مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 2، شماره 2، پاییز و زمستان 1389)

مقایسه چند شکلی در ژن مبدل سیگنال و فعال کننده نسخه برداری (*STAT5A*) در گاو های نژاد هلشتاین و سیمنتال

مجتبی نجفی*[1]، قدرت الله رحیمی[2]، مسعود بابایی[3]، زربخت انصاری[4]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[2] استاد گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[3] دانش آموخته دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[4] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: 1389/10/20، تاریخ پذیرش: 1390/04/18

چکیده

مبدل سیگنال و فعال کننده نسخه برداری (*STAT5A*) یک پروتئین سیگنالی کلیدی است که فعالیت بیولوژیک هورمون پرولاکتین را میانجیگری می‌کند و سبب فعال شدن نسخه‌برداری ژن های پروتئین شیر می شود. در این تحقیق، به منظور شناسایی چند شکلی ژن *STAT5A* از 100 راس گاو نژاد هلشتاین و سیمنتال خون گیری شد. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته و تکثیر یک قطعه 281 جفت بازی از بخشی از اینترون 15 و اگزون 16 این ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی صورت گرفت. ژنوتیپ هر نمونه با استفاده از روش SSCP و رنگ آمیزی نیترات نقره تعیین شد. برای این ژن در جایگاه مورد مطالعه دو الگوی باندی Aو B با فراوانی 91 و 9 درصد در گاوهای هلشتاین، 88 و 12درصد در گاوهای سیمنتال شناسایی شد. در این مطالعه دو ژنوتیپ AA با فراوانی 0/82، 0/76 و ژنوتیپ AB با فراوانی 0/18 و 0/24 به ترتیب در گاوهای هلشتاین و سیمنتال مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که این ناحیه از ژنوم در گاوهای مورد مطالعه چند شکل بوده و تکنیک SSCP توانایی شناسایی چند شکلی ها را دارد. علاوه بر این، در مطالعه حاضر مقایسه فراوانی های آللی و ژنوتیپی بین نمونه های تعیین ژنوتیپ شده در گاوهای نژاد هلشتاین و سمینتال اختلاف آماری معنی داری نشان نداد.

کلمات کلیدی: *چند شکلی، PCR- SSCP، STAT5A، گاو هلشتاین و سیمنتال.*

* نویسنده مسئول: مجتبی نجفی تلفن: 09132625020 E. Mail: mojtaba_najafy@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یکی از ابزارهای مورد استفاده در مطالعه‌ی عوامل ژنتیکی موثر بر صفات اقتصادی، شناسایی ژن های بزرگ اثر موثر بر آنها است. از جمله ژن های بزرگ اثر، مجموعه ژن های گروه *STAT*[1] است. مولکول های مبدل سیگنال و فعال کننده نسخه برداری (*STAT*) در پی اتصال هورمون های رشد، انسولین و هورمون های گلوکوکورتیکوئیدی به گیرنده خود فعال می‌شوند و اثرات خود را اعمال می کنند (Darnell, 1997). *STAT*، پروتئینی از فاکتورهای رونویسی است که سیگنال های بیولوژیک را از فضای خارج به داخل هسته عبور می دهد. *STAT* ها، کلاس جدیدی از فاکتورهای رونویسی هستند که نقش‌های بیولوژیک مختلفی در بدن دارند. در پستانداران، 7 خانواده از کلاس *STAT* ها شناسایی شده که از 750-850 اسید آمینه تشکیل شده اند. موقعیت کروموزومی *STAT*ها و پروتئین های شناسایی شده نشان دهنده این حقیقت است که آن ها از یک ژن مشتق شده اند. *STAT1* و *STAT4* روی کروموزوم 2 و *STAT3*، *STAT5A* و *STAT5B* روی کروموزوم 19 نقشه یابی شدند. *STAT6* روی کروموزوم 5 گاوی قرار گرفته در حالی که *STAT2* هنوز موقعیت یابی نشده است. *STAT5A* در بردارنده 19 اگزون و 18 اینترون می باشد. فاکتورهای *STAT*، از خانواده پروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند که در پاسخ به سیتوکنین ها، فاکتورهای مختلف رشد و نیز هورمون ها، فعال می شوند (Darnell, 1997). پروتئین های *STAT* از طریق فسفریلاسیون فعال شده و سپس در ادامه از کمپلکس گیرنده های همودایمر یا هترودایمر جدا شده و از سیتوپلاسم به هسته، جایی که با اثر بر پروموتور ژن های خاص که نهایتاً در تنظیم بیان ژن نقش دارند، جابه جا می شوند (Darnell, 1997). اثرات فیزیولوژیک پروتئین های *STAT* نخستین بار از طریق آزمایشات غیر فعال سازی در موش شناسایی شدند. موش هایی که *STAT4* غیر فعال داشتند، کارکردهای مختلفی، شامل افزایش در تولید IFN-γ، افزایش پیام دهی، تکثیر و تمایز سلول های T کمکی نوع 1 داشتند (Akira, 1999). در گزارشات متعددی آمده است که *STAT1* در توسعه و تمایز غدد پستانی نقش دارد. نشان داده شد که *STAT1* در تنظیم فرایند توسعه و آپوسیت در غده پستانی، نقش دارد (Watson, 2001). بررسی ژنوم کامل در گاو هلشتاین با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان داد که همبستگی معنی داری بین صفات تولیدی و نشانگرهای ریزماهواره در مجاورت *STAT1* وجود دارد (Mosig et al., 2001;

