ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ۱۰۴-۱۰۱

بررسی ارتباط چند شکلی آللی ژن *DGAT1* با بیماری ورم پستان در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران

حامد خراتی کوپایی*[۱]، محمدرضا محمدآبادی،[۲] علیرضا ترنگ[۳]، محمود خراتی کوپایی[٤]، علی اسماعیلی زاده کشکوئیه[٥]

۱- دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۲ و ۵- دانشیاران بخش علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۳- استادیار بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال کشور (رشت)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

٤- استادیار بخش آمار دانشگاه شیراز.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:hmd_kh_ko@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۱- تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

چکیده

در این پژوهش ۳۹۸ نمونه خون از گاوهای شیری هلشتاین در ایران جمع‌آوری و با استفاده از PCR یک قطعه ٤۱۱ جفت‌بازی از اگزون شماره ۸ ژن *DGAT1* تکثیر شد. تعیین ژنوتیپ افراد با استفاده از تکنیک RFLP-PCR انجام گرفت. نتایج نشان داد ۳٦ فرد دارای ژنوتیپ KK، ۲۲٦ فرد دارای ژنوتیپ KA و ۱۳٦ فرد دارای ژنوتیپ AA می‌باشند و فراوانی‌های آلل‌های K و A (آلل جهش یافته) به ترتیب برابر با ۰/۳۷ و ۰/٦۳ برآورد گردید. ارتباط ژنوتیپ‌های افراد برای این ژن با شمارش سلول‌های بدنی موجود در شیر به عنوان معیار اندازه‌گیری ورم پستان مورد بررسی قرار گرفت. نتاج این پژوهش نشان داد که هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و سلول‌های بدنی شیر مشاهده وجود ندارد (P>۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی

ژن *DGAT1*،
سلول‌های بدنی شیر و ورم پستان.

ورم پستان به آماس غده‌های پستانی گفته می‌شود که بیشتر در پی عفونت‌های باکتریایی بوجود می‌آید. این بیماری می‌تواند زیان‌های اقتصادی قابل توجهی را به گله‌های صنعتی وارد نماید (Zamiri 2006). برای نمونه، در پژوهشی که در گاوداری‌های صنعتی استان اصفهان انجام گرفت مشخص شد که به ازای افزایش هر ۱۰۰ هزار سلول بدنی در هر میلی لیتر نمونه شیر، تولید شیر حدود ۱/۵ لیتر کاهش می‌یابد و در صورتی‌که تعداد سلول‌های بدنی از ۹۰۰ هزار در هر سی سی شیر بیشتر باشد کاهشی در حدود ۵ کیلوگرم و یا بیشتر از ٦ کیلوگرم در تولید شیر روزانه را سبب می‌شود (Zamani et al. 2009). در حالت زیر کلینیکی تشخیص این بیماری تنها با روش‌های آزمایشگاهی امکان‌پذیر است.

