

بررسی حضور جهش نقطه‌ای در اینترون ۷ ژن B4GALNT2 و ارتباط آن با چندقلوزایی در گوسفند نژاد شال

محمد مهدی باقری امیرآبادی^۱، حمید قاسم‌زاده نوا^{۲*}، آیدین رحیم طایفه^۳، فرید حیدری^{۳*}

۱. دستیار تخصصی گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۲. گروه مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۳. گروه زیست‌فناوری دامی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران- ایران.

پذیرش: ۲۰ شهریورماه ۱۴۰۳

دریافت: ۲۶ خردادماه ۱۴۰۳

چکیده

ژن *B4GALNT2* با ۱۲ اگزون در کروموزوم ۱۱ قرار دارد. پروتئین *B4GALNT2* با فعالیت ترانسفراز در مرحله‌ی آخر ساخت آنتی ژن Sd^a نقش دارد، از طرفی مشخص شده جهش $g.36938224T>A$ یا $FecL^L$ در اینترون ۷ این ژن در نژاد لاکون بر روی تخمک‌گذاری و چندقلوزایی تأثیر مثبت دارد. با توجه به اهمیت چندقلوزایی در صنعت گوسفند این مطالعه با هدف بررسی حضور جهش $g.36938224T>A$ و یا جهش‌های دیگر در محل رخداد این جهش در بخشی از اینترون هفتم ژن *B4GALNT2* انجام شد. برای این کار در دو گروه ۲۰ راسی از میش‌های نژاد شال چندقلوزا (گروه یک) و تک‌قلوزا (گروه دو)، پس از خون‌گیری، استخراج DNA و انجام توالی‌یابی سنجر در قطعه‌ای از اینترون هفتم ژن *B4GALNT2*، با توجه به سوابق زایمانی موجود از ۵ سال گذشته، حضور یا نبود حضور این جهش و یا جهش‌های احتمالی دیگر بررسی شد و ارتباط آن‌ها با چندقلوزایی، مورد ارزیابی قرار گرفت. در نتایج بدست آمده پس از توالی‌یابی، جهش $FecL^L$ در نمونه‌های مور مطالعه حضور نداشته و سه جهش $g.37129493 T>C$ ، $g.37129812 C>A$ و $g.37130289 T>A$ یافت شدند که بر اساس این جهش‌ها نیز تفاوت معناداری میان دو گروه مورد مطالعه وجود نداشت ($P > 0/05$). با توجه به نتایج بدست‌آمده به نظر می‌رسد جهش $FecL^L$ در نژاد شال وجود نداشته اما با توجه به رخداد آن در اینترون و احتمال پایین تأثیر آن بر پروتئین نهایی، بررسی شبکه‌ی ژنی برای بررسی سایر فنوتایپ‌ها پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: چندقلوزایی، تک‌قلوزایی، شال، ژن، *B4GALNT2*، جهش $FecL^L$

مقدمه

در حالت کوتاه دارای ۵۰۶ و در حالت بلند با داشتن دم سیتوپلاسمی ۶۷ آمینوسیدی دارای طولی به حدود ۵۶۶ آمینواسید است (۱۹). از جمله کاربردهای این ژن و آنزیم مربوط به آن می‌توان به تأثیر آن در پیش‌آگهی در سرطان‌های مختلف مانند سرطان کولون و سرطان پستان در کنار Sd^a اشاره کرد، به طور مثال در سرطان کولون میزان ترشح این آنزیم در بسیاری از موارد به مقدار زیادی کاهش یافته و یا قطع می‌شود اما گزارش شده در بیماران که میزان آنزیم *B4GALNT2* در آن‌ها بالا باقی مانده و یا بالا می‌رود به همان نسبت میزان زنده‌مانی و امید به بهبودی این بیماران نیز بیشتر است (۲۲-۲۱، ۱۸). از دیگر کاربردهای این مجموعه تأثیر آن در هموستازی، تعامل با

ژن *B4GALNT2* که با ۱۲ اگزون در کروموزوم ۱۱ قرار دارد با بیان پروتئین *B4GALNT2* به عنوان آنزیم ترانسفراز (Transferase) در مرحله‌ی آخر بیوسنتز (biosynthesis) و ساخت آنتی ژن Sd^a ، که یک آنتی ژن کربوهیدراتی بر روی گلبول‌های قرمز است، نقش دارد. این ژن *B4GALNT2* به مقدار زیاد در کولون (Colon) و به مقدار کمتر در روده‌ی باریک (Ileum)، معده و کلیه‌ها بیان می‌شود و همین‌طور در مایعات بدن از جمله ادرار محصولات آنتی‌ژنی Sd^a را نیز می‌توان یافت (۴، ۶، ۹). این ژن با داشتن دو نوع نحوه‌ی بیان (Transcript) دو حالت پروتئین *B4GALNT2* کوتاه و بلند را بیان می‌کند که



سوابق فصل تولید مثلی کنونی آن‌ها و طی برنامه‌ی تولیدمثلی فصل جدید بدون دریافت دارو و به صورت طبیعی در وضعیت آبستنی مثبت قرار داشتند و یا در سوابق زایمانی ثبت شده برای فصل‌های تولید مثلی ۵ سال گذشته‌ی آن‌ها، بدون مصرف داروهای محرک تولید مثلی هیچ سابقه‌ی زایمان دوقلو و یا بالاتر ثبت نشده بود. خون‌گیری در مؤسسه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران واقع در امین‌آباد تهران توسط لوله‌های ونوجکت K₃ EDTA با حجم ۶ سی‌سی (Vialab EDTA Tube) پس از مهار دام و از ورید وداج با حجم حدود ۵ سی‌سی انجام شد.

