نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۶، بهـار ۱۳۹۹
ص‌ص: ۷۳~۸۲

بررسی چندشکلی ژن‌های DNMTs در گاو سیستانی با استفاده از روشPCR-SSCP

- **سجاد شهدادی ساردو**
دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
- **مهدی وفای واله**(نویسنده مسئول)
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاوزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
- **غلامرضا داشاب**
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
- **محمد رکوعی**
دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت : دی ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش : اسفند ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۵۸۲۳۷۵۵۰
Email: Mehdi.valleh@uoz.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.124714.1847

چکیده

متیلاسیون DNA یکی از شناخته شده‌ترین مسیرهای اپی‌ژنتیکی می‌باشد که نقش مهمی در کنترل فرآیند تمایز سلولی و نیز تنظیم الگوهای بیان ژن در انواع مختلف رده های سلولی دارد. متیلاسیون DNA به طور عمده به فعالیت اعضای خانواده DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) شامل ژن‌های DNMT1، DNMT3a و DNMT3b بستگی دارد. نشان داده شده است که بروز هر گونه تغییر در عملکرد این ژنها اثرات شگرفی بر فرآیند تکوین جنین و نیز وزن تولد در پستانداران دارد، لذا هدف از انجام این تحقیق بررسی چندشکلی ژن‌های خانواده DNA متیل ترانسفراز و ارتباط آن‌ها با وزن تولد در گاو سیستانی بود. خون‌گیری به طور تصادفی از ٦٠ رأس گاو سیستانی به عمل آمد. استخراج DNA با استفاده از روش فنول‌کلروفرم انجام شد. نواحی کاندیدا برای وجود جهش شامل قطعه‌های ١١٤ جفت بازی واقع در اگزون ٣٣ ژن DNMT1، قطعه ١٧٦ جفت بازی واقع در اینترون ٤ ژن DNMT3a و قطعه ٢٠٧ جفت بازی واقع در اینترون ٣ ژن DNMT3b توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شدند. به منظور بررسی وجود چندشکلی در ژن‌های هدف از روش PCR-SSCP به‌وسیله‌ی ژل پلی آکریل آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید. ارزیابی نتایج دلالت بر عدم وجود تنوع الگوهای باندی در تمام نمونه‌های مورد بررسی داشت. بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که عدم مشاهده تنوع ژنتیکی در نواحی مورد بررسی احتمالاً دلالت بر انتخاب بر علیه وقوع جهش های خاص در جمعیت مورد نظر دارد. در مجموع براساس نتایج این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی در نواحی مورد بررسی، جهت شناسائی مارکرهای موثر در برنامه‌های اصلاحی صفات تولیدی در گاو سیستانی فاقد کارائی می باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs)، چندشکلی، گاو سیستانی، PCR-SSCP

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 126 pp: 73-82

Analysis of polymorphism in DNMTs genes in Sistani cattle Using PCR-SSCP Method.

1- Sajjad Shahdadi Sardo, M.Sc, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
2- Mehdi Vafaye Valleh, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
3- Gholamreza Dashab, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
4- Mohammad Rokouei, Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

Received: January 2019 **Accepted: March 2019**

DNA methylation is one of the most recognized epigenetic pathways that plays an important role in controlling the process of cell differentiation and regulating patterns of gene expression in various cell lines. This process mainly depends on the activity of the members DNA methyl transferase (DNMTs) family, including DNMT1, DNMT3a and DNMT3b. It has been shown that the occurrence of any changes in the function of these genes has a significant effect on both the embryo development and birth weight in mammals; therefore, the aim of the present study was to investigate the presence of DNA polymorphisms in the members of DNA methyl transferase superfamily and its relationship with birth weight in Sistani cattle's. Blood sampling was done randomly from 60 Sistani cows. DNA extraction was performed using phenol chloroform method. Candidate region for the presence of functional polymorphism within the DNMTs gene including the 114-bp fragment of the exon 33 of the DNMT1 gene, the 176-bp fragment of the intron 4 of the DNMT3a gene, and the 207-bp fragment in intron 3 of the DNMT3b gene were amplified by polymerase chain reaction. PCR-SSCP followed by polyacrylamide gels silver stain analysis was done to evaluate the presence of candidate mutations in target gens. The result analysis of all analyzed region did not show any mutations in the investigated samples. Based on the results of this study, it seems that the lack of observation of genetic diversity in the studied regions could be related to the evolutionary selection against occurrence of specific mutations in the analyzed population. In general, based on the results of this study, analysis of genetic diversity in the studied genomic region may not be effective in identifying effective markers for breeding programs in Sistani cows.

