بررسی چند شکلی ژن لپتین در گاوهای نر هلشتاین ایران

رامین محمد قاسملو[1] ، ناصر امام جمعه کاشان[2] ، سیروس امیری نیا[3] ، داود کلبه داری[4] ، محمد باقر صیاد نژاد[5]

چکیده

برای تعیین چندشکلی در ژن لپتین گاو و بررسی ارتباط آن با صفات تولید، از DNA تعداد ۵۹ راس گاو نر پروف شده داخل کشور که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور استخراج گردید، استفاده شد. با استفاده از روش PCR ، یک قطعه با اندازه ۵۸۱ جفت باز از ژن لپتین (شامل اگزون دو، قسمتی از اینترون یک و قسمتی از اینترون دو) تکثیر شد. سپس با استفاده از آنزیم برش دهنده Bsec1 ، قطعه مورد تکثیر هضم شد. چندشکلی مورد نظر یک جانشینی یک نوکلئوتیدی (تبدیل آدنین (A) به تیمین (T)) در موقعیت ۴۱۳ قطعه مورد تکثیر می باشد که منجر به تبدیل اسید آمینه تیروزین (tAt) به فنیل آلانین (tTt) می شود. در شکل وحشی (آلل A)، یک جایگاه شناسایی (AT↓CGAT) برای آنزیم برش دهنده Bsecl وجود دارد که قطعه مورد تکثیر را در آن ناحیه برش می دهد و دو قطعه با اندازه های ۱۶۹ و ۴۱۲ جفت باز حاصل می شود. در آلل جهش یافته (آلل T)، قطعه مورد نظر برش نمی خورد و بنابراین یک قطعه با اندازه ۵۸۱ جفت باز حاصل می‌شود. در تحقیق حاضر، هر سه نوع باند با اندازه های ۱۶۹ ، ۴۱۲ و ۵۸۱ جفت باز مشاهده شد که وجود چندشکلی را در جامعه مورد مطالعه نشان می دهد. دو ژنوتیپ AA و AT به ترتیب با تعداد ۵۸ و یک نمونه در این جامعه مشاهده شد. فراوانی آلل وحشی (A)، ۹۹/۱۵ درصد و فراوانی آلل جهش یافته (T)، ۰/۸۵ درصد بود. نتایج سایر تحقیقات نیز کم بودن فراوانی آلل جهش یافته (T) را در نژادهای مختلف نشان می دهد.

واژه های کلیدی : ژن لپتین ، روش PCR ،گاوهای نر هلشتاین.

مقدمه

در موش های خانگی چاق (با ژنوتیپ ob/ob) هورمونی شناسایی شده که آن را لپتین نامیده اند (۶). هورمون لپتین ناشی از بیان ژن چاقی می باشد. این ژن که به طور اختصاصی در بافت چربی بیان می شود (۱۱)، در سال ۱۹۹۴ در موش های با ژنوتیپ ob/ob تشخیص داده شد (۱۵). در گاو این ژن بر روی کروموزوم شماره چهار قرار دارد و دارای سه اگزون و دو اینترون می باشد (۲) که اگزون شماره یک (۶) و ۲۸ نوکلئوتید ابتدای اگزون شماره دو به پروتئین لپتین ترجمه نمی شوند (۴). هورمون لپتین ۱۴۶ اسیدآمینه، ۱۶ کیلو دالتون وزن مولکولی و ساختمان ملکولی مارپیچی دارد و به عنوان یک شاخص میزان چربی و انرژی در بدن عمل می کند. بنابراین مقدار این هورمون در خون به مقدار ذخایر چربی بدن بستگی دارد (۶).

۱- کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- استاد گروه علوم دامی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳- استادیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۴- استادیار گروه علوم دامی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۵- کارشناس ارشد مرکز اصلاح نژاد دام کشور