پس از اتمام خون‌گیری هر لوله شماره‌گذاری و داخل محفظه دارای یخ قرار داده شد و در سریع‌ترین زمان ممکن و با حفظ زنجیره سرمایه‌ی و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. مراحل استخراج DNA در آزمایشگاه واقع در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تهران و توسط کیت استخراج از خون (Kiagene Fanavar – Rednakia Blood DNA Isolation Kit, Iran) صورت گرفت. به این ترتیب که در ابتدا میزان ۵۰۰ میکرولیتر از خون با محلول‌های مشخص شده بنا بر دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت ترکیب شده و طی چند نوبت سانتریفیوژ گردید. در پایان میزان ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های اولیه، DNA استخراج شد. با استفاده از دستگاه نانودراپ و بررسی در ژل آگاروز ۱/۳ درصد، کیفیت و کمیت باند ژنومی استخراج شده سنجیده و در صورت نداشتن کیفیت مناسب، استخراج DNA مجدداً تکرار شد. کلیه نمونه‌های استخراج شده در دمای ۲۰- درجه جهت انجام آزمایش‌ها و بررسی‌های آتی ذخیره شدند. به منظور تعیین دقیق محل موتاسیون، با استفاده از نرم افزار SnapGene و مشخص کردن ناحیه حضور جهش FecL^L (g.36938224T>A) و نیز اطلاعات ارائه شده در تحقیق گئو و همکارانش در سال ۲۰۱۸ (۱۰) دو پرایمر که هر کدام ۲۰ جفت باز طول داشتند و مقدار ۱۰۶۹ جفت باز در بین آن‌ها موجود بود، طراحی و سفارش داده شدند (GenScript Biotech) (جدول ۱ و جدول ۲).

میکروفلورا (Microflora) طبیعی دستگاه گوارش به خصوص روده‌ها، تأثیر احتمالی در درمان دیستروفی عضلانی دوشن (Duchenne muscular dystrophy) و همینطور تأثیر آن در روندهای تولید مثلی است (۶). آنتی‌ژن Sd^a هم در هر دو گامت نر و ماده حیوانات مختلف و نیز سلول‌های تروفوبلاستی در نشخوارکنندگان بیان می‌شود. از طرفی خود ژن B4GALNT2 تحت تأثیر استروژن و پروژسترون بافت رحم در موش بر روی میزان لانه‌گزینی در این حیوان تأثیر مثبت داشته و به دنبال کاهش آن میزان لانه‌گزینی نیز کاهش یافته است (۱۶-۱۴، ۷). به طور کلی جهش‌های مختلفی در ژن B4GALNT2 گزارش شده که اثرات مختلفی از جمله تأثیر بر پاکسازی فاکتور ون ویلی برند (Von Willebrand factor) در موش دارد که باعث اختلال خونی می‌شود (۱۲). برای اولین بار در نژاد لاکون جهش FecL^L (g.36938224T>A) در اینترون (Intron) شماره هفت دیده و تأثیر آن بر چند قلوزایی در گوسفند بررسی شده است (۲۰۴، ۱۰، ۱۱). هدف از انجام این پژوهش، بررسی بخشی از اینترون هفت از ژن B4GALNT2 در نژاد شال، به عنوان یکی از نژادهای چند قلوزا در ایران (۱) و سعی در یافتن جهش‌های احتمالی موثر بر چندقلوزایی در این نژاد است.

مواد و روش کار

در تابستان سال ۱۴۰۲ تعداد ۴۰ راس دام ماده نژاد شال متعلق به موسسه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران واقع در امین‌آباد تهران، شامل دو گروه ۲۰ راسی، خون‌گیری شدند. گروه اول شامل دام‌های چندقلوزایی بود که در سوابق فصل تولید مثلی کنونی آن‌ها و طی برنامه‌ی تولیدمثلی فصل جدید، بدون دریافت دارو و به صورت طبیعی در وضعیت آبستنی مثبت قرار داشتند و یا در سوابق زایمانی ثبت شده برای فصل‌های تولید مثلی موجود از ۵ سال گذشته‌ی آن‌ها، حداقل یک زایش دوقلو و یا بالاتر بدون استفاده از داروهای محرک تولیدمثلی مانند GnRH و یا eCG برای آن‌ها ثبت شده است. گروه دوم نیز شامل دام‌های تک قلوزایی بود که در