Key words: DNA methyl transferase Genes (DNMTs), polymorphism, Sistani cattle, PCR-SSCP

مقدمه

ویژگی یک سلول به طور عمده به الگوی بیان ژنی آن وابسته می‌باشد. الگوی بیان ژنی در هر یک از رده‌های سلولی بطور خاص تحت تاثیر الگوهای اپی ژنتیکی آن می‌باشد (Haig، ۲۰۰۴). یکی از مهمترین مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی موثر در شکل گیری الگوهای اپی ژنتیکی، متیلاسیون کربن شماره ۵ نوکلئوتید سیتوزین در نواحی غنی از توالی های تکراری CpG، می‌باشد (Seidel و همکاران، ۲۰۱۲). متیلاسیون DNA نقش تعیین کننده‌ای در کنترل طیف گسترده ای از مسیرهای سیگنال درون سلولی دارد، بطوریکه در غیر فعال سازی کروموزوم X (Lee، ۲۰۰۳)، کنترل الگوی بیان ژن‌ها (Tidball and Spencer، ۲۰۰۲) و بطور خاص تنظیم فعالیت ژن‌های ایمپرینت، که اهمیت بالایی در کنترل روند تکوین جنین و نیز وزن تولد نتاج دارند، دخالت دارد (Saradalekshmi و همکاران، ۲۰۱۴). در این راستا نشان داده شده است، سه عضو اصلی و شناسایی شده از خانواده ژن‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs)، شامل؛ DNMT1، DNMT3a و DNMT3b در کنترل شکل‌گیری

و ابقاء الگوهای متیلاسیون نقشی متمایز ایفاء می‌کنند (Moore و همکاران، ۲۰۱۳).

اهمیت ژن‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) در مدلهای مختلف حیوانی مورد مطالعه قرار گرفته است؛ به عنوان مثال محققان گزارش کرده اند که ممانعت از فعالیت ژن DNMT1 علاوه بر هیپومتیلاسیون وسیع ژنومی، سبب افزایش نرخ مرگ و میر در دوران جنینی می شود (Golding و همکاران، ۲۰۱۱). همچنین اختلال در عملکرد ژن DNMT1 موجب بروز اخلال در شکل گیری الگوهای ایمپرینت ژن‌های IGF2 و H19، که نقشی کلیدی در کنترل فرآیند تکوین رویان و رشد جنینی دارند، می‌شود (Li و همکاران، ۱۹۹۳؛ Biniszkiewicz و همکاران، ۲۰۰۲).

از طرف دیگر ژن‌های DNMT3a و DNMT3b نقش مهمی در شکل‌گیری الگوهای اپی‌ژنتیکی در دوره گامتوژنز (Okano و همکاران، ۱۹۹۹) و در شکل‌گیری الگوهای جدید اپی‌ژنتیکی در فرآیند برنامه‌ریزی ژنوم در دوره‌ی پس از لقاح دارند (Goll and Bestor، ۲۰۰۵). مطالعات مختلف گزارش کردند که ژن‌های DNMT3a و DNMT3b مسئول شروع متیلاسیون جدید در سلول‌های بنیادی و دوره‌های مختلف رشد جنینی بوده (Lucifero و همکاران، ۲۰۰۷) و هر گونه اختلال در فعالیت این ژن‌ها باعث متیلاسیون نامناسب DNA، اختلال در تکوین جنین و وقوع سرطان‌های مختلف می‌شود (Wang و همکاران، ۲۰۱۴).

