بررسی چندشکلی در دو جایگاه ژن STAT1 در گاوهلشتاین استان اصفهان

غلامحسین عسکری*[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، قدرت رحیمی میانجی[۳]،زربخت انصاری[۳]
۱ و ۳ – دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی و اعضا هیات علمی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
عضو هیات علمی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

mohsen4794@yahoo.com*

چکیده:

این مطالعه جهت بررسی وجود چندشکلی و محاسبه فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن STAT1 درگاوهای هلشتاین استان اصفهان صورت گرفت. STAT، پروتئینی از فاکتورهای رونویسی است که سیگنالهای بیولوژیک را از فضای خارج به داخل هسته عبور می‌دهد. ژن STAT1 در کروموزوم شماره ۲ در بازوی q و در موقعیت ۲q۳۲,۲ قرار دارد و دارای ۲۰ اینترون و ۱۹ اگزون است.در این مطالعه از ۳۵۰ راس گاو هلشتاین مربوط به پنج گاوداری این استان، پس از جمع آوری نمونه های خون، DNA ژنومی به روش نمکی بهینه استخراج گردید. سپس روی نمونه ها PCR انجام شد و محصولات حاصل از PCR در حضور آنزیم Pag1 مورد هضم قرار گرفتند. در این مطالعه دو جایگاه از ژن مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت که در یکی از جایگاه ها هیچگونه چند شکلی مشاهده نشد و در جایگاه دیگر ژنوتیپ‌های BB ، CC ، DD ، AC ، AB، BC، BD، CD با فراوانی‌های به ترتیب ۰/۰۹۹۹ ،۰/۰۸۵۶، ۰/۰،۰۵۱۴/۲۸۵، ۰/۰۰۸۵، ۰/۰،۰۰۸۵/۰۳۴۱،و ۰/۴۲۷ مورد شناسایی قرار گرفتند. فراوانی آللی نیز برای A ، B ، C و D به ترتیب ۰/۰۲۹۸ ، ۰/۱۲۵ ، ۰/۳۴۲ و ۰/۵۰۳۲ به دست آمد. براساس نتایج بدست آمده جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار نداشت (p‹۰/۰۰۰۱).

کلمات کلیدی: چند شکلی، STAT1، گاو هلشتاین، RFLP_PCR

مقدمه

STAT [۱]، به عنوان یک تنظیم کننده در بیان و چگونگی فعالیت ژن های مرتبط عمل می‌کند (Weiguo and Hershei., 2007). بر اساس گزارشات منتشر شده، خانواده‌ی STAT گاوی، دارای ۷ عضو بوده که شامل:STAT1، STAT2، STAT3، STAT4، STAT5A، STAT5B و STAT6 می‌باشند (Cobanoglu et al., 2006). دو عضو STAT1وSTAT4 روی کروموزوم شماره دو و سه عضو STAT5B, STAT5A وSTAT3 روی کروموزوم شماره ۱۹ و یک عضو STAT6 روی کروموزوم شماره پنج قرار دارند. لازم به ذکر است STAT2 هنوز نقشه‌یابی نشده است (Durbin et al., 1996). ژن STAT1 در کروموزوم شماره ۲ در بازوی q و در موقعیت ۲q۳۲,۲ قرار دارد و دارای ۲۰ اینترون و ۱۹ اگزون است. یکی از رایج و اصلی‌ترین محدوده‌های فعالیت پروتئین STAT1، فعالیت وابسته به رونویسی STAT1 به عنوان بازدارنده تولید اینترفرونIFN[۲] برای جلوگیری از رشد بیش از حد سلول است. این احتمال وجود دارد که از دست دادن پروتئین STAT1 به هر دلیل باعث شیوع بیماری سرطان، به علت اختلال در مسیر کنترل منفی رشد سلولی می‌شود (levy and Gilliland., 2000). پژوهش‌های انجام شده نشان دادند که در موش کاهش STAT1 بر ابقای

---

[۱] - Signal Transducer and Activator of transcription

۲- interfron

لنفوسیت و افزایش آن در پاسخ به IFN تأثیر گذار است (Lee et al., 2000. همچنین موشهای دارای STAT1 با فعالیت ناکارآمد یا ناقص، نسبت به عفونت‌ها و آلودگی‌های ویروسی و باکتریایی بسیار حساس‌تر هستند (Gavrilescu et al., 2004). اهمیت این پروتئین‌ها از نقطه نظر علم پرورش دام در تمایز، رشد و تکامل غدد پستانی می‌باشد (Watson and Neoh., 2008).