جدول ۱- اطلاعات ژن و جهش مورد بررسی

نام ژن	کروموزوم	اطلاعات دسترسی ژن	جهش مورد بررسی	طول قطعه
B4GALNT2	شماره ۱۱	ENSOARG00020022870 Gene ID: 101119323	rs.588626728 (g.36938224T>A)	۱۰۶۹ جفت باز

جدول ۲- توالی آغازگرها

نام ژن	توالی آغازگر
B4GALNT2	GCATGGCATGTGATAGGGAC Forward
	AAGTCACTCCGTGAACCGAG Reverse

وارد فرایند اصلی PCR شدند. طی فرایند PCR در ابتدا در مرحله‌ی واسرشتگی (Degeneration)، دمای محیط دستگاه (PEQLAB PEQSTAR Biotechnologie GmbH) تا ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بالا رفته، سپس تا دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد پایین آمده و برای پنج دقیقه در این دما باقی ماند. پس از آن چرخه‌ی گسترش (Extension) آغاز گردید که طی آن در ابتدا دمای محیط دستگاه که به ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رسیده به مدت ۳۰ ثانیه در این دما باقی ماند. سپس دمای محیط دستگاه تا ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد پایین آمده و برای مدت ۴۵ ثانیه در این دما باقی ماند. در آخر نیز دمای محیط دستگاه به ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد رسیده و به مدت یک دقیقه تحت این دما باقی ماند. پس از پایان این سه مرحله، برای ۳۰ مرتبه چرخه‌ی گسترش تکرار شد. پس از پایان چرخه‌ی گسترش، دمای محیط در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه باقی ماند. در پایان هم با پایین آمدن دمای محیط دستگاه به ۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، نمونه‌ها جهت ذخیره‌سازی و مراحل بعد آماده شدند (جدول ۳).

پس از دریافت پرایمر در ابتدا طبق دستورالعمل شرکت سازنده با افزودن آب به آن ابتدا محلول استوک (Stock) ساخته شد و سپس از محلول استوک با رقیق‌سازی، محلول ۱۰ میکرومولار تحت عنوان محلول کار (Working Solution) تهیه شد. پس از آن از محلول کار میزان یک میکرولیتر به ۲۰ واحد محلول مستر میکس (Master Mix) اضافه شد و محلول مستر میکس برای استفاده در فرایند PCR آماده گردید. پس از آماده‌سازی پرایمر برای مشخص شدن دمای مناسب برای فرایند PCR یک نمونه به صورت تصادفی برای تعیین دمای مناسب جهت فرایند اتصال (Annealing) تحت گرادینت (Gradient) دمایی قرار گرفت. پس از مشخص شدن دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، مقدار ۵ میکرولیتر از نمونه محصول در محیط الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۳ درصد در زیر نور فرابنفش قرار گرفت و از صحت عملکرد پرایمر، کیفیت استخراج و مناسب بودن شرایط انجام مراحل PCR اطمینان حاصل شد. سپس بنا بر درخواست شرکت دریافت کننده‌ی نمونه‌ها برای توالی‌یابی سنگر، مقدار ۲۰ میکرولیتر از ۴۰ نمونه DNA استخراج شده،

جدول ۳- اطلاعات مربوط به PCR

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشتگی (Degeneration)	۹۵	۳۰	۳۰ عدد
اتصال (Annealing)	۵۵	۳۰	
گسترش (Extension)	۷۲	۶۰	

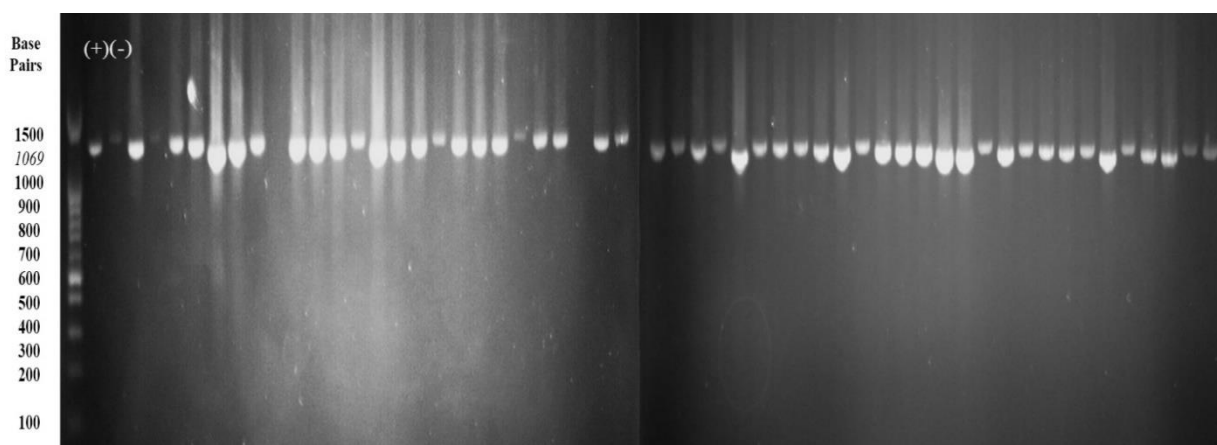


توالی نمونه‌ها با استفاده از داده‌های پایگاه اطلاعاتی Ensemble و NCBI تعیین شدند. برای انجام تحلیل آماری جهت بررسی تأثیر جهش $FecL^L$ (g.36938224T>A) و یا جهش‌های نقطه‌ای احتمالی که ممکن است در طول فاصله‌ی توالی‌یابی شده در میان دو گروه چندقلوزا (گروه یک) و گروه تک قلوزا (گروه دو) بر روی چندقلوزایی در دام‌های ماده نژاد شال رخ داده باشد، از نرم افزار SPSS Statistics 27 و آنالیز آماری کای اسکوئر (Chi-squared) استفاده گردید.

