Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

" مقاله پژوهشی"

شناسایی جهش فقدان عملکرد p.R12X در جایگاه ژنی SLC37A2 در گاوهای مونبلیارد و هلشتاین

زهره‌سادات حسینی[۱]، ایوب فرهای[۲]، محسن قلی‌زاده[۳] و قدرت رحیمی میانجی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: ayoub_farhadi@ymail.com)
۳ و ۴- دانشیار و استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰
صفحه: ۱۳۵ تا ۱۴۲

چکیده

هدف از پژوهش حاضر شناسایی جهش فقدان عملکرد p.R12X مؤثر بر مشکلات تولید مثلی و سقط جنین در ژن SLC37A2 با روش‌های PCR-SSCP و توالی‌یابی در گاوهای هلشتاین و مونبلیارد بوده است. تعداد ۲۵۰ نمونه خون (۱۵۰ نمونه هلشتاین و ۱۰۰ نمونه مونبلیارد) تهیه و استخراج DNA با کیت انجام شد. یک جفت آغازگر اختصاصی با نرم‌افزارOligo7 طراحی شد که قطعه‌ای با طول ۲۰۸ جفت باز از اگزون ۲ ژن SLC37A2 حاوی جهش p.R12X را تکثیر نماید. تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با روش SSCP انجام و فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی و شاخصه‌های ژنتیک جمعیت با نرم‌افزارPOPGEN محاسبه شدند. در جایگاه SLC37A2 دو ژنوتیپ AA و AB به‌ترتیب با فراوانی‌های ۹۸/۷ و ۱/۳ و ۸۶ و ۱۴ درصد به ترتیب در دو نژاد هلشتاین و مونبلیارد مشاهده شدند. همچنین فراوانی‌های آللی ژن SLC37A2 در دو جمعیت هلشتاین و مونبلیارد برای آلل‌های A و B به‌ترتیب برابر با ۹۹/۳ و ۰/۷ و ۰/۹۳ و ۰/۷ برآورد شدند. تست دقیق فیشر و تست کای-اسکوئر نشان داد که اختلاف آماری معنی‌داری از نظر فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی بین دو جمعیت هلشتاین و مونبلیارد وجود دارد (p <۰/۰۵). پس از تعیین ژنوتیپ، از هر ژنوتیپ دو نمونه به‌طور دو طرفه توالی‌یابی شدند و بررسی‌های بیوانفورماتیکی توالی‌های حاصل با نرم‌افزار BioEdit انجام شد. نتایج نشان داد که در ژنوتیپ AB ژن SLC37A2 در گاوهای هلشتاین و مونبلیارد جهش فقدان عملکرد (p.R12X) وجود دارد. با توجه به نقش جهش p.R12X در نقایص تولید مثلی و سقط جنین در گاو مونبلیارد می‌توان از نتایج این پژوهش مستقیما در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت شناسایی دام‌های حامل و حذف آن‌ها در گله‌های تجاری و روستایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ژن SLC37A2، گاو هلشتاین، گاو مونبلیارد، سقط جنین، توالی‌یابی

مقدمه

صفات تولید مثلی صفات پیچیده‌ایی هستند و به‌علت توجه بیش از حد به صفات تولیدی در طول زمان و توجه کمتر به این صفات و در نتیجه همبستگی منفی بین صفات تولیدی و تولید مثلی، این صفات روند نامطلوبی داشته‌اند به‌طوری که انتخاب ژنتیکی برای گاوها با تولید شیر بالاتر با باروری ضعیف تر آن‌ها همراه است، بنابراین کنترل باروری از طریق انتخاب ژنتیکی در دراز مدت یک راه‌حل پایدار ارائه می‌دهد. برای دست‌یابی به راندمان بالای تولید شیر در گاوهای شیری، بهبود ژنتیکی صفات تولید مثلی، امری ضروری است. کاهش عملکرد تولیدمثلی گاوهای شیری و اثرات آن بر تولید شیر و میزان حذف در گله (۱۲) از یک طرف و مشکلات ناشی از افزایش اندازه گله گاوهای شیری و ضرورت تولید بهینه شیر از طرف دیگر، نگرانی‌های صنعت پرورش گاو شیری می‌باشند، زیرا کاهش عملکرد تولید مثلی در نهایت با کاهش سودآوری و کاهش عملکرد اقتصادی همراه است (۲).

