Archive of SID

سومین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی
3rd National Conference on New Concepts in Agriculture
دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
دانشکده کشاورزی
پنج شنبه ۲۶ آذرماه ۱۳۹۴

تنوع ژنتیکی ژن FCGRT در گاوهای هلشتاین ایران با استفاده از تکنیک PCR-SSCP

محمد غلام آزاد*، علی قاضی خانی شاد و جعفر یدی
* گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
* Email: gholamazad.mohammad@yahoo.com

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی تنوع ژنتیکی و محاسبه فراوانیهای ژنی و ژنوتیپی و نیز بررسی وضعیت تعادل هاردی وینبرگ در ژن FCGRT گاوهای شیری هلشتاین ایران به روش PCR-SSCP بود. بدین منظور نمونه گیری خون و بدنبال آن استخراج DNA از ٦٣ راس گاو شیری نژاد هلشتاین و با کمک کیت اختصاصی DNAfast انجام شد. با کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر ناحیه ۲۰۲ جفت باز ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. جهت انجام SSCP ،محصولات PCR نمونه‌های مختلف در ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفوز و تعیین جهش گردیدند. محصولات PCR به منظور تک رشته‌ای شدن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵℃ قرار گرفتند و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل گردیدند. برای انجام SSCP از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد در سیستم الکتروفورز عمودی استفاده گردید. رنگ آمیزی ژل ها نیز با روش نیترات نقره انجام گرفت. نتایج این تحقیق سه الگوی ژنوتیپی برای این جایگاه ژنی را نشان میداد. فراوانی سه الگوی ژنوتیپی AB،AA و CC به ترتیب ٤٣، ٤٤ و ١٣ درصد مشاهده شد و فراوانی آللی A و B و C نیز به ترتیب ٠/٦٤ ، ٠/٢٢ و ٠/١٣ بدست آمد. نتایج تجزیه و تحلیل داده های ژنتیک جمعیت نشان داد که در جمعیت حاضر تعادل هاردی وینبرگ برقرار نیست.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، ژن FCGRT، گاو هلشتاین، PCR-SSCP

مقدمه

برای داشتن گاوهای پرتولید در آینده، باید گوساله های با توان ژنتیکی بالا را سالم و تندرست پرورش دهیم. بهره وری گاوداری تا حد زیادی مشروط به این امر است. بر این اساس باید عملیات بهداشتی و خوراک دهی گوساله ها را به درستی انجام داد. در اولین روزهای زندگی، گوساله ها افزون بر این که برای رشد عضله و تامین انرژی به چربی و پروتیین نیاز دارند، به فاکتورهای رشد، هورمونها و بسیاری از مولکولهای زیستی هم محتاج هستند. آغوز تامین کننده این نیازهای اساسی است. در تغذیه گوساله، آغاز تولیدی مادر نسبت به شیر مادر دارای سطوح بالاتری از پروتیینها، ویتامین ها، محرکهای رشد و مواد ایمنولوژیکی است و بدین منظور برای حفظ هموستازی و تامین نیازهای مربوط به نگهداری و رشد گوساله بهتر از شیر است. خصوصیت مهم آغوز در برابر اکثر مواد خوراکی، مواد ایمنولوژیکی آن و بویژه ایمونوگلوبولین ها است که باعث کاهش احتمال وقوع بیماریهایی از قبیل اسهال و پنومونی و نیز مرگ و میر گوساله شیرخوار میشود. (۱)