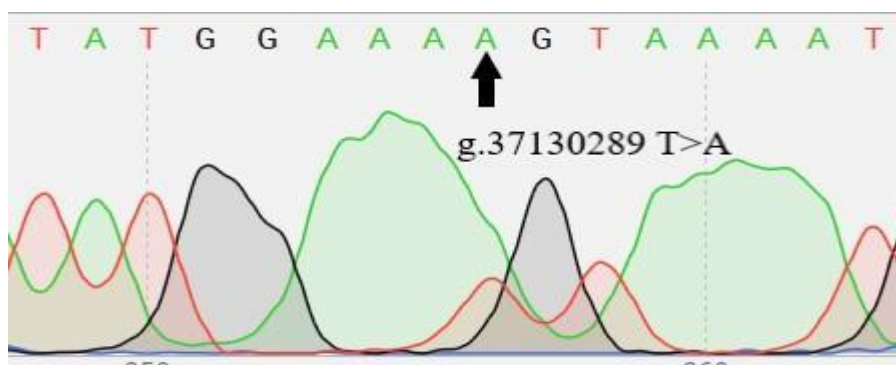
نتایج

در مطالعه‌ی حال حاضر پس از دریافت نتایج، توالی‌یابی یکی از نمونه‌ها در گروه چندقلوزا ناموفق و در ۳ نمونه بخش مربوط به جهش $FecL^L$ توالی‌یابی نشده بود، اما در سایر موارد پس از بررسی نتایج توالی‌یابی سنگر و هم‌ترازسازی توالی‌های نمونه با توالی مرجع مشخص شد که جهش g.36938224T>A یا جهش $FecL^L$ در نمونه‌های مورد مطالعه حضور نداشته و نمونه‌های توالی-یابی شده هر دو گروه در ناحیه حضور این جهش دارای باز آلی T (که در حالت طبیعی حضور دارد) هستند (شکل ۲).

پس از پایان فرایند PCR نمونه‌ها برای بررسی کیفیت و کمیت باندهای به دست آمده، در محیط الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۳ درصد در الکتروفورز با ولتاژ ۱۳۰ ولت طی مدت یک ساعت قرار می‌گرفتند و سپس زیر نور فرا بنفش با استفاده از رنگ آمیزی سیف استین (Safe Stain) جهت بررسی کیفیت محصول PCR بررسی شدند. زمانی که نمونه‌ها قوی‌ترین باندها را بدون هیچ باند اضافه‌ی زیر نور فرا بنفش نشان دادند، طبق شرایط و دستورالعمل استاندارد شرکت دریافت کننده (Kiagene Fanavar, Iran) جهت امر توالی‌یابی در میکروتیوب‌های علامت‌گذاری شده با حجم ۰/۲ میلی‌لیتری آماده سازی شدند و با رعایت زنجیره‌ی سرمایی جهت انجام فرایند توالی‌یابی سنگر به شرکت مربوطه تحویل داده شدند (شکل ۱). پس پایان فرایند توالی‌یابی سنگر، نتایج توسط نرم افزار CLC Sequence Viewer 8 و ابزار آنالیز Cluster Omega هم تراز (Alignment) و برای ارزیابی و مقایسه کامل با توالی مرجع (B4GALNT2 NC_056064.1 (NCBI, 2024) بررسی شدند. پس از مشخص شدن نتایج حضور جهش g.36938224T>A و یا جهش‌های احتمالی دیگر که در مجاورت جهش $FecL^L$ و در طول توالی بررسی شده (توسط پرایمرهای ذکر شده) قرار داشتند، ارزیابی شدند و جایگاه جهش‌های موجود در



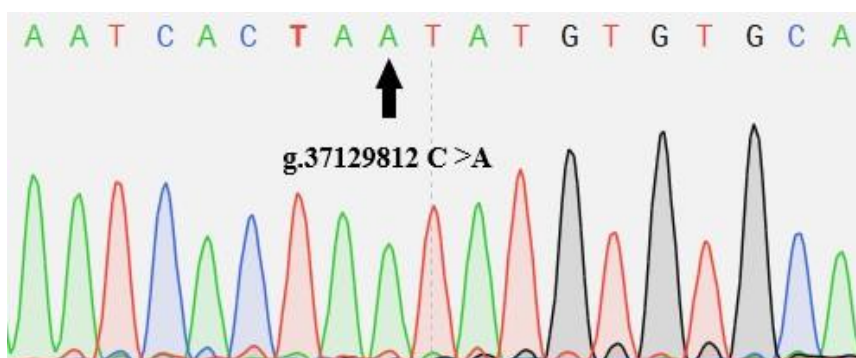
شکل ۱- بررسی کیفیت باند ایجاد شده از نمونه‌ها پس از فرایند PCR و قبل از ارسال برای توالی‌یابی
 (+) = کنترل مثبت، - = کنترل منفی، سایر باندها = نمونه‌ها و تکرار آن‌ها، لدر مورد استفاده = 100 bps)



