

مطالعه چند شکلی ژن *ABCG2* در گاوهای نر نژاد هلستاین ایران

سید علی موسوی زاده^۱، عبدالرضا صالحی^{۲*}، محمد مهدی امین افشار^۳، محمد حسین ناظم شیرازی^۴

۱ و ۲- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیار گروه علوم دامی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران

۴- کارشناس ارشد دامپزشکی کشور مرکز تشخیص و آزمایشگاه کنترل دارو و مواد بیولوژیک تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arsalehi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

ژن *ABCG2* در کرموزم ۶ گاو واقع شده و با بیان پروتئین *ABCG2* درانتقال مواد دارویی از غشا پلاسما و کسترویل به شیر نقش دارد. در اثر جهش در باز شماره ۱۸۶ اگزون ۱۴ آلل A به آلل C تبدیل شده و در نتیجه اسیدآمین تیروزین به سرین تغییر یافته و افزایش میزان شیر و کاهش درصد پروتئین و چربی را به همراه دارد. هدف از این تحقیق بررسی چند شکلی ژن *ABCG2* در گاوهای نر نژاد هلستاین ایرانی بود. DNA ژنومی از ۱۰۵ نمونه اسپرم گاوهای نر هلستاین استخراج شد. آغازگرها توسط نرم افزار Oligo طراحی و برای تکثیر قطعات مورد نظر استفاده گردید. محصولات PCR تعیین توالی شدند، نتایج با توالی موجود در بانک جهانی ژن NCBI مقایسه شدند. جهش A/C در باز شماره ۱۸۶ اگزون ۱۴ با فراوانی ۰/۰۲ مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

چندشکلی،
ژن *ABCG2*
گاوهای هلستاین ایران.

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعاتی بر روی مکان صفت کمی QTL به فاصله ۴ سانتی مورگان روی کرموزوم ۶ گاوهای شیری انجام شده است که نتیجه آن شناسایی ژن‌هایی است که بر روی ترکیب شیر مؤثر می‌باشند (Olsen et al. 2005; Cohen-Zinder et al. 2005). جایگاه ژن *ABCG2* در بانک جهانی ژن (NCBI) با شناسه AJ871176 (ID) معرفی می‌شود. طول این جایگاه ۱۷۱۷۱۲ جفت باز است و شامل ژن‌های *ABCG2*، *PKD2* و *SPP1* می‌باشد. ژن *ABCG2* دارای ۱۶ اگزون و ۱۵ اینترون است و محدوده آن از باز ۲۱۲۲۵ تا باز ۶۶۱۳۸ می‌باشد.

موش باکره وجود ندارد ولی در اواخر آبستنی و بویژه در دوران شیردهی افزایش می‌یابد (Jonker et al. 2005). در دام افزایش ABCG2 از زمان زایش شروع و تا پایان دوره شیردهی ادامه دارد (Cohen et al. 2004). محصولات ژن ABCG2 برای بسیاری از واکنش‌های سلولی ضروری است و جهش در آن تأثیر زیادی بر فعالیت‌های سلولی دارد (Robey et al. 2003). این پروتئین سلول‌های بدن را از انواع مواد سمی محافظت می‌کند و نقش عمده‌ای در روده، کبد و جفت دارد. وجود چند شکلی در ژن ABCG2 می‌تواند بر روی جذب و توزیع مواد دارویی موثر باشد. از طرف دیگر جهش‌های موجود در این ژن را می‌توان به عنوان مارکرهای انتخابی در ژن درمانی استفاده کرد (Sarkadi et al. 2004). پروتئین مقاومت سرطان سینه، از جمله پروتئین‌های خانواده ژن ABCG2 می‌باشد که اخیراً کشف شده و به طور گسترده در جفت^۶ بیان می‌شود. نقش این پروتئین که در دوران آبستنی در انسان و موش افزایش می‌