Archive of SID

www.SID.ir

هورمون لپتین در تنظیم وزن بدن، متابولیسم و تنظیم فعالیت های تولید مثل نقش عمده دارد (۶). همچنین به دلیل مشاهده همبستگی ژنتیکی بین صفات تولیدمثل، تعادل انرژی، وزن زنده (۱۴)، احتمال همبستگی بین ژن لپتین و صفات تولید شیر نیز وجود دارد. البته باید توجه داشت که در گاو جایگاه های صفت کمی (QTL) تولید شیر در نزدیکی ژن لپتین گزارش شده است (۹). این QTL ها برای صفات مقدار چربی و مقدار پروتئین شیر به ترتیب در فاصله های ۶۵ و ۸۵ سانتی مورگان از این ژن گزارش شده اند (۹). چندشکلی های زیادی در ژن لپتین در ارتباط با صفات مختلف تولید و تولیدمثل در گاو گزارش شده است. در یک تحقیق نشان داده شد که تولید روزانه شیر در تلیسه های با ژنوتیپ AB نسبت به ژنوتیپ AA ، ۱/۲۳ کیلوگرم بیشتر است (۸). در یک تحقیق دیگر نشان داده شد که بین چند شکلی RFLP – Sau3AI و صفات تولید مثل ارتباط وجود دارد. در این تحقیق مشخص شد که وجود آلل LEPSau3AI ، سبب افزایش فاصله زایش به مدت ۸۱ روز می شود (۱). در سال ۲۰۰۰ یک جهش جدید در ژن لپتین گاو معرفی شد (۳). این چندشکلی ممکن است یک نشانگر برای درصد چربی شیر باشد (۸) و اثر آن بر تولید شیر و پروتئین معنی دار است (۱۰). مشخص شده است که ریز ماهواره BM1500 با غلظت لپتین در طول آبستنی همبستگی دارد ولی بر غلظت آن در طول شیردهی اثر ندارد (۷).

در سال ۲۰۰۳ یک چندشکلی یک نوکلئوتیدی (252-SNP) در اگزون شماره دو ژن لپتین گاو معرفی شد. این چندشکلی عبارت از جانشین شدن آدنین (A) با تیمین (T) (در نوکلئوتید شماره ۱۱۲۷ در توالی کامل ژن لپتین (۴)) می باشد که سبب تبدیل اسید آمینه تیروزین (tAt) به فنیل آلانین (tTt) می شود (۵). مشخص شد که ارتباط این چندشکلی با مصرف خوراک معنی دار است (۵). در این تحقیق همچنین نشان داده شد که فراوانی آلل جهش یافته (T) در نژادهای فریزین بریتانیایی ، آبردین آنگوس، هرفورد، هایلند و شارولە به ترتیب ۴/۰۸ ، ۳/۵۷ ، ۱۲/۰۰ ، صفر و ۱۵/۱۸ درصد می باشد (۵). همچنین فراوانی آلل جهش یافته (T) در چهار نژاد آنگوس، لیموزین، شارولە و سیمنتال به ترتیب ۴/۶ ، ۵/۰ ، ۹/۱ و ۲/۲ درصد گزارش شده است (۱۲و۱۳). در ضمن ارتباط این چندشکلی با صفات لاشه معنی دار است (۱۲و۱۳).

در تحقیق حاضر چند شکلی ژن لپتین در ۵۹ نمونه از گاوهای نر هلشتاین ایران با روش PCR-RFLP تعیین می گردد.

مواد و روش ها

در این تحقیق با استفاده از اطلاعات موجود در مرکز اصلاح نژاد دام کشور، از DNA مربوط به ۵۹ نمونه اسپرم منجمد گاوهای نر پروف شده داخل کشور در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور استفاده شد. به منظور تکثیر قطعه مورد نظر در واکنش PCR ، از یک جفت آغازگر استفاده شد. توالی این آغازگرها به شرح زیر می باشد:

Forward : 5́ - GTGGGGGATACAGGGGAGTTTT - 3′
Reverse : 5́ - ACGGGATGGCCACGGTTCTAC - 3́

واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرو لیتر (شامل ۱۰۰–۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده، بافر PCR با غلظت ۱ X ، کلرید منیزیوم با غلظت ۱/۵ میلی مولار، آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی با غلظت ۰/۳ میکرو مولار برای هر آغازگر ، دی اکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار و یک واحد آنزیم DNA Taq پلی مراز)

Archive of SID

www.SID.ir

انجام شد. واکنش های PCR با برنامه حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتیگرادبه مدت دو دقیقه (یک چرخه) – ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (۳۵ چرخه) – ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه (یک چرخه) انجام شدند. محصول PCR یک قطعه ۵۸۱ جفت بازی می باشد که شامل قسمتی از اینترون یک، اگزون دو و قسمتی از اینترون دو ژن لپتین گاو می باشد. محصول PCR بر روی ژل آکریل آمید هشت درصد، در ولتاژ ۳۰۰ و به مدت سه ساعت الکتروفورز شد. ب رای هضم فرآورده های PCR از آنزیم برش دهنده BsecI استفاده شد. جایگاه برش این آنزیم توالی $AT^{\downarrow}CGAT$می باشد. واکنش هضم آنزیمی در حجم ۱۰ میکرولیتر و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در طول شب انجام شد. در این واکنش شش میکرو لیتر محصول PCR توسط سه واحد آنزیم برش دهنده هضم شد . فرآورده های حاصل از هضم آنزیمی در ژل آگارز دو درصد در ولتاژ ۱۴۰ و به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز شد. سه باند با اندازه های ۱۶۹، ۴۱۲ و ۵۸۱ جفت باز در نمونه های مورد بررسی مشاهده شد. وجود باندهای با اندازه ۱۶۹ و ۴۱۲ جفت باز، برش خوردن قطعه DNA مورد تکثیر را در نقطه مورد نظر نشان می دهد و باند با اندازه ۵۸۱ جفت باز نشان از عدم برش در آن نقطه است.

