ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۱۴۵- ۱۴۱

# مطالعه چند شکلی ژن *ABCG2* در گاوهای نر نژاد هلشتاین ایران

سید علی موسوی زاده[۱]، عبدالرضا صالحی[*۲]، محمد مهدی امین افشار[۳]، محمد حسین ناظم شیرازی[۴]

۱ و ۲- به‌ترتیب کارشناس ارشد و دانشیار گروه علوم دامی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران
۴- کارشناس ارشد دامپزشکی کشور مرکز تشخیص و آزمایشگاه کنترل دارو و مواد بیولوژیک تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arsalehi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

## چکیده

**ژن *ABCG2* در کرموزم ۶ گاو واقع شده و با بیان پروتئین ABCG2 درانتقال مواد داروئی از غشا پلاسما و کلسترول به شیر نقش دارد. در اثر جهش در باز شماره ۱۸۶ازون ۱۴ آلل *A* به آلل *C* تبدیل شده و در نتیجه اسیدآمینه تیروزین به سرین تغییر یافته و افزایش میزان شیر و کاهش درصد پروتئین و چربی را به همراه دارد. هدف از این تحقیق بررسی چند شکلی ژن *ABCG2* در گاوهای نر نژاد هلشتاین ایرانی بود. DNA ژنومی از ۱۰۵ نمونه اسپرم گاوهای نر هلشتاین استخراج شد. آغازگرها توسط نرم‌افزار Oligo طراحی و برای تکثیر قطعات مورد نظر استفاده گردید. محصولات PCR تعیین توالی شدند، نتایج با توالی موجود در بانک جهانی ژن NCBI مقایسه شدند. جهش *A/C* در باز شماره ۱۸۶ازون ۱۴ با فراوانی ۰/۰۲ مشاهده شد.**

**واژه‌های کلیدی**

**چندشکلی،
ژن *ABCG2*،
گاوهای هلشتاین ایران.**

## مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی مکان صفت کمی QTL به فاصله ۴ سانتی مورگان روی کروموزوم ۶ گاوهای شیری انجام شده است که نتیجه آن شناسائی ژن‌هائی است که بر روی ترکیب شیر مؤثر می‌باشند(Cohen-Zinder et al. 2005; Olsen et al. (2005). جایگاه ژن *ABCG2* در بانک جهانی ژن (NCBI) با شناسه AJ871176 (ID) معرفی می‌شود. طول این جایگاه ۱۷۱۷۱۲ جفت باز است و شامل ژن‌های *ABCG2*، *PKD2* و *SPP1* می‌باشد. ژن *ABCG2* دارای ۱۶ اگزون و ۱۵ اینترون است و محدوده آن از باز ۲۱۲۲۵ تا باز ۶۶۱۳۸ می‌باشد.

