ارزیابی فراوانی چند شکلی جایگاه K232A از ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز(DGAT1) در گاو هلشتاین ایران

ملیحه پیرزاد[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]، محمد علی ادریس[۳]، محمد خوروش[۴]، سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی[۵].

۱-دانشجوی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان. ۲،۴-استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان ۳،۵- استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.

چکیده

از آنجا که تا ثیر چند شکلی DGAT1 K232A در تنوع میزان چربی شیر به اثبات رسیده است، این تحقیق به منظور ارزیابی فراوانی چند شکلی DGAT1 K232A در گاوهای شیری هلشتاین ایران صورت گرفت. ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز۱(DGAT1)، آنزیم آسیل کوآ: آسیل ترانسفراز۱ را کد می‌کنند. این آنزیم در ساخت تری گلیسرید در غده پستانی گاو نقش کلیدی ایفا می‌کند. چند شکلی مورد نظر، نتیجه جایگزینی نوکلئوتید AA→GC در اگزون ۸ این ژن می‌باشد که نتیجتاً باعث تغییر اسیدآمینه آلانین(A) به لایزین(K) در آنزیم تولید شده می-شود. ۴۰۸ فرد با استفاده از تکنیک RFLP-PCR ژنوتایپ شدند. به این صورت که یک قطعه ۴۱۱ جفت بازی، در برگیرنده جهش، تکثیر و با آنزیم *CfrI* هضم می‌گردید و از این طریق ۴۰۸ گاو هلشتاین ژنوتایپ شدند و درکل سه نوع ژنوتایپ KK ، KA و AA تعیین گردید. افراد KK فاقد آلل جهش یافته بودند و افراد KA داری یک آلل جهش یافته و افراد AA دارای دو آلل جهش یافته بودند. فراوانی ژنوتیپی AA ، KAو KK به ترتیب ۰/۳۵۷۸، ۰/۵۵۱۵ و ۰/۰۹۰۷ و فراوانی آلل های K و A به ترتیب ۰/۳۷ و۰/۶۳تخمین زده شد.

واژه کلیدی:ژنDGAT1، چند شکلی K232A، RFLP-PCR، گاوهای هلشتاین ایران

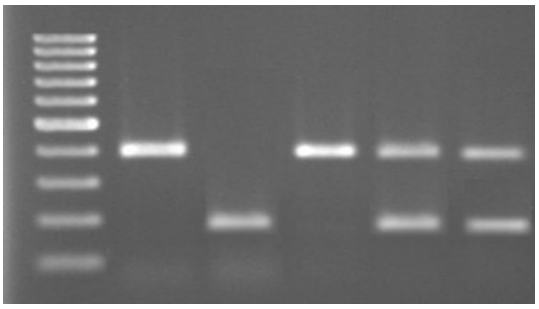
مقدمه

کاربرد نشانگرهای ژنتیکی در اصلاح دام از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و استفاده درست از آن‌ها موجب افزایش سرعت و دقت در پیشرفت ژنتیکی دام می‌شود. در پژوهش‌های مختلف وجود یک QTL موثر بر صفات تولید شیر و درصد چربی شیر در انتهای سانترومر کروموزم ۱۴ گاو گزارش شده است که محدوده ۳ سانتی مورگان را در بر می‌گیرد. ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز۱[1](DGAT1) به عنوان ژن کاندید موثر بر میزان چربی شیر معرفی شده است (گریزارت و همکاران،۲۰۰۲). وجود تنوع آللی در نواحی کد کننده و یا ساختمانی این ژن می‌تواند روی بیان ژن، توالی محصول تولید شده یا کمیت وکیفیت آن تاثیر گذارد. این ژن کد کننده آنزیم دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱ است که در آخرین مرحله ساخت تری گلیسرید در غدد پستانی گاو نقش کلیدی دارد. بیش از ۹۸ درصد چربی شیر از تری گلیسرید تشکیل شده است که بیان کننده نقش مهم این آنزیم در تولید چربی شیر می‌باشد. در ژن DGAT1، ایجاد یک جهش موثر از نوع تک نوکلئوتیدی باعث تبدیل گوانین به آدنین و نتیجتاً منجر به جایگزینی لیزین با آلانین در موقعیت ۲۳۲ امینه اسید در این آنزیم می‌گردد. وجود این جهش باعث اثر بزرگی روی تولید و ترکیب شیر می‌باشد. زیرا آلل جهش یافته به نسبت، می‌تواند منجر به تولید تری گلیسرید بیشتری شود (نسلودوهمکاران، ۲۰۰۸). هدف این تحقیق، بررسی چند شکلی K232A از ژن DGAT1 گاو نژاد هلشتاین در ایران بود.