[1]Signal transducer and activator of transcription

Archive of SID

www.SID.ir

(Ron et al., 2004; Ashwel et al., 2004).این پروتئین اولین بار در غده پستان شناخته شد و به همین دلیل به آن فاکتور غده پستان (MGF[1]) نیز می‌گویند (Brym et al., 2004). گزارش شده است که فعالیت *STAT5* و *STAT3* ممکن است نقش حیاتی در تنظیم رشد، تمایز و آپوپیوسیس داشته باشند (Bromberg, 2001). مبدل سیگنال و فعال کننده نسخه برداری یک میانجی‌گر کلیدی داخل سلولی برای علائم پرولاکتین است که می‌تواند نسخه‌برداری ژنهای پروتئین شیر را در پاسخ به پرولاکتین فعال کند. بنابراین، چند شکلی ژن *STAT5A* بر بیان ژن پروتئین شیر و صفات تولید شیر در گاوهای شیری مؤثر گزارش شده است (Wakao et al., 1994). *STAT5A* به عنوان عضوی از مسیر سیگنالی لاکتوژن جفتی و اینترفرون نیز شناخته شده است. رحم در معرض لاکتوژن جفتی، اینترفرون و بسیاری از هورمون ها از قبیل پروژسترون، استروژن و هورمون های جفتی قرار می گیرد. لاکتوژن جفتی موجب دایمر شدن *STAT5A* و آن نیز باعث رونویسی ژن های *OPN*[2] و *UTMP*[3] می شود که این ژن ها بر تولید شیر و صفات مرتبط به سلامت حیوان و تولید مثل اثر دارند (Khatib et al., 2008). از مطالعات انجام شده تا به امروز، می توان چنین نتیجه گرفت که این ژن می تواند یک ژن کاندید در آغاز فعالیت های آبستنی و نیز تولید شیر باشد. هدف از پژوهش حاضر شناسایی چند شکلی و مقایسه فراوانی ژنی و ژنوتیپی در جایگاه ژنی *STAT5A* در یک گله از گاوهای شیری هلشتاین و سیمنتال بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از یک گله 100 راسی که شامل 66 گاو هلشتاین و 34 گاو سیمنتال بود، خون گیری به عمل آمد. نمونه ها بلافاصله با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت استخراج DNA از پروتکل استخراج DNA به روش نمکی بهینه[4]یافته و برای تعیین ویژگی‌های کمی و کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. در این مطالعه بخشی از اینترون 15 و اگزون 16 از جایگاه ژنی *STAT5A* انتخاب و با یک جفت آغازگر اختصاصی قطعهای به طول 281 جفت باز تکثیر شد. توالی آغازگر های ژن STAT5A شامل توالی رفت
F: 5′-

[1]Mammary gland factor
[2]Osteopontin
[3] Bovine uterine milk protein
[4]Modified salting Out method