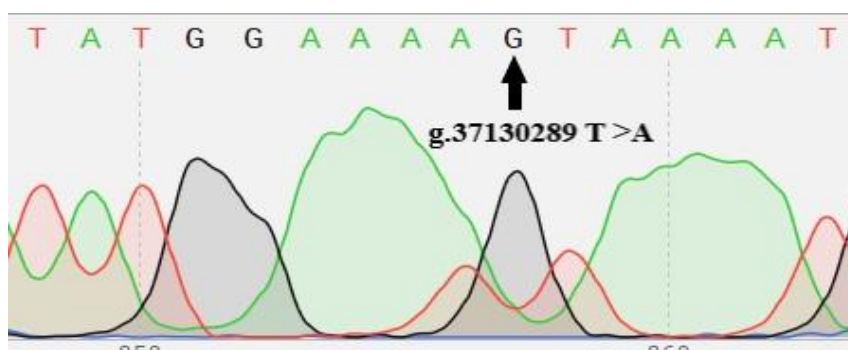
شکل ۲- نتیجه‌ی توالی‌یابی برای Fecl^L

با این حال طی بررسی‌های بیشتر در ناحیه توالی‌یابی شده بخشی از اینترون ۷ ژن *B4GALNT2* تعداد سه جهش نقطه‌ای دیگر یافت شد. مشخصات این جهش‌ها شامل جهش *g.37129812 C>A* (rs.400889307) در ۱۵ راس از ۱۹ راس در گروه چندقلوزا و ۱۴ راس از ۲۰ راس در گروه تک قلوزا (شکل ۳)، جهش *g.37129493 T>C* (rs.409870770) در ۱۶ راس از ۱۹ راس در گروه چندقلوزا و ۱۵ راس از ۲۰ راس در گروه تک قلوزا می‌باشد (شکل ۵).

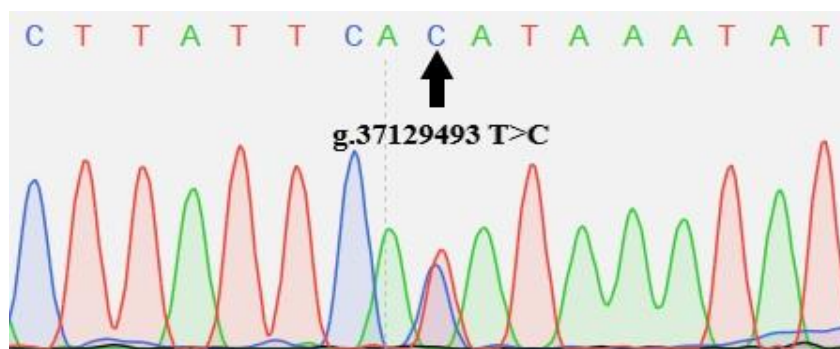
با این حال طی بررسی‌های بیشتر در ناحیه توالی‌یابی شده بخشی از اینترون ۷ ژن *B4GALNT2* تعداد سه جهش نقطه‌ای دیگر یافت شد. مشخصات این جهش‌ها شامل جهش *g.37129812 C>A* (rs.400889307) در ۱۵ راس از ۱۹ راس در گروه چندقلوزا و ۱۴ راس از ۲۰ راس در گروه تک قلوزا (شکل ۳)، جهش *g.37130289 T>A* (rs.424492932) در ۱۳ راس از ۱۹ راس در گروه چندقلوزا و ۱۱ راس از ۲۰ راس در گروه تک قلوزا (شکل ۴) و جهش *g.37129493 T>C* (rs.409870770) در ۱۶ راس از ۱۹ راس در گروه چندقلوزا و ۱۵ راس از ۲۰ راس در گروه تک قلوزا می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۳- نتیجه‌ی توالی‌یابی برای *g.37129812 C>A*



شکل ۴- نتیجه‌ی توالی‌یابی برای *g.37130289 T>A*



شکل ۵- نتیجه‌ی توالی‌یابی برای g.37129493 T>C

تعیین تأثیر احتمالی آن‌ها بر روی چندقلوزایی بین دو گروه دام‌های ماده نژاد شال تک قلوزا و چندقلوزا انجام شد و از لحاظ تعداد رخداد جهش‌های یاد شده در نمونه‌های توالی‌یابی شده و ارتباط آن با چندقلوزایی، اختلاف معناداری دیده نشد ($P > 0.05$, جدول ۴).