در بین نژادهای بومی ایران، گاو سیستانی از استعداد رشد و تولید گوشت بالایی برخوردار بوده و به‌عنوان یک ذخیره ژنتیکی و استراتژیک کشور مطرح می باشد. خصوصیات این نژاد نظیر مقاومت به بیماری‌ها، تغییرات جوی و کم‌توقعی این نژاد در کنار استعداد رشد و پروار شدن جبرانی گوساله‌های نر سیستانی در زمان پرواربندی، قابلیت تولید گوشت، کمیت و کیفیت لاشه، بازده غذایی و قابلیت پرواربندی مناسب در این نژاد قابل توجه می‌باشد (بیرجندی، ۱۳۷۶). با توجه به نقش کلیدی DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs) در شکل‌گیری و ابقاء الگوهای متیلاسیون در دوران جنینی و تأثیر بسزایی که در کنترل بیان ژن‌های مؤثر بر تکوین جنین دارند، احتمالا تنوع ژنتیکی در این ژنها روی عملکرد آن‌ها و متعاقبا رشد و نمو گوساله در دوران جنینی و وزن تولد تأثیرگذار می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه بررسی وجود چندشکلی‌های پیشنهادی تأثیرگذار بر عملکرد ژن‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) در گاو سیستانی با استفاده از روش PCR-SSCP است.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق، در زمستان سال ۱۳۹۴ از تعداد ۶۰ رأس گاو نر و ماده (که دارای رکوردهای ثبت شده برای وزن تولد بودند) که در ایستگاه پرورش گاو نژاد سیستانی شهرستان زابل نگهداری می شدند، خونگیری بعمل آمد. نمونه‌های خون به وسیله ونوجکت‌های حاوی EDTA (۰/۵ مولار و PH= ۸) و از ورید گردن گرفته شد. نمونه‌ها پس از شماره‌گذاری در ظروف حاوی یخ به دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافت. استخراج DNA با روش فنول کلروفرم و بررسی کیفیت نمونه‌های استخراج شده به روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام گرفت. توالی‌های آغازگرها براساس وجود چندشکلی‌های تأئید شده در سایت NCBI با استفاده از نرم افزار Primer Premier نسخه‌ی ۶، طراحی و به وسیله‌ی سایت NCBI Blast از یکسان بودن محل جفت شدن آغازگرها اطمینان حاصل آمد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط شرکت پیشگام سنتز شد (جدول ۱). تکثیر نواحی هدف مطابق با پروتکل‌های بهینه‌سازی شده (جدول ۲)، توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) انجام شد (جدول ۳).

جدول ۱- ویژگی توالی آغازگرهای مورد استفاده

ژن	توالی آغازگرها	طول (جفت‌باز)	شماره‌ی ثبت در بانک ژن
DNMT1	F:5′-CCACGGTGTTCACAGAGGACTG-3′ R: 5′-CGCACAGCATCTCCACATCTCC-3′	114	NM_182651.2
DNMT3b	F: 5′-CACAGAGGAGGTTCCAAGAGAT-3′ R:5′-ATTCAGGTCATTATCAGGCACTG-3′	207	AC_000170.1
DNMT3a	F:5′-TCTGGTGAGAGGAACGGTAGGA-3′ R:5′-GACTTTGGAAGCAGGACCTTGAC-3′	176	AC_000168.1

جدول ۲- مواد مورد استفاده برای PCR هر نمونه

مواد	مقدار (µL)
آب دیونیزه	۹
مسترمیکس (شرکت پیشگام تهران)	۱۲
DNA الگو	۲
پرایمر	۲
حجم نهایی	۲۵

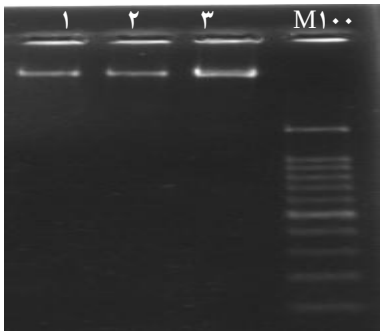
جدول ۳- مراحل مختلف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR)

ژن	گامه واکنش		دما (°C)	زمان (S)	زمان(Min)
DNMT1	واسرشت‌سازی اولیه		۹۰		۵
	۳۸ چرخه	واسرشت‌سازی	۹۴	۴۵	
		اتصال آغازگر	۶۰	۴۵	
		دمای گسترش	۷۲	۴۵	
	بسط نهایی		۷۲		۱۵
DNMT3a DNMT3b	واسرشت‌سازی اولیه		۹۰		۵
	۳۸ چرخه	واسرشت‌سازی	۹۴	۴۵	
		اتصال آغازگر	۶۳	۴۵	
		دمای گسترش	۷۲	۴۵	
	بسط نهایی		۷۲		۱۵