Archive of SID

اگزون ۱۴ این ژن از ۹۰ جفت باز تشکیل شده که جهش *A/C* در باز شماره ۸۶ این اگزون و باز شماره ۶۲۵۶۹ از جایگاه AJ871176 ایجاد شده و در اثر آن اسیدآمینه تیروزین به سرین تبدیل می‌شود[1].این چندشکلی در NCBI باشناسه rs43702337 (ID) معرفی شده است[2]. مطالعه جایگاه ژن *ABCG2* و ارتباط آن با صفات تولید شیر در گاوهای شیری نشان داد، آلل *A* این ژن که توانائی رمز اسیدآمینه تیروزین (اسید آمینه در موقعیت ۵۸۱) را دارد مقدار و درصد چربی وپروتئین را افزایش و مقدار تولید شیر را کاهش می دهد. این آلل در اثر جهش به آلل *C* و اسید آمینه سرین تبدیل می‌شود که موجب کاهش درصد چربی و پروتئین و افزایش میزان تولید شیر می‌شود (Cohen-Zinder et al. 2005; Olsen et al. 2007). ارتباط شش جایگاه ژن‌های *ABCG2*، *PPARGC1A*، *OLR1* و *SCD1* با ترکیب شیر را بر روی گاوهای نر هلشتاین لهستانی بررسی شد. نتایج تحقیق نشان داد، جهش *A/C* (Y581S) اگزون ۱۴ ژن *ABCG2* به عنوان بیشترین جایگاه تاثیر گذار بر روی صفات تولیدی شیر، بین جایگاه‌های دیگر است(Dorynek 2009) (Komisarek and. نوعی مسمومیت در کبد گوسفند[3] بوسیله سم قارچ Sporidesmin[4] با نام علمی Facial eczem (FE) بوجود می‌آید. مقاومت به این بیماری تحت تاثیر چند ژن قرار دارد. مطالعه جایگاه صفات کمی(QTL)[5] مرتبط با این صفت در کروموزم‌های گوسفند نشان می‌دهد که ژن ABCG2 به عنوان یک ژن کاندیدا در انتقال مواد داروئی بر روی این صفت موثر می‌باشد(Duncan et al. 2007). تحقیقات نشان می‌دهد پروتئین ABCG2 نقش مهمی در ترشح مواد بالینی و دارو به داخل شیر گوسفند و گاو دارد و مقدار آن در دوران آبستنی افزایش می‌یابد (Olsen et al. 2007). *ABCG2* به عنوان انتقال دارو به پلاسما، کلسترول به شیر و انتقال مواد بالینی از مادر به نوزاد از طریق شیر مؤثر است (Cohen et al. 2004). آنالیز مواد بالینی درمراحل مختلف رشد پستان نشان می‌دهد *ABCG2* در موش باکره وجود ندارد ولی در اواخر آبستنی و بویژه در دوران شیردهی افزایش می‌یابد(Jonker et al. 2005). در دام افرایش *ABCG2* از زمان زایش شروع و تا پایان دوره شیردهی ادامه دارد (Cohen et al. 2004). محصولات ژن *ABCG2* برای بسیاری از واکنش های سلولی ضروری است و جهش در آن تاثیر زیادی بر فعالیت های سلولی دارد (Robey et al. 2003). این پروتئین سلول‌های بدن را از انواع مواد سمی محافظت می‌کند و نقش عمده‌ای در روده، کبد و جفت دارد. وجود چند شکلی در ژن *ABCG2*، می تواند بر روی جذب و توزیع مواد داروئی موثر باشد. از طرف دیگر جهش‌های موجود در این ژن را می‌توان به عنوان مارکرهای انتخابی در ژن درمانی استفاده کرد ( Sarkadi et al.2004). پروتئین مقاومت سرطان سینه، از جمله پروتئین‌های خانواده ژن *ABCG2* می‌باشد که اخیراً کشف شده و به طور گسترده در جفت[6] بیان می‌شود. نقش این پروتئین که در دوران آبستنی در انسان و موش افزایش می‌یابد به عنوان محافظت کننده جنین در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد(Litman et al. 2000). هدف از این تحقیق مطالعه چندشکلی اگزون ۱۴ ژن *ABCG2* در گاوهای نر هلشتاین ایرانی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

DNA ژنومی از ۱۰۵ نمونه اسپرم گاوهای نرآزمون نتاج شده هلشتاین ایران استخراج شد. در این تحقیق از کیت شرکت ROCHE[7] آلمان با شماره شناسایی ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱ برای استخراج DNA استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دو روش ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتر تعیین شد. میانگین غلظت DNA استخراج شده در کل نمونه‌ها حدود ng/µl ۱۱۰ بود. آغازگرها توسط نرم افزار Oligo طراحی و صحت آن‌ها در بانک جهانی ژن (NCBI) بررسی شد. توالی آغازگرها بدین صورت بود:

Forward: 5'–GTATTCACGAGACTGTCAGGG-3'

Reverse: 5'-GGCTTTATTCTGGCTGTTTCC-3'

بهینه‌سازی PCR در دو حالت با استفاده از کیت PCR آماده از شرکت Ampliqon کشور دانمارک و کیت PCR به صورت جدا

[1] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&val=70671396
[2] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=65624775
[3] Hepatogenous Mycotoxicosis
[4] Fungal Toxin Sporidesmin
[5] Quantitative Trait Loci
[6] Placenta
[7] Roche Kit



Archive of SID
www.SID.ir

از شرکت کیاژن آلمان استفاده شد. جدول یک اجزاء واکنش و غلظت آن‌ها را با استفاده از کیت PCR آماده نشان می‌دهد. به منظور بهینه‌سازی PCR و تعیین مناسب‌ترین دمای اتصال آغازگرها از شیب حرارتی استفاده و مناسب‌ترین دمای اتصال برای آغازگرها مشخص شد. در پایان مناسب‌ترین زمان لازم برای واسرشته‌سازی، اتصال و گسترش تعیین شد(جدول ۲).

