Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 8:30 IRST on Sunday December 5th 2021

بررسی چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبولین گوسفند به روش PCR-RFLP

قربان الیاسی[۱]، جلیل شجاع غیاث[۲]، محمدرضا نصیری[۳]، عبدالمنصور طهماسبی[۲] و ام‌البنین پیراهری[۴]

چکیده

در برنامه‌های نوین اصلاح‌نژاد دام چند شکلی موجود در پروتئین‌های شیر می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی به کار برده شود. بتالاکتوگلوبولین پروتئین اصلی بخش آب‌پنیر شیر نشخوارکنندگان می‌باشد که ژن کدکننده آن روی کروموزوم ۳ گوسفند تعیین نقشه شده است. این پروتئین در طی دوره‌های آبستنی و شیردهی در غدد پستان ساخته می‌شود. مطالعات نشان داده که این پروتئین در اکثر نژادهای گوسفند دارای چند شکلی است و دلیل آن جانشینی ساده یک باز در ژن BLG می‌باشد که با انجام برش آنزیمی توسط RsaI تشخیص داده می‌شود.

هدف از این پژوهش بررسی توزیع ژنوتیپی ژن BLG در گوسفندان بومی است. در این تحقیق نمونه‌های خون از ۱۴۲ رأس گوسفند (قزل، افشاری، مغانی، ماکوئی و آرخارمرینو) جمع‌آوری گردید. DNA ژنومی از ۲۰۰ میکرولیتر خون با روش بوم و همکاران (۱۹۸۹) که توسط شیخایف (۱۹۹۵) تغییراتی در آن داده شده بود استخراج گردید. تکثیر ناحیه پلی‌مورفیک ژن بتالاکتوگلوبولین به طول ۴۵۲ جفت باز از اگزون II با آغازگرهای BLG5 و BLG6 صورت گرفت. برای مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید استفاده گردید. برای برش آنزیمی قطعات DNA تکثیر شده، از آنزیم RsaI استفاده شد. محصولات هضم شده، بر روی ژن پلی‌آکریلامید ۸٪ الکتروفورز شده و با اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی گردید. فراوانی ژنوتیپ‌ها، آلل‌ها، تعادل هاردی- واینبرگ و دندروگرام فواصل ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار PopGen32 محاسبه گردید. فراوانی آلل A در نژاد قزل ۵۶٪، نژاد آرخارمرینو ۴۸٪، نژاد ماکویی ۵۳٪، نژاد مغانی ۳۶٪ و نژاد افشاری ۳۴٪ به دست آمد. به غیر از نژاد افشاری سایر جمعیت های مورد بررسی در تعادل هاردی - واینبرگ بودند. کمترین فاصله ژنتیکی بین نژادهای مغانی و افشاری و بیشترین آن بین نژادهای قزل و افشاری به دست آمد و در نهایت به نظر می‌رسد که PCR-RFLP یک روش مناسب برای تعیین ژنوتیپ و بررسی تنوع ژنتیکی در دام باشد.

واژه‌های کلیدی: *بتالاکتوگلوبولین، گوسفند، چندشکلی، PCR-RFLP*

۱. مربی پژوهش علوم دامی، مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی، استان آذربایجان شرقی

۲. به ترتیب دانشیار و استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. استادیار علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴. کارشناس ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 8:30 IRST on Sunday December 5th 2021