به‌علاوه در قسمت‌های دیگر هم جهش‌های نقطه‌ای با تعداد بسیار محدود و با میزان رخداد کمتر از پنج عدد هم حضور داشته که با توجه به تعداد پایین رخداد این جهش‌ها در نمونه‌های هر دو گروه امکان بررسی تأثیر آن‌ها بر روی چندقلوزایی وجود نداشت. در پایان بررسی و مقایسه آماری در میان دو گروه برای سه جهش یاد شده، جهت

جدول ۴- تعداد جهش‌ها در هر گروه و نتایج بررسی آماری بین گروه یک (چندقلوزا) ۱۹ راس و گروه دو (تک قلوزا) ۲۰ راس

p-value	بدون جهش		دارای جهش در		جهش‌ها
	گروه ۲	گروه ۲	گروه ۱	گروه ۱	
۰/۷۵۲۵۲	۵	۱۵	۳	۱۶	g.37129493 T>C
۰/۷۸۵۰۲	۶	۱۴	۴	۱۵	g.37129812 C>A
۰/۵۹۴۸۲	۹	۱۱	۶	۱۳	g.37130289 T>A

($P < 0.05$ معنی‌دار)

پلازما شده و ایجاد بیماری ون ویلی برند می‌کند که نوعی اختلال انعقادی خون است (۱۷، ۱۳-۱۲). همین‌طور برای چند قلوزایی نیز بررسی‌هایی در سال‌های گذشته انجام شده است، همانند $FecL^L$ که در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۳ برای اولین بار در نژاد لاکن بررسی و مشخص شد که در این نژاد جهش g.36938224T>A در اینترون هفت از این ژن با بیان بیش از حد و نابجای آن در سلول‌های گرانولوزای تخمدان باعث تغییر عملکرد آن شده به صورتی که به طور متوسط برای یک کیپی از ژن ۱/۵ برابر و دو کیپی از آن به طور میانگین ۳ برابر میزان تخمک گذاری را در این نژاد افزایش داده است. از طرفی در نژادهای دیگر همچون نژاد دم کوتاه هان (Small Tail Han) جهش‌های دیگر این ژن مانند g.36946470C > T و g.36933082C > T و یا

بحث

ژن *B4GALNT2* به عنوان بیان کننده‌ی آنزیم *B4GALNT2* که به مقدار زیاد در کولون‌ها و به مقدار کمتر در ایلئوم و کلیه‌ها بیان می‌شود به عنوان آخرین مرحله در ساخت آنتی‌ژن Sd^a با فعالیت ترانسفراز باعث ساخت این آنتی‌ژن بر روی گلبول‌های قرمز می‌شود (۶) چند شکلی در سطح این ژن تأثیرات مختلفی از جمله تغییر در جایگاه پراکنش آنزیم *B4GALNT2* و یا تغییر در جایگاه بیان آن دارد، به طور مثال در موش جهشی با نام *Mvwf1* در موش‌های RIIS/J دیده شده که باعث تغییر بیان این ژن از اپیتلیوم روده به اندوتلیوم عروقی آن می‌شود که این جهش باعث گلیکولیزاسیون (glycosylation) نا به جای فاکتور ون ویلی برند (von Willebrand Factor) و افزایش سرعت پاک سازی آن از

استفاده از شبکه‌ی ژنی تأثیر سایر فنوتایپ‌ها برای این جهش‌ها بررسی شوند.

منابع

1. Akbarinejad, V; Kazempoor, R; Shojaei, Mr and Rezaee M; Oji R; Atlas of Iranian Sheep Breeds; Noorbakhs; Tehran, 2014; pp : 86-87.
2. Ben Jemaa, S; Ruesche, J; Sarry, J; Woloszyn, F; Lassoued, N; Fabre, S; The high prolificacy of D'man sheep is associated with the segregation of the FecLL mutation in the B4GALNT2 gene. *Reprod. Domest. Anim*; 2019;54(3):531-7.
3. Bodin, L; SanCristobal, M; Lecerf, F; Mulsant, P; Bibé, B; Lajous, D; Belloc, J-P; Eychenne; Amigues, Y and Elsen, J-M; Segregation of a major gene influencing ovulation in progeny of Lacaune meat sheep. *Genet. Sel. Evol*; 2002;34(4):447-64.
4. Drouilhet, L; Mansanet, C; Sarry, J; Tabet, K; Bardou P, Woloszyn F; The highly prolific phenotype of Lacaune sheep is associated with an ectopic expression of the B4GALNT2 gene within the ovary. *PLoS Genet*; 2013;9(9):e1003809.
5. Drouilhet, L; Taragnat, C; Fontaine, J; Duittoz, A; Mulsant, P; Bodin, L and Fabre, S; Endocrine characterization of the reproductive axis in highly prolific Lacaune sheep homozygous for the FecLL mutation. *Biol. Reprod*; 2010;82(5):815-24.
6. Duca, M; Malagolini, N; Dall'Olio, F; The story of the Sda antigen and of its cognate enzyme B4GALNT2: What is new? *Glycoconj J*; 2023;40(1):123-33.
7. Easton, RL; Patankar, MS; Lattanzio, FA; Leaven, TH; Morris, HR; Clark, GF; et al; Structural analysis of murine zona pellucida glycans: evidence for the expression of core 2-type O-glycans and the Sda antigen. *J. Biol. Chem*; 2000;275(11):7731-42.