طول قطعه‌ی به دست آمده از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. بررسی چندشکلی فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) محصولات PCR توسط ژل پلی‌آکریل آمید و رنگ‌آمیزی به وسیله نیترات نقره انجام گرفت. بدین منظور، ۴ میکرولیتر محصول PCR با ۸ میکرولیتر محلول واسرشت‌سازی (شامل برموفنل، زینول سیانید ۱۰٪، فرمامید ۹۹٪ و EDTA ۶ مولار) مخلوط شدند و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. سپس جهت ممانعت از اتصال مجدد رشته‌های مکمل، میکروتیوب‌ها سریعاً بر روی یخ انتقال یافتند. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، تمام حجم حاصل به وسیله‌ی دستگاه الکتروفورز عمودی (شرکت Bio Rad) حاوی TBE 1X، روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد، با ولتاژ ۱۸۰ ولت، به مدت ۶ ساعت و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد الکتروفورز گردید. الگوهای باندی به وسیله‌ی رنگ‌آمیزی نیترات نقره و در فضای سرد و تاریک مشاهده شدند.

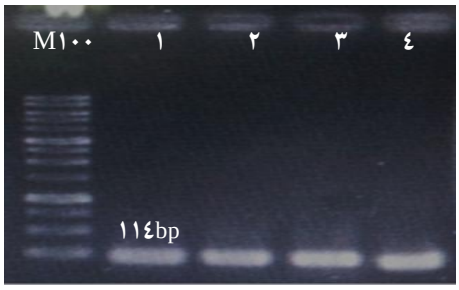
نتایج و بحث

استخراج DNA از خون با موفقیت انجام گرفت. الکتروفورز تمام نمونه‌های استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد نشان دهنده‌ی باندهای کاملاً شفاف و روشن، فاقد شکستگی و آلودگی با RNA بود (شکل ۱).

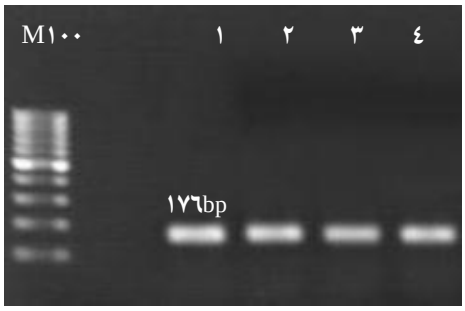


شکل ۱- کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده گاو سیستانی روی ژل آگارز ۱ درصد، M: نشانگر ۱۰۰bp

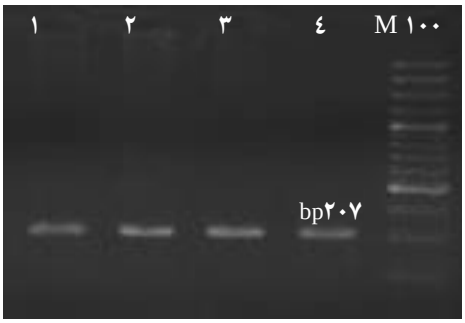
محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به همراه نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و الکتروفورز گردید. از مقایسه‌ی محل قرار گرفتن باندهای تولید شده نمونه‌ها با اندازه‌ی نشانگر طول قطعات تکثیری در مقابل ۱۱۴جفت‌باز برای DNMT1 (شکل ۲)، ۱۷۶ جفت‌باز برای DNMT3A (شکل ۳) و ۲۰۷ جفت‌باز برای DNMT3B (شکل ۴) برآورد گردید.



شکل ۲- نمونه‌هایی از صحت تکثیر محصولات PCR ژن DNMT1 روی ژل آگارز ۱ درصد، M: نشانگر ۱۰۰bp