جدول۱- غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR با استفاده از کیت PCR آماده

| مواد مورد استفاده | غلظت استوک | حجم مورد استفاده |
|---|---|---|
| آغازگر رفت | ۱۰PM | ۳ µl |
| آغازگر برگشت | ۱۰PM | ۳ µl |
| کیت PCR | | ۱۲/۵ µl |
| DNA | | ۵ µl |
| $ddH_2o$ | | ۱/۵ µl |
| حجم نهایی | | ۲۵ µl |

جدول ۲- چرخه حرارتی تنظیم شده برای ترموسایکلر

| مراحل PCR | دما (درجه سانتی‌گراد) | زمان | تعداد مرحله |
|---|---|---|---|
| واسرشت اولیه | ۹۵ | ۴ دقیقه | ۱ |
| واسرشت | ۹۵ | ۶۰ ثانیه | ۳۵ |
| اتصال آغازگر | ۶۰ | ۴۵ ثانیه | ۳۵ |
| بسط | ۷۲ | ۶۰ ثانیه | ۳۵ |
| بسط نهائی | ۷۲ | ۷ دقیقه | ۱ |

به منظور بهینه‌سازی PCR، در مرحله اول برای تعیین مناسب‌ترین دمای اتصال آغازگرها از شیب حرارتی استفاده و مناسب‌ترین دمای اتصال برای آغازگرها مشخص شد. در مرحله دوم به منظور حذف باندهای غیراختصاصی و تعیین مناسب‌ترین غلظت کلرید منیزیم از شیب غلظتی(۱/۵ تا ۴/۵ میلی‌مولار) استفاده شد و مناسبترین غلظت یون منیزیم مشخص شد. جدول ۳ اجزاء واکنش و غلظت آنها را با استفاده از کیت PCR به صورت جدا را نشان می‌دهد. درمرحله سوم، پس از انجام آزمایشات و برنامه‌های مختلف مناسبترین زمان لازم برای واسرشته‌سازی، اتصال و بسط به دست آمد (جدول ۴). پس از انجام عملیات PCR، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با استفاده از کیت کیاژن خالص سازی شدند. در نهایت نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت MWG آلمان و مایکروژن کره‌جنوبی فرستاده و نتایج تعیین توالی با توالی موجود در NCBI مقایسه شدند.

جدول ۳- غلظت استفاده شده در واکنش PCR با استفاده از کیت PCR به صورت مجزا

| اجزاء واکنش | حجم مورد استفاده در واکنش | غلظت استوک |
|---|---|---|
| بافر(Buffer) | ۵ µl | ۱۰ x |
| dNTPs | ۱ µl | ۱۰mM |
| Primer Forward | ۱ µl | ۱۰ pM |
| Primer Reverse | ۱ µl | ۱۰ pM |
| آنزیم Taq DNA Polymerase | ۰/۲ µl | ۵ Unit/ µl |
| Water | ۱۱ µl | – |
| $MgCl_2$ | ۰/۸ µl | ۱/۵ mM |
| DNA | ۵ µl | ۵۰ ng / µl |
| حجم نهائی واکنش | ۲۵ µl | – |

جدول۴- چرخه حرارتی تنظیم شده برای ترموسایکلر

| مراحل PCR | دما(درجه سانتیگراد) | زمان | تعداد سیکل |
|---|---|---|---|
| واسرشت اولیه | ۹۵ | ۱۵ دقیقه | ۱ |
| واسرشت | ۹۵ | ۳۰ ثانیه | ۳۵ |
| اتصال آغازگر | ۵۰ | ۳۰ ثانیه | ۳۵ |
| بسط | ۷۲ | ۴۰ ثانیه | ۳۵ |
| بسط نهائی | ۷۲ | ۵ دقیقه | ۱ |

## نتایج و بحث

کشورهای مختلفی روی ژن *ABCG2* مطالعه کرده و گزارشاتی را منتشر کرده‌اند، تمامی تحقیقات از نمونه خون برای بررسی جایگاه مورد نظر استفاده کرده‌اند (Olsen 2007; Komisarek J and Dorynek Z 2009; (Cohen-Zinder et al. 2005; Tantia et al. 2006. در این تحقیق برای اولین بار از نمونه اسپرم استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت جایگاه این ژن و بالا بودن هزینه‌های تعیین توالی، شناسائی آنزیم برشی برای جایگاه مورد نظر و استفاده از تکنیک RFLP که هزینه پائین‌تری دارد، حائز اهمیت است. آنزیم برشی *StyLT1* با استفاده از نرم‌افزار MAPDRAW، برای جایگاه مورد نظر شناسائی شد که پیش از این گزارش نشده بود. توالی شناسائی آنزیم برشی *Sty*LT1 به صورت *CAGAG* می‌باشد که با توجه به توالی تکثیر شده، جایگاه موتانت (*CTCTG*) ژن را به صورت اختصاصی شناسائی کرده و آن را برش می‌دهد. تحقیقات زیادی برای شناسائی آنزیم برشی *Sty*LT1 انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد این آنزیم در باکتری Sahmonella–Typhimurium وجود داشته و توالی -5' *CAGAG*-3' را شناسائی می‌کند (Backer and Colson 1991a;Backer and Colson $1991_b$; Ryan, and Reggie 1999) در این پژوهش قطعه ۲۴۰ جفت بازی مربوط به جایگاه قسمت