نتایج و بحث

برای بررسی چندشکلی در ژن لپتین گاو، یک قطعه دارای ۵۸۱ جفت باز (شامل اگزون دو، قسمتی از اینترون یک و قسمتی از اینترون دو) توسط روش PCR تکثیر شد. چندشکلی مورد نظر یک جانشینی یک نوکلئوتیدی(تبدیل آدنین (A) به تیمین (T)) در موقعیت ۴۱۳ قطعه مورد تکثیر می باشد که منجر به تبدیل اسید آمینه تیروزین (tAt) به فنیل آلانین (tTt) می شود. در شکل وحشی (آلل A)، یک جایگاه شناسایی ($AT^{\downarrow}CGAT$) برای آنزیم برش دهنده BsecI وجود دارد که قطعه مورد تکثیر را در آن ناحیه برش می دهد و دو قطعه با اندازه های ۱۶۹ و ۴۱۲ جفت باز حاصل می شود. در حالت جهش یافته (آلل T) (TTCGAT) قطعه مورد نظر برش نمی خورد و بنابراین یک قطعه ۵۸۱ جفت بازی حاصل می شود. بعد از تکثیر قطعه مورد نظر با روش PCR و هضم آنزیمی، سه باند با اندازه های ۱۶۹، ۴۱۲ و ۵۸۱ جفت بازی حاصل شد که وجود چند شکلی را در جامعه مورد مطالعه نشان می دهد. در ۵۸ نمونه دو باند با اندازه های ۱۶۹ و ۴۱۲ جفت بازی و در یک نمونه سه باند با اندازه های ۱۶۹، ۴۱۲ و ۵۸۱ جفت بازی حاصل شد. بنابراین ۵۸ رأس از گاوهای نر دارای ژنوتیپ هموزیگوت وحشی (AA) و یک گاو نر هتروزیگوت (AT) می باشد. در این تحقیق ژنوتیپ هموزیگوت جهش یافته (TT) مشاهده نشد. بدین ترتیب فراوانی آلل وحشی (A)، ۹۹/۱۵ درصد و فراوانی آلل جهش یافته (T)، ۰/۸۵ درصد می باشد.

نتایج نشان می دهد که فراوانی آلل جهش یافته (T) در جامعه مورد مطالعه بسیار کم است. در یک تحقیق روی ۴۹ گاو نژاد فریزین بریتانیایی مشخص شد که فراوانی آلل جهش یافته ۴/۰۸ درصد می باشد. در جامعه مزبور تعداد حیوانات با ژنوتیپ AA و AT به ترتیب ۴۵ و چهار بود و ژنوتیپ TT نیز مشاهده نشد (۵). همچنین فراوانی آلل جهش یافته (T) در چهار نژاد آبردین آنگوس، هرفورد، هایلند و شاروله به ترتیب ۳/۵۷ ، ۱۲ ، صفر و ۱۵/۱۸ درصد گزارش شده است (۵). فراوانی آلل مزبور (T) در چهار نژاد آنگوس، لیموزین، شاروله و سیمنتال نیز به ترتیب ۴/۶ ، ۵/۰ ، ۹/۱ و ۲/۲ درصد برآورد شده است (۱۲و۱۳).

تحقیقات نشان داده است که آلل جهش یافته (T) با صفات مختلف ارتباط دارد. در یک تحقیق بر روی ۱۶۹ رأس گوساله نر آمیخته نسل دوم مشخص شد که میانگین مصرف خوراک در حیوانات با ژنوتیپ AT در مقایسه با

Archive of SID

www.SID.ir

حیوانات AA ، ۱۹ درصد بیشتر است (P = ۰/۰۴۳). در این تحقیق ژنوتیپ TT مشاهده نشد (۵). در یک تحقیق بر روی ۱۱۱۱ گاو نژاد گوشتی مشخص شد که اثر آلل T با کاهش تولید چربی و افزایش تولید گوشت معنی دار است (P < ۰/۰۵) (۱۳). در یک تحقیق دیگر بر روی ۸۰۰ گاو نژاد گوشتی مشخص شد که میزان چربی لاشه در حیوانات با ژنوتیپ AT نسبت به حیوانات با ژنوتیپ AA کمتر است (P = ۰/۰۰۷) (۱۲). تحقیقات نشان داده است که فراوانی آلل جهش یافته (T) در نژادهای مختلف بسیار کم و در برخی نژادها صفر است. در تحقیق حاضر فقط در یک حیوان یک آلل جهش یافته (T) مشاهده شد (ژنوتیپ AT). لذا با توجه به تعداد نمونه مورد استفاده بررسی رابطه چند شکلی این ژن با صفات تولید در گاوهای نر هلشتاین ایران ممکن نشد. که این امر می تواند به عنوان تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Almeida, S. E. M. Almeida, E. A. Moraes, J. C. F. Weimer, T. A. 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. J. Animal. Breed. Genet. 120:106-113.

