



GENETIC POLYMORPHISM OF SOME GENES RELATED TO REPRODUCTION IN THE RIVER BUFFALO

Thesis
Submitted to Faculty of Science
Ain Shams University

For the degree of Master of Science

By
Dalia Mamdouh Mabrouk Mostafa
(B.Sc. Zoology)

Supervised by

Prof. Dr. Nagwa H. A. Hassan
Professor of Cytogenetics
Zoology Department
Faculty of Science
Ain Shams University

Prof. Dr. Kamelia B. Abd El Aziz
Professor of Animal Genetics
Cell Biology Department
National Research Center

Prof. Dr. Sahar S. E. Ahmed
Professor of Animal Biotechnology
and Molecular Genetics
Cell Biology Department
National Research Center

Zoology Department
Faculty of Science
Ain Shams University

٢٠١١



التباين الوراثى لبعض الجينات المرتبطة بالتكاثر فى الجاموس النهري

رسالة مقدمة إلى

كلية العلوم- جامعة عين شمس

قسم علم الحيوان

للحصول على درجة الماجستير فى العلوم

مقدمة من

داليا ممدوح مبروك مصطفى

تحت إشراف

أ.د. كاميليا بدرخان عبد العزيز

أستاذ وراثة الحيوان- قسم بيولوجيا الخلية
المركز القومى للبحوث

أ.د. نجوى حسن على حسن

أستاذ الوراثة الخلوية- قسم علم الحيوان
كلية العلوم- جامعة عين شمس

أ.د. سحر سعد الدين أحمد

أستاذ البيوتكنولوجيا والوراثة الجزيئية للحيوان
قسم بيولوجيا الخلية
المركز القومى للبحوث

قسم علم الحيوان- كلية العلوم

جامعة عين شمس

القاهرة - ٢٠١١



جامعة عين شمس
كلية العلوم

رسالة ماجستير

اسم الطالب: داليا ممدوح مبروك مصطفى
عنوان الرسالة: "التباين الوراثي لبعض الجينات المرتبطة بالتكاثر في الجاموس النهري".

اسم الدرجة: الماجستير في العلوم
لجنة الاشراف:

- (١) أ.د. نجوى حسن علي حسن أستاذ الوراثة الخلوية - قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة عين شمس.
- (٢) أ.د. كاميليا بدرخان عبد العزيز أستاذ وراثة الحيوان - قسم بيولوجيا الخلية - المركز القومي للبحوث.
- (٣) أ.د. سحر سعد الدين أحمد أستاذ البيوتكنولوجيا والوراثة الجزيئية للحيوان - قسم بيولوجيا الخلية - المركز القومي للبحوث.

لجنة التحكيم:

- (١) أ.د. محمد أكمل عبد الرحيم الغر أستاذ الوراثة - قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة القاهرة.
- (٢) أ.د. فوزية عبد الفتاح علي أستاذ الوراثة - قسم الوراثة والسيولوجي - المركز القومي للبحوث.
- (٣) أ.د. نجوى حسن علي حسن أستاذ الوراثة الخلوية - قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة عين شمس.
- (٤) أ.د. كاميليا بدرخان عبد العزيز أستاذ وراثة الحيوان - قسم بيولوجيا الخلية - المركز القومي للبحوث.

تاريخ البحث: / / ٢٠١١ م

ختم الاجازة: / / ٢٠١١

الدراسات العليا
اجيزت الرسالة بتاريخ
/ / ٢٠١١

موافقة مجلس الجامعة
/ / ٢٠١١

موافقة مجلس الكلية
/ / ٢٠١١



جامعة عين شمس
كلية العلوم

صفحة العنوان:

اسم الطالب: داليا ممدوح مبروك مصطفى

الدرجة العلمية: الماجستير في العلوم

القسم التابع له: قسم علم الحيوان

اسم الكلية : كلية العلوم

الجامعة : عين شمس

سنة التخرج: ٢٠٠٤

سنة المنح: ٢٠١١



جامعة عين شمس
كلية العلوم

شكر

شكر السادة الأساتذة الذين قاموا بالاشراف وهم:

(١) أ.د. نجوى حسن علي حسن

أستاذ الوراثة الخلوية - - قسم علم الحيوان - كلية العلوم - جامعة عين شمس.

(٢) أ.د. كاميليا بدرخان عبد العزيز

أستاذ وراثة الحيوان - قسم بيولوجيا الخلية - المركز القومي للبحوث.

(٣) أ.د. سحر سعد الدين أحمد

أستاذ البيوتكنولوجيا والوراثة الجزيئية للحيوان - قسم بيولوجيا الخلية - المركز القومي للبحوث.