مواد و روش‌ها

[1] Diacylglycerol acyle transferase 1

در این پژوهش به منظور استخراج DNA و بررسی چندشکلی ژن DGAT1 در گله گاوهای نژاد هلشتاین ایرانی و همچنین بررسی فراوانی ژنی وژنوتیپی، جمعیتی از پنج گله در استان اصفهان مورد مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که در مجموع ۴۰۸ نمونه خون از این گله‌ها به صورت تصادفی جمع‌آوری شد. نمونه خون‌ها تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. همچنین اطلاعات مربوط به رکوردهای شیردهی و تولید مثل گاوها نیز از واحدهای گاوداری تهیه شد. استخراج DNA ژنومی از گلبول‌های سفید به روش استخراج نمکی میلر انجام گرفت. این روش مبتنی بر استفاده از لیز کننده سلول گلبول قرمز و سفید می‌باشد. جهت تعیین غلظت و کیفیت ماده ژنتیکی استخراج شده (DNA) از روش الکتروفورز استفاده گردید که غلظت نمونه‌ها حدود۱۰۰ -۵۰ نانوگرم تخمین زده شد. تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۱۱ جفت باز، در بر گیرنده چند شکلی K232A ژن DGAT1 با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز[1] (PCR)انجام گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده (وینتر و همکاران، ۲۰۰۲) عبارتند از: آغاز گر رفت '-GCACCATCCTCTTCCTCAAG 3-'۵ **و** آغاز گر برگشت: ' 3-GGAAGCGCTTTCGGATG -'۵



شکل۱- ژل آگارز الکتروفورز شده ۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید. انواع ژنوتیپ های حاصل از هضم آنزیمی. ستون ۱ از سمت چپ نشانگر DNA ، ستون ۲و۴ ژنوتیپ KK، ستون ۳ ژنوتیپAA و ستون ۵ و۶ ژنوتیپ KA .

غلظت نهایی مواد در ۲۰ میکرولیتر شامل ۲میکرولیتر DNA (۵۰-۱۰۰نانوگرم)، ۱/۲ میلی مول کلرید منیزیوم، ۰/۱۶ میلی مول مخلوط نوکلئوتیدی، ۶/۶ پیکومول از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم تک پلی مراز(سیناژن) و ۱X بافرPCR بود. واسرشته سازی اولیه DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با الگوی ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد. بعد از این چرخه‌ها، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.از روش چند شکلی طول قطعات محدود شده[2](RFLP) برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها استفاده شد. به این صورت که ۵ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲/۵ واحد آنزیم برشی *Cfr1* (فرمنتاز، آلمان) و ۱X بافر آنزیم *Cfr1* *به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هضم گردید. قطعات حاصل شده در ژل آگاروز ۲/۵ درصد مشاهده گردید. آنزیم برشی، قطعه‌ی ۴۱۱ جفت بازی را به دوقطعه‌ی ۲۰۳ و ۲۰۸ جفت بازی برش می‌دهد. قطعه PCR برش نیافته، نشان دهنده آلل لا یزین(آلل K) و دو قطعه‌ی حاصل از هضم نشان دهنده آلل آلانین (الل A) بود (شکل۱).*

نتایج و بحث

فراوانی آللی وژنوتی

فراوانی ژنوتیپی و اللی مشاهده شده، شاخص نئی، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده **با** استفاده از نرم افزار Pop_Gene برآورد گردیدند(جدول۱). به منظور بررسی تعادل هاردی- وینبرگ در جایگاه‌های مورد مطالعه در این جمعیت، از ازمون کای اسکوار استفاده گردید. فراوانی آلل K در این پژوهش (۰/۳۷) کاملاً با گزارش گویتر و همکاران (۲۰۰۷) در رابطه با بررسی گاوهای