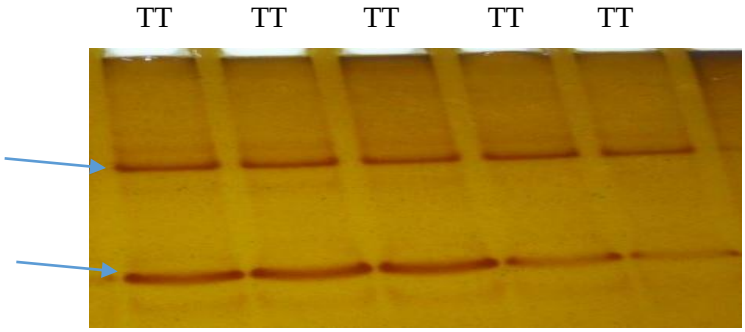


شکل ۳- نمونه‌هایی از صحت تکثیر محصولات PCR ژن DNMT3a روی ژل ۱ درصد، M: نشانگر ۱۰۰bp

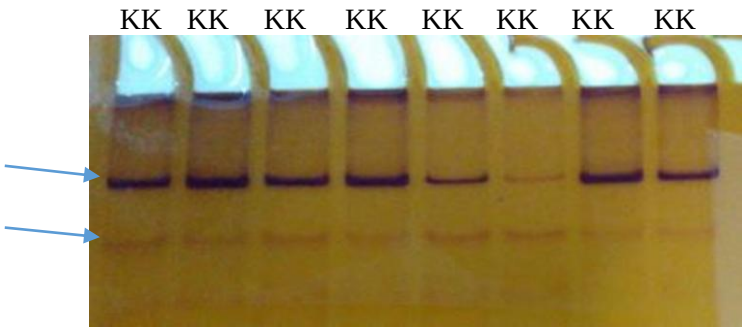


شکل ۴- نمونه‌هایی از صحت تکثیر محصولات PCR ژن DNMT3bروی ژل آگارز ۱ درصد، M: نشانگر ۱۰۰bp

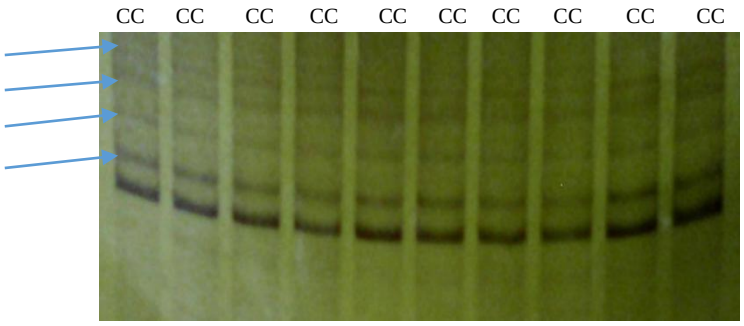
روش PCR-SSCP بخاطر دقت بالا در تشخیص جهش‌های ناشناخته نسبت به روش‌های دیگر از کارائی بالاتری برخوردار می‌باشد (Takahashi و همکاران، ۲۰۰۰) و همچنین شناسایی جهش از طریق این روش برای قطعات با طول کمتر از ۳۰۰ جفت بازی، بیش از ۸۰ درصد گزارش شده است (Hayashi and Yandell، ۱۹۹۳)، لذا در تحقیق حاضر از روش SSCP جهت شناسایی ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. نتایج حاصل از SSCP بر روی نمونه‌های گاو سیستانی برای جایگاه‌های اگزون ۳۳ ژن DNMT1، اینترون ۴ ژن DNMT3a و اینترون ۳ ژن DNMT3b به ترتیب در شکل‌های ۵، ۶ و ۷ نشان داده شده است.



شکل ۵- نمونه‌هایی از الگوهای باندی حاصل از SSCP برای ژن DNMT1 برای گاو سیستانی



شکل ۶- نمونه‌هایی از الگوهای باندی حاصل از SSCP برای ژن DNMT3a برای گاو سیستانی



شکل ۷- نمونه‌هایی از الگوهای باندی حاصل از SSCP برای ژن DNMT3b برای گاو سیستانی

نتایج حاکی از عدم وقوع جهش در جایگاه‌های مورد مطالعه می‌باشد و تمامی نمونه‌های تعیین ژنوتیپ شده گاو سیستانی دارای ژنوتیپ یکسان بودند. از جمله دلایل احتمالی در توجیه عدم وجود چند شکلی در نواحی مورد بررسی، می توان به کوچک بودن جمعیت مورد بررسی و یاانجام برنامه های اصلاحی(انتخاب) در گله مورد بررسی اشاره کرد.بعلاوه وقوع جهش در نواحی مورد بررسی ممکن است فاقد مزیت های تکاملی بوده و لذا انتخاب طبیعی بر علیه برخی جهش های خاص صورت گرفته باشد.

