بررسی بیان ژن مادری فیلیا (Filia) در تخمدان، تخمک و رویان آزمایشگاهی گاو

آزاده زحمتکش[1*]، سعید انصاری مهیاری[1]، مرتضی دلیری جوپاری[2]، عباس شیرازی[3]، حمیدرضا رحمانی[1]

[1] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران، [2] گروه بیوتکنولوژی دام و آبزیان، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران، [3] گروه بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی ابن سینا، جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: آزاده زحمتکش a.zahmatkesh@ag.iut.ac.ir

چکیده

برای بررسی بیان ژن مادری فیلیا در گاو، دو جفت آغازگر، یکی بر اساس کل توالی پیش‌بینی‌شده‌ی mRNAی فیلیای گاو در NCBI (XM_868481.4) و دیگری بر اساس همولوژی بخشی از آن با فیلیای انسان، با نرم‌افزار OLIGO5 طراحی شد. تخمک‌ها به محیط بلوغ، منتقل شدند و پس از ۲٤ ساعت تخمک‌های بالغ برای استخراج RNA استفاده شدند. تعدادی از تخمک‌های بالغ وارد محیط لقاح شدند و پس از ۲۲ ساعت تخمک‌های بارور بعد از جدا کردن کومولوس‌ها به محیط SOF منتقل شدند و رویان‌های دوسلولی پس از ۲٤ ساعت، برای استخراج RNA استفاده شدند. استخراج RNA از بافت تخمدان نیز صورت گرفت. پس از سنتز cDNA، ژن فیلیا و ژن شاخص Histone-H2a وارد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شدند. واکنش با آغازگرهای اول، تکثیری از ژن فیلیا به‌همراه نداشت. ممکن است mRNAی پیش‌بینی‌شده کاملا مطابق با mRNAی حقیقی فیلیا پیش‌بینی نشده باشد و یا توالی ۸٤٦ بازی دارای توالی های غنی از GC باشد و تکثیر آن با شرایط ذکر شده ممکن نباشد. واکنش دوم منجر به تکثیر ژن فیلیا (۱٦٤ bp)و شاخص (۲٤۰bp) در تخمدان، تخمک بالغ و رویان دوسلولی گاو شد.این نشان می‌دهد که ژن فیلیا در تخمدان، تخمک و رویان گاو بیان می‌شود. بیان این ژن نشانه‌ی نقش احتمالی آن در تکامل رویان پیش از لانه‌گزینی در گاو است.

واژه‌های کلیدی: ژن فیلیا، تکامل پیش از لانه‌گزینی، تخمک بالغ، رویان دوسلولی.

مقدمه

هنگامی‌که تخمک وارد مرحله‌ی رشد و بلوغ می‌شود، پروتئین‌های مادری درون آن تجمع می‌کنند (۹). عوامل مادری، تکامل رویان اولیه پیش از فعال شدن ژنوم رویان، مراحل کلیواژ بعدی و ایجاد اجداد سلولی را کنترل می‌کنند (۱، ۲، ۳). بررسی ژنتیکی در موش منجر به شناسایی چندین ژن با آثار مادری شد که از آن‌ها می‌توان به فیلیا اشاره کرد. mRNAی فیلیا توسط یک ژن تک کپی با سه اگزون در کروموزوم ۹ موش کد می‌شود. پروتئین آن دارای ده تکرار از یک توالی ۲۳ اسیدآمینه‌ای است که در نزدیکی انتهای کربوکسیل آن قرار دارد که در ژنوم موش اختصاصی است (٤). بیان این ژن منحصرا در تخمک در حال رشد حیوانات بالغ شناسایی شده است. ژن خاموش‌شده‌ی فیلیا در موش منجر به کاهش تعداد فرزندان به یک‌دوم حالت طبیعی یا هتروزیگوت می‌شود. عدم حضور فیلیا باعث تأخیر در روند چرخه‌ی سلولی و اختلال در تکامل پیش از لانه‌گزینی می‌شود. از آن‌جا که پروتئین فیلیا در موش با این پروتئین در موش صحرایی (٦۷٪) و انسان (٤۱٪) همولوژی دارد (NCBI)، این فکر ایجاد شده است که پروتئین فیلیا در تخمک گاو نیز حضور و نقش مهمی داشته باشد. در این تحقیق وجود آن مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