جهش‌های $g.25929637 G>A$ و $g.25929679 T>C$ و $g.25929819 A>G$ در نژاد مغولی و همینطور جهش $g.25921552 C>T$ در نژاد تن مشخص شده با تعداد بره‌های به دنیا آمده به ازای هر میش (Litter Size) ارتباط معناداری داشته‌اند (۳-۵،۸،۱۰) در این پژوهش با هدف بررسی تأثیر جهش‌های احتمالی به‌دست‌آمده از طریق توالی‌یابی بخشی از اینترون هفتم ژن *B4GALNT2* سه جهش در توالی مورد بررسی از این ژن یافت شده‌است. پس از بررسی‌های آماری انجام شده بر روی نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر سه جهش یافت شده با مشخصات $g.37129493 T>C$ ، $g.37129812 C>A$ و $g.37130289 T>A$ همانند بررسی‌های انجام شده بر روی نژاد یوجیمکین (Ujimqin) و مغولی برای جهش‌های $g.25921552 C>T$ و $g.25935026 C>T$ و یا جهش‌های $g.25929637 G>A$ ، $c.440 C>T$ و $c.823 C>T$ (Pro288Ser) در نژاد یوجیمکین ارتباطی بین حضور این جهش‌ها و میزان چندقلوزایی یافت نشد (۱۱). اما تأثیر جهش‌هایی مانند $g.25929637 G>A$ و $g.25929679 T>C$ در نژاد مغولی و جهش‌های $g.36933082 C>T$ و $g.36946470 C>T$ کوتاه هان (Small Tail Han) بر چندقلوزایی مشخص گردید (۱۰). همینطور برای جهش $g.36938224 T>A$ یا $FecL^L$ همانند نتایج بدست آمده در این مطالعه در نژادهای مهربان، زندی، هو (Hu)، دم کوتاه هان (Small Tail Han)، سافولک سفید و سیاه (White Suffolk & Black Suffolk)، سونید (Sonid)، دورست (Dorset) نیز این جهش یافت نشده و علاوه بر نژاد لاکون در نژاد دی من (D'man) به طور مستقیم گزارش شده است (۲۲-۲۳، ۲). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حال حاضر به نظر می‌رسد جهش $g.36938224 T>A$ ($FecL^L$) و سه جهش $g.37129493 T>C$ ، $g.37130289 T>A$ و $g.37129812 C>A$ چندقلوزایی در نژاد شال نداشته باشند. به علاوه با توجه به یافته شدن سه جهش $g.37129493 T>C$ ، $g.37130289 T>A$ و $g.37129812 C>A$ در اینترون ژن *B4GALNT2*، احتمال تأثیر آن در پروتئین نهایی بسیار اندک است. به همین دلیل پیشنهاد می‌گردد با