در خصوص تأثیر تنوع ژنتیکی در این ژن‌ها بر صفات تولیدی حیوانات اهلی گزارشات اندکی به چاپ رسیده است و عمده‌ی مطالعات بر مدل‌های انسانی تمرکز دارند. به طوری که در پژوهشی، اثر سن بر ارتباط بین متیلاسیون p16CDKN2A و چندشکلی ژن DNA متیل ترانسفراز 3b (DNMT3b) (C46359T) با کارسینوم سر و گردن و میزان زنده‌مانی بیمار، با استفاده از روش PCR-RFLP با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت و در نتایج آن برای ژن DNA متیل ترانسفراز 3b (DNMT3b) سه نوع ژنوتیپ TT، TC، CC نشان داده شد، و آلل T در افراد مسن‌تر ارتباط معنی‌داری با پیشرفت اندازه‌ی تومور داشت و ارتباطی بین متیلاسیون p16CDKN2A و چندشکلی ژن DNA متیل ترانسفراز 3b (DNMT3b) گزارش نشد (Farias و همکاران، ۲۰۱۰).

در مطالعه‌ای دیگر در رابطه با ارتباط پلی‌مورفیسم ژن DNA متیل ترانسفراز 3b (DNMT3b) و سرطان مری، تأثیر پروموتر ۵۷۹ (G>T) ژن DNMT3b با خطر ابتلا به سرطان مری نیز مورد بررسی قرار گرفت. افراد حامل آلل G ژن DNMT3b در مقایسه با افرادی که آلل T را حمل می‌کردند ارتباط نزدیک‌تری با سرطان مری نشان دادند. در ادامه تحقیق ترکیب ژنوتیپ‌های GG و GT ارتباط معنی‌داری را بین پلی‌مورفیسم ۵۷۹ (G>T) ژن DNMT3b و در استعداد ابتلا به سرطان مری نشان نداد، که نشان دهنده‌ی این مطلب می‌باشد که پلی‌مورفیسم ۵۷۹ (G>T) در ژن DNMT3b نمی‌تواند به عنوان یک مارکر قابل استناد

برای ارزیابی میزان حساسیت به سرطان مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیقی، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNP) ژن DNA متیل ترانسفراز 3b (DNMT3b) با کیفیت گوشت و صفات لاشه در گاو گوشتی با استفاده از نشانگر PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت که برای SNP1 (C63029349T) سه نوع ژنوتیپ CC، CT و TT (اینترون ۶)، SNP2 (G63032883A) سه نوع ژنوتیپ GG، AG، AA (اینترون ۵)، همچنین برای SNP3 (A63039420G) سه نوع ژنوتیپ AA، AG، GG (اینترون ۱۳) گزارش شد (Liu و همکاران، ۲۰۱۲). Cheng و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که جهش در ژن DNMT-1 (rs2228612)، (rs16999593)، (rs2228611)، با میزان الیگواسپرمی (ناهنجاری در اسپرم) در ارتباط است. در مطالعه‌ای گزارش شد جنین موش‌هایی که به علت نقص در آنزیم‌های DNMT1، DNMT3A و DNMT3B دچار تغییر در الگوهای متیلاسیون شده‌اند، پس از لانه‌گزینی سقط شدند (Lorincz و همکاران، ۲۰۰۴).

به طور کلی، در این مطالعه در جایگاه‌های مورد بررسی هیچ گونه جهشی شناسایی نشد و برای تمامی نمونه‌های مورد بررسی در گاو سیستانی تنها یک نوع الگوی باندی نمایان گردید. فقدان تنوع ژنتیکی در نواحی مورد مطالعه احتمالاً فاقد مزیت‌های تکاملی بوده و نواحی مورد مطالعه در این ژن‌های کاندید نمی‌توانند به عنوان مارکر برای برنامه‌های اصلاحی صفات تولیدی در گاو سیستانی استفاده شوند. از طرفی از دلایل تفاوت نتایج حاضر با سایر پژوهش‌ها می‌توان به نژاد و اندازه جمعیت مورد بررسی اشاره کرد. ضمن اینکه تکنیک مورد استفاده جهت نمایان‌سازی ژنوتیپ‌های احتمالی مارکر PCR-SSCP بود که بر اساس تحقیقات از دقت و کارایی بالاتری نسبت به روش‌های دیگر ارزیابی نظیر روشهای مبتنی بر تعیین توالی برخوردار می‌باشد. بنابراین با توجه به اهمیت بالای ژن‌های DNA متیل ترانسفراز (DNMTs) در فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله رشد و تکوین جنین و با توجه به اینکه تحقیقات اندکی در این زمینه صورت گرفته است، انجام مطالعات بیشتر و گسترده‌تر در رابطه با شناسایی چندشکلی در این ژن‌ها و ارتباطشان با صفات مهم اقتصادی در جمعیت بزرگتر و سایر نژادها مفید خواهد بود.