طراحی آغازگر- بر اساس توالی کل ژنوم گاو (۱۱) و تکامل گونه‌ای خانواده‌ی ژنی KHDC1/DPPA5/FILIA/OOEP در رحم‌داران (۷)، توالی mRNAی فیلیا گاو در پایگاه داده‌های NCBI در کروموزوم ۹ آن پیش‌بینی شده است. برای بررسی بیان این ژن، آغازگرهایی بر اساس این توالی پیش‌بینی‌شده به‌کمک نرم‌افزار OLIGO5 طراحی شد. نخستین طراحی بر اساس توالی پیش‌بینی‌شده‌ی mRNAی فیلیا گاو با کد دسترسی XM_868481.4 صورت‌گرفت و انتظار می‌رفت که قطعه‌ای به‌طول bp ۸٤٦ را تکثیر کند. توالی آغازگرها در جدول۱ آمده است. بخش ابتدایی توالی پیش‌بینی‌شده‌ی mRNAی فیلیا گاو به‌عنوان اگزون فرضی یک با mRNAی فیلیا انسان در پایگاه داده‌ی NCBI بلاست گذاشته شد و پس از مشاهده‌ی ۸۰٪ یکسانی نوکلئوتیدی، از این بخش نیز طراحی آغازگر صورت گرفت که توالی آن‌ها نیز در جدول ۱ آمده است. هر دو جفت آغازگر برای بررسی عدم یکسانی با سایر نقاط ژنومی گاو با در پایگاه داده‌ی NCBI با کل ژنوم گاو بلاست گذاشته شد.

استخراج RNA- تخمدان‌ها از کشتارگاه راک واقع در کرج جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس فولیکول‌های ٦-۲ میلی‌متری آسپیره شدند و تخمک‌های دارای سیتوپلاسم یکپارچه به‌کمک پیپت در زیر میکروسکوپ جداسازی و به محیط کشت شامل TCM199، ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیترEGF و ۱۰٪ FBS که به‌صورت قطره‌های ۱۰۰ میکرولیتری تهیه شده بود، منتقل شدند و در انکوباتور با شرایط ۵٪ CO_2 و دمای ۳۸/۵°C به‌مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد. تخمک‌های بالغ برحسب گسترش کومولوس‌ها جدا شدند و پس از جدا کردن کومولوس‌ها برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. برای به‌دست‌آوردن رویان دوسلولی، گروه‌های ده تایی از تخمک‌های بالغ پس از شستشو وارد قطره‌های ۵۰ میکرولیتری لقاح شدند و با ۵ میکرولیتر از اسپرم با غلظت $۱۰^٦$×۱۰ در میلی‌لیتر، برای ایجاد غلظت نهایی $۱۰^٦$×۱ در میلی‌لیتر تلقیح شدند. سپس به‌مدت ۲۲ ساعت درون انکوباتور با شرایط ۵٪ CO_2 و دمای ۵°C/ ۳۸ نگهداری شدند. تخمک‌های بارورشده‌ی احتمالی پس از جدا کردن کومولوس‌ها به محیط SOF (مایع اویداکت سنتزی) شامل ۵٪ FBS منتقل شدند و پس از ۲٤ ساعت کشت در دمای °C ۳۸/۵ در انکوباتور با شرایط ۵٪ CO_2، رویان‌های دوسلولی برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه‌ی استخراج‌ها به کمک کیت Qiagen RNeasy® Plus Micro انجام شد. استخراج RNA از بافت تخمدان نیز به روش استخراج دستی با Trizol انجام گرفت.

RT-PCR- RNAهای استخراج‌شده در واکنش رونویسی معکوس به‌کمک پرایمرهای رندوم هگزامر (Fermentas) و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Fermentas) به‌مدت یک ساعت در دمای °C ٤۲ تبدیل به cDNA شدند. سپس cDNAی ژن موردنظر و ژن شاخص Histone H2a (۸) با شرایط مطابق با جدول ۲ وارد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شد. آغازگرهای پیش‌رو و معکوس برای ژن فیلیا و ژن شاخص در جدول ۱ آمده است. محصولات واکنش در ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز شدند و پس از بررسی UV، نتایج به‌صورت عکس ثبت شدند.

جدول ۱- آغازگرهای پیش‌رو و معکوس

	پیش‌رو	معکوس
آغازگرهای اول ژن فیلیا	۳´-cctctcccaagcggtttcc-۵´	۳´-ctaacacccagctgttaacagt-۵´
آغازگرهای دوم ژن فیلیا	۳´-ctggacgtggcaaacaagg-۵´	۳´-gcgggatgatacgggtctt-۵´