Archive of SID

www.SID.ir

AGCCCTACAGCTCCAATCCT-3′ و توالی برگشت R: 5′-CTAAGCAGCGGGTACACCC -3′ بود (Flisikowski et al., 2003). واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم 25 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر بافر PCR (10x)، 0/5 میکرولیتر dNTPs، 0/2 میکرولیتر *Taq polymerase*، 100 نانو گرم DNA ژنومی و 1/5 میکرولیتر $MgCl_2$ که در نهایت با آب مقطر به حجم 25 میکرولیتر رسید، انجام گرفت. سپس چرخه های PCR با برنامه حرارتی شامل: 95 درجه سانتی گراد جهت واسرشته سازی اولیه DNA به مدت 300 ثانیه، واسرشت ثانویه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 60 ثانیه، دمای 61 درجه سانتی گراد برای اتصال آغازگرها به مدت 60 ثانیه، دمای 72 درجه سانتی گراد جهت بسط آغازگرها به مدت 60 ثانیه به تعداد 34 چرخه و بسط نهائی به مدت 600 ثانیه در 72 درجه سانتی گراد انجام شد. برای آزمون صحت قطعه به دست آمده و هم چنین تعیین کیفیت محصول PCR از ژل آگارز 2 درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید به همراه نشانگر وزنی M100شرکت فرمنتاز[1]استفاده شد. برای تعیین ژنوتیپ هر حیوان از روش PCR-SSCP و الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید استفاده شد. در این روش تعیین ژنوتیپ بر اساس اختلاف حرکت محصول PCR تکثیر شده که ناشی از شکل فضایی باندهای حاصل از تک رشته‌ای شدن محصولات PCR است، صورت می پذیرد. برای تک رشته‌ای کردن، 2 میکرولیتر از محصول PCR را با 8 میکرولیتر از بافر بارگذاری مخصوص ژل اکریل آمید مخلوط و از دستگاه PCR استفاده شد. مخلوط واکنش به مدت30 ثانیه با سرعت 3500 دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس به دستگاه PCR انتقال و به مدت 6 دقیقه با دمای 96 درجه سانتی گراد حرارت داده شد تا به صورت تک رشته‌ای در آید. در این پژوهش از ژل اکریل آمید 10% که نوع ترکیب آن در جدول 1 آمده است، استفاده شد. بعد از الکترفورز محصولات PCR روی ژل اکریل آمید، از نیترات نقره برای رنگ آمیزی استفاده شد. بر اساس قرار گرفتن الگوهای باندی ژنوتیپ حیوانات تعیین شد. در این پژوهش با رویت و شمارش مستقیم الگوهای باندی، فراوانی آللی و ژنوتیپی تعیین شد. مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی جایگاه مورد مطالعه بین دو نژاد هلشتاین و سیمنتال به ترتیب از روش دقیق فیشر و روش آزمون مربع – کای و نیز بررسی تعادل هاردی – واینبرگ با استفاده از برنامه SAS نسخه 9/1 انجام گرفت.

[1]Fermentase

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

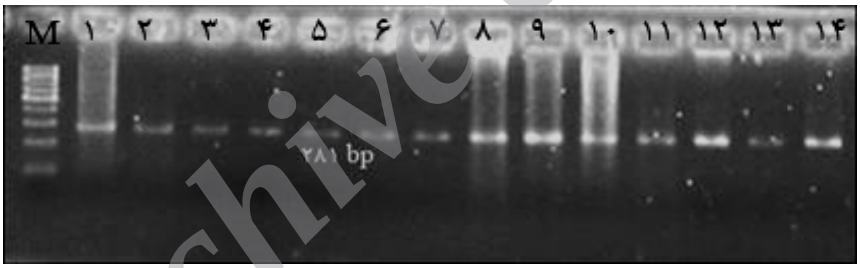
در این پژوهش با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه به طول 281 جفت باز از جایگاه ژنی *STAT5A* شامل بخشی از اینترون 15 و اگزون 16 تکثیر شد. نمونه‌ای از محصولات PCR تکثیر شده در شکل 1 نشان داده شد. در نتایج حاصل از آنالیز اس اس سی پی این پژوهش همان طور که در شکل 2 آمده است دو الگوی باندی A و Bو دو ژنوتیپ AB و AA در هر یک از جمعیت های مورد مطالعه مشاهده شد.

جدول 1 – مواد مورد استفاده در تهیه ژل اکریل آمید 10%.

Table 1- Materials used for preparation of 10% acrylamide gel.

حجم نهایی Final volume	پلی اکریل آمید 30% Polyacrylamide 30%	TEMED	TBE 1X	APS 10%	درصد نهایی ژل Final percent of gel
65**	21.67**	70.2*	43.33**	600*	10

* میکرولیتر ** میلی لیتر

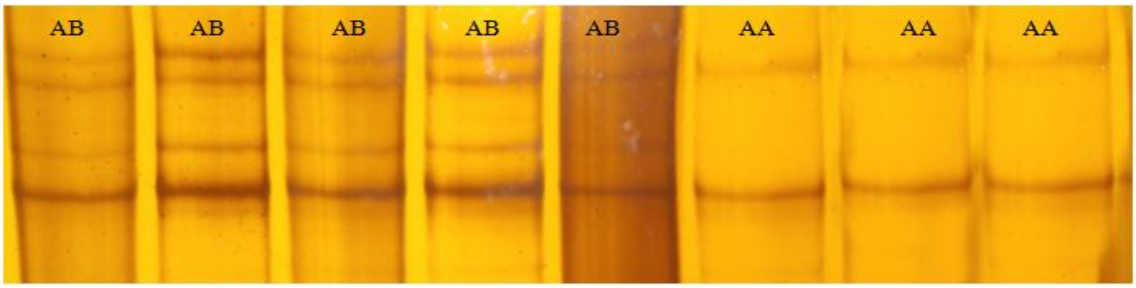


شکل 1- الگو باندی حاصل از تکثیر ژن *STAT5A*از DNA ژنومی در گاوهای هلشتاین و سیمنتال.