عملکرد تولید مثلی نامناسب گاوهای شیری که به‌صورت افزایش فاصله گوساله‌زایی یا افزایش حذف اجباری گاوهای شیری و یا هر دو بروز می‌کند، سبب کاهش تولید شیر و گوساله‌زایی در سال می‌شود (۱۴). اگرچه سطح تولید گله به‌خاطر رابطه ظاهراً منفی تولید شیر و تولید مثل گاوهای شیری، موضوع بسیاری از تحقیقات بوده‌است (۲،۶)، با این‌حال مشخص شده است اثرات افزایش تولید شیر بر تولید مثل بیشتر در گاوهای شیری پر تولید مشاهده می‌شود (۴،۹،۱۴). به‌طور مشخص یک ارتباط منفی بین تولید شیر و تولید مثل در گاوهای شیری وجود دارد. اگرچه تولید شیر یک فرآیند فیزیولوژیک همراه با کاهش تولید مثل است (۹،۱۶،۱۷)، اما در گله‌هایی که دارای مشکلات مربوط به مدیریت و سلامتی گاو مانند ضعف عملکرد سیستم ایمنی، علائم فحلی ضعیف، افزایش دوره عدم تخمک‌گذاری پس از زایش، کاهش درصد آبستنی و افزایش مرگ و میر جنین هستند، میزان باروری پایین‌تر می‌باشد.

یکی از ابزارهای مورد استفاده در مطالعه‌ی عوامل ژنتیکی مؤثر بر صفات اقتصادی، شناسایی ژن‌های بزرگ اثر مؤثر بر آن‌ها است. ژن SLC37A2 عضو شماره ۲ خانواده ۳۷ (عامل انتقال گلیسرول تری فسفات) در گاو طبق مستندات موجود در NCBI (AC_000186) روی کروموزوم شماره ۲۹ و در موقیت ۲۸۸۹۲۸۹۶-۲۸۸۶۵۰۸۷ جفت بازی قرار داشته و طول آن ۲۷۸۱۰ جفت باز می‌باشد (۱۸).

هی و همکاران (۵) مجموعه ژن‌های SLC را مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که این خانواده شامل بیش از ۵۰ عضو است که انتقال دهنده‌های متصل به غشا را کد می‌کنند. خانواده SLC37 شامل چهار انتقال‌دهنده فسفات- قند SLC37A1 (SPX1)، SLC37A2 (SPX2)، SLC37A3 (SPX3) و SLC37A4 (SPX4) می‌باشد. رونوشت SLC37A2 در نوتروفیل‌ها بیشتر بیان می‌شوند (۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020

رینارتز و دیستل (۱۳) در تحقیقی بیان کردند که در گله گاو مونبلیارد دو جهش کاندید روی کروموزوم ۱۹ و ۲۹ در ارتباط با سقط جنین وجود دارند. آن‌ها بیان کردند که جنین‌های سقط شده در گله مونبلیارد برای جهش SLC37A2:g.28879810 روی کرومزوم ۲۹ هموزیگوس بوده و هر دو والد و همچنین پدربزرگ پدری و مادری برای این جهش هتروزیگوس بوده‌اند. این جنین سقط شده جهش یافته برای SLC37A2 فرضیه اثر حذف‌کنندگی این جهش را تائید می‌کند.

بروز جهش در ژن SLC37A2 در ناحیه MH2 نیز به‌عنوان کاندیدای قوی برای تأثیر بر صفات تولیدمثلی معرفی شده‌است. این جهش در موقعیت g.28879810C>T جفت بازی روی BTA29 قرار دارد که باعث تبدیل کدون آرژنین به یک کدون خاتمه (p.R12X) در قسمت‌های آغازین پروتئین SLC37A2 می‌شود. ناگاهاتا و همکاران (۱۰) نشان دادند که خانواده بزرگ حامل املاح شامل ۳۰۰ عضو و ۵۱ خانواده می‌باشند که در انتقال بین غشایی طیف وسیعی از املاح نقش دارند. اشیدیا و همکاران (۷) اعلام کردند که تاکنون موارد متعددی از مشکلات ژنتیکی ایجاد شده در اثر نقص در پروتئین‌های منتقل‌کننده املاح در انسان، موش و حیوانات مزرعه‌ای (از جمله CVM) گزارش شده است. ویژگی مشترک این بیماری‌ها تغییر در انتقال مولکول‌ها و در نتیجه فقدان یا افزایش بیش از حد معمول این املاح در بخش‌های خاص سلول است.

پان و همکاران (۱۱) SLC37A2 را به‌عنوان عامل تغییر گلوکز-۶-فسفات (G6P) شناسایی کردند. کانا و همکاران (۸) و تامسن و همکاران (۱۵) گزارش کردند که گلوکز-۶-فسفات مولکول کلیدی در متابولیسم انرژی سلولی بوده و نقص در چندین آنزیم درگیر در متابولیسم G6P در موش منجر به مرگ جنینی می‌شوند. این یافته‌ها، جهش شناسایی شده در SLC37A2 را به‌عنوان یک جهش مرتبط با مشکلات تولید مثلی و مرگ جنینی در MH2 پیشنهاد می‌کند.