آغازگرهای ژن شاخص	۳´-ctggacgtggcaaacaagg-۵´	۳´-gcgggatgatacgggtctt-۵´

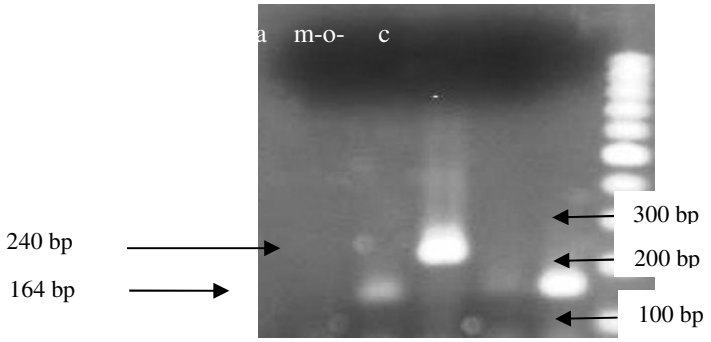
جدول ۲- شرایط PCR

شرایط	آغازگرهای دوم	آغازگرهای اول
واسرشت‌سازی اولیه	۵ دقیقه، ۹۵ °C	۵ دقیقه، ۹۵ °C
۳۵ سیکل: واسرشت‌سازی	۲۰ ثانیه، ۹۵ °C	۴۵ ثانیه، ۹۵ °C
۳۵ سیکل: اتصال آغازگر	۲۰ ثانیه، ۵۸ °C	۴۰ ثانیه، ۵۸°C
۳۵ سیکل: تکثیر	۲۰ ثانیه، ۷۲ ° C	۱ دقیقه، ۷۲ °C
تکثیر نهایی	۵ دقیقه، ۷۲ °C	۱۰ دقیقه، ۷۲ °C

نتایج و بحث

واکنشی که با آغازگرهای اول صورت گرفت، هیچ‌گونه تکثیری از ژن فیلیا با طول پیش‌بینی‌شده به همراه نداشت و از آن‌جا که توالی مربوط به ژن شاخص با طول ۲٤۰ bp تکثیر شد، اشکال در استخراج RNA و سنتز cDNA نبود. پس می‌توان احتمال داد که mRNAی پیش‌بینی‌شده در پایگاه داده‌ها کاملا مطابق با mRNAی حقیقی فیلیا پیش‌بینی نشده است. ممکن است در اتصال اگزون‌های mRNAی حقیقی تفاوت‌هایی با آن‌چه پیش‌بینی شده (XM_868481.4)، وجود داشته باشد. همچنین ممکن است توالی ۸٤٦ بازی دارای توالی های غنی از GC باشد (همان‌گونه در توالی پیش‌بینی شده، درصد بالایی از GC وجود دارد) و تکثیر آن با شرایط ذکر شده ممکن نباشد.

واکنشی که به‌کمک آغازگرهای دوم صورت گرفت منجر به تکثیر هر دو ژن فیلیا (با طول قطعه‌ی ۱٦٤ bp)و شاخص (با طول قطعه‌ی ۲٤۰bp) در تخمدان، تخمک بالغ و نیز رویان دوسلولی گاو شد (شکل ۱) و این نشان‌دهنده‌ی این است که ژن فیلیا در تخمدان، تخمک و رویان گاو بیان می‌شود. عدم فعالیت ژن فیلیا در موش باعث تأخیر در روند چرخه‌ی سلولی و اختلال در تکامل پیش از لانه‌گزینی می‌شود (۱۰). با توجه به این یافته‌ها احتمالا این ژن نقش مهمی نیز در تکامل رویان اولیه‌ی گاو دارد. پیش‌تر بیان ژن‌های مادری دیگری مانند MATER، ZAR1 و نیز ژن‌های GDF9 و BMP15 به روش RT-PCR در تخمک گاو شناسایی شده بود (٦). بیان ژن فیلیا در موش محدود به تخمک در حال رشد و بخش کوچکی از بافت سوماتیک اطراف آن است (٤).



شکل۱- M : DNA ladder bp۱۰۰ ، 2-c : رویان دوسلولی، ov : بافت تخمدان، H2a : ژن شاخص Histone H2a ، m-o: تخمک بالغ، -c : کنترل منفی شامل آب بدون cDNA. بیان ژن فیلیا در رویان دوسلولی، بافت تخمدان و تخمک بالغ مشخص شده است. بیان ژن شاخص و عدم تکثیر کنترل منفی نیز صحت آزمایش را نشان می‌دهد.

کاهش mRNAی فیلیا در موش منجر به نقص در تکامل رویان پیش از لانه‌گزینی و بروز بالای انیوپلوئیدی ناشی از تجمع غیر طبیعی دوک‌ها و عدم ترتیب کروموزوم‌ها می‌شود. فیلیا باعث تخصیص مناسب عوامل تنظیم‌کننده‌ی کلیدی تجمع دوک‌ها (مانند γ-tubulin، PLK1،AURKA) به مرکز سازمان‌دهی میکروتوبول‌ها از طریق مسیر ارسال سیگنال RhoA می‌شود (۹). بیان این ژن در تخمک و رویان گاو نشانه‌ی نقش احتمالی آن در تفکیک کروموزوم‌ها در رویان پیش از لانه‌گزینی است. ژن خاموش-شده‌ی فیلیا در موش باعث کاهش درصد رویان‌هایی می‌شود که به مراحل تکاملی مورولا و بلاستوسیست می‌رسند. تخم‌های دارای فیلیا خاموش‌شده بارور می‌شوند ولی پیشرفت چرخه‌ی سلولی طی مراحل کلیواژ، ۸-۶ ساعت به تأخیر می‌افتد (۳). جهش‌هایی در ژن فیلیای انسانی شناسایی شده است که بر سقط جنین پی در پی مؤثر است (۵). بنابراین تغییرات در بیان این ژن در گاو نیز ممکن است در میزان باروی ماده گاوها مؤثر باشد. این فرضیات می‌توانند در آینده مورد بررسی قرار گیرند.