منابع

بیرجندی، م. ر. (۱۳۷۶). بررسی وضعیت پرورش و تعیین توان تولید شیر و خصوصیات شیرواری گاو سیستانی در منطقه سیستان. چکیده طرح‌های تحقیقاتی وزارت جهاد سازندگی (جلد دوم). ص ۳۶۸-۳۷۰. وزارت جهاد سازندگی.

Biniszkiewicz, D., Gribnau, J., Ramsahoye, B., Gaudet, F., Eggan, K., Humpherys, D. et al. (2002). Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Molecular and Cellular Biology*, 22(7): 2124-2135.

Boligon, A. A., Mercadante, M. E. Z., Forni, S., Lobo, R. B. and Albuquerque, L. G. D. (2010). Covariance functions for body weight from birth to maturity in Nellore cows. *Journal of Animal Science*, 88(3): 849-859.

Cheng, P., Chen, H., Zhang, R.P., Liu, S.R. and Zhou-Cun, A. (2014). Polymorphism in DNMT1 may modify the susceptibility to oligospermia. *Reproductive biomedicine online*, 28: 644-649.

Chew, B. P., Maier, L. C., Hillers, J. K. and Hodgson, A. S. (1981). Relationship Between Calf Birth Weight and Dam's Subsequent 200-and 305-Day Yields of Milk, Fat, and Total Solids in Holsteins1. *Journal of Dairy Science*, 64(12): 2401-2408.

Dawson, W. M., Phillips, R. W. and Black, W. H. (1947). Birth weight as a criterion of selection in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 6(3): 247-257.

Delaval, K. and Feil, R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current opinion in Genetics and Development*, 14(2): 188-195.

Denis, H., Ndlovu, M. N. and Fuks, F. (2011). Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Reports*, 12: 647–656.

Eden, S., Constancia, M., Hashimshony, T., Dean, W., Goldstein, B., Johnson, A. C. et al. (2001). An upstream repressor element plays a role in Igf2 imprinting. *The EMBO Journal*, 20(13): 3518-3525.

Fan, H., Liu, D. S., Zhang, S. H., Hu, J. B., Zhang, F. and Zhao Z. J. (2008). DNMT3B 579 G>T promoter polymorphism and risk of esophagus carcinoma in Chinese. *World Journal of Gastroenterology*, 14: 2230.

Farias, L. C., De Carvalho Fraga, C. A., De Oliveira, M. V. M., Silva, T. F., Marques-Silva, L., Moreira, P. R. et al. (2010). Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *International Journal of Oncology*, 37(1): 167-176.

Golding, M. C., Williamson, G. L., Stroud, T. K., Westhusin, M. E. and Long, C. R. (2011). Examination of DNA methyltransferase expression in cloned embryos reveals an essential role for Dnmt1 in bovine development. *Molecular Reproduction and Development*, 78(5), 306-317.

Goll, M. G. and Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 74: 481-514.

Guo, X., Liu, X., Xu, X., Wu, M., Zhang, X., Li, Q. et al. (2012). The expression levels of DNMT3a/3b and their relationship with meat quality in beef cattle. *Molecular Biology Reports*, 39(5), 5473-5479.

Haig, D. (2004, January). The (dual) origin of epigenetics. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 69, pp. 67-70). Cold Spring Harbor Laboratory Press. P. 67-70.

Hayashi, K. and Yandell, D. W. (1993). How sensitive is PCR-SSCP?. *Human Mutation*, 2(5): 338-346.