Archive of SID
www.SID.ir

انتهایی اینترون ۱۳ (از باز ۴۱۰۵ تا ۴۱۴۱)، اگزون ۱۴ و قسمت ابتدایی اینترون۱۴ (۶۸ باز ابتدایی) ژن *ABCG2*، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده، تکثیر شدند. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲درصد الکتروفورز شدند. استاندارد وزن مولکولی استفاده شده در کنار محصولات PCR، صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تایید می‌کند. نتایج حاصل از تعیین توالی، با توالی موجود در بانک جهانی ژن[1] مقایسه شدند (NCBI→BLAST→Align). نتایج تحقیق بر روی ژن *ABCG2* نشان می‌دهد، چندشکلی در باز ۸۶ اگزون ۱۴ (*A/C*) این ژن موجب تغییر اسیدآمینه تیروزین به اسیدآمینه سرین در موقعیت ۵۸۱ شده که بر روی ترکیب شیر موثر می‌باشد (Cohen-Zinder et al. 2005;Olsen 2007; Komisarek and Dorynek 2009). وزن مولکولی اسیدآمینه تیروزین و سرین به ترتیب برابر با ۱۸۱/۲ و ۱۰۵/۱ می‌باشد و هر دو اسیدآمینه قطبی و بدون بار هستند ((Yazdisamadi and vagizadeh 2004). جهش *A/C* در جایگاه مورد مطالعه ژن *ABCG2* در گاوهای هلشتاین ایران با فراوانی ۲ درصد مشاهده شد و توالی آن با شناسه JQ398810 در بانک ژن جهانی ثبت شد. فراوانی آللی $ABCG2^A$ در گاوهای هلشتاین فلسطین اشغالی در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۰ از هفتادو پنج درصد به شصت‌ودو درصد و از ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۲ به هفتادوهفت درصد افزایش داشته است، این موضوع نشان دهنده تغییر روند شاخص انتخاب برای میزان تولید شیر در این سال‌ها می‌باشد (Cohen-Zinder et al. 2005). مطالعه چند شکلی ژن *DGAT1* و *ABCG2* در گاوهای بومی هندی و بوفالو نشان داد که فراوانی آلل‌های $DGAT1^A$ و $ABCG2^A$ در جمعیت تثبیت شده‌اند، که با تولید پائین شیر، و در صد بالای چربی و پروتئین شیر آن‌ها متناسب است (Tantia et al. 2006). بررسی تحقیقات انجام شده بر روی ژن *ABCG2* در نژادهای مختلف نشان داد که آلل *A* به صورت غالب در همه جمعیت‌ها وجود دارد (Ron et al. 2006). در بررسی چندشکلی این ژن در گاوهای اروپایی[2] و هندی[3] گزارش شد که آلل *A*، آلل اجدادی می‌باشد و جایگزین شدن آلل مزبور با آلل *C* احتمالاً پس از انشعاب گاوهای اروپایی و هندی از یکدیگر رخ داده است (Ron et al. 2006). نتایج حاصل از فراوانی جهش *A/C* در گاوهای هلشتاین ایران مشخص می‌کند، آلل *A* مشابه نتایج کشورهای مختلف بر روی نژادهای متفاوت به صورت غالب بوده و نشان دهنده روند شاخص انتخاب برای صفات مقدار و درصد چربی و پروتئین در ایران می‌باشد. با توجه به نقش کلیدی و کرموزومی ژن *ABCG2* در صفات تولید، تولید مثلی و مقاومت به بیماری در موجودات مختلف، مطالعات بیشتر چندشکلی این ژن به‌ویژه در دام توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مرکز اصلاح نژاد دام کشور، آزمایشگاه بیوتکنولوژی سازمان دامپزشکی، دکتر کسری اصفهانی و خانم سمیه رئوف زاده به خاطر همکاری در این تحقیق صمیمانه سپاسگذاری می‌شود.