هدف از پژوهش حاضر شناسایی واریانت‌های آللی در جایگاه ژنی SLC37A2 با روش‌های PCR-SSCP و توالی‌یابی و بررسی ارتباط آن‌ها با صفات تولید مثلی و تولیدی در گاوهای مونبلیارد و هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون و استخراج DNA

تعداد ۱۵۰ نمونه خون گاو هلشتاین و ۱۰۰ نمونه خون گاو مونبلیارد از بانک خون آزمایشگاه و از گاوداری بهکده رضوی بجنورد تهیه‌شد. پس از انتخاب افراد به‌صورت تصادفی، خونگیری حیوانات از ورید دمی با استفاده از ونوجکت حاوی EDTA انجام شد. سپس نمونه‌های خون در مخزن حاوی یخ جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این پژوهش استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت یکتا تجهیز آزما و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها

طراحی آغازگر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

طراحی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر یک قطعه از ژن SLC37A2 با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 از روی توالی ژنومی با شماره دسترسی (AC_000186) انجام شد. برای تکثیر قطعه موردنظر که حاوی جهش مؤثر بر کارآیی تولید مثل در گاو بود، قطعه‌ای از اگزون شماره ۲ ژن SLC37A2 انتخاب شد. بر اساس پژوهش فریتز و همکاران (۳) یک جهش بد معنی در ژن SLC37A2 واقع شده در هاپلوتایپ شماره دو (MH2) گاو مونبلیارد رخ می‌دهد. جهش در ژن SLC37A2 در موقعیت g.28879810C>T جفت بازی روی BTA29 قرار دارد که باعث تبدیل کدون آرژنین به یک کدون خاتمه (p.R12X) در قسمت‌های آغازین پروتئین SLC37A2 می‌شود. پس از تایید نهایی آغازگرها جهت سنتز به شرکت سیناژن سفارش داده شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table 1. Sequences of primers used in this study

طول قطعه	توالی آغازگر	ژن
۲۰۸	F-CCTGGACTCTGCTAACCC R-CCGGGCTGTGCTACTGAAG	SLC37A2

حجم کل واکنش، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. مواد لازم و مقادیر مورد نظر در واکنش PCR شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس PCR (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایرا) و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه بود. سیکل‌های دمایی PCR شامل واسرشت‌سازی قطعه الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۳۴ سیکل شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگرها در ۷۲ درجه سانتیگراد به‌مدت ۳۰ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه بود. صحت PCR با الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شدند.

آزمون SSCP

برای مشاهده قطعات حاصل از PCR ژن‌های مورد مطالعه از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲ درصد استفاده شد. در این پژوهش از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل VSTA-1002M استفاده شد. قطر ژل در این پژوهش ۲ میلی‌متر و ابعاد ژل ۳۵×۲۵ سانتی‌متر بوده است. بعد از قرار گرفتن ژل در تانک عمودی ۴ میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر از بافر بارگذاری

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020

مخلوط و داخل چاهک‌ها ریخته شد (برای SSCP محصول PCR را همراه با بافر بارگیری SSCP به‌مدت ۱۰ دقیقه داخل دستگاه PCR با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا DNA تک‌رشته‌ای شود). سپس هر یک از DNAهای تک‌رشته‌ای را داخل یکی از چاهک‌ها ریخته و ژل اکریل‌آمید به‌مدت ۱۵ ساعت با ولتاژ ۴۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد الکتروفوز شدند. در انتها ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برآورد شاخصه‌های ژنتیک جمعیت در جایگاه مورد مطالعه

برای برآورد شاخصه‌های ژنتیک جمعیت از جمله فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی، تست تعادل هاردی واینبرگ، شاخص شانون، میانگین هتروزایگوسیتی، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) و ... از نرم‌افزار POPGEN استفاده شد.