گزارش شده است که عامل STAT از راه های مختلفی در تمایز غدد پستانی موثر می‌باشد اما چون STAT1 طی تنظیم تکامل غدد پستانی نسبت به دیگر انواع STAT، مانند نوع ۳ و ۵، الگوی متفاوتی را نشان می‌دهد لذا تشخیص این موضوع که کدام STAT در غدد پستانی و در تنظیم پیشرفت و توسعه آن بیان می‌شود بسیار مهم است. با بررسی mRNA های به‌دست آمده از غدد پستانی در روزهای۷ ،۱۳و۱۶ آبستنی و روزهای ۱ و ۱۴ شیردهی به این نتیجه رسیدند که بیان STAT1 وSTAT3 در خلال دوره، ثابت بوده اما بیان STAT4 و STAT5 در طول تمایز غدد پستانی روی داده و متناسب با آن می‌باشد (Watson., 2001). نتایج مطالعات روی اثر STAT1 در سلولهای سوماتیک شیر که یک شاخص برای سلامتی غدد پستانی در گاو است با گزارش‌های مشابه در انسان و موش متناظر بوده و گزارش شده است که این ژن در این شاخص هم موثر است.

موادوروش ها:

خون گیری واستخراج DNA: پس از ارزیابی اولیه گله های تجاری شیری در سطح استان اصفهان به طور تصادفی ۳۵۰ رأس گاو هلشتاین ازپنج گاوداری انتخاب و از آن‌ها نمونه خون تهیه و به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی منتقل گردید. نمونه ها درلوله های ونوجکت[1] حاوی ۵۰ میلی مول EDTA ریخته و فریز شدند. پس از یخ‌گشایی، DNA ژنومی به روش نمکی بهینه ازسلول‌های لکوسیت استخراج گردید و با استفاده از ژل آگاروز ۰/۷ درصد، DNA ازلحاظ کمیت وکیفیت موردارزیابی قرارگرفت.

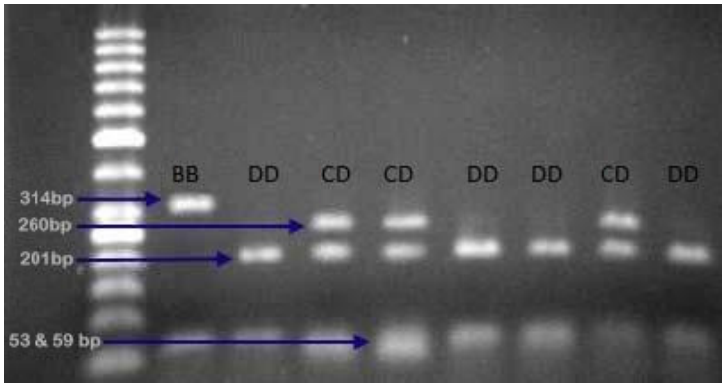
تکثیرقطعه موردنظر بوسیله PCR: واکنش PCR جهت تکثیر قطعه ۳۱۴ جفت بازی موردنظر با استفاده ازآغازگر F:5-GCCTCAAGTTTGCCAGTGGC-3 برای رفت و آغازگر R: 5-GGCTCCCTTGATAGAACTGT-3 برای برگشت صورت پذیرفت. شرایط واکنش PCR، برای جایگاه موردمطالعه به صورت زیر است: ۲میکرولیتردی ان آ، ۲میکرولیتر بافر پی سی آر ۱X، ۰/۷میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰میلی مولار، ۱/۵میکرولیتر از هر آغازگر، ۲۵۰ میکرومولار dNTPs و ۰/۵میکرولیترآنزیم TaqDNA پلیمراز و برای رسیدن به حجم موردنظر از آب مقطر استفاده شد. مراحل واکنش شامل واسرشته سازی ابتدایی دردمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵دقیقه، ۳۵سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت۳۰ ثانیه جهت واسرشته سازی، دمای ۶۳درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و۳۰ثانیه دردمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی شامل ۱۰ دقیقه دردمای ۷۲درجه سانتیگراد انجام گرفت. جهت صحت قطعه بدست آمده ازمحصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول را با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری (۶X) مخلوط شد و بر روی ژل آگاروز ۱,۵ درصد الکتروفورز شد و با رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید مورد تائید و ارزیابی قرار گرفتند. از نشانگر وزنی M100 برای تشخیص اندازه قطعه مورد نظر استفاده گردید.