Figure 1- Banding pattern of STAT5A gene amplification from genomic DNA in Holstein and Simmental cows.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2- نمونه ای از ژنوتیپ های AA و AB از ژن *STAT5A* بر مبنای باندهای حاصل از آنالیز SSCP در گاوهای هلشتاین و سیمنتال.

Figure 2- AA and AB genotype samples of STAT5A gene based on SSCP analyses in Holstein and Simmental cows.

نتایج حاصله از فراوانی ژنوتیپ های AB و AA و هم چنین فراوانی آللی B و A جایگاه مورد نظر برای گاوهای نژاد هلشتاین و برای گاوهای نژاد سیمنتال در جدول 2 نشان داده شد. بررسی مقایسه فراوانی آللی و نیز مقایسه فراوانی های ژنوتیپی مشاهده شده بین دو نژاد مورد مطالعه در پژوهش حاضر تفاوت معنی داری ($P>0.05$) را نشان نداد (جدول 2). هر دو نژاد از نظر فراوانی ژنوتیپی در تعادل هاردی - واینبرگ قرار داشتند. علت عدم مشاهده همه ژنوتیپ ها در این مطالعه را می توان به کوچک بودن اندازه نمونه و نیز پایین بودن فراوانی آلل B در این جایگاه دانست. در این پژوهش، علاوه بر تعیین و مقایسه فراوانی ژنی و ژنوتیپی بین دو نژاد هلشتاین و سیمنتال، مقایسه ای بین فراوانی ژنی و ژنوتیپی این دو نژاد با دیگر نژادها نیز صورت گرفت. مقایسه آماری وفور ژنی و ژنوتیپی بین گاوهای نژاد ایرانی با دیگر نژادها نیز اختلاف معنی داری را نشان نداد (جدول 3 و 4). گزارش شده است که *STAT5* به دو فرم ایزومری A و B وجود دارد که تنها در تعداد کمی از اسید آمینه کربوکسیلیک متفاوت هستند و این دو فرم توسط ژن های جداگانه با فاصله 40 کیلو باز تولید می شوند (Selvaggia1 et al., 2009). گزارش شده است که بیان ژن های *STAT*، تحت کنترل هورمون پرولاکتین است. در این مسیر گیرنده پرولاکتین منجر به راه اندازی فعالیت پروتئین های *STAT1*،*STAT3* و *STAT5* می شود و این پروتئین ها در ادامه رونویسی ژن هایی را که در تراوش پروتئین های شیر و ترکیبات آن نقش دارند را تنظیم می کنند (Cobanoglu et al., 2006). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد ژن های *STAT* ممکن است نقش مهمی را در تنظیم متابولیسم چربی

Archive of SID

www.SID.ir

و سنتز پروتئین شیر احتمالاً از طریق روش هدایت سیگنال پرولاکتین در غدد پستانی داشته باشند. نشان داده شد که *STAT1* برای جلوگیری از رشد سلول در پاسخ به *IFN*[1]، ضروری می باشد. گزارش شده است موشی هایی که *STAT* غیر فعال دارند در حد زیادی به عفونت از طریق پاتوژن حساس و روند توسعه تومورها در آن ها نسبت به موش های نرمال بیشتر است (Cobanoglu et al., 2006). در گزارشی تنظیم بیان *STAT* به وسیله عوامل موثر بر تمایز بافت چربی مورد بررسی قرار گرفت و گزارش شد که *STAT1*، *STAT5A* و *STAT5B* به طور اختصاصی به وسیله عوامل موثر خودشان تنظیم نمی شوند، بلکه بیان آن ها در حد زیادی با انباشتگی چربی مرتبط است (Stewart et al., 1999). در مطالعه ای سطوح بیان *STAT1*، *STAT3* و *STAT5* در غدد پستانی بزهای شیری اندازه گیری و گزارش شد که بیان این ژن ها به وسیله هورمون رشد تنظیم می شود (Boutinaud, and Jammes, 2004). نقش *STAT5A* در تنظیم بیان ژن وابسته به جنس در کبد موش های ماده با استفاده از آنالیز آرایش نانویی[2] بررسی و گزارش شده است که *STAT5A* برای تنظیم بیان ژننقش اساسی ایفا می کند (Cohen-Zinder et al., 2005).در پژوهش های صورت گرفته، در اگزون 7 این ژن نیز چند شکلی مشاهده شد.چند شکلی در اگزون 7 با تکثیر یک قطعه 215 جفت بازی و هضم آنزیمی *AvaI* آشکار شده که جایگزینی یک سیتوزین با تیمین(C→T) در موقعیت نوکلئوتیدی 6853 را به دنبال داشته است. ژنوتیپ CC وزن زنده بیشتر در 15 ماهگی و افزایش وزن روزانه بیشتری نسبت به دیگر ژنوتیپها داشته است. فراوانی آلل C در هشت نژاد لهستانی مورد مطالعه این پژوهشگر، 0/82 برآورد شد (Flisikowski et al., 2003b). بررسی چند شکلی در اگزون 7 ژن *STAT5A*و نیز چند شکلی های دیگر در ژن های لپتین و *Pit-1* و همچنین همبستگی این جایگاه ها با صفات رشد، ضریب تبدیل غذایی و کیفیت لاشه در گاو نرهای سیاه و سفید لهستانی آزمون و نشان داده شد که گاوهای با ژنوتیپ CCدر مقایسه با ژنوتیپCT در صفات وزن زنده، راندمان خوراک و چندین صفت مرتبط به لاشه برتری داشتند (Oprządek et al., 2003).