منابع

1. Latham, K. E. 1999. Mechanisms and control of embryonic activation in mammalian embryos. International Review of Cytology. 193: 71-124.
2. Latham, K. E. and R. M. Schultz. 2001. Embryonic genome activation. Frontiers in Biosciense. 6: 748-759.
3. Li, L., P. Zheng and J. Dean. 2010. Maternal control of early mouse development. Development. 137: 859-870.
4. Ohsugi, M., Z . Ping, B. Boris, L. Li and J. Dean. 2008. Maternally derived Filia-MATER complex localizes asymmetrically in cleavage-stage mouse embryos. Development. 135: 259-269.
5. Parry, D. A, C. V. Logan, B. E. Hayward, M. Shires, H. Landolsi, C. Diggle, I. Carr, C. Rittore, I. Touitou, L. Philibert, R. A. Fisher, M. Fallahian, J. D. Huntriss, H. M. Picton, S. Malik, G. R. Taylor, C. A. Johnson, D. T. Bonthron and E. G. Sheridan. 2011. Mutations causing Familial Biparental Hydatidiform Mole implicate C6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. American Journal of Human Genetics. 89: 451-458.
6. Pennetier, S., S. Uzbekova, C. Perreau, P. Papillier, P. Mermillod and R. Dalbie `s-Tran. 2004. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos. Biology of Reproduction. 71: 1359-1366.
7. Pierre, A., M. Gautier, I. Callebaut, M. Bontoux, E. Jeanpierre , P. Pontarotti and P. Monget. 2007. Atypical structure and phylogenomic evolution of the new eutherian oocyteand embryo-expressed KHDC1/DPPA5/ECAT1/OOEP gene family. Genomics. 90: 583–594.
8. Robert, C., S. McGraw, L. Massiocotte, M. Pravetoni, F. Gandolfi and M. A. Sirard. 2002. Quantification of housekeeping transcript levels during the development of bovine preimplantation embryos. Biology of Reproduction. 67: 1465-1472.
9. Schultz, R.M. 1993. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. Bioessay. 8: 531-538.

10. Zheng, P. and J. Dean. 2009. Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. Proceeding of National Academic Scienses. USA. 106(18): 7473-7478.
11. Zimin, A. V., A. L. Delcher, L. Florea, D. R. Kelley, M. C. Schatz, D. Puiu, F. Hanrahan, G. Pertea C. P. Van Tassell, T. S. Sonstegard, G. Marçais, M. Roberts, P. Subramanian, J. A. Yorke and S. L. Salzberg. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, Bos Taurus. Genome Biology. 10: R42.

Tracking of the maternal effect gene "Filia" in bovine ovary, oocyte and invitro embryos

Azadeh Zahmatkesh[1*], Saeid Ansari Mahyari[1], Morteza Daliri Joupari[2], Abbas Shirazi[3], Hamidreza Rahmani[1]
[1]Department of Animal Sciences, College of agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, [2]Department of Animal and Marine Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran, [3]Department of Reproductive Biotechnology, Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
* Corresponding E-mail address: a.zahmatkesh@ag.iut.ac.ir

Abstract
To find the expression of maternal effect gene Filia, two pairs of primers were designed with OLIGO5 software, one according to the whole bovine Filia mRNA sequence predicted in NCBI (access no: XM_868481.4), and the other according to its partial homology with human Filia. Oocytes were transferred to the maturation media and after 24h, matured oocytes were used for RNA extraction. Numbers of mature oocytes were inseminated and after 22h, fertilized oocytes were transferred to SOF media after cumulus cell removal. After 24h, 2-cell embryos were used for RNA extraction. Also total RNA were extracted from bovine ovaries. After cDNA synthesis, Filia and the housekeeping gene (Histone-H2a) were amplified in PCR. The reaction with first primers did not work, maybe because the predicted mRNA is not predicted in accordance with the real one. In the second reaction, Filia (164 bp) and the house keeping (240 bp) genes were amplified in the bovine ovary, oocyte and embryo. This indicates the possible role for Filia in bovine pre-implantation development.
Keywords: Filia gene, pre-implantation development, mature oocyte, 2-cell embryo.