واکنش PCR برای جایگاه دیگر با استفاده از آغازگر 5'-ATGCGAAGAACTGACTCAACTGG-3' برای رفت و 5'-GTGCCCTTCAGAACTGTTTCAGG-3' برای برگشت صورت گرفت. شرایط واکنش PCR مشابه شرایط بیان شده بود و تنها دمای واسرشته سازی متفاوت بود و برابر ۶۲ درجه سانتیگراد بود. بررسی این جایگاه با روش PCR-SSCP انجام گرفت.

---

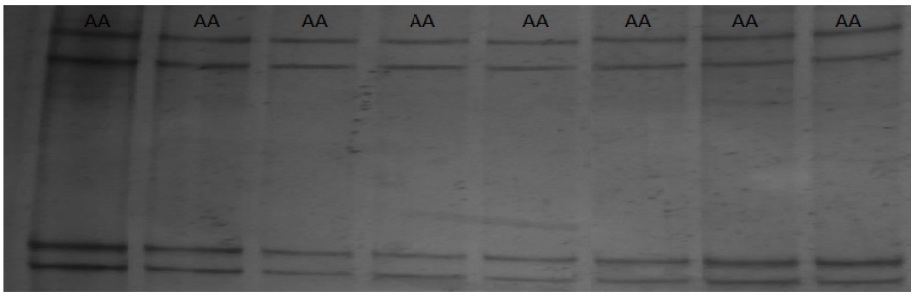
[1]- venoject

تعیین ژنوتیپ: دربررسی چند شکلی ژن STAT1 از آنزیم محدودگر Pag1 استفاده شد. جهت هضم آنزیمی، حجم نهایی واکنش ۲۰میکرولیتر در نظرگرفته شد. میزان محصول پی سی آر، آنزیم و بافرآنزیم مورد استفاده برای هضم به ترتیب ۲و۰/۱۲،۵ میکرولیتردرنظرگرفته شد و با استفاده از آب مقطر حجم نهایی به۲۰ میکرولیتر رسانده شد. نمونه ها در بن‌ماری و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۱۲ ساعت قرارگرفته و سپس نمونه ها روی ژل آگاروز۲ درصد الکتروفورز شد و برای تشخیص اندازه باندها، از نشانگر وزنی ۵۰bp استفاده شد پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، محصولات هضم مورد شناسایی قرارگرفته شد. (شکل ۱) و با توجه به اینکه این آنزیم برشی اختصاصی ما دارای دو جایگاه برش در طول محصول پی سی آر بود تعداد ژنوتیپ‌های زیادی مشاهده شد بررسی وفور ژنی و ژنوتیپی با شمار مستقیم ژنوتیپ‌ها انجام پذیرفت. پس از بررسی هر ژل، بر اساس اختلاف در اندازه قطعات روی ژل نام گذاری زنوتیپ انجام گرفت.



شکل ۱ محصول هضم آنزیمی

در جایگاه دوم پس از بررسی های انجام شده هیچ گونه چند شکلی مشاهده نشد و تمامی نمونه ها یک شکل بودند.(شکل۲)



نتیجه آزمون PCR-SSCP قطعه ۳۲۱ جفت بازی از ژن STAT1 در نژاد هلشتاین

نتایج و بحث

محصول واکنش PCR قطعه ای به اندازه ۳۱۴ جفت باز است که روی ژل آگاروز ۱,۵ درصد مورد شناسایی قرارگرفت. الگوهای ژنوتیپی حاصل ازهضم، با توجه به اینکه این آنزیم برشی اختصاصی ما دارای دو جایگاه برش در طول محصول پی سی آر بود حاکی از وجود

دونوع آلل A و B درجایگاه اول برش آنزیم و C و D در جایگاه دوم برش آنزیمی بود. به این صورت که برش در جایگاه اول با آلل A و عدم برش با آلل B نشان داده می‌شود و در جایگاه برش دوم ایجاد برش توسط آنزیم برشی با آلل C و عدم برش با آلل D نشان داده می‌شود. ودر پایان فراوانی ژنی و ژنوتیپی برای ژنوتیپ‌ها و آلل‌های موجود محاسبه شد که به این صورت بود ژنوتیپ‌های BB ، CC ، DD ، AC ، AB، BC، BD، CD با فراوانی‌های به ترتیب ۰/۰۹۹۹ ،۰/۰۸۵۶، ۰/۰،۰۵۱۴/۲۸۵، ۰/۰۰۸۵، ۰/۰۰۸۵/۰۳۴۱،۰/۰،و ۰/۴۲۷ مورد شناسایی قرار گرفتند. فراوانی آللی نیز برای A ، B ، C و D به ترتیب ۰/۰۲۹۸ ، ۰/۱۲۵ ، ۰/۳۴۲ و ۰/۵۰۳۲ به دست آمد. **براساس آزمون مربع کای نتایج بدست آمده نشان دادند جمعیت مورد مطالعه از نظر ژن** STAT1 **در تعادل هاردی- واینبرگ قرار نداشت (۰/۰۰۰۱>p).**

منابع:

1- Cobanoglu, O., I. Zaitoun, Y.M. Chang, G.E. Shook and H. Khatib. (2006). Effects of the signal transducer and activator of transcription 1 (*STAT1*) gene on milk production traits in Holstein dairy cattle. Journal of Dairy Science., 89: 4433-4437.

2- Durbin, J.E., R.E. Hackenmiller, M.C. Simon and D. E. Levy. (1996). Targeted disruption of the mouse STAT1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. Cell, 84: 443-450.

3- Gavrilescu, L.C., B.A. Butcher, L.D. Rio, G.A. Taylor and E.Y. Denkers. (2004) . STAT1 is essential for antimicrobial effector function but dispensable for gamma interferon production during Toxoplasma gondii infection. Infection and Immunity, 72: 1257-1264.

4- Lee, CK, E. Smith, R. Gimeno, R. Gertner, and DE. Levy. (2000). Divergent roles of STAT1 and STAT5 in malignancy as revealed by gene disruptions in mice .Journal of Immunology. 164: 1286-1292.

5- Watson, C.J. and K. Neoh. (2008). The STAT family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. Seminars in cell & developmental biology, 19: 401-406.

6- Weiguo, C., K. Gurjit and K. Hershey. (2007). Signal transducer and activator of transcription signals in allergic disease. Journal Allergy Clinical Immunul., 119: 521-549.

Polymorphism study in STAT1 gene at two positions in Holstein cows of Isfahan province

Gholamhosain Askary*[1], Saeid Ansari Mahyari[2], Ghodrat Rahimimianji[3],Zarbakht Ansari[3]

1, 3- Department of Animal Science, University of Agriculture Sciences and Natural Resources of Sari

2- Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

Mohsen4794@yahoo.com*

Abstract

This experiment was performed to study a mutation in STAT1 gene and calculate allelic and genotypic frequencies. The STAT1 gene is one of a series of the genes which passes biological signals from out of nucleus into the inner parts. This factor has a regulator action in the gene expression and function. STAT1 is located on chromosome-2 at 2q32.2 containing 20 introns and 19 exons. Three hundred fifty blood samples were collected from Holstein cattle herds and DNA was extracted using modified salting out method. Two positions were studied. One fragment with 321bp polymerase chain reaction (PCR) products was studied but polymorphism was not observed. Another fragment with 314bp by specific

primer pairs was studied and PCR products were electrophorsed. RFLP method was used to for genotyping and the resultant PCR products were digested by Pag1 enzyme. Genotyping results showed that the genotypes BB, CC, DD, AC, AB, BC, BD, CD with frequencies of 0.0999, 0.0856, 0.0285, 0.0514, 0.0085, 0.0341, 0.0085 and 0.427; and the alleles A, B, C, D with frequencies 0.0298, 0.125, 0.342, 0.5032. *Results showed that in* STAT1 gene *there is not Hardy-Weinberg equilibrium* in this population.
Keywords: Holstein cow, STAT1, SSCP