در گونه های مختلف پستانداران عبور ایمنوگلوبولین مادر از جفت به ضخامت و تعداد لایه های مختلف موجود بین خون مادر و نوزاد بستگی دارد. نوع جفت در نشخوار کنندگان از نوع اپیتلیوکوریال می باشد که در آن بافت پوششی جنین در تماس مستقیم با بافت رحم بوده و دارای ٦ لایه است و بنابراین عبور مولکولهای کامل ایمنوگلوبولین مادر به

www.SID.ir

Archive of SID

جنین در این نوع جفت امکانپذیر نمی باشد و در نتیجه نوزاد نشخوار کنندگان بطور کامل به ایمنوگلوبولینهای دریافتی از آغوز وابسته است و با همین استدلال خون گوساله تا زمانی که آغوز مصرف نشده فاقد ایمنوگلوبولین است یا مقدار بسیار جزئی ایمنوگلوبولین در آن جریان دارد. با وجود این موضوع زمان جذب مستقیم ایمنوگلوبولین آغوز از طریق سیستم گوارش نسبتا کوتاه است و معمولا تا قبل از سن ٦ هفتگی می توان ایمنوگلوبولینهای با منشاء آغوز را در خون گوساله ردیابی کرد.

ایمنوگلوبولینها دسته ای از پروتئینها به شمار می آیند که بوسیله سلولهای پلاسما در نتیجه تاثیر متقابل لنفوسیتهای B حساسیت آنتی ژن تولید می شود. ایمنوگلوبولینها دارای وزن مولکولی ۹۰۰۰۰۰-۱۸۰۰۰۰ دالتون هستند. همه مولکولهای ایمنوگلوبولین از یک یا چند منومر دارای زنجیره پلی پپتیدی که دو زنجیره سنگین است تشکیل شده اند. زنجیره ها بوسیله پیوند دی سولفیدی به هم متصل شده اند. ایمنوگلوبولین G(IgG) ایمنوگلوبولین غالب در آغوز محسوب می شود زیرا نزدیک به ۹۰-٦٥ درصد از کل ایمنوگلوبولین آغوز را تشکیل می دهد. غلظت ایمنوگلوبولینهای M,A, G در آغوز گاو به ترتیب ۸۰-۱۵،۷۰-۱۵،۱۰-۱۰ درصد می باشد. انتقال IgG(G) به درون آغوز قبل از زایمان کامل می گردد. بنابراین اگر گاو پیش از زایش دوشیده شود و یا آغوز از پستان تراوش کند آغوز بعد از زایمان دارای IgG ناچیزی خواهد بود.

هدف از انجام این تحقیق بررسی پلی مورفیسم و تنوع ژنتیکی و محاسبه فراوانیهای ژنی و ژنوتیپی و نیز بررسی وضعیت تعادل هاردی وینبرگ در ژن FCGRT گاوهای شیری هلشتاین ایران به روش PCR-SSCP است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ٦٣ راس گاو شیری تازه زا متعلق به گاوداری صنعتی با ظرفیت تولیدی ٦٠٠٠ راس و ٢٦٠٠ دوشا واقع در آبیک قزوین نمونه خون به میزان ۸ سی سی در لوله های آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد گرفته شد. نمونه های خون بلافاصله به آزمایشگاه دانشگاه تبریز منتقل گردید تا برای جایگاه ژنی مورد نظر تعیین ژنوتیپ گردند.

استخراج DNA از نمونه های خون با کمک کیت اختصاصی DNAfast انجام شد. تکثیر ناحیه ۲۰۲ جفت باز ژن مورد نظر از نمونه های DNA استخراج شده با کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت.

پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۲۰۲ جفت بازی از ژن مورد نظر به صورت زیر بود:

F: 5-GCGCGGATCAAATTAGTGGG-3
R: 5-AGCGAGCGATAGTTCTCTGC-3

جهت انجام SSCP ،محصولات PCR نمونه‌های مختلف در ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفوز و تعیین جهش گردیدند. محصولات PCR به منظور تک رشته‌ای شدن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵℃ قرار گرفتند و سپس بلافاصله به ظرف