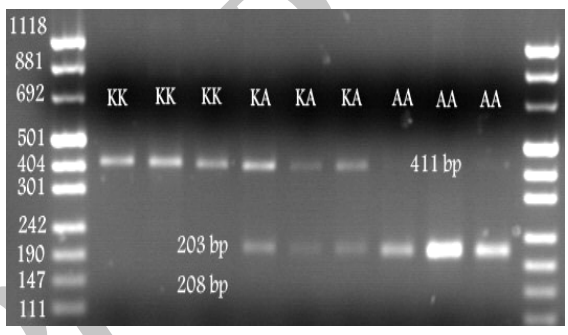
Archive of SID

از مهم‌ترین روش‌های آزمایشگاهی می‌توان به شمارش سلول‌های بدنی[1]، رسانایی الکتریکی، CMT[2] و MMT[3] اشاره کرد. از آن‌جا که عفونت پستان موجب وارد شدن گلبول‌های سفید بسیاری از خون به شیر می‌گردد لذا با شمارش سلول‌های بدنی می توان به وجود بیماری ورم پستان پی برد. معمولاً در این روش تعداد ۲۰ تا ۲۰۰ هزار سلول در هر سی سی نشان دهنده سالم بودن غده پستانی می‌باشد (Zamiri 2006). یکی از دلایل اصلی اهمیت دادن به سلول‌های بدنی همبستگی بالای ژنتیکی (۰/۷) با بیماری ورم پستان می باشد. در طرح‌های نقشه یابی QTL مشخص شد که یک ژن کاندید بالقوه (*DGAT1*) در انتهای سانترومری کروموزوم شماره ١٤ برای درصد چربی و تولید شیر وجود دارد. این ژن با کد کردن آنزیم دی آسیل گلیسرول اسیل ترانسفراز نقش اصلی را در سنتز تری گلیسرید و در نهایت چربی شیر دارد. ایجاد یک جهش تک نوکلئوتیدی هم جنس[4] باعث تبدیل گوانین به آدنین و منجر به جایگزینی آلانین به جای لیزین در آنزیم می‌گردد (Grisart et al. 2002). مشخص شده است که گاوهای شیری انرژی زیادی را برای تولید چربی مصرف می‌کنند، زیرا چربی نقش بسزایی را در باروری و سلامت پستان‌ها ایفا می‌کند (Kaupe et al. 2007). با توجه به اینکه ژن *DGAT1* نقش اصلی را در سنتز چربی بدن بر عهده دارد می‌تواند بر سلامت پستان تاثیر داشته باشد. با توجه به همبستگی ژنتیکی که بین ارزش اصلاحی SCS و طول عمر تولید مثلی وجود دارد (Kaupe et al. 2007) و اینکه اثر ژن *DGAT1* بر برخی از صفات تولید مثلی معنی‌دار گزارش شده است، لذا ژن*DGAT1* می‌تواند بر تعداد و نمره سلول‌های بدنی تاثیر گذار باشد. QTLهای موثر به روی ورم پستان نیز شناسایی گردیده است، برای نمونه چهار QTL روی کروموزوم‌های ۸، ۱۰، ۱۱ و۲۱ برای نمره سلول‌های بدنی در جمعیت گاوهای هلشتاین شناسایی گردیده است. از تجزیه ترکیبی ژن *DGAT1* همراه با ژن ۱۱- بتا هیدروکسی لیز (CYP11B1) اثر معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و نمره سلول‌های بدنی شیر مشاهده نگردید (Kaupe et al. 2007). ناسلند و همکاران (۲۰۰۸) و بری و همکاران (۲۰۱۰) هیچ گونه اثر معنی داری بین ژن DGAT1 و رکوردهای سلول‌های بدنی شمارش شده مشاهده نکردند. در این پژوهش ۳۹۸ نمونه خون از ۱۰ گله از استان‌های اصفهان و تهران جمع‌آوری گردید. فقط رکورد تعداد ٢١٤ راس از این گاوها برای تعداد سلول‌های بدنی شیر در دسترس بود. استخراج DNA با استفاده از روش نمکی انجام گرفت (Lien et al. 1990). برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای رفت 5′-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3′ و برگشت 5′-GGAAGCGCTTTCGGATG-'3 استفاده شد (Kaupe et al. 2004). سیکل‌های حرارتی PCR به صورت زیر انجام گرفت: واسرشته سازی اولیه: دمای ٩٤°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در ٩٤°C و به مدت ٦٠ ثانیه، اتصال به مدت ٦٠ ثانیه در دمای ٦٠°C و سنتز در دمای ٧٢°C و به مدت ٦٠ ثانیه. سنتز نهایی: به مدت۷ دقیقه و در دمای ٧٢°C. واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرو لیتر و با استفاده از مواد استاندارد آن انجام شد. با انجام واکنش PCR قطعه ٤١١ جفت‌بازی از ژن *DGAT1* تکثیر شد. برای شناسایی تغییرات آلل ژن *DGAT1*، ۵ میکرولیتر از DNA تکثیر شده با ۲ واحد از آنزیم برشی*Cfr*I به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد هضم شد. محصولات برش داده شده در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و در نهایت ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. آلل K با آنزیم برشی بریده نمی‌شود و آلل A بریده خواهد شد. محاسبه فراوانی‌های آللی، ژنوتیپی و بررسی تعادل هاردی-وینبرگ با استفاده از نرم افزار Pop Gene انجام شد (Nei 1977). نرمال‌سازی داده‌های SCC با استفاده از نسخه ۱۳/۲ نرم افزار MINITAB و تبدیل Box-Cox انجام شد (λ= ۰/۳٤). با استفاده از نسخه ١٦ نرم افزار SPSS و رویه GLM اثر ژنوتیپ های بدست آمده در قالب یک مدل اثرات ثابت روی رکوردهای فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری مورد استفاده بصورت زیر بود: $Y_{ijkl}= \mu +G_i+S_j+C_k+e_{ijkl}$ در این مدل، Y_{ijkl}: نشان دهنده هر مشاهده، μ: اثر میانگین، G: نشان‌دهنده اثر ژنوتیپ در سه سطح، S: اثر گله در شش سطح، C_k: اثر سال زایش در چهار سطح و e: اثر عوامل ناشناخته یا خطا. بر اساس نحوه برش آنزیم سه نوع ژنوتیپ AA،KA،KK قابل مشاهده بودند.

[1] Somatic cell count
[2] California mastitis test
[3] Michigan mastitis test
[4] Transition

Archive of SID
www.SID.ir

افراد KK، بدون جهش افراد KA دارای یک آلل جهش‌یافته و افراد AA در هر دو آلل آن‌ها جهش صورت گرفته است. افرادی که تنها در ناحیه ٤١١ جفت‌بازی دارای باند هستند، جهش در آن ها رخ نداده است و به شکل وحشی باقی مانده‌اند. افرادی که در دو ناحیه ٤١١ جفت بازی و۲۰۳ یا ۲۰۸ جفت‌بازی دارای باند هستند، هتروزیگوت می‌باشند و در نهایت افرادی که دارای دو باند در ناحیه ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت‌بازی هستند، هموزیگوت جهش یافته می‌باشند (Kaupe et al. 2004). به علت نزدیک بودن دو قطعه ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت‌بازی افراد AA به شکل یک باند ضخیم روی ژل قابل تشخیص هستند (شکل ۱).