وكذلك الهيئات:

(١) كلية العلوم - جامعة عين شمس

(٢) المركز القومي للبحوث - قسم بيولوجيا الخلية

Dedication

**I DEDICATE THIS WORK WITH ALL MY
LOVE**

TO MY PARENTS;

TO MY BROTHER SHERIEF.

TO MY COUNTRY EGYPT.

Acknowledgement

First, foremost, and all thanks to Allah by whose grace this work has been completed and by whose grace all my life is arranged in the best. Nobody can imagine this way that had been drawn by the mercifulness of the God.

After thanking Allah, I would like to express my unlimited thanks to my parents. I can not evaluate their efforts which extend all imagination and all limits from my birth till now to render me happy and successful. So, all my success is their success.

I would like to express my deepest respect and sincere gratitude to *Prof. Dr. Nagwa Hassan Ali*, Professor of Cytogenetics, Zoology department, Faculty of science, Ain Shams University; for her continuous, valuable help and mainly for giving me the honor of working under her supervision.

I would like to express my respect and sincere appreciation towards *Prof. Dr. Kamelia B. Abd El Aziz*, Professor of Animal Genetics, Cell Biology Department, and National Research Center; for her help and generous supervision.

I also wish to record my thanks to *Prof. Sahar S. E. Ahmad*, Professor of Animal Biotechnology, Cell Biology Department, and National Research Center; for her help and active supervision.

I can not forget the great effort which exerted by my colleagues at Cell Biology Department, National Research Center, to make me pass the first steps to learning Molecular Biology.

I will not forget to thank all my real friends for their encouragement to exceed all barriers in my way and during the hard times.

ABBREVIATIONS

%C :	Percent of cross linking
AFLP:	Amplified fragment length polymorphism
APS :	Ammonium per sulphate
bp:	Base pair
CI:	Calving interval
ddH₂O:	Deionized water
DNA:	Deoxyribonucleic acid
dNTP:	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP:	2'-deoxyribonucleoside 5'- triphosphate
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
FSH :	Follicular stimulating hormone
FSHR:	follicular Stimulating hormone receptor
IGF-I:	Insulin growth factor-1
IGF-IR:	Insulin growth factor-1 receptor
INHBA:	Inhibin beta A
MAS:	Marker assisted selection
PCR:	Polymerase chain reaction
QTL:	Quantitative trait locus
RAPD:	Random amplified polymorphism DNA
RFLP:	Restriction fragment length polymorphism
Rpm:	Round per minute
SDS:	Sodium Dodecyle Sulphate
SNP:	Single nucleotide polymorphism
SSCP:	Single strand conformation polymorphism
ssDNA:	single strand DNA
STAT³A:	Signal transducer and transcript ³ A
TEMED:	N, N, N', N'-Tetramethylethylene-diamine
UV:	ultraviolet

ABSTRACT

The study was preliminary attempt to establish the association between reproductive trait and genetic polymorphism in five candidate genes (FSHR, IGF-I, IGF-IR, INHBA and STAT^αA) in Egyptian buffalo using Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique.

The correlation between the phenotypic data and the molecular results of genes studied revealed that (1) Pattern 1 of FSHR gene locus recorded the lowest CI period with predication of 90% accuracy for the phenotype of high fertility (2) IGF-I gene locus reported no impact on reproductive productivity. (3) IGF-IR gene locus predicated the phenotype of the high fertility with approximately 78% accuracy for pattern 1, 83,3% accuracy for pattern 2 and 62,5% accuracy for pattern 3. (4) INHBA gene locus detected no impact on reproductive productivity. (5) Pattern 1 of STAT^αA gene locus concerned with high fertility, while pattern 3 concerned with low fertility.

The results confirmed that the candidate gene approach was proposed as a procedure to identify genes with significant effects for possible use in the improvement of farm animal productivity.

Keywords: Calving interval, Candidate genes, Genetic polymorphism, Reproductive trait and Single Strand Conformation Polymorphism

CONTENTS

Title	Page number
Abstract	I
List of Figures	II
List of Tables	V
Introduction and Aim of the work	VI
CHAPTER I: LITERATURE OF REVIEW	١
١,١. Egyptian Buffalo	١
١,٢. Marker Assisted Selection	٢
١,٣. Quantitative approaches	٤
١,٤. Quantitative trait loci	٥
١,٥. Candidate gene approach	٨
١,٥,١. General Description	٨
١,٥,٢. Advantages and Disadvantages of candidate gene approach	٩
١,٦. Molecular Markers	٩
١,٦,١. Restriction fragment length polymorphism	١١
١,٦,١,١. Advantages and Disadvantages	١٢
١,٦,٢. Single strand conformation polymorphism	١٢
١,٦,٢,١. Advantages and disadvantages	١٤
١,٦,٣. Microsatellite	١٤
١,٦,٤. Random amplified polymorphic DNA	١٥