[1] NCBI (www.ncbi.com)

[2] Bos tarus.

[3] Bos indicus

## منابع

Yazdisamadi B, vagizadeh M (2004) Genetics University of Tehran, press., Tehran, Iran.(In Farsi).

Backer OD Colson C (1991a) Transfer of the genes for the StyLT1 restriction modification system of Salmonella typhimurium to strains lacking modification ability results in death of the recipient cells and degradation of their DNA. J Bacteriol 173:1328-30.

Backer OD Colson C (1991b) Identification of the recognition sequence for the M.StyLTI methyltransferase of *Salmonella typhimurium* LT7: an asymmetric site typical of type-III enzymes. Gene 2:97 (1):103-7.

Backer OD Colson C (1991) Two-step cloning and expression in Escherichia coli of the DNA restriction-modification system StyLT1 of Salmonella typhimurium. J Bacteriol 173:1321-7.

Cohen M, Reichenstein M, Wind A E, Heon-Lee J, Shani M, Lewin H A, Weller J I, Ron M, Seroussi E (2004). Cloning and characterization of FAM13A1-A gene near a milk protein QTL on BTA6: Evidence for population-wide linkage-disequilibrium in Israeli Holsteins. Genomics 84: 374–383.

Cohen M, Seroussi E, Band MR, Lewin H A, Drackley JK, Larkin D M, Everts-van der Wind A, Heon-Lee J, Loor JJ, Shani M:(2004). SPP1 is a candidate gene for the QTL affecting milk protein concentration on BTA6 in Israeli Holstein. 29th Int Conf Ani Gen, ISAG, F015, Tokyo, Japan.



Archive of SID
www.SID.ir

Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Loor JJ, Wind A E, Lee JH, Drackley JK, Band MR, Hernandez AG, Shani M, Lewin HA, Weller JI, and 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. Genome Res 15:936–944.

Duncan EJ, Dodds KG, Henry HM, Thompson MP, Phua SH (2007). Cloning, mapping and association studies of the ovine ABCG2 gene with facial eczema disease in sheep. Anim Genet 38(2):126-31.

Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel A H (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (*ABCG2*) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. Nat. Med 11:127–129.

Komisarek, Dorynek Z (2009) Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functionaland production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. J Appl Genet 50(2), 125–132.

Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH and Bates SE (2000) The multidrugresistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (*ABCG2*). J. Cell Sci 113:2011–2021.

Olsen H G, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg P R, Sundsaasen M, Svendsen KK and Meuwissen T H (2005) Mapping of a milk production QTL to a 420 kb region on bovine chromosome 6. Genetics 169:275-283.

Olsen HG, Nilsen H, Hayes B, Berg PR, Svendsen M, Lien S, Meuwissen T (2007) Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the *ABCG2* gene affecting milk composition of dairy cattle. BMC Genet 8: 32.

Robey R, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem T, Runge S, Risbood M, Poruchynsky M, Bates S (2003) Mutations at amino-acid 482 in the *ABCG2* gene affect substrate and antagonist specificity. BJ of Cancer 89: 1971 – 1978.

Ron M, Cohen-Zinder M, Peter C, Weller JI, Erhardt G (2006) Short Communication: A Polymorphism in *ABCG2* in Bos indicus and Bos taurus Cattle Breeds. J Dairy Sci 89:4921–4923.

Ron M, Kliger D, Feldmesser E, Seroussi E, Ezra E, Weller JI (2001). Multiple QTL analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. Genetics 159: 727–735.

Ryan KA, and Reggie YC (1999) Characterization of a *CACAG* pentanucleotide repeat in Pasteurella haemolytica and its possible role in modulation of a novel type III restriction-modification system. Nucleic Acids Research 27: 1505-1511.

Sarkadi B, OzvegyLaczka C, Nemet K, Varadi A (2004) Minireview *ABCG2* – a transporter for all seasons. FEBS Letters 567 (2004) 116–120.

Tantia MS, Vijh RK, Mishra BP, Mishra B, Kumar STB, Sodhi M (2006). *DGAT1* and *ABCG2* polymorphism in Indian cattle (Bos indicus) and buffalo (Bubalus bubalis) breeds. BMC Veterinary Research doi:10.1186/1746-6148-2-32.

Archive of SID



www.SID.ir