شکل ۱- چند شکلی ژن *DGAT1* در جمعیت مورد مطالعه

میزان فراوانی آلل K برابر ۰/۳۷ و آلل A برابر با ۰/٦۳ تخمین زده شد. فراوانی‌های آللی بدست آمده، با نتایج حاصل از پژوهش Naghdi et al. (1389) و HosseinPour et al. (2011) تقریباً همخوانی دارد. در این پژوهش فراوانی‌های ژنوتیپی KK، KA و AA به‌ترتیب برابر با ۰/۰۹، ۰/٥٦ و ۰/۳٤ برآورد گردید. نتایج بدست آمده با نتایج تالر و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت داشت. آزمون مربع کای نشان داد که جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی- وینبرگ انحراف دارد. اثر نمونه‌گیری و انتخاب می‌توانند دلایل عدم تعادل در این جمعیت باشند. آلل K موجب افزایش چربی شیر و آلل A باعث افزایش تولید شیر می‌شود (2009 .Signorelli et al). بنابراین انتظار می‌رود که میانگین تعداد سلول های بدنی در هر میلی‌لیتر شیر در ژنوتیپ AA بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها باشد. برآورد میانگین سلول‌های بدنی ژنوتیپ‌ها نیز ظاهراً موید این مطلب می‌باشد به طوری‌که افراد AA دارای میانگین ۱٥۱۰۰۰ سلول بدنی می‌باشند و افراد KA و KK به ترتیب دارای میانگین ۱۳۸۰۰۰ و ۹۸۰۰۰ سلول بدنی می‌باشد. اما نتایج تحلیل آماری داده‌ها نشان داد بین ژنوتیپ‌های ژن DGAT1 و رکوردهای حاصل از شمارش سلول‌های بدنی هیچ‌گونه رابطه معنی‌داری وجود ندارد. نتایج این پژوهش با نتایج Kaupe et al. (2007); Berry et al. 2010 مطابقت دارد. به دلیل اینکه وراثت پذیری صفت مقاومت به ورم پستان پایین می باشد، درجه همبستگی بین عملکرد فنوتیپی و ارزش اصلاحی کم می‌باشد. زیرا بیشتر تغییرات واریانس فنوتیپی این صفت بیشتر بوسیله محیط و ارزش ترکیب‌های ژنی که قابل انتقال به نسل بعد نیستند، کنترل می‌شوند. بنابراین توصیه می‌گردد که برای بهبود این گونه صفات بیشتر از اقدامات مدیریتی و بهداشتی استفاده شود.

منابع

Berry DP, Howard D, Boyle P, Waters S, Kearney JF McCabe M (2010) Associations between the K232A polymorphism in the diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) gene and performance in Irish Holstein-Friesian dairy cattle. Irish Journal of Agricultural and Food Research 49: 1- 9.

Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges 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. Genome Research 12: 222–231.

Kaupe B, Brandt H, Prinzenberg EM Erhardt G(2007) German Holstein cattle production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk. Journal of Animal Science 85:11-21.

Kaupe B, Winter A, Fries R, Erhardt G (2004) DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taursus* cattle breeds. Journal of Dairy Research 71: 182-187.

Naghdi N, Edris MA, Rahmani HR, Khorvash M (2010) Effect of the DGAT1 gene polymorphism on milk production and reproductive traits in Iranian Holstein cows. Proceedings of 4th national congress of Animal Science. Iran, Tehran University, 2911-2914. (In Farsi).

Näslund J, Fikse WF, Pielberg GR Lundén A (2008) Frequency and effect of the Bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle. Journal of Dairy Science 91: 2127–2134.

Archive of SID
www.SID.ir

Nei M (1977) F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics, London 41: 225–233.

Signorelli F, Orru L, Napolitano F, Matteis G D, Scata M C, Catillo G, Marchitelli C, Moili B (2009) Exploring polymorphisms and effect on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds, Livestock Science 125:74-79

Thaller G, Kramer W, Winter A, Kaupe B, Erhardt G, Fries R (2003) Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. American Society of Animal Science 81:1911-1918.

Zamani F, Babaei M, Fazeli MH, Sharif zadeh A, Mohaghegh pour A (2009) Economical characterization of sub clinical mastitis in dairy Holstein herds in Isfahan province. Proceedings of 1ast national congress of poultry and livestock industrial. Iran, Golestan University, 223-227. (In Farsi).

Zamiri MJ (2006) Dairy cattle production. Shiraz university press. Shiraz, Iran. (In Farsi)

Archive of SID

www.SID.ir