Johanson, J. M., Berger, P. J., Tsuruta, S. and Misztal, I. (2011). A Bayesian threshold-linear model evaluation of perinatal mortality, dystocia, birth weight, and gestation length in a Holstein herd. *Journal of Dairy Science*, 94(1): 450-460.

Kamei, Y., Suganami, T., Ehara, T., Kanai, S., Hayashi, K., Yamamoto, Y. et al. (2010). Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity*, 18(2), 314-321.

Kulis, M. and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, 70: 27-56.

Lee, J. T. (2003). Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting?. *Current Biology*, 13(6): R242-R254.

Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R. (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*, 366:362–365.

Li, E., Bestor T. H. and Jaenisch R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69: 915–926.

Liu, X., Guo, X. Y., Xu, X. Z., Wu, M., Zhang, X., Li, Q. et al. (2012). Novel single nucleotide polymorphisms of the bovine methyltransferase 3b gene and their association with meat quality traits in beef cattle. *Genetics and Molecular Research*, 11: 2569-2577.

Lorincz, M. C., Dickerson, D. R., Schmitt, M. and Groudine, M. (2004). Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(11): 1068.

Lucifero, D., La Salle, S., Bourc'his, D., Martel, J., Bestor, T. H., Trasler, J. M. (2007). Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Developmental Biology*, 7: 36.

Meijering, A. (1984). Dystocia and stillbirth in cattle-A review of causes, relations and implications. *Livestock Production Science*, 11(2): 143-177.

Mmereole, F. U. and Obinne, J. I. (2010). Relationship of the body weight and linear measurements of the west African Dwarf (WAD) sheep under the humid environment of Nigeria. *Agricultura Tropica et Subtropica,* 43(1): 64-67.

Moore, L. D., Le, T. and Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology, 38*(1): 23.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell,* 99: 247-257.

Olson, K. M., Cassell, B. G., McAllister, A. J. and Washburn, S. P. (2009). Dystocia, stillbirth, gestation length, and birth weight in Holstein, Jersey, and reciprocal crosses from a planned experiment. *Journal of Dairy Science,* 92(12): 6167-6175.

Saradalekshmi, K. R., Neetha, N. V., Sathyan, S., Nair, I. V., Nair, C. M. and Banerjee, M. (2014). DNA methyl transferase (DNMT) gene polymorphisms could be a primary event in epigeneticsusceptibility to schizophrenia. *PLoS ONE,* 9: e98182.

Seidel, C., Florean, C., Schnekenburger, M., Dicato, M. and Diederich, M. (2012). Chromatin-modifying agents in anti-cancer therapy. *Biochemistry,* 94: 2264-2279.

Sleutels, F., Zwart, R. and Barlow, D. P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature,* 415: 6873- 810.

Takahashi, K., Kobayashi, T. and Kanayama, N. (2000). p57Kip2 regulates the proper development of labyrinthine and spongiotrophoblasts. *Molecular Human Reproduction,* 6(11): 1019-1025.

Tidball, J. G. and Spencer M. J. (2002). Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *The Journal of Physiology,* 545(3): 819-828.

Wang, Q., Ning, X., Zhang, Q., Liu, F., Wu, H., Zhang, Y. et al. (2014). Molecular characterization of two glutathione peroxidase genes in Mytilus galloprovincialis and their transcriptional responses to sub-chronic arsenate and cadmium exposure. *ISJ,* 11: 149-162.

Xiang, G., Zhenkun, F., Shuang, C., Jie, Z., Hua, Z., Wei, J. et al. (2010). Association of DNMT1 gene polymorphisms in exons with sporadic infiltrating ductal breast carcinoma among Chinese Han women in the Heilongjiang Province. *Clinical Breast Cancer,* 10: 373-377.

Ye, C., Beeghly-Fadiel, A., Lu, W., Long, J., Shu, X. O., Gao, Y. T. et al. (2010). Two-stage case–control study of DNMT-1 and DNMT-3B gene variants and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment,* 121: 765-769.

Zhong, X., Peng, Y., Yao, C., Qing, Y., Yang, Q., Guo, X., Xie, W., Zhao, M., Cai, X., and Zhou, J. G. (2016). Association of DNA methyltransferase polymorphisms with susceptibility to primary gouty arthritis. *Biomedical Reports,* 5: 467-472.