مقدمه

چند شکلی‌های موجود در پروتئین‌های شیر می‌تواند به عنوان نشانگر ژنتیکی به کار برده شود. بتالاکتوگلوبولین (B-Lactoglobulin) پروتئین اصلی بخش آب‌پنیر شیر نشخوارکنندگان است. تحقیقات نشان داده که این پروتئین در بسیاری از نژادها دارای چندشکلی است. آلل B ژن بتالاکتوگلوبولین با تولید بالای شیر در ارتباط است(۲) و در عوض آلل A بازده تولید پنیر را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد که ژنوتیپ BB بتالاکتوگلوبولین با تولید بالای شیر و ژنوتیپ‌های AA و AB با میزان بالای کازئین و پروتئین در شیر همراه هستند(۶). آلل A و B در اسیدآمینه شماره ۲۰ با همدیگر اختلاف دارند(۷) که این ویژگی در نتیجه جانشینی ساده یک باز در ژن بتالاکتوگلوبولین می‌باشد. اطلاعات حاصل از تعیین توالی(Sequencing) نشان داده که یک محل برشی آنزیم RsaI در آلل A وجود دارد که در آلل B موجود نیست. در محل اسید آمینه شماره ۲۰ در آلل A تیروزین (Tyr) قرار دارد که با کدون TAC کد می‌شود در صورتی‌که در آلل B در همان ناحیه کدون CAC قرار گرفته که مسئول کد کردن اسید آمینه هیستیدین (His) است که می‌تواند توسط تکنیک (Restriction Fragment Length Polymorphism RFLP) و با استفاده از آنزیم RsaI تشخیص داده شود. علی و همکاران (۱) توالی آلل‌های A و B را مقایسه کردند و از آن زمان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(Polymerase Chain Reaction) (۹) برای تکثیر ناحیه چند شکل این ژن استفاده شد. هدف از این پژوهش بررسی واریانت‌های A و B و هم‌چنین ژنوتیپ‌های به دست آمده ژن بتالاکتوگلوبولین در نژادهای ایرانی گوسفند با روش PCR-RFLP می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۴۲ نمونه خون از نژادهای گوسفند مورد مطالعه شامل ۳۲ رأس نژاد قزل، ۳۰ رأس نژاد ماکوئی، ۲۹ رأس نژاد مغانی، ۲۹ رأس نژاد افشاری و ۲۱ رأس نژاد آرخارمرینو که به طور تصادفی از مناطق مختلف پرورش انتخاب شده بودند، جمع‌آوری شد. برای جلوگیری از انعقاد خون به میزان ۰/۱ حجم نمونه خون اخذ شده، محلول EDTA (۰/۵ مولار با PH ۸) به لوله‌های حاوی خون افزوده شد. استخراج DNA از ۲۰۰ میکرولیتر خون با متد سیلیکاژل و با روش بوم و همکاران(۳) که توسط شیخایف(۱۰) تغییراتی در آن داده شده بود انجام گرفت. در این روش نخست سلول‌های خونی با استفاده از مواد شیمیایی لیز شده و سپس ذرات بسیار ریز شیشه که DNA را به خود جذب می‌کند به محلول اضافه شد. پس از سانتریفوژ به غیر از رسوب تشکیل شده که حاوی DNA می‌باشد بقیه مواد دور ریخته شد و در مرحله آخر DNA خالص‌سازی گردید. به منظور تعیین کیفیت و کمیت DNA از روش‌های الکتروفورز و اسپکتروفتومتری استفاده شد. برای تکثیر ژن بتالاکتوگلوبولین گوسفند آغازگرهای BLG3 و BLG5 با توالی زیر مورد استفاده قرار گرفت.

BLG3 (5′-TTGGGTTCAGTGTGAGTCTGG-3′)
BLG5 (5′-AAAAGCCCTGGGTGGGCAAC-3′)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۳۵ چرخه (۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه برای واسرشته کردن(Denaturation) ۶۵°C به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال(Annealling) آغازگرها و ۷۲°C به مدت ۴۰ ثانیه برای امتداد(Extension) زنجیره DNA در دستگاه ترموسایکلر(Thermocycler) مدل UNIOII شرکت بیومترا(Biometra) و در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPS، ۲ میکرولیتر مخلوط آغازگرها(۱۰ پیکومول از هر آغازگر)، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA Polymerase(۵u/µl)، ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۱۱/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر) صورت گرفت که آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر یک قطعه ۴۵۲ جفت بازی از اگزون II ژن بتالاکتوگلوبولین گوسفند طراحی شده بودند(۵). به منظور تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید استفاده گردید. برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن بتالاکتوگلوبولین، برش آنزیمی محصولات

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 8:30 IRST on Sunday December 5th 2021

PCR با استفاده از آنزیم محدودگر RsaI شرکت Fermentase به مدت ۳ ساعت در دمای۳۷°C انجام گرفت که در تیوب‌های واکنش مقدار ۸ میکرولیتر محصول PCR، مقدار ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم برشی (۲u/µl) و ۴ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. محصولات هضم شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۸ ٪ الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. نرم افزار PopGen32 برای برآورد فراوانی آلل‌ها، ژنوتیپ‌ها، تعادل هاردی- واینبرگ(Hardy-Waienberg) و ترسیم دندروگرام (Dendrogram) فواصل ژنتیکی بین نژادها به کار برده شد.