www.SID.ir

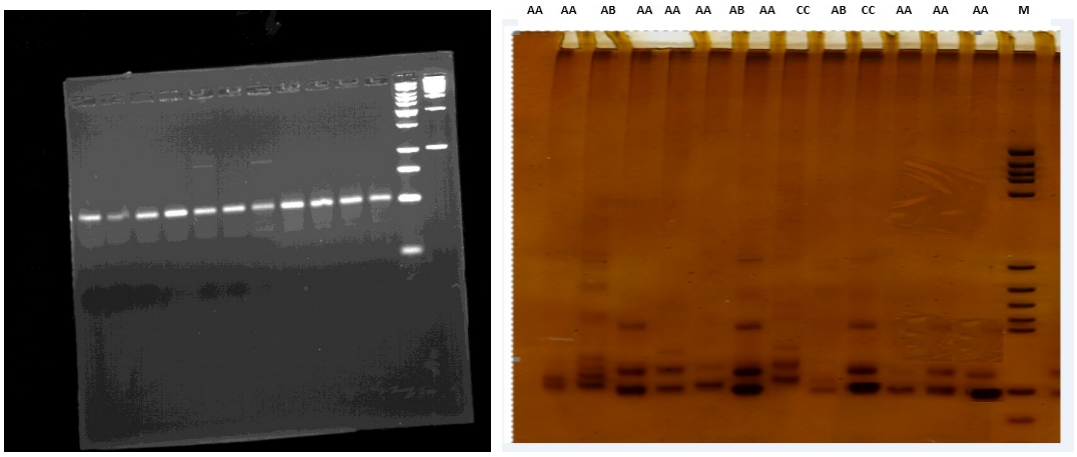
Archive of SID

یخ منتقل گردیدند. برای انجام SSCP از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد در سیستم الکتروفورز عمودی استفاده گردید. رنگ آمیزی ژل ها نیز با روش نیترات نقره انجام گرفت.

برای بررسی فراوانیهای آللی، ژنوتیپی، محاسبه هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی و بررسی تعادل هاردی وینبرگ از آزمون مربع کا (x2) و نرم افزار POP Gene 3.2 استفاده شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق سه الگوی ژنوتیپی برای این جایگاه ژنی دیده شد. از بین ٦٣ نمونه، تعداد نمونه های مربوط به سه الگوی ژنوتیپی AB،AA و CC به ترتیب ۲۷، ۲۸ و ۸ راس با فراوانی ژنوتیپی ٤٣، ٤٤ و ۱۳ درصد مشاهده شد. بر این اساس فراوانی آللهای A و B و C نیز به ترتیب ۰/٦٤ ، ۰/۲۲ و ۰/۱۳ بدست آمد. نتایج تجزیه و تحلیل داده های ژنتیکی نشان داد که در جمعیت حاضر تعادل هاردی وینبرگ برقرار نیست. Zhang و همکاران (۲۰۰۹) هاپلوتیپهای FCGRT (کد کننده زنجیره سنگین) و ارتباط آن را با سطح ایمنوگلوبین کلستروم گاوی مورد مطالعه قرار دادند. آنها ٤ نوع SNP که در ٥ گروه هاپلوتیپی قرار داشتند را در مجموعا ٤٩ راس گاو شیری ارزیابی کردند.آنها ارتباط ژنتیکی بالایی بین هاپلوتیپ پنجم و سطح بالای ایمنوگلوبین کلستروم گزارش نمودند.



شکل ۱: نتایج تکثیر قطعه ژنی ۲۰۲ جفت بازی مورد نظر (چپ) و نتایج حاصل از SSCP محصولات PCR (راست)

Ishii-Watabe و همکاران (۲۰۱۰) تمامی مناطق اگزونی و اینترونی ژن FCGRT را در ۱۲٦ فرد ژاپنی مطالعه کردند. آنها ۳۳ ژنوتیپ مختلف را گزارش نمودند که ۱۷ تای آنها ژنوتیپهای جدید بودند. آنها ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم این ژن و سطح این آنتی بادی در خون این افراد پیدا نمودند. ZHANG (۲۰۱۰) با کمک PCR-SSCP به مطالعه پروموتور ژن FCGRT در ۱۸۹ راس گاو شیری پرداختند. آنها به مطالعه ۳ بخش مختلف این ژن پرداختند و فراوانیهای ژنی مختلفی را برای این ۳ ناحیه گزارش نمودند. در ناحیه ۱ فراوانی AA، AB و BB به ترتیب ۲۵/٤۰٪، ٥۹/۲٦٪ و ۱٥/۳٤٪ مشاهده کردند، در حالی که در ناحیه دوم فراوانی CC، CD و DD به ترتیب ۲۰/٦۳٪، ٥٦/٦۱٪ و ۲۲/۷٥٪ بود. در ناحیه ۳ نیز فراوانی سه ژنوتیپ EE، EF و FF به