مقایسه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی بین دو جمعیت گاوهای هلشتاین و مونبلیارد

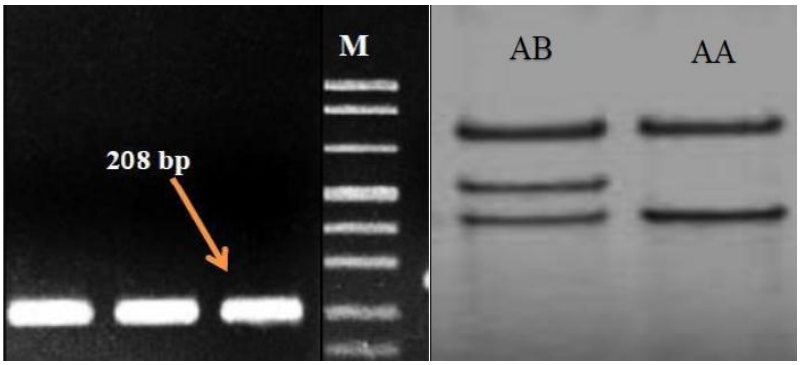
با توجه به اینکه در پژوهش حاضر دو جمعیت هلشتاین و مونبلیارد مورد بررسی قرار گرفته بودند، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی بین دو جمعیت به‌ترتیب با تست دقیق فیشر و آزمون کای-اسکوئر مورد مقایسه قرار گرفتند.

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

بعد از مشاهده الگوهای باندی مختلف، از هر الگو دو نمونه برای ارسال جهت توالی‌یابی انتخاب شد. قبل از ارسال نمونه‌ها برای تعیین توالی، مقدار ۶۰ میکرولیتر محصول PCR از هر نمونه، برای بازیافت آماده شد. برای بازیافت DNA از کیت اختصاصی شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. مراحل استخراج DNA از روی ژل آگارز با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی بیشتر توالی تکثیر شده و مقایسه آن با توالی رفرنس بانک ژنی و ردیابی دقیق‌تر وجود جهش مورد نظر در قطعه تکثیر شده از هر الگوی باندی دو نمونه برای تعیین توالی دو طرفه به شرکت ژن فن‌آوران تهران ارسال شد. پس از آن‌که قطعه‌های تکثیری تعیین توالی شدند، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در ادامه، هم‌ترازی توالی‌های به‌دست آمده و مقایسه آن‌ها با توالی رفرنس از بانک ژنی برای شناسایی جهش سببی مورد نظر با ابزار CLUSTALW Multiple alignment نرم‌افزار BioEdit (version7.0.9.0) صورت گرفت.

نتایج و بحث

قطعه مورد نظر از ناحیه اگزون دوم ژن SLC37A2 با طول ۲۰۸ جفت باز توسط جفت آغازگرهای اختصاصی با موفقیت تکثیر شدند (شکل ۱). بعد از تکثیر قطعه ۲۰۸ جفت بازی و آزمون SSCP، در این جایگاه دو ژنوتیپ AA و AB مشاهده شدند (شکل ۱).



شکل ۱- باندهای مربوط به محصول PCR (چپ) و ژنوتیپ‌های ژن SLC37A2 (راست)
Figure 1. Bands of PCR products (left) and genotypes of SLC37A2 gene (right)

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

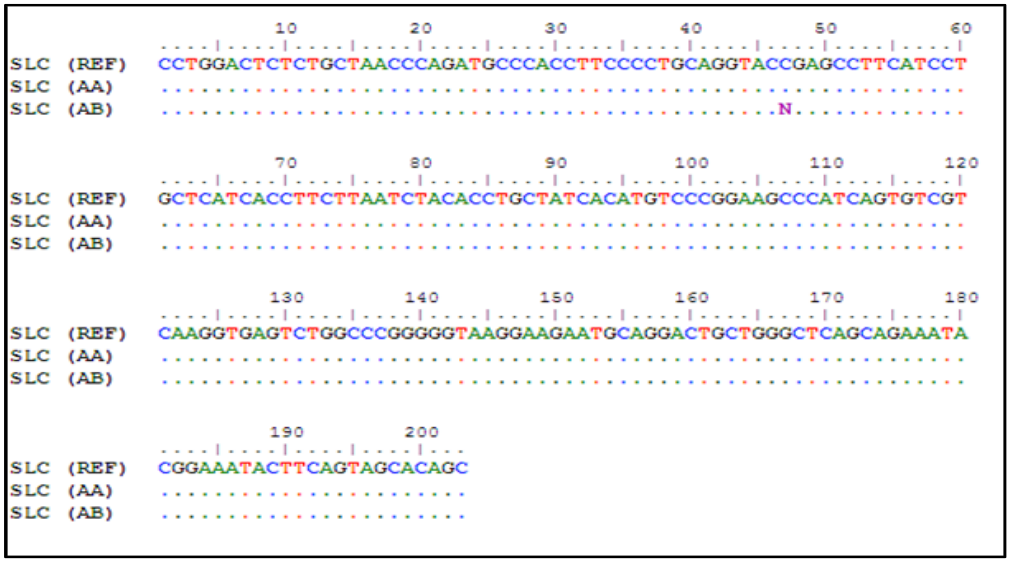
توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی اگزون شماره دو ژن SLC37A2