2- Gerritsen, R. Liefers, S. Van der Lende, T. 2002. Localisation of a functional mutation on the leptin gene, which is associated with milk production.

3- Haegeman, A. Van Zeveren, A. Peelman, L. J. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. Anim. Genet. 31:79.

4- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

5- Lagonigro, R. Wiener, P. Pilla, F. Woolliams, J. A. Williams, J. L. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Anim Genet. 34(5):371–374.

6- Liefers, S. 2004. Physiology and genetics of leptin in periparturient dairy cows. Ph.D.Thesis. Animal Breeding and Genetics, Wageningen University, Wageningen and Division of Animal Resources Development, Animal Sciences Group, Lelystad.

7- Liefers, S. C. Te pas, M. F. W. Veerkamp, R. F. Chilliard, Y. Delavaud, C. Gerritsen, R. Van der lende, T. 2003. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. Mamm. Genome. 14:657-663.

8- Liefers, S. C. Te Pas, M. F. W. Veerkamap, R. F. Van der Lende, T. 2002. Associations between leptin gene polymorphism and production, live weight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. J. Dairy Sci. 85:1633-1638.

9- Lindersson, M. Andersson-Eklund, L. De Koning, D.-J. Lundén, A. Mäki-Tanila, A. Andersson, L. 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. J. Dairy Sci. 81:1454-1461.

10- Madeja, Z. Adamowicz, T. Chmurzynska, A. Jankowski, T. Melonek, J. Switonski, M. Strabel, T. 2004. Effect of leptin gene polymorphism on breeding value for milk production traits. J. Dairy Sci. 87:3925-3927.

11- Robert, C. Palin, M. F. Coulombe, N. Roberge, C. Silversides, F. G. Benkel, B. F. McKay, R. M. Pelletier, G. 1998. Backfat thickness in pigs is positively associated with leptin mRNA levels. Can. J. Anim. Sci. 78:473-482.

12- Schenkel, F. S. Miller, S. P. Moore, S. S. Li, C. Fu, A. Lobo, S. Mandell, I. B. Wilton, J. W. 2006. Association of SNPs in the leptin and leptin receptor genes with different fat depots in beef cattle. 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, Belo Horizonte, MG, Brasil.

13- Schenkel, F. S. Miller, S. P. Ye, X. Moore, S. S. Nkrumah, J. D. Li, C. Yu, J. Mandell, I. B. Wilton, J. W. Williams, J. L. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J. Anim. Sci. 83:2009-2020.

14- Veerkamp, R. F. Oldenbroek, J. K. Van der Gaast, H. J. Van der Werf, J. H. 2000. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. J. Dairy Sci. 83:577-583.

15- Zhang, Y. Proenca, R. Maffei, M. Barone, M. Leopold, L. Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 372:425-432.

Archive of SID

www.SID.ir

Associations Between Leptin Gene and Milk Production in Holstein Cattle of Iran

Mohammad Ghasemlo.R.,[۱] N.Emam Jome Kashan.[1], S.Amirinia[۲] .,D.Kolbedari .,[1] M.B.Sayyadnejad[۳]

Abstract

To study the polymorphism of bovine lepton gene, 59 Iranian proven Holstein bulls are genotyped. The PCR was used to amplify a 581bp fragment including part of intone 1, axon 2 and part of intone 2. Digestion of PCR products were performed with Bsec1 (AT$^{\downarrow}$CGAT). The studied polymorphism is an A to T substitution at position 413 of amplified fragment (in axon 2) resulting in Tyrosine to phenylalanine substitution. In wild type (A allele), the amplified fragment is digested and give two fragments of 412bp and 169bp. In mutant type (T allele), the amplified fragment is not digested. In present study, the allele frequency was estimated 99.15 and 0.85 percentage for A and T allele, respectively. The results of other studies have also shown low frequency of mutant allele (T) in different breeds.

Key words : Leptin gene , PCR , Holstein

Archive of SID

[۱] Tehran University Aboreyhan Pradis

[۲] Animal Science Research Institute, P.Box : 31585-1483

[۳] Iranian Animal Breeding center

www.SID.ir