[1]Interferon-γ
[2]Microarray

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 2- مقایسه فراوانی ژنی جایگاه *STAT5A* در مطالعه حاضر.

Table 2- Comparison of *STAT5A* gene frequency in the present study.

سطح احتمال P-value		فراوانی Frequency			
سیمنتال Simmental	هلشتاین Holstein	آلل B B allele	آلل A A allele	تعداد Number	نژاد Breed
0.7308	----	0.09	0.91	66	هلشتاین Holstein
----	0.7308	0.12	0.88	34	سیمنتال Simmental
سیمنتال Simmental	هلشتاین Holstein	BB	AB	AA	نژاد breed
0.5265	----	-	0.18	0.82	هلشتاین Holstein
----	0.5265	-	0.24	0.76	سیمنتال Simmental

جدول 3- مقایسه فراوانی ژنی جایگاه *STAT5A* در بین نژادهای مختلف.

Table 3- Comparison of STAT5A gene frequency in between different breeds.

سطح احتمال P-value		فراوانی ژنی Gene frequency			
سیمنتال ایرانی Iranian Simmental	هلشتاین ایرانی Iranian Holstein	آلل B B allele	آلل A A allele	تعداد Number	نژاد Breed
1.000	0.5308	0.125	0.875	279	هلشتاین چینی
0.7898	0.2802	0.15	0.85	150	سیاه و سفید لهستانی
0.4248	0.2103	0.195	0.805	18	شاروله
0.6657	0.3675	0.188	0.812	16	لیموزین
1.000	1.000	0.10	0.9	10	آبردین آنگوس
1.000	0.6504	0.125	0.875	16	هرفورد
1.000	1.000	0.091	0.909	11	سیمنتال

Archive of SID

www.SID.ir

جدول4- مقایسه فراوانی ژنوتیپی جایگاه *STAT5A* در بین نژادهای مختلف.

Table 4- Comparison of *STAT5A* genotype frequency in between different breeds.

P-value		فراوانی ژنی Gene frequency				
سیمنتال ایرانی Iranian Simmental	هلشتاین ایرانی Iranian Holstein	BB	AB	AA	تعداد Number	نژاد Breed
0.8770	0.4297	2	68	209	279	**هلشتاین چینی**
0.6629	0.2127	3	39	108	150	**سیاه و سفید لهستانی**
0.3450	0.0948	1	5	12	18	**شارولە**
0.3047	0.0940	-	6	10	16	**لیموزین**
0.8149	0.8901	-	2	8	10	**آبردین آنگوس**
0.9096	0.5370	-	4	12	16	**هرفورد**
0.7108	1.000	-	2	9	11	**سیمنتال**

با کشف یک چند شکلی دیگر در جایگاه ژنی *STAT5A* در اینترون 9 به اندازه 224جفت باز توسط روش SSCP، تفاوت معنی‌داری در صفات تولیدی گاوهای سیاه و سفید لهستان مشاهده نشد، ولی تولید شیر، درصد چربی و پروتئین در گاوهای جرزی تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) نشان داد. به طوری که گاوهای با ژنوتیپ GG تولید شیر بالاتری (415/7کیلوگرم) نسبت به گاوهای AA داشتند. تولید پروتئین در گاوهای AG به طور معنی داری از گاوهای AA بالاتر بود (12/3 کیلوگرم). گاوهای جرزی با ژنوتیپ AA بیشترین درصد چربی را نسبت به ژنوتیپ های دیگر در دوره شیردهی اول و دوم داشتند (Brym et al., 2004). به کمک آغازگرهای اختصاصی یک قطعه 15291 جفت بازی از ژن *STAT5A* در 886 راس گاو نژاد هلشتاین تکثیر و 12 چند شکلی تک نوکلئوتیدی (11 مورد آن در اینترون و یک مورد در اگزون) در مکان های متفاوت شناسایی شد، که یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در جایگاه اگزون 8 بر صفات مرتبط به تولید شیر اثر معنی دار داشت (Khatib et al., 2008). این چند شکلی تک نوکلئوتیدی (C/G) در

