) دارد، برای تعیین جنسیّت قناری استفاده کردند(٥).

در این مطالعه بهینه‌سازی PCR برای افزایش دقت در تفکیک جنسیت قناری بر اساس دو ژن CHD-W و CHD-Z صورت گرفت، تا باندهای بهتری ایجاد شود و از خطا هنگام تشخیص کاسته شود زیرا ۲ باندی که برای قناری ماده در ژل الکتروفورز رویت می‌شود بسیار به هم نزدیک هستند و ممکن است هنگام مشاهده ۲ باند از هم تفکیک نشوند و یک باند دیده شود و قناری به طور کاذب نر شناخته شود.

مواد و روش کار

از ٢٤ قناری به طور تصادفی دو پر حاوی ریشه تهیه گردید و DNA از بالب پرها به روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج گردید. جهت استخراج DNA ابتدا ٤ میلی متر از انتهای هر پر بریده و خرد کرده و آن را در داخل میکروتیوپ استریل mL ١,٥ قرار داده شد و ٢٠ میکرولیتر هیدروکسید سدیم (0.2 N) به آن اضافه گردید و به مدت یک دقیقه ورتکس شد. سپس به مدّت ٤٥ دقیقه در داخل بن ماری ٩٦ درجه سانتی گراد قرار داده و به مقدار ١٨٠ میکرولیتر Tris-Hcl (0.04 N) نرمال به آن اضافه شد سپس ورتکس کرده و به مدت ٣٠ ثانیه spin می کنیم و مایع رویی حاوی DNA را به میکروتیوپ دیگر انتقال داده شد و تعیین کمیّت DNAهای استخراج شده با کمک نانودراپ و کیفیت آن توسط ژل الکتروفورز (٣٪) و رنگ‌آمیزی با سایبر سیف (syber safe) صورت پذیرفت .

در این مطالعه از پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر جایگاه های ریز ماهواره ای اختصاصی جنس نر و ماده از توالی ژن W-CHD مربوط به پرنده فرونتالیس همیسپینگوس (*Hemispingus frontalis*) طرّاحی شده توسّط دوستی و همکاران ، استفاده شد که توالی آن به صورت زیر است (٥) و توسط شرکت TAG Copenhagen (Kong Georgs Vej 12, 2000 Frederiksberg, Denmark) با غلظت ١٠٠میکرومولار ساخته شد:

Canary-F: 5'- GGATGAGGAACTGTGCAAAAC -3'
Canary-R: 5'- AATAGTTCGCGGTCTTCCAC -3'

واکنش‌های PCR بر روی نمونه‌های DNA ژنومی توسط دستگاه مسترسایکلر گرادینت شرکت Eppendorf (Germany) با استفاده از پرایمرهای فوق انجام شد.

در این بررسی اثر مقدار DNA الگو (٣٠، ٩٠ و ١٢٠ نانوگرم)، زمان آنیلینگ (٣٠، ٤٥ و ٦٠ ثانیه) دمای آنیلینگ (گرادیان دمای ٥٥ تا ٦٥ درجه سانتی‌گراد) و زمان بسط توالی (٤٠، ٥٠ و ٦٠ ثانیه) بررسی شدند.

محلول واکنش PCR شامل: ٣٠، ٩٠ و ١٢٠ نانوگرم DNA الگو، ١ میکرولیتر از مخلوط دو پرایمر(٥٠ پیکومول از هر پرایمر)، ٦ میکرولیتر Master mix red (2x) شامل ١/٥ mM Mgcl2 (شرکت Ampliqon,Germany)، و حجم نهایی واکنش ١٢ میکرولیتر بود.

برنامه‌های حرارتی مورد بررسی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه جهت مرحله شروع و واسرشت کردن اولیه، سپس ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه جهت واسرشت کردن، گرادیان دمای ۵۵ تا ٦۵ درجه سانتی گراد با زمان‌های ۳۵، ٤۵ و ٦۰ ثانیه جهت آنیلینگ و مرحله طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با زمان‌های٤۰، ۵۰ و ٦۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. در نهایت محصولات واکنش در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر نگهداری شدند.