1,6,5. Amplified fragment length polymorphism	16
1,6,6. Single nucleotide polymorphism	17
1,7. Genes Chosen	18
1,7,1. Follicle-Stimulating Hormone Receptor	18
1,7,1,1. Biology and role	18
1,7,1,2. Previous studies	20
1,7,2. Insulin-like growth factor-I and Insulin-like growth factor-I receptor	21
1,7,2,1. Biology and role	21
1,7,2,1.A. Insulin-like growth factor-I	22
1,7,2,1.B. Insulin-like growth factor-I receptor	23
1,7,2,2. Previous studies	24
1,7,3. Inhibin beta-A gene	26
1,7,3,1. Biology and role	26
1,7,3,2. Previous studies	28
1,7,4. Signal Transducers and Activators of Transcription α A	29
1,7,4,1. Biology and role	29
1,7,4,2. Previous studies	31
CHAPTER II: MATERIALS AND METHODS	35
3,1 Materials	35
3,1,1 Animals	35

٣,١,٢ Chemicals	٣٥
٣,١,٣ Buffers and Solutions	٣٧
٣,٢ Methods	٤٠
٣,٢,١ DNA extraction	٤٠
٣,٢,١,١ First day	٤٠
٣,٢,١,٢ Second day	٤٠
٣,٢,٢ DNA concentration and purity determination	٤١
٣,٢,٣ DNA amplification by Polymerase chain reaction	٤١
٣,٢,٤ Detection of PCR products by electrophoresis on agarose gel	٤٤
٣,٢,٥ Single strand conformation polymorphism technique	٤٥
٣,٢,٦ Silver staining	٤٦
٣,٢,٧ Data analysis	٤٧
CHAPTER III: RESULTS	٤٨
CHAPTER IV: DISCUSSION	٨٦
CHAPTER V: REFERENCES	٩٨
Summary and Conclusion	١٢٦
Arabic Summary	i
Arabic Abstract	iii

LIST OF FIGURES

Figure	Title	Page
(١)	Agarose gel viewed under UV light after ethidium bromide staining showing a ٢٣٠ bp amplified fragment of FSHR gene.	٥٣
(٢)	Silver stained polyacrylamide (١٢%) gel showing three SSCP patterns of a ٢٣٠bp amplified fragment of FSHR gene (exon ١٠).	٥٤
(٣)	The frequency of SSCP patterns of FSHR gene locus in ٧٠ tested animals.	٥٥
(٤)	The frequency of SSCP patterns of FSHR gene locus in ٤٧ animals.	٥٦
(٥)	The frequency SSCP patterns of FSHR gene locus in each group of fertility.	٥٧
(٦)	Calving interval (mean $\pm$ s.e) in high and low fertility groups for each pattern of FSHR gene locus.	٥٨
(٧)	Agarose gel viewed under UV light after ethidium bromide staining showing a ٢٦٠ bp amplified fragment of IGF-I gene (٥'- flanking region).	٦١
(٨)	Silver stained polyacrylamide (١٢%) gel showing two SSCP patterns of a ٢٦٠ bp amplified fragment of IGF-I gene (٥'-flanking region).	٦٢
(٩)	The frequency of SSCP patterns of IGF-I gene locus in ٧٠ tested animals.	٦٣
(١٠)	The frequency of SSCP patterns IGF-I gene locus in ٤٧ animals.	٦٤
(١١)	The frequency of SSCP patterns of IGF-I gene locus in each group of fertility.	٦٥

(١٢)	Calving interval (mean $\pm$ s.e) in high and low fertility groups for each pattern of IGF-I gene locus.	٦٦
(١٣)	Agarose gel viewed under UV light after ethidium bromide staining showing a ٣٣٥ bp amplified fragment of IGF-IR gene.	٦٩
(١٤)	Silver stained polyacrylamide (١٢%) gel showing four SSCP patterns of a ٣٣٥ bp amplified fragment of IGF-IR gene.	٧٠
(١٥)	The frequency of SSCP patterns of IGF-IR gene locus in ٧٠ tested animals.	٧١
(١٦)	The frequency of SSCP patterns of IGF-IR gene locus in ٤٧ animals.	٧٢
(١٧)	The frequency of SSCP patterns of IGF-IR gene locus in each group of fertility.	٧٣
(١٨)	Calving interval (mean $\pm$ s.e) in high and low fertility groups for each pattern of IGF-IR gene locus.	٧٤
(١٩)	Agarose gel viewed under UV light after ethidium bromide staining showing a ١٧٧ bp amplified fragment of INHBA gene.	٧٦
(٢٠)	Silver stained polyacrylamide (١٢%) gel showing one SSCP pattern of a ١٧٧ bp amplified fragment of INHBA gene.	٧٧
(٢١)	Agarose gel viewed under UV light after ethidium bromide staining showing a ٢١٥ bp amplified fragment of STAT α A gene (exon γ).	٨٠