نتایج و بحث

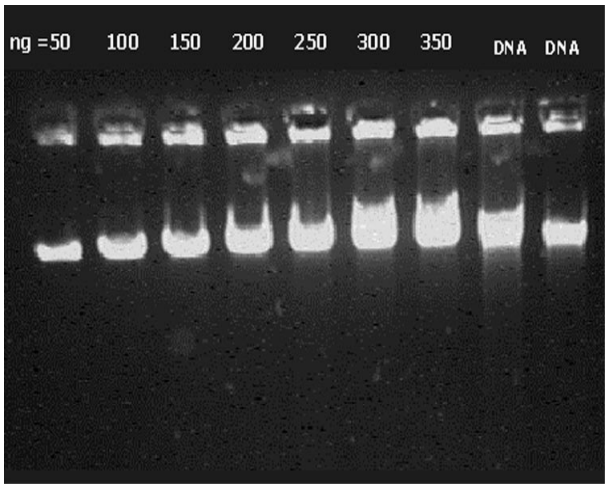
استخراج DNA با روش سیلیکاژل مقادیر بالایی از DNA ژنومی (حدود ۵۰ng/µl) با طولی در حدود ۵۰ الی ۶۰ هزار جفت باز حاصل کرد که در کنار λDNA به راحتی قابل ارزیابی می‌باشد (شکل ۱- الف) و به نظر می‌رسد که اندازه این مولکول‌ها به علت داشتن طول زیاد و خلوص بالا، جهت کارهای مهندسی ژنتیک و آزمایش‌های مولکولی بسیار مناسب باشد. نتیجهٔ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شکل ۱- ب نشان داده شده است. همان طوری که انتظار می‌رفت یک قطعه ۴۵۲ جفت بازی از ژن بتالاکتوگلوبولین شامل قسمتی از اینترون ۱، بخشی از اگزون ۲ و ناحیه‌ای از اینترون ۲ تکثیر شده است که برای تشخیص از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شده است. مقایسه باندهای موجود در نمونه‌های هضم شده محصولات PCR با مارکر PUC19 نشان داد قطعات موجود بر روی ژل پلی‌آکریلامید با آنچه که از روی ترادف DNA ژن بتالاکتوگلوبولین برای ژنوتیپ‌های مختلف پیش‌بینی می‌شد یکسان می‌باشد(شکل ۱- ج). در ژنوتیپ AA باندهای ۱۷۵، ۱۷۰، ۶۶ و ۴۱ جفت بازی وجود دارد در صورتی که در ژنوتیپ BB سه باند ۲۳۶، ۱۷۵ و ۴۱ جفت بازی و در ژنوتیپ هتروزیگوت همه باندها قابل مشاهده هستند. نتیجهٔ حاصل از این پژوهش نشان داد که ژن بتالاکتوگلوبولین در تمام نژادهای مورد آزمایش دارای چند شکلی بوده و هر سه ژنوتیپ حاصل از ۲ واریانت قابل مشاهده است و انجام PCR-RFLP با آنزیم RsaI روش مناسبی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مختلف گوسفند در راستای اصلاح‌نژاد بر اساس ژن بتالاکتوگلوبولین بوده و RsaI آنزیمی اختصاصی بسیار کارآمد برای تشخیص این ژن در نژادهای گوسفند می‌باشد.

فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های ژن بتالاکتوگلوبولین در جدول۱ آورده شده است. در تمام نژادها فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت بیشتر از ژنوتیپ‌های هموزیگوت می‌باشد که با نتایج به دست آمده از تحقیقات ولتکا و همکاران (۱۱) و اکثر پژوهش‌های انجام شده مطابقت دارد و در ضمن نژادهای آرخارمرینو و ماکوئی از تنوع ژنتیکی بیشتری نسبت به سایر نژادها برخوردار هستند. حداقل فراوانی ژنوتیپ AA در نژاد افشاری و حداکثر آن در نژاد قزل به دست آمد. حداقل فراوانی ژنوتیپ BB در نژاد قزل و حداکثر آن در نژاد مغانی برآورد شد. ریکو و همکاران (۸) در گوسفند مرینو فراوانی ۰/۵۸ را برای آلل A و ۰/۴۱ را برای آلل B گزارش کردند. این محققان در نژاد ماسز(Massese) فراوانی ۰/۵۳ را برای آلل A و ۰/۴۷ را برای آلل B گزارش نمودند. دی‌استاسیو (۴) در نژاد وال‌دل‌بلایس(Valle del belice) فراوانی ۰/۳۵ را برای آلل A و ۰/۶۵ را برای آلل B به دست آورد. به غیر از نژاد افشاری سایر نژادهای مورد مطالعه از تعادل هاردی- واینبرگ برخوردار بودند که می‌تواند بر بر عدم انجام تلاقی‌های خویشاوندی و گزینش مصنوعی در راستای ژن بتالاکتوگلوبولین دلالت داشته باشد. احتمال داده شد که عدم وجود تعادل هاردی- واینبرگ در مورد نژاد افشاری، در اثر یکی بودن منشأ گوسفندان نمونه‌برداری شده باشد که به طور ناخواسته باعث انجام تلاقی‌های جهت‌دار گشته است که پس از ریشه‌یابی مسأله این امر محرز شد.

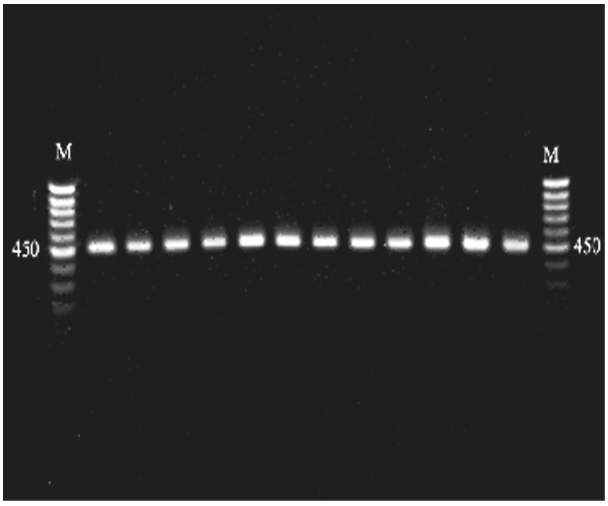
با توجه به گزارش‌های موجود در ارتباط ژن بتالاکتوگلوبولین با صفات تولیدی، انتظار می‌رود که شیر تولید شده توسط نژاد قزل به علت بالا بودن فراوانی آلل A کارآیی

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 8:30 IRST on Sunday December 5th 2021

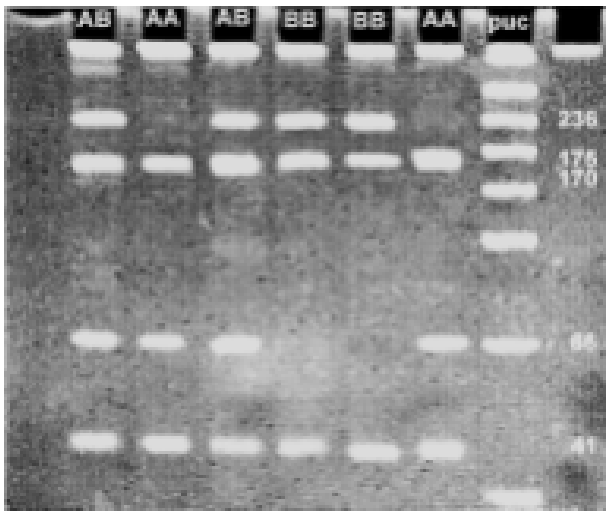
الف)



ب)



ج)



شکل ۱. الف) استخراج DNA به روش سلیکاژل و مقایسه آن با λDNA (دو نمونه سمت راست، DNA مورد آزمایش و بقیه ستون‌ها مقادیر مختلفی از λDNA می‌باشند). ب) تکثیر قطعه ۴۵۲ جفت بازی از ژن بتالاکتوگلوبولین نمونه‌های مختلف در کنار مارکر 100 bp Lader (M) ج) برش آنزیمی محصولات PCR و تعیین ژنوتیپ دام در کنار مارکر PUC19