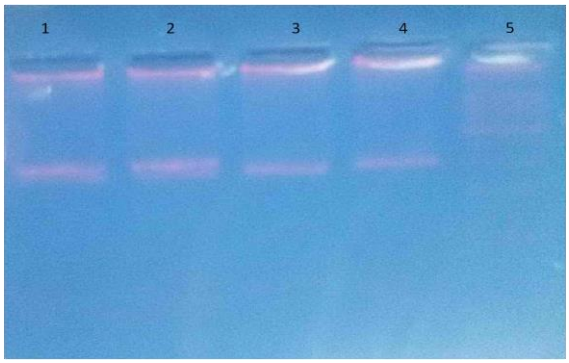
محصولات تکثیر شده با مخلوطی از لودینگ بافر و Super gel red و در کنار مارکر ۱۰۰bp (شرکت Fermentas) بر روی ژل آگارز ۱/۵ و ۳٪ به مدت ٤۵ دقیقه در ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز گردیدند. باندهای مربوطه با استفاده از دستگاه تصویر بردار از ژل (Biometr) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

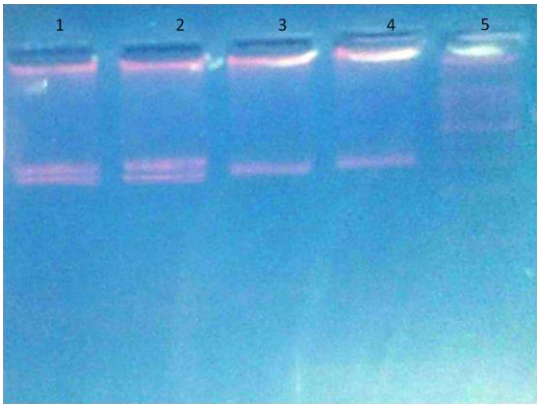
برنامه حرارتی قبل از بهینه سازی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹٤ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه بود (۵)، که باندها به شکل واضحی مشاهده نشدند (نگاره ۱).

در بررسی اثر مقدار DNA الگو(۳۰، ۹۰ و ۱۲۰ نانوگرم)، بهترین نتیجه با مقدار۱۲۰ نانو گرم بدست آمد. همچنین در در بررسی دمای آنیلینگ و زمان بسط توالی دمای ۵۸ درجه سانتیگراد به مدّت ۳۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدّت ۵۰ ثانیه به ترتیب بهترین مقادیر این دو پارامتر بودند. لذا PCR با شرایط: واسرشته سازی اوّلیه ۹٤ درجه سانتیگراد به مدّت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با شرایط : ۹٤ درجه سانتیگراد به مدّت ٦۰ ثانیه ،۵۸ درجه سانتیگراد به مدّت ۳۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدّت ۵۰ ثانیه و در نهایت به منظور تکمیل فرایند تکثیر قطعات، دمای۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و المتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۳٪ به عنوان شرایط بهینه به دست آمد (نگاره ۲).

از ۲٤ قناری مورد بررسی ۱۰ قطعه نر و ۱٤ قطعه ماده بودند که این روش در تعیین جنسیت همه را به درستی شناسایی کرد و با ویژگی‌های ریخت‌شناسی دو جنس نر و ماده صد در صد تطابق داشت.



نگاره ۱- الکتروفورز محصول PCR قطعه CHD قبل از بهینه کردن. شماره های ۱ و ۲ مربوط به قناری ماده است ودو یاند بخوبی تفکیک نشده است. شماره های ۳ و ٤ مربوط به قناری نر است. شماره ۵ مارکر ۱۰۰bp



نگاره ۲- الکتروفورز محصول PCR قطعه CHD بعد از بهینه کردن. شماره‌های ۱ و ۲ مربوط به قناری ماده است و دو یاند بخوبی تفکیک شده است. شماره های ۳ و ٤ مربوط به قناری نر است. . شماره ۵ مارکر ۱۰۰bp

بحث

حدود ٦٠٪ گونه‌های پرندگان از لحاظ جنسیت تک شکل هستند. کاریوتیپ، تعیین جنسیت از طریق کلوآک و تعیین جنسیت استروئیدی روش‌های متداول تعیین جنسیّت پرندگان می‌باشند، اما این روش‌ها معمولاً پر هزینه، وقت‌گیر و نامطمئن هستند(٤). تعیین جنسیت استروئیدی نیاز به خون‌گیری دارد و از آنجایی که خون گیری به قناری استرس وارد می‌کند، ممکن است قناری آواز نخواند یا اینکه دیگر تخم نگذارد یا حتی موجب مرگ پرنده گردد لذا کارایی مناسبی دارد.

قبل از آنکه دانش مولکولی به شکل امروزی پیشرفت یابد، روش‌هایی مانند لاپاروسکوپی و آندوسکوپی و تعیین کاریوتیپ از بهترین روش‌ها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بود. تعیین کاریوتیپ معمولا روش خوبی برای تعیین جنسیت پرندگان بوده ولی درصد خطای بالایی دارد. در سال ٢٠٠٠ Nesje و همکاران، سعی کردند با استفاده از دو جایگاه میکروستلایتی، پرندگانی ازقبیل شاهین، باز وحشی، قوش و غیره را تعیین جنسیّت نمایند، اما این روش در تعیین جنسیّت برخی از پرندگان مورد آزمایش، موفقیت‌آمیز نبود(٩). همچنین در سال ٢٠٠٤ Agate و همکاران برای تعیین جنسیّت فنچ راه‌راه یا سهره گورخری (Zebra Finch با نام علمیTaeniopygia guttata) از ژن CHD1-Zو CHD1-W استفاده کردند(١). روش PCR دقیق‌ترین روش در تعیین جنسیّت پرنده می‌باشد و ضریب صحّت آن نزدیک به صد در صد است. به علاوه بسیار سریع، دقیق و کم هزینه بوده، استرس بسیار کمی به پرنده وارد می‌کند و در هر دوره از زندگی پرنده می‌تواند به کار رود. در سال ١٩٩٨ Griffiths و همکاران با استفاده از دو ژن CHD-Z (Chromo-helicase-DNA binding gene) و CHD-W و طراحی پرایمر های متعدد، به تعیین جنسیّت گروهی از پرندگان (شتر مرغ، قو، کبوتر، غاز وحشی و ...) پرداختند(٥). در تفکیک جنسیت بر اساس PCR دو ژن CHD-W و CHD-Z در پرنده نر تنها قطعه ای با طول ٣٠٦جفت باز تکثیر می یابد اما درقناری ماده قطعه‌هایی با طول ٣٠٦ جفت باز و ٣٤٥ جفت تکثیر می‌یابند. دوستی و همکاران در سال ٢٠٠٩ تعیین جنسیت در قناری را با استفاده از واکنش PCR و براساس دو ژن CHD-W و CHD-Z شرح دادند(٦).

در این بررسی نشان داده شد یا افزایش مقدار DNA الگو به ١٢٠ نانوگرم نتیجه بهتری بدست می‌آید. زمان آنیلینگ بهینه همانند روش دوستی و همکاران ٥٨ درجه سانتیگراد تعیین شد اما به دلیل آنکه گسترش در بالای باند اصلی مشاهده شد، کم شدن زمان مرحله آنیلینگ و طویل شدن باعث گردید تا گسترش محو شود. همچنین برای پررنگ تر شدن باند ها تعداد سیکل ها به ٣٥ سیکل افزایش یافت و برای تفکیک بهتر باندها از ژل ٣٪ استفاده شد. در نهایت بهترین شرایط PCR به دست آمد و نشان داده شد که روش بهینه شده PCR می‌تواند با دقت صد درصد جنسیت قناری را تعیین کند و لذا مناسب ترین روش برای تعیین جنسیّت قناری است و می‌تواند به عنوان یک روش قطعی در زمینه تعیین جنسیّت مورد استفاده پرورش دهندگان قناری قرار گیرد.

فهرست منابع

1. Agate, R. J., Choe, M., Arnold, A. P. (2004): Sex differences in structure and expression of the sex chromosome genes chd1z and chd1w in zebra finches. Mol. Biol. Evol. 21(2): 384-396.

2. Caetano, L. C. & E. S. Ramos, 2008. MHM assay: Molecular sexing based on the sexspecific methylation pattern of the MHM region in chicken. Conservation Genetics. 9: 985−987.

3. Cerit, H.; K. Avanus, (2006). Identification by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in Nymphicus hollandicus. World Poul. Sci. J., Supplement, XII European Poultry Conference 10–14 September. 62: 216.

4. Cerit, H., Avanus, K. (2007): Sex identification in avian species using DNA typing methods. World Poul. Sci. J. 63(1): 91-99.
5. Doosti, A., Fathpour, H., Moshkelani, S. (2009): Sex identification in the canary using DNA typing methods. Bulg. J. Vet. Med. 12(3): 207−211.
6. Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K., Dawson, R. J. G. (1998): A DNA test to sex most birds. Mol. Ecol. 7(8): 1071-1075.
7. Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. (1990): A gene mapping to the sex determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature. 346(6281):245-50.
8. Jensen, T., Pernasetti, F.M., Durrant, B. (2003): Conditions for rapid sex determination in 47 avian speciesby PCR of genomic DNA from blood, shell-membraneblood vessels and feathers. Zoo Biol. 22(6): 561-567.
9. Nesje, M., Roed, K. (2000): Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers. Hereditas. 132(3): 261-263.
10. Stefos, K., Arrighi, F. E. (1971): Heterochromatic nature of chromosomes in birds. Exp. Cell. Res. 68(1): 228-231.
11. Takagi, N., Itoh, M., Sasaki, M. (1972): Chromosome studies in four species of ratitae (Aves). Chromosoma. 36(3): 281-291.