Archive of SID

www.SID.ir

موقعیت 12195 ژن *STAT5A* قرار داشت. فراوانی آلل C، 61 درصد و فراوانی آلل G، 39 درصد گزارش شده بود. مطالعات آن ها نشان داد که آلل G و ژنوتیپ GG در ارتباط با کاهش درصد چربی و پروتئین شیر نقش داشته است. در مطالعه ای 233 راس نژاد گاوهای قهوه ای ایتالیایی در جایگاه اگزون 7 ژن *STAT5A* مورد مطالعه قرار گرفتند (Selvaggia1 et al., 2009). در این مطالعه به کمک آنزیم *AvaI*، یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی در اگزون 7 شناسایی شد. این چند شکلی تک نوکلئوتیدی در موقعیت 6853 این ژن باعث تبدیل باز سیتوزین به تیمین می شود. فراوانی آللC، 83 درصد و فراوانی آلل T، 17 درصد گزارش شده بود. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که گاو های با ژنوتیپ CC شیر و پروتئین بیشتری نسبت به دو ژنوتیپ TT و TC تولید می کنند. همچنین برای مقدار چربی شیر تفاوت معنی داری را نیافتند. گزارشی مبنی بر وجود یک حذف سه نوکلئوتیدی CCT (واریانت B) در موقعیت 12549 در اینترون 15 با استفاده از تکنیک آنالیز هترودوپلکس در شش نژاد مختلف گاو ارائه شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی ژنوتیپ AA از 61 درصد در شاروله تا 83 درصد، در گاوهای فریزین و آنگوس قرمز متغیر و فراوانی آلل A بین 77 درصد تا 91 درصد برآورد شد (Flisikowski et al., 2003a). چند شکلی ژن *STAT5A* در دو جایگاه که جایگاه اول شامل بخشی از اینترون 9 و اگزون 10 (A/G) و جایگاه دوم بخشی از اینترون 15 و اگزون 16 (T/C) بود، مورد بررسی قرار گرفت و سپس رابطه این جایگاه ها با عملکرد صفات تولید شیر در گله گاوهای هلشتاین چینی مورد آزمون قرار گرفت که نتایج این مطالعه بیانگر سه نوع ژنوتیپ و هفت هاپلوتایپ در دو لوکوس بود (Bin et al., 2008). در مطالعه مذکور اگر چه مقدار شیر تولیدی در گاوهای با ژنوتیپ AA بالاتر بود، ولی از نظر آماری تفاوت معنی داری را نشان نداد. اما، در دوره شیردهی دوم، درصد تولید پروتئین شیر در گاوهای با ژنوتیپ AB به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج فراوانی آللی و ژنوتیپی این محققین با نتایج مطالعه حاضر از لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول 3). چند شکلی نوکلئوتیدی اگزون 16 ژن *STAT5A* نیز مورد مطالعه قرار گرفت که در این مطالعه ارتباط بین این چند شکلی (T/C) با صفات تولید شیر در گله گاوهای سیاه و سفید لهستانی برآورد شد (Flisikowski et al., 2004). پژوهش این محققین نشان داد که گاوهای با ژنوتیپ CT به طور معنی داری تولید شیر بیشتری نسبت به گاوهای با ژنوتیپ TT دارند. فراوانی ژنوتیپی