جایگاه مورد نظر در گاو هلشتاین و مونبلیارد چند شکل بوده و دو ژنوتیپ AA و AB در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شدند. نتایج هم‌ترازی توالی‌های ژنوتیپ‌های این جایگاه و بررسی‌های بیوانفورماتیکی در شکل ۲ نشان داده شده‌است. همچنین در شکل ۳ گراف حاصل از توالی‌یابی مربوط به جهش فقدان عملکرد p.R12X به تصویر کشیده شده است. همچنین در شکل ۴ ترجمه قطعات توالی‌یابی شده نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

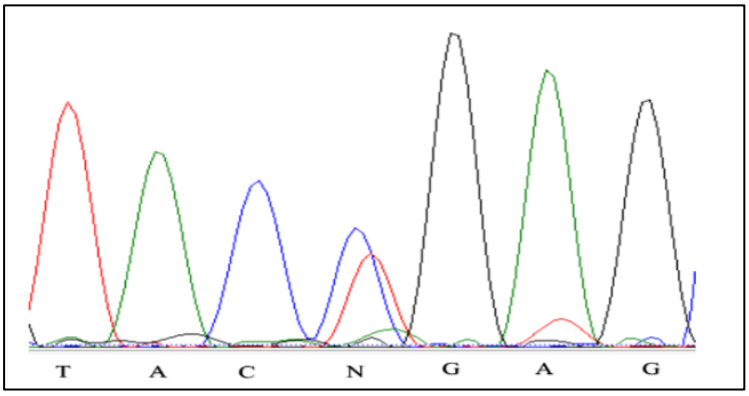
Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020



شکل ۲- هم‌ترازی توالی ژنوتیپ‌های مشاهده شده در اگزون شماره دو ژن SLC37A2 با توالی رفرنس. Ref: توالی قطعه مورد نظر برگرفته از بانک ژنی (AC_000186)، N: هتروزایگوت C/T (محل جهش p.R12X)

Figure 2. Sequence of genotypes observed in exon 2 of SLC37A2 gene aligned with reference sequence. Ref: Sequence from Gene Bank (AC_000186), N: C/T heterozygote (position of p.R12X mutation).

همانگونه که در شکل ۲ نشان داده شده‌است در ژنوتیپ AB از قطعه تکثیر شده از ناحیه اگزون شماره دو ژن SLC37A2 در گاوهای هلشتاین و مونبلیارد در موقعیت ۴۷ جفت بازی جهش فقدان عملکرد (p.R12X) وجود داشته و باعث تفاوت با توالی رفرنس و با ژنوتیپ AA شده است.



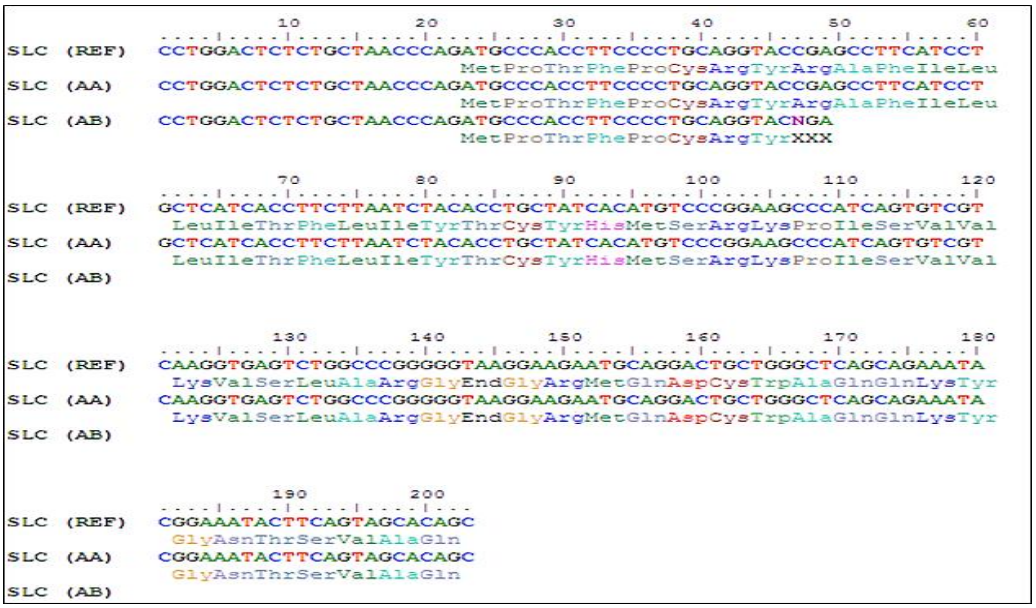
شکل ۳- تایید بروز جهش p.R12X در موقعیت ۴۷ جفت بازی ژن SLC37A2 در گاوهای هلشتاین و مونبلیارد. N: هتروزیگوت C/T

Figure 3. Confirmation of occurrence of p.R12X mutation in position 47 of SLC37A2 gene in Holstein and Montbeliarde cattle. N: C/T heterozygote (position of p.R12X mutation)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020



شکل ۴- توالی ترجمه‌شده قطعه مورد نظر از ژنوتیپ‌های مشاهده شده در ژن SLC37A2. REF: توالی قطعه مورد نظر برگرفته از بانک ژنی (AC_000186)، SLC (AA) و SLC (AB): ژنوتیپ‌های مشاهده شده در گاو هلشتاین، N: هتروزایگوت C/T، XXX: کدن خاتمه TGA

Figure 4. Translated sequence of genotypes observed in SLC37A2 gene. REF: Sequence from Gene Bank (AC_000186), SLC (AA) and SLC (AB): Genotypes observed in studied cattle, N: Heterozygote C/T, XXX: TGA stop codon

شاخصه‌های ژنتیک جمعیت در جایگاه SLC37A2

در جدول ۲ شاخصه‌های ژنتیک جمعیت برای جایگاه ژنی SLC37A2 ارائه شده است.

جدول ۲- شاخصه‌های ژنتیک جمعیت در ژن SLC37A2 در گاوهای هلشتاین و مونبلیارد

Table 2. Population genetics indices at SLC37A2 locus in Holstein and Montbeliarde cattle

جمعیت	فراوانی ژنوتیپی (درصد)			فراوانی آللی (درصد)		*ne	میانگین هتروزایگوزیستی	شاخص شانون
	BB	AB	AA	B	A			
هلشتاین	۰	۱/۳	۹۸/۷	۰/۷	۹۹/۳	۱/۰۱	۰/۰۱۳	۰/۰۴
مونبلیارد	۰	۱۴	۸۶	۷	۹۳	۱/۱۴	۰/۱۳	۰/۲۵

*ne: تعداد آلل‌های مؤثر

مقایسه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی جایگاه SLC37A2 بین دو جمعیت هلشتاین و مونبلیارد

در این جایگاه دو ژنوتیپ AA و AB به‌ترتیب با فراوانی‌های ۹۸/۷، ۱/۳ و ۸۶ و ۱۴ درصد در دو نژاد هلشتاین و مونبلیارد مشاهده شدند. همچنین فراوانی‌های آللی در دو جمعیت هلشتاین و مونبلیارد برای آلل‌های A و B به‌ترتیب ۹۹/۳، ۰/۷ و ۹۳ و ۷ برآورد گردید. تست دقیق فیشر و تست کای-اسکوئر به‌ترتیب برای مقایسه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی بین دو جمعیت نشان‌داد که اختلاف آماری معنی‌داری از نظر فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی بین دو جمعیت وجود دارد ($p<0/05$) (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی ژن SLC37A2 بین دو نژاد هلشتاین و مونبلیارد

Table 3. Comparison of allelic and genotype frequencies of SLC37A2 between Holstein and Montbeliarde breeds

آلل	نژاد		ژنوتیپ	نژاد	
	هلشتاین	مونبلیارد		هلشتاین	مونبلیارد
A	۹۹/۳	۹۳	AA	۹۸/۷	۸۶
B	۰/۷	۷	AB	۱/۳	۱۴
P-value	۰/۰۲		BB	۰	۰
			P-value	۰/۰۰۷	

در پژوهش حاضر یک قطعه ۲۰۸ جفت بازی از اگزون شماره ۲ ژن SLC37A2 در گاوهای هلشتاین و مونبلیارد با موفقیت با استفاده از PCR تکثیر شدند. سپس تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با تکنیک SSCP نشان‌داد که جایگاه SLC37A2 در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020

هر دو نژاد هلشتاین و مونبلیارد چندشکل بوده و دو ژنوتیپ AA و AB به‌ترتیب در نژاد هلشتاین با فراوانی ۹۸/۷ و ۱/۳ درصد و در نژاد مونبلیارد با فراوانی ۸۶ و ۱۴درصد مشاهده شدند. همچنین فراوانی آللی در جمعیت هلشتاین برای آلل‌های A و B به‌ترتیب ۹۹/۳ و ۰/۷و برای نژاد مونبلیارد ۹۳ و ۷ درصد برآورد شد. بررسی‌های بیوانفورماتیک روی توالی‌های به‌دست آمده از هر ژنوتیپ نشان داد که جهش فقدان عملکرد p.R12X که باعث تبدیل کدون اسیدآمینه آرژنین به یک کدون خاتمه می شود در افراد دارای ژنوتیپ AB وجود داشته و در واقع آلل B نشان دهنده این جهش می‌باشد. بروز این جهش در ژن SLC37A2 در ناحیه MH2 به‌عنوان کاندیدای قوی برای تأثیر بر صفات تولید مثلی خصوصا بروز سقط جنین معرفی شده است. این جهش در موقعیت g.28879810C>T جفت بازی روی BTA29 قرار دارد.

رینارتز و دیستل (۱۳) در تحقیقی بیان کردند که در گله گاو مونبلیارد جهش p.R12X باعث سقط جنین می‌شود. با توجه به اینکه جنین‌های سقط شده در گله مونبلیارد برای این جهش هموزیگوس بودند فرضیه اثر حذف‌کنندگی این جهش تایید شد. در پژوهش حاضر آلل مضر B در جایگاه SLC37A2 در هر دو جمعیت گاوهای مونبلیارد و هلشتاین مشاهده شد، اما در مونبلیارد فراوانی آن ده برابر بیشتر از هلشتاین بود. به هر حال در برنامه‌های اصلاح نژادی اثر این ژن در هلشتاین نیز باید مورد توجه قرار گیرد. همچنین تعداد الل‌های مؤثر در این جایگاه برای نژاد مونبلیارد بیشتر از هلشتاین برآورد شد. بر اساس اطلاعات ما تا کنون مطالعه‌ای مبنی بر ردیابی جهش فقدان عملکرد ژن SLC37A2 گاوهای مونبلیارد و هلشتاین در کشور انجام نشده است. لذا با توجه به نقش این جهش در سقط جنین و مشکلات تولیدمثلی در گاوهای شیری می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی از یافته‌های این پژوهش استفاده مستقیم نمود.

در پژوهش حاضر هر دو جایگاه مورد مطالعه چند شکل بودند. جهش فقدان عملکرد p.R12X در ژن SLC37A2 واقع شده در هاپلوتایپ شماره ۲ گاو مونبلیارد با روش توالی‌یابی در هر دو نژاد گاوهای مونبلیارد و هلشتاین ایران با فراوانی‌های متفاوت شناسایی شد. فراوانی آلل مضر B در مونبلیارد بیشتر از هلشتاین بود که با توجه به اینکه جهش مورد نظر در هاپلوتایپ مونبلیارد قرار دارد این تفاوت فراوانی مورد انتظار بود. از آنجایی که این جهش نقش بسیار مهمی در سقط جنین در گاو دارد، یافته‌های این پژوهش قدم مؤثری در راستای حذف آلل مضر p.R12X از جمعیت گاوهای شیری کشور است. بنابراین می‌توان نتایج حاصل از این پژوهش را مستقیماً در برنامه‌های اصلاح نژادی گاوهای مونبلیارد و هلشتاین در گاوداری‌های صنعتی و حتی کوچک در راستای شناسایی حاملین این جهش و حذف آن‌ها از گله به‌کار برد.