www.SID.ir

Archive of SID

ترتیب ۱/۵۹٪، ۱۲/۱۷٪ و ۸۶/۲۴٪ بود. تجزیه تحلیل توالی نشان دهنده ۳ جهش نقطه ای منفرد در نقاط تکثیر شده بود. همچنین به غیر از نقطه اول، دو نقطه دیگر در تعادل هاردی وینبرگ قرار داشتند.

ZHANG (۲۰۱۱) به مطالعه چندشکلی بخش پروموتور و اثر هورمون درمانی بر سطح mRNA در ژن FCGRT پرداختند. آنها گاوهای سیاه و سفید چینی را انتخاب و فراوانی ژن مربوطه را مورد بررسی قرار دادند.

Freiberger (۲۰۱۰) با مطالعه ارتباط پلی مورفیسم در بخش پروموتور ژن FCRN با استفاده از نشانگر VNTR بر روی ۱۰۳ نوزاد هیچگونه ارتباط معنی داری بین ژنوتیپهای مشاهده شده و سطح IgG در این افراد گزارش نکردند.

نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات ZHANG و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشته، اما با نتایج Freiberger (۲۰۱۰) مطابقت ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

۷- فراوانی ژنوتیپی سه الگوی ژنوتیپی AB،AA و CC به ترتیب ۴۳، ٤٤ و ۱۳ درصد و فراوانی آللی A و B و C نیز به ترتیب ۰/٦٤ ، ۰/۲۲ و ۰/۱۳ بدست آمد.

۸- در جمعیت مورد مطالعه حاضر تعادل هاردی وینبرگ برقرار نیست.

منابع

۱- عظیمی. م. ۱۳۸۸.تاثیر روشهای متفاوت خورانیدن آغوز بر سلامت گوساله ها. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه زنجان.

2- Burton JL, Kennedy BW, Burnside EB, Wilkie BN, Burton JH. Variation in serum concentrations of immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian calves. J Dairy Sci 1989; 72:135–149.

3- Doleschall M, Zhao Y, Mayer B, Hammarstrom L, Kacskovics I. 2005. Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. Vet Immunol Immunopathol; 108:145–150

4- Freiberger T, B. Ravčuková , L. Grodecká. 2010. No association of FCRN promoter VNTR polymorphism with the rate of maternal–fetal IgG transfer. Volume 85, Issue 2, Pages 193–197,

5- Laegreid WW, Heaton MP, Keen JE, Grosse WM, Chitko-McKown CG, Smith TP, Keele JW, Bennett GL, Besser TE. Association of bovine neonatal Fc receptor alpha-chain gene (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves. Mamm Genome 2002; 13:704–710.

6- Lu W, Zhao Z, Zhao Y, Yu S, Zhao Y, Fan B, Kacskovics I, Hammarstrom L, Li N. Over-expression of the bovine FcRn in the mammary gland results in increased IgG levels in both milk and serum of transgenic mice. Immunology 2007; 122:401–408

7- ZHANG Chun-lin, WANG Jia-qi, ZHAO Sheng-guo, ZHAO Guo-qi. 2010. SSCP Polymorphism Research of Promoter of FcRn α Chain Gene in Holstein Dairy Cows. China Animal Husbandary veterinary Medicine. , Vol. 37 »Issue (5): 108-111

www.SID.ir