Archive of SID

www.SID.ir

در این مطالعه برای ژنوتیپ های TT، TC و CC به ترتیب 72، 26 و 2 درصد و فراوانی آللی T و C نیز 85 و 15 درصد برآورد شد. همان طور که در جدول 3 نشان داده شد تفاوت معنی داری بین وفور آللی و ژنوتیپی مورد مطالعه این محققین با پژوهش حاضر وجود نداشت. در مطالعه مذکور یک جانشینی T به C در اگزون 16 به طور معنی داری روی تولید شیر، پروتئین شیر و لاکتوز اثر داشت. با توالی‌یابی قطعه 281 جفت بازی در اینترون 15و اگزون 16، دو موتاسیون شامل یک حذف CCT در موقعیت 12549 در اینترون 15 و یک جایگزینی T→C در موقعیت 12743 در اگزون 16 (واریانت C) مشاهده شد. موتاسیون دوم توسط آنزیم محدودگر *MslI* قابل تشخیص است که دو آلل T وC را نشان می‌دهد و باعث جایگزینی اسید آمینه Val/Ala در موقعیت 686 می شود. فراوانی آللT بین 76 تا 91 درصد در نژادهای مختلف، متغیر بود. در این مطالعه فعالیت باند پذیری DNA در واریانت های ژنتیکی مختلف *STAT5A* اندازه گیری شد که تفاوت بین همه ژنوتیپ ها مشاهده اما فقط بین دو ژنوتیپ TT و CC این تفاوت معنی دار بود ($P<0.05$). به طوری که حیوانات با ژنوتیپ CC ظرفیت باند پذیری DNA کمتری را نسبت به دیگر ژنوتیپ ها از خود نشان دادند. به هر حال چند شکلی در این ناحیه ممکن است منجر به تغییرات در خصوصیات فعال سازی پروتئین *STAT5A* شود و نهایتا روی سطح بیان ژن هایی که توسط این فاکتور رونویسی تنظیم می شوند اثر بگذارد (Flisikowski et al., 2003c). با توجه به مطالعات صورت گرفته در جایگاه مورد مطالعه، هنوز هم نمی توان ادعا کرد که این جایگاه بتواند به عنوان نشانگری برای صفات تولید شیر در برنامه های انتخاب بر اساس نشانگرعمل نماید، چرا که نیاز به مطالعات بیشتر در زمینه های تعیین چند شکلی و ارتباط آن با این صفات در جمعیت های بزرگ دارد. در تحقیقی بررسی چند شکلی در ژن *STAT5A* در نژادهای سیمنتال و هلشتاین ایرانی مورد بررسی قرار گرفت وجایگاه مورد نظر که شامل بخشی از اینترون 15 و اگزون 16 بود با تکنیک PCR- RFLP و با استفاده آنزیم برشی *Hinf1* برای اولین بار مورد آزمون قرار گرفت (Babaie, 2009). نتایج این مطالعه نمایانگر عدم وجود چند شکلی در جایگاه مورد مطالعه در هر دو نژاد سیمنتال و هلشتاین بود. اما، مطالعه حاضر نشان داد بر خلاف تکنیک PCR-RFLP که با استفاده از آنزیم برشی *Hinf1* قادر به شناسایی چند شکلی در این جایگاه مارکری نبود، اما تکنیک PCR-SSCP توانایی شناسایی چند شکلی در جایگاه مورد نظر را داشته است. لذا به دلیل سرعت

Archive of SID

www.SID.ir

زیاد، سادگی و ارزان بودن روش PCR-SSCP در مقایسه با PCR-RFLP، می توان نتیجه گیری نمود که این تکنیک می تواند جایگزین مناسبی به جای PCR-RFLP برای شناسایی چند شکلی آللی در این جایگاه ژنی مورد توجه قرار گیرد.

منابع

Akira S (1999). Functional roles of STAT family proteins: Lessons from knockout mice. Stem Cells 17:138–146.

Antonioue D, Hirtsb J, Groszm J, Skidmorec J (1999). A single strand conformation polymorphism in the bovine gene STAT5A. Animal Genetic 30: 225-244.

Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA (2004). Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health and reproductive traits in Holstein cattle. Journal of Dairy Science 87:468–475.

Babaie M (2009). Association of allelic polymorphisms in STAT5A, GHR, GH and PIT1 in Holestain and Semmintal cows. M.Sc. thesis, Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University Pp. 138.

Bin B, Xing-tang F, Hong C, Run –feng ZH, Lin-jun Y, Hai-jun ZH(2008). Polymorphisms of SATA5A gene and its association with milk performance traits in Chinese Holstein cattle. Scientia Agricultura Sinica 41: 1872-1878.

Boutinaud M, Jammes H(2004). Growth hormone increases STAT5 and STAT1 expression in lactating goat mammary gland: A specific effect compared to milking frequency. Domestic Animal Endocrinology 27: 363–378.

Bromberg J(2001). Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development. Journal of Breast Cancer Research and Treatment 2: 86–90.

Brym P, Kaminski S, Ruœæ A (2004). New SSCP polymorphism within bovine STAT5A gene and its associations with milk performance traits in Black-and-White and Jersey cattle. Journal of Applied Genetics 45: 445-452.

Cobanoglu O, Zaitoun I, Chang YM, Shook GE, Khatib H (2006). Effects of the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gene on milk production traits in Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science 89: 4433-4437.

Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Loor JJ, Everts-van der Wind A, Lee JH, Drackley JK, Band MR, Hernandez AG, Shani M, Lewin HA, Weller JI, Ron M (2005). Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. Journal Genome Research 15: 936–944.

Archive of SID

www.SID.ir

Darnell J.E (1997). STATs and gene regulation. Science, 277: 1630-1635

Darnell JE, Kerr IM, Stark GR(1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science 264: 1415-1421.

Flisikowski K, Zwierzchowski L(2003a). Polymerase chain reaction – heteroduplex (PCR-HD) polymorphism within the bovine STAT5A gene. Journal of Applied Genetics 44: 185-189.

Flisikowski K, Oprządek J, Dymnicki E, Zwierzchowski L(2003b). New polymorphism in the bovine STAT5A gene and its association with meat production traits in beef cattle. Animal Science Papers and Reports 21: 147-157.

Flisikowski K, Szymanowska M, Zwierzchowski L(2003c). The DNA-binding capacity of genetic variants of the bovine STAT5A transcription factor. Cellular & Molecular biology Letters 8: 831-840

Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Cambisano N, Mni M, Reid S, Spelman R, George M, Snell R (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. Journal of Genome Research 12: 222–231.

Khatib H, Monson RL, Schutzkus V, Kohl DM, Rosa GM, Rutledge JJ (2008). Mutations in the STAT5A Gene Are Associated with Embryonic Survival and Milk omposition in Cattle. Journal of Dairy Science 91: 784-793.

Mosig M, Lipkin E, Khutoreskaya G, Tchourzyna E, Soller M, Friedmann A (2001). A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk protein percentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion. Genetics 157: 1683–1698.

Oprządek J, Flisikowski K, Zwierzchowski L, Dymnicki E (2003). Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. Animal Science Papers and Reports 21: 135-145.

Ron M, Feldmesser E, Golik M, Tager-Cohen I, Kliger D, Reiss V, Domochovsky R, Alus O, Seroussi E, Ezra E, Weller JI (2004). A complete genome scans of the Israeli Holstein population for quantitative trait loci by a daughter design. Journal of Dairy Science 87: 476–490.

Selvaggia1 M, Darioa1 C, Normannoa1 G, Celanoa1 GV, Dario M (2009). Genetic polymorphism of STAT5A protein: relationships with production traits and milk composition in Italian Brown cattle. Journal of Dairy Research 76: 441-445.

Stewart WC, Morrison RF, Young SL, StephensJ M(1999). Regulation of signal transducers and activators of transcription (STATs) by effectors of adipogenesis: Coordinate regulation of STATs 1, 5A, and 5B with peroxisome proliferator-activated receptor- γ and C/AAAT enhancer binding protein-α. Journal of Biochimica Biophysica Acta 1452: 188–196.

Archive of SID

www.SID.ir

Wakao H, Gouilleux F, Groner B (1994). Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine-regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. EMBO 13: 2182-2191.

Watson CJ(2001). Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 6: 115–127.

Comparison of polymorphism of *STAT5A* gene in Simmental and Holstein cows

Najafy M.*[1], Rahimi G.[2], Babaie M.[3], Ansari Z.[4]

[1] M.Sc. student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[2] Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[3] M.Sc. graduated student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
[4] Assistant professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

Abstract

Signal transducer and activator of transcription 5A*(STAT5A)* is a crucial signaling protein mediating the biological effects of prolactin hormone which in turn activates the transcription of milk proteins genes. In order to study the polymorphisms of *STAT5A* gene total blood samples were collected randomly from one hundred of Holstein and Simmental cattle. DNA was extracted using modified salting out method and polymerase chain reactions (PCR) were carried out using a specific primer pairs for amplification a fragment of 281 bp from part of exon 15 and intron 16 of *STAT5A* gene. All of individuals were genotyped by single stranded conformation polymorphism (SSCP) analyses using silver staining. Two SSCP patterns of A and B were identified with the frequency of 0.91 and 0.09 and 0.88 and 0.12 in Holstein and Simmental cattle, respectively. Two genotypes of AA (0.82) and AB (0.18) were found in Holstein and AA (0.76) and AB (0.24) in Simmental individuals. The results revealed that the marker site of STAT5A gene is polymorph in studied Holstein and Simmental cattle and the SSCP technique has a great potential for detection of such polymorphism. Furthermore, a comparison of gene and genotype frequencies showed no any statistical differences (P>0.05) between Holstein and Simmental cattle breed that have genotyped in the present study.

Keywords: *Polymorphism, PCR-SSCP, STAT5A, Holstein and Simmental cow.*

* Corresponding Author: Najafy M. Tel: 09132625020 Email: mojtaba_najafy@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir