دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران
12th Iranian Genetics Congress
I.G.S.
انجمن ژنتیک ایران

بررسی ارتباط چندشکلی ژن گیرنده لپتین با صفات تولیدی در گاوهای هلشتاین استان اصفهان

سجاد قنبری باغنوئی*[۱]، سعید انصاری مهیاری[۲]،محمدعلی ادریس[۲]، محمد دادپسند[۳]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۲]

۱- کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان ۲- عضو هیات علمی دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

*نویسنده مسئول:**سجاد قنبری باغنوئی، دانشگاه صنعتی اصفهان**،sajad.ghanbari@gmail.com

چکیده

هدف از این پژوهش ارزیابی ارتباط چندشکلی موجود در ژن گیرنده لپتین با صفات تولیدی بود. بدین منظور از ۳۹۵ رأس گاو شیری مربوط به پنج گاوداری استان اصفهان نمونه‌های خون جمع‌آوری شد. DNA با روش استخراج نمکی استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ای به طول ٤٠٠ جفت باز تکثیر و توسط ژل آگاروز ۱ درصد مورد شناسایی قرار گرفت. قطعه تکثیر شده به وسیله آنزیم محدودگر *TaqI* مورد هضم قرار گرفت. سه ژنوتیپ برای ژن گیرنده لپتین در جمعیت مورد بررسی شناسایی شد. ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات تولیدی بر اساس یک مدل خطی و با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS بررسی شد. اثر ژنوتیپ بر تولید شیر ۳۰۵ روز شیردهی، درصد چربی و درصد پروتئین معنی دار نبود.

کلمات کلیدی: ژن گیرنده لپتین، صفات تولیدی، گاوهای شیری، چند شکلی

مقدمه

تعداد زیادی چندشکلی در ژنهای مختلف موثر روی صفات تولیدی و تولیدمثلی گزارش شده است [٤]. لپتین، گیرنده لپتین، هورمون رشد و گیرنده هورمون رشد از جمله ژنهای شناسایی شده در این ارتباط میباشند [۱]. لپتین هورمون پروتئینی است که عمدتاً بوسیله بافت چربی سفید سنتز و ترشح میشود و در کنترل فعالیتهای فیزیولوژیک ازجمله کنترل مصرف خوراک، به کارگیری انرژی و فعالیتهای تولید مثلی و ایمنی ایفای نقش میکند. لپتین در تلیسههای گاو شیری در حال رشد در آغاز پیوبرتی نقش ایفا میکند [۲].

گیرنده لپتین حدواسط عملکردهای فیزیولوژیک لپتین میباشد . شش ایزومر از این گیرنده لپتین (LEPR) شناسایی شدهاند، که فقط بزرگترین ایزومر آن (LEPR-b) توانایی پیامدهی را دارد [۲]. بیان گسترده LEPR-b در هیپوتالاموس پیشنهاد میکند که احتمالاً یک حدواسط ضروری برای عمل لپتین در سطح هیپوتالاموس میباشد . ژنهای لپتین و گیرنده لپتین گاو به ترتیب روی کروموزوم ٤ و ۳ مکانیابی شده است . چندین چندشکلی در ژن لپتین کشف شده در حالی که فقط یک چندشکلی در ژن گیرنده لپتین کشف شده است. بعضی از این چندشکلیها ممکن است بر فعالیت یا بیان لپتین و گیرندهاش اثر داشته باشد [۳]. هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده از ژن گیرنده لپتین به عنوان ژن کاندیدا در برنامه‌های انتخاب گاوهای شیری در سنین اولیه میباشد.

مواد وروشها

از ۳۹۵ گاو هلشتاین از ۵ گاوداری صنعتی استان اصفهان که دارای ثبت اطلاعات تائید شدهای بودند از رگ دمی توسط لوله ونوجکت[1] (خلاء) حاوی ماده ضد انعقاد EDTA[2] نمونهگیری خون به عمل آمد. نمونهها در کنار یخ به آزمایشگاه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان منتقل و سپس در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از یخگشایی، DNA ژنومی به روش نمکی از سلولهای لکوسیت استخراج گردید و با استفاده از ژل آگاروز ۰/۷ درصد، DNA از لحاظ کمیت و کیفیت مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) از مواد موجود در جدول ۱ استفاده گردید؛ همچنین توالی آغازگر مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول۱- مواد مورد نیاز برای واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR)