منابع

1. Behmaram, R., P. Akbari, M.D. Shakouri and M. Kazemi. 2018. The Effect of calving season on some of productive and reproductive traits in Tehran province's Holstein cows. Research on Animal Production, 9(19): 76-82 (In Persian).
2. De Vries, A., C. Steenholdt and Risco. 2005. Pregnancy rates and milk production in natural service and artificially inseminated dairy herds in Florida and Georgia. Journal of dairy science, 88(3): 948-956.
3. Fritz, S., A. Capitan, A. Djari, S.C. Rodriguez, A. Barbat, A. Baur and C. Klopp. 2013. Detection of haplotypes associated with prenatal death in dairy cattle and identification of deleterious mutations in GART, SHBG and SLC37A2. PloS one, 8(6): e65550.
4. Hansen, L.B. 2000. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. Journal of dairy science, 83(5): 1145-1150.
5. He, L., K. Vasiliou and D.W. Nebert. 2009. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. Human genomics, 3(2): 195.
6. Hoseinpour Kol-Mahaleh, M., A. Farhadi, G. Rahimi Mianji and M. Gholizadeh. 2019. Molecular and bioinformatics analysis of regulatory upstream region of leptin and SIGLEC5 genes in association with production and reproduction traits in Holstein cattle. Animal ProductionResearch, 8(3): 73-85 (In Persian).
7. Ishida, N. and M. Kawakita. 2004. Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). Pflügers Archiv, 447(5): 768-775.
8. Kanae, Y., D. Endoh, H. Nagahata and M. Hayashi. 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. Journal of veterinary diagnostic investigation, 17(3): 258-262.
9. Lucy, M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? Journal of dairy science, 84(6): 1277-1293.
10. Nagahata, H., H. Oota, A. Nitanai, S. Oikawa, H. Higuchi, T. Nakade and H. Ogawa. 2002. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. Journal of veterinary medical science, 64(12): 1107-1112.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Pan, C.J., S.Y. Chen, H.S. Jun, S.R. Lin, B.C. Mansfield and J.Y. Chou. 2011. SLC37A1 and SLC37A2 are phosphate-linked, glucose-6-phosphate antiporters. PloS one, 6(9): e23157.
12. Plaizier, J.C.B., K.D. Lissemore, D. Kelton and G.J. King. 1998. Evaluation of overall reproductive performance of dairy herds. Journal of dairy science, 81(7): 1848-1854.
13. Reinartz, S and O. Distl. 2016. Validation of deleterious mutations in Vorderwald cattle. PloS one, 11(7): e0160013.
14. Sewalem, A., G.J. Kistemaker and F. Miglior. 2010. Relationship between female fertility and production traits in Canadian Holsteins. Journal of dairy science, 93(9): 4427-4434.
15. Thomsen, B., P. Horn, F. Panitz, E. Bendixen, A.H. Petersen, L.E. Holm and C. Bendixen. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. Genome research, 16(1): 97-105.
16. VanRaden, P.M., A.H. Sanders, M.E. Tooker, R.H. Miller, H.D. Norman, M.T. Kuhn and G. Wiggans. 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. Journal of dairy science, 87(7): 2285-2292.
17. Wall, E., S. Brotherstone, J.A. Woolliams, G. Banosa and M.P. Coffey. 2003. Genetic evaluation of fertility using direct and correlated traits. Journal of Dairy Science, 86(12): 4093-4102.
18. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/506687.

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of Lack of Function Mutation of P.R12X in SLC37A2 Locus in Montbeliarde and Holstein Cattle

Zohre Sadat Hoseini[1], Ayoub Farhadi[2], Mohsen Gholizadeh[3] and Ghodrat Rahimi-Mianji[4]

1- M.Sc. Graduated, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Ntural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Ntural Resources University, Sari, Iran, (Corresponding author: ayoub_farhadi@ymail.com)
3 and 4- Assistant Professor and Professor, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Ntural Resources University, Sari, Iran
Received: January 18, 2020 Accepted: February 29, 2020

Abstract

The aim of this study was to identify the lack of function mutation of p.R12X affecting reproductive problems and abortion in SLC37A2 gene by PCR-SSCP and sequencing methods in Holstein and Montbeliarde cows, For this purpose, 250 blood samples (150 Holstein and 100 samples of Montbeliarde) were prepared and DNA was extracted by kit. A pair of specific primers was designed with Oligo7 software to amplify a fragment with length of 208 bp from exon 2 of the SLC37A2 gene, which contains mutation. Genotyping was done by SSCP method and allelic and genotypic frequencies and population genetic indices were calculated by POPGEN software. In SLC37A2 locus, two AA and AB genotypes with frequencies of 98.7 and 1.3, and 86 and 14% were observed in Holstein and Montbeliarde breeds, respectively. Also, SLC37A2 allelic frequencies in both Holstein and Montbeliarde for alleles A and B were estimated to be 99.3, 0.7 and 93 and 7%, respectively. The Fischer's exact and Chi-square tests for comparing allelic and genotypic frequencies between two populations showed that there was a significant difference in allelic and genotypic frequencies between Holstein and Montbeliarde population ($P < 0.05$). After genotyping, a sample of each genotype was sequenced in both end and the bioinformatics of the sequences obtained were performed with BioEdit software. The results showed that in the AB genotype of SLC37A2 gene in Holstein and Montbeliarde cows there was a lack of function mutation (p.R12X). Considering the role of p.R12X mutation in reproductive defects and abortion in Montbeliarde cattle, the results of this study can be directly used in the breeding programs to identify carrier animals and culling them from commercial and rural herds.

Keywords: SLC37A2 Gene, Holstein Cattle, Montbeliarde Cattle, Abortion, Sequencing

Downloaded from rap.sanru.ac.ir at 8:50 +0330 on Saturday November 21st 2020

www.SID.ir