- R; The Sda/GM2-glycan is a carbohydrate marker of porcine primordial germ cells and of a subpopulation of spermatogonia in cattle, pigs, horses and llama. *Reprod*; 2011;142(5):667-674.
15. Klisch, K; Jeanrond, E; Pang, P-C; Pich, A; Schuler, G; Dantzer, V; Kowalewski, M-P and Dell, A; A tetraantennary glycan with bisecting N-acetylglucosamine and the Sda antigen is the predominant N-glycan on bovine pregnancy-associated glycoproteins. *J. Glycobiol*; 2008;18(1):42-52.
 16. Li, P-T; Liao, C-J, Wu, W-G; Yu, L-C and Chu, ST; Progesterone-regulated B4galnt2 expression is a requirement for embryo implantation in mice. *Int. J. Fertil. Steril*; 2011;95(7):2404-9. e3.
 17. Linnenbrink, M; Johnsen, JM; Montero, I; Brzezinski, CR; Harr, B; Baines, JF; Long-term balancing selection at the blood group-related gene B4galnt2 in the genus *Mus* (Rodentia; Muridae). *Mol. Biol. Evol*; 2011;28(11):2999-3003.
 18. Malagolini, N; Dall'Olio, F; Di Stefano, G; Minni, F; Marrano, D; Serafini-Cessi, F; Expression of UDP-GalNAc: NeuAc α 2, 3Gal β -R β 1, 4 (GalNAc to Gal) N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the synthesis of Sda antigen in human large intestine and colorectal carcinomas. *Cancer Res. J*; 1989;49(23):6466-70.
 19. Malagolini, N; Santini, D; Chiricolo, M and Dall'Olio, F; Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiol*; 2007;17(7):688-97.
 20. Pucci, M; Gomes, Ferreira, I; Orlandani, M; Malagolini, N; Ferracin, M and Dall'Olio, F; High expression of the Sda synthase B4GALNT2 associates with good prognosis and attenuates stemness in colon cancer. *Cell. J*; 2020;9(4):948.
 8. GAO, Yi-Jie WJ; CHAO, Lu-Meng; CANG, Ming; YU, Hai-Quan; WANG, Jian-Guo; BAO, Si-Qin; LIU, Yong-Bin; ZHANG, Wen-Guang; MA, Qing and TONG, Bin; Association Between Polymorphisms in B4GALNT2 Gene and Litter Size in Mongolia Sheep and Ujimqin Sheep (*Ovis aries*). *J. Agric. Biotechnol*; 2022;30(8):1510 - 23.
 9. Groux-Degroote, S; Wavelet, C; Krzewinski-Recchi, M-A; Portier, L; Mortuaire, M; Mihalache, A; Maro, T; Delannoy, P; Malagolini, N; Chiricolo, M; Dall'olio, F and Harduin-Lepers, A; B4GALNT2 gene expression controls the biosynthesis of Sda and sialyl Lewis X antigens in healthy and cancer human gastrointestinal tract. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*; 2014;53:442-9.
 10. Guo, X; Wang, X; Liang, B; Di, R; Liu, Q; Hu, W; He, X; Zhang, J; Zhang, X and Chu, M; Molecular cloning of the B4GALNT2 gene and its single nucleotide polymorphisms association with litter size in small tail han sheep. *J. Anim*; 2018;8(10):160.
 11. Ji, X; Cao, Z; Hao, Q; He, M; Cang, M; Yu, H; Ma, Q; Li, X; Bao, S; Wang, J and Tong, B; Effects of New Mutations in BMPRII, GDF9, BMP15, LEPR, and B4GALNT2 Genes on Litter Size in Sheep. *Vet. Sci*; 2023;10(4):258.
 12. Johnsen, JM; Levy, GG; Westrick, RJ; Tucker, PK; Ginsburg, D; The endothelial-specific regulatory mutation, *Mvwl1*, is a common mouse founder allele. *Mammalian Genome*; 2008;19:32-40.
 13. Johnsen, JM; Teschke, M; Pavlidis, P; McGee, BM; Tautz, D; Ginsburg, D and Baines, JF; Selection on cis-regulatory variation at B4galnt2 and its influence on von Willebrand factor in house mice. *Molecular biology and evolution*; 2009;26(3):567-78.
 14. Klisch, K; Contreras, D; Sun, X; Brehm, R; Bergmann, M and Alberio,



- Melting (HRM) technique in Zandi sheep. *Mod. Genet*; 2022;17(1):87-90.
23. Talebi, R; Ahmadi, A; Afraz, F; Sarry, J; Woloszyn, F; Fabre, S; Detection of single nucleotide polymorphisms at major prolificacy genes in the Mehraban sheep and association with litter size. *Ann. Anim. Sci*; 2018;18(3):685-98.
21. Pucci, M; Malagolini, N and Dall'Olio, F; Glycosyltransferase b4galnt2 as a predictor of good prognosis in colon cancer: Lessons from databases. *Int. J. Mol. Sci*; 2021;22(9):4331.
22. Salehi, A; Rostami, F; Bakhtiari, Zadeh MR; Study of B4GALNT2 (FecL) gene mutation by using High Resolution





Detection of a mutation in the intron 7 of B4GALNT2 gene and its association with Litter size in Shal breed

Mohamad Mahdi Bagheri Amir Abadi¹; Hamid Ghasemzadeh-nava^{2*};
Aidin Rahim-Tayefeh³; Farid Heidari^{3*}

1. DVSc Student, Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.
2. Department of Theriogenology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.
3. Department of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIIGEB), Tehran- Iran.

Summary

Received: 15 June 2024

Accepted: 10 September 2024

The gene B4GALNT2, with 12 Exons, is located on chromosome 11. This gene is associated with the production of the B4GALNT2 protein, which functions as a transferase in the final step of synthesizing the Sd^a antigen. In the Lacaune breed, a mutation known as FecL^L (g.36938224T>A) in intron 7 of this gene has been found to have a positive effect on fertility and multiple births. Considering the effect of multiple births in the small ruminant industry, an investigation was conducted to explore the presence of the FecL^L mutation and other potential mutation near its location in part of the intron 7 of B4GALNT2 gene. Two groups of multiple birth and single birth, each containing 20 shal ewes were selected for blood collection, DNA extraction and sanger sequencing, based on their reproductive histories of last 5 year of lambing records and the current breeding season. The sequence analysis revealed the absence of the FecL^L mutation in the samples. However, three other mutations were identified: g.37129493 T>C, g.37129812 C>A, and g.37130289 T>A. No significant differences were observed between the two study groups regarding these mutations (P > 0.05). Based on these findings, it appears that the FecL^L mutation may not be present in the Shal breed. However, due to the occurrence of the mutations in the intron and their potential low impact on the final protein, further investigation of the gene network and a larger sample size is recommended to explore other phenotypic associations and detect additional mutation.

Keywords: Twinning, Singleton, Shal breed, Gene, B4GALNT2 mutation

*Corresponding authors: hghasem@ut.ac.ir ; heidari@nigeb.ac.ir