ماده	میزان مصرف	غلظت در محلول پایه	غلظت در حجم ۲۰µl
DNA	۲ میکرولیتر	۲۵ نانوگرم در میکرو لیتر	۵۰ نانو گرم
بافرPCR	۲ میکرولیتر	۱۰X	۱X
کلرید منیزیم	۰/۸ میکرولیتر	۵۰ میلی مولار	۲ میلی مولار
مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs)	۰/۵ میکرولیتر	۱۰ میلی مولار	۲۵۰ میکرو مولار
آغازگر رفت	۱ میکرولیتر	۱۰ پیکو مول در میکرو لیتر	۱۰ پیکو مولار
آغازگر برگشت	۱ میکرولیتر	۱۰ پیکو مول در میکرو لیتر	۱۰ پیکو مولار
تک پلیمراز	۰/۵ میکرولیتر	۵ واحد در میکرو لیتر	۲/۵ واحد

جدول ۲- توالی آغازگرهای رفت و برگشت

آغازگر	توالی
رفت	5'- GCA ACT ACA GAT GCT CTA CTT TTG T*-3'
برگشت	5'- CAG GGA AAT TTC CCT CAA GTT TCA A-3'

*نوکلئوتید دارای چندشکلی

دو میکرو لیتر از هر نمونه DNA ژنومی داخل ویالهای ۰/۲ ریخته شد. سپس با توجه به تعداد نمونه ها اقدام به تهیه مخلوطی از کل مواد مورد نیاز برای تمام نمونه ها گردید. سپس به اندازه ۱۸ میکرو لیتر از مخلوط تهیه شده به هر یک از ویال های حاوی نمونه DNA اضافه شد و ویالها به دستگاه ترموسایکلر منتقل گردید. مراحل واکنش شامل واسرشته سازی ابتدایی دردمای ۹٤ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه، ۲۹سیکل شامل ۹٤ درجه به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشته سازی، دمای ٦۰ درجه به مدت ٦۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و٦۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت. جهت صحت قطعه بدست آمده ازمحصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول را با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری (٦X) مخلوط شد و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد

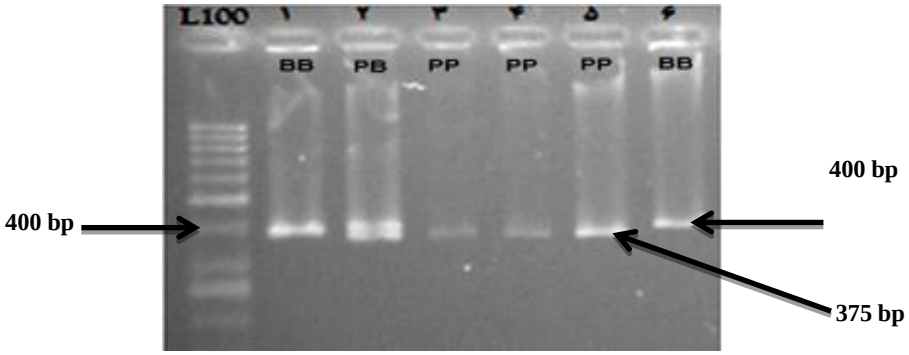
[1] Venoject
[2] Ethylene diamine tetra acetic acid

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.جهت صحت قطعه بدست آمده ازمحصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول را با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری (6X) مخلوط شد و بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و از نشانگر وزنی M100 برای تشخیص اندازه قطعه مورد نظر استفاده گردید.

تعیین ژنوتیپ

در بررسی چند شکلی ژن گیرنده لپتین از آنزیم برشی *TaqI* استفاده شد. پس از هضم روی ژل آگاروز ۲/۵ 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 و با توجه به اینکه این آنزیم برشی دارای یک جایگاه برش در طول محصول PCR بود سه ژنوتیپ مشاهده گردید. پس از بررسی هر ژل، بر اساس اختلاف در اندازه قطعات روی ژل نامگذاری زنوتیپ انجام گرفت (شکل۱).

شکل ۱- محصول هضم ژن گیرنده لپتین روی ژلTBE، ۲/۵ درصد



مدل آماری

مدل آماری مورد استفاده جهت بررسی ارتباط چندشکلی ژن گیرنده لپتین بر صفات تولیدی (تولیدشیر تصحیح شده، درصد پروتئین شیر و درصد چربی شیر) شکم اول به صورت زیر میباشد :

$$y_{ijk}= M + G_i + HYS_j + b_1(V_{ijk}-\overline{V}) + e_{ijk}$$

Y_{ijk}، صفات تولیدی (تولید شیر تصحیح شده، درصد پروتئین شیر و درصد چربی شیر)؛ M میانگین کل، G_i اثر ثابت ژنوتیپ (BB، BPو PP)، HYSj اثر ثابت گله-سال-فصل زایش، V_{ijk} طول دوره شیردهی براساس روز و V میانگین روزهای طول دوره شیردهی، b_1 ضریب رگرسیون جزئی مربوط به طول دوره شیردهی میباشد . در این مدل اثر گله-سال-فصل زایش به عنوان اثرات ثابت مدیریتی فرض شده است. به دلیل تصحیح شیر برای ۳۰۵ روز شیردهی اثر طول دوره شیردهی روی تولید شیر در نظر گرفته نشد.

نتایج و بحث

عامل ژنوتیپ روی صفات تولیدی دوره اول شیردهی اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۱). بانوز و همکاران نتایج مشابهی در مورد تولید شیر گزارش کردند [۱]. اثر گله–سال–فصل زایش روی تولید شیر تصحیح شده و درصد چربی شیر شکم اول معنیدار بود ($p<۰/۰۱$). بررسی‌های انجام شده بر روی تأثیرگذاری روزهای شیردهی نشان داد که هیچگونه ارتباط معنی‌داری بین روزهای شیردهی و درصد چربی شیر وجود ندارد ($p>۰/۰۵$). نتایج حاصل همچنین نشان داد که روزهای شیردهی اثر معنیداری بر درصد پروتئین شیر نشان داد ($p<۰/۰۱$)، اما اثر گله– سال – فصل زایش برای درصد پروتئین معنیدار نبود.

جدول۱. مقایسه میانگین سطوح مختلف ژنوتیپ برای صفات تولیدی

ژنوتیپهای دارای حروف مشترک اختلاف معنیداری در سطح ۰/۰۵ ندارند

ژنوتیپ	شیر تصحیح شده (کیلوگرم)	درصد چربی	درصد پروتئین
BB	۹۵۰۶/٤٦^{a}±۲۱۸/۲۷	۳/۲۲۹^{a}±۰/۰۸	۲/۹۹^{a}±۰/۰۳
PB	۹٥٤۹/٤۳^{a}±۱۲٦/۷۹	۳/۱۸۳^{a}±۰/۰٥	۲/۹۸^{a}±۰/۰۲
PP	۹۳٦٥/۱۰^{a}±۱۳٦/۳۹	۳/۱۷۹^{a}±۰/۰٥	۲/۹۷^{a}±۰/۰۲

نتیجهگیری کلی

نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داده است که ژنوتیپ ژن گیرنده لپتین با هیچ یک از صفات مورد بررسی (شیر تصحیح شده، درصد چربی و درصد پروتئین) ارتباط معنیداری نشان نداد. با توجه به اجرای برنامه‌های بهنژادی و انتخاب برای صفات تولیدی از جمله انتخاب در جهت افزایش تولید شیر در گلههای مورد بررسی مشاهده گردید که این ژن باهیچ یک از صفات تولیدی مورد بررسی ارتباط معنیداری ندارد . که دلیل آن میتواند عدم لینکاژ ژنی بین ژن گیرنده لپتین و ژنهای مرتبط با صفات تولیدی دانست . به عنوان یک پیشنهاد به نظر میرسد که بررسی توام چندشکلی ژن لپتین و ژن گیرنده آن روی صفات عملکردی میتواند شناخت بهتری از تاثیر این ژنها را نشان دهد .

منابع

1- **Banos, G., Woolliams, J. A., Woodward, B. W., Forbes, A. B., Coffey, M. P., 2008.** Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerolacyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK Dairy Cows. J. Dairy Sci. 91: 3190-3200.

2- **Komisarek, J., 2010.** Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Anim. Sci. Pap. Rep. 28: 133-141.

3- **Myers, M. G. 2004.** Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. The Endocrine Society All rights of reproduction in any form reserved

4- **Oikonomou, G., Angelopoulou, K., Arsenos, G., Zygoyiannis, D., Banos, G., 2008.** The effects of polymorphisms in the DGAT1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. International Society for Animal Genetics, Animal Genetics. 40: 10-17.

Association of polymorphism of Leptin receptor gene with production traits of Isfahan Holstein dairy cows

Sajad Ghanbari*[1], S. Ansari Mahyari[1], M. A. Edriss[1], M. Dadpasand[2], B.E. Sayed Tabatabaei[3]

[1]Department of Animal Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, [2]Department of Animal Science, College of Agriculture, Shiraz University
[3]Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

*Sajad Ghanbari E-mail address: sajad.ghanbari@gmail.com

Abstract:
The objectives of present study were to evaluate the association between Leptin receptor gene polymorphism and production traits of Holstein cows of Isfahan province. For this purpose, blood samples were collected from 395 cows of five Holstein dairy herds in Isfahan province. DNA was extracted using salting out procedure. The DNA quality and quantity were assessed by electrophoresis. The 400bp fragment of the gene was amplified by specific primers. PCR products were detected by electrophoresis on 1% TAE Agarose gel. Amplified fragment digested via *Taq*I restriction enzyme. Statistical analysis was done by GLM procedure of the SAS software. The observed genotypes didn't show any significant relationships with milk, fat or protein percentage.

Key words: Leptin receptor gene, performance traits, dairy cows, polymorphism