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 8:30 IRST on Sunday December 5th 2021

جدول۱. تعداد ژنوتیپ‌ها، فراوانی ژنوتیپ‌ها، فراوانی آلل‌ها و آزمون $\chi 2$ برای نژادهای مورد بررسی

نژاد مورد مطالعه	تعداد ژنوتیپ			فراوانی ژنوتیپ			فراوانی آلل		$\chi 2$
	BB	AB	AA	BB	AB	AA	B	A	
قزل	۶	۱۶	۱۰	۰/۱۹	۰/۵۰	۰/۳۱	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۰۰۰
آرخارمرینو	۲۵	۱	۴	۰/۲۴	۰/۵۷	۰/۱۹	۰/۵۲	۰/۴۸	۰/۳۰۸
ماکویی	۶	۱۸	۸	۰/۲۰	۰/۵۳	۰/۲۷	۰/۴۷	۰/۵۳	۰/۰۸۹
مغانی	۱۲	۱۳	۴	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۱۴	۰/۶۴	۰/۳۶	۰/۰۶۵
افشاری	۱۰	۱۸	۱	۰/۳۵	۰/۶۲	۰/۰۳	۰/۶۵	۰/۳۴	۳/۷۰۸*

بیشتری برای پنیرسازی داشته باشد و پنیر بیشتری هم تولید نماید که علی‌رغم نبود اطلاعات علمی، به صورت تجربی کاملاً صحیح است. زیرا پنیر معروف لیقوان که از کیفیت بالایی برخوردار است از شیر این نژاد تهیه می‌شود. به علت بالا بودن فراوانی آلل B در نژادهای مغانی و افشاری تولید بالای شیر و درصد بالای پروتئین‌های آب پنیر و کازئین در شیر این نژادها مورد انتظار است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از اساتید گرامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، پرسنل محترم مجتمع آزمایشگاهی این دانشکده و عزیزانی که از جهاد کشاورزی استان آذربایجان شرقی ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Ali, S., M., J. P. McGlenaghan, A. Simons and J. Clark. 1990. Characterization of the alleles encoding ovine Beta-Lactoglobulin A and B. Gene. 91: 202-207.
2. Bolla, P., A. Caroli, A. Mezzelani, R. Rizzi, G. Pagnacco, A. Fraghi and S. Casu 1989. Milk protein markers and production in sheep. Anim. Genent. 20: (Suppl. 1)- 78.
3. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C.L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen and J. Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clinical Microbiol. 28(3) : 495-503.
4. Di Stasio, I. B.Portolano, M.Todaro, P.Fiandra, P.Giaccone, R.Finocchiaro and M. L. Alicata. 1997. Effect of ovine β-lactoglobulin phenotype on cheese yield and composition. pp. 324-327. *In*: Milk Protein Polymorphism. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
5. Eignatev. 1998. Genetic polymorphisms of milk proteins in Russian sheep breeds and crosses. Ph.D. Thesis, Moscow University, Russia.
6. Garzon, A. I. and J. Martinez. 1992. Beta-Lactoglobulin in Manchega sheep breed: Relationship with milk technological index in handcraft manufacture of manchego cheese. XXIII. Int. Conf. Anim. Genet. Interlaken.
7. Kolde, H. J. and G. Braunitzer. 1983. The primary structure of ovine Beta-Lactoglobulin. Milckwissenschaft. 38: 70-72.
8. Recio, I., A. Fernandez-Fournier, P. J. Martin-Alvarez and M. Ramos. 1997. B-lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: Influence of cheese making properties and milk composition. Lait. 77: 259-265.
9. Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Schare, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Sci. 239: 487-491.
10. Shaikhayev, G.O. 1995. Extraction of DNA From the Whole Blood by Silica Gel. Inc.Gene Biology. Moscow.
11. Vlatka, C. C., M. Feligini, J. Lukac-Havranek, I. Curik and E. Guiseppe. 2002. Genetic polymorphism of Beta-Lactoglobulin in native sheep from the Island of Pag. Food Technol. Biotechnol. 40: 75-78