---

[1] Polymerase Chain Reaction

[2] Restriction Fragment Length Polymorphism

هلشتاین فرانسه مطابقت دارد. وینیکیوس[1] و همکاران(۲۰۱۰) با ژنوتایپ ۳۰۷۰ گاو هلشتاین آمریکایی، فراوانی این آلل را ۰/۴ اعلام نمودند. صادقی (۱۳۸۷)نیز طی ارزیابی اثر جایگاه K232A در گاوهای نر هلشتاین ایرانی، فراوانی الل K را ۰/۳۹۹ گزارش نمود. به طور کلی، با توجه به گزارشات صادقی وهمچنین پژوهش حاضر، فراوانی پایین‌تر آلل K نسبت به آلل A، ممکن است به دلیل انتخاب دام‌ها در جهت افزایش تولید شیر طی سال‌های گذشته باشد. از جهت دیگر، جمعیت گاوهای هلشتاین مورد بررسی، حامل درصد بالایی از ژن‌های گاوهای نر آمریکایی هستند که این عامل می‌تواند دلیل دیگری برای مشاهده فراوانی پایین تر آلل K نسبت به آلل A باشد. مقدار کای اسکور ۱۴/۱۹۴ با احتمال ۰/۰۰۰۱۶۵ برآورد شد که نشان دهنده نبود تعادل هاردی- وینبرگ در جمعیت مورد نظر است و از آنجا که افراد جمعیت مورد مطالعه ما از گله‌های صنعتی انتخاب شده بودند، بخاطر اعمال انتخاب و یا انجام تلقیح مصنوعی و نبود آمیزش تصادفی در گله های صنعتی، این نتیجه دور از انتظار نبود. بیشترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به ژنوتیپ KA می‌باشد که با نتایج تالر و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. شاخص نئی و شانون برآورد شده با مقدار نسبتاً بالا، میزان تنوع ژنتیکی بالایی را در جمعیت نشان می‌دهد. در نهایت می‌توان اینطور نتیجه گیری کرد که میزان تنوع ژنتیکی درجمعیت مورد مطالعه بالاست و با توجه به این نکته که تنوع، اساس کارهای اصلاح نژادی است، می‌توان از گاوهای هلشتاین ایران به عنوان یک منبع ژنتیکی مناسب استفاده کرد.

جدول۱ :فراو

ژنوتیب	فراوانی ژنوتیپی	فراوانی اللی	شاخص نئی	شاخص شانون	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	هتروزیگوسیتی مشاهده شده
AA	۰/۳۵۷۸	الل K : ۰/۳۷	۰/۴۶۴۳	۰/۶۵۷	۰/۴۶۴۹	۰/۶۰۷۶
KA	۰/۵۵۱۵					
KK	۰/۰۹۰۷	الل A : ۰/۶۳				

*آلل A و K به ترتیب آلل‌های آلانین و لیزین در جایگاه K232A

منابع

۱-صادقی م. ۱۳۸۶. اثر پلی مورفیسم ژن‌های کاندیدا بر ارزش اصلاحی صفات تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران. رساله دکتری. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی،دانشگاه تهران.

2- Gautier, M., Capitan, A., Fritz, S., Eggen, A., Biochard, D. and Druet, T.2007.Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairycattle. J. Dairy Sci. 90: 2980-2988.

3- Thaller, G., W. Kramer, A, Winter, B. Kaupe, G. Erhardt, R. Fries. 2003. Effects of DGAT1 variants in German cattle breed. *Anim. Sci*. 81: 1911-1918.

[1] Vinicius

4- Naslud, j., W. F. Fikse, G. R. Pielberg, A. Lund. 2008. Frequency and Effect of the Bovineacyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Swedish Dairy cattle. *Dairy Sci*,. 91: p. 2127-2134.

5- Vinicius, M., T. Sonstegard, R. Thallman, E. Connor, R. Schnabel, C. Van Tassell. 2010. Characterization of DGAT1 allelic effects in a sample of North American Holstein cattle. *Anim. Biotechnology*. 21: 88–99.

6- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Sirnon, P., Spelman, R., Georges, M. and Snell, R.2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. Genome Res. 12: 222-231.

Frequency of the Bovine Acyl-CoA:Diacylglycerol Acyltransferase 1 (DGAT1) K232A Polymorphism in Iranian Holstein Dairy Cattle

malihe pirzad[1]. Saeid Ansari Mahyari[2]. Mohammad-Ali Edriss[3], Mohammad Khorvash[4], Badraldin Ebrahim Sayed-Tabatabaei[5]

1-M. Sc of genetic and animal breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technolgy.

2-4- Assistant Professor. College of Agricultural, Isfahan University of technology. 3,5- Professor, College of Agricultural, Isfahan University of technology.

Abstract:

Because of the DGAT1 K232A polymorphism in the diversification of milk fat has been proven, This study were to assess the frequency of DGAT1 K232A polymorphism in Iranian Holstein dairy cows. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) , which is encoded by the DGAT1 gene, is a key enzyme in triacylglycerol synthesis in the mammary gland. The considered polymorphism results from AA→GC nucleotide substitution in DGAT1 gene exon 8 and so, alanine to lysine amino acid change at product protein. This polymorphism proved to significantly affect the percent fat content in milk. Genotyping population, was performed using RFLP-PCR technique. A 411 bp fragment including this polymorphism was amplified and digested with the enzyme *CfrI* to determine the genotypes of 408 Holstein cows.Three types genotype KK, KA and AA were detected. KK individuals have not mutatnt alles, KA individuals have one mutant allele and AA individual have twomutant alleles. Frequency of genetic AA, KA and KK genotypes were respectively 0/3578, 0.5515, and 0.0907 and frequency of K and A allels were estimated 0.37 and 0.63, respectively.

Keywords: DGAT1 gene, K232A polymorphism, RFLP-PCR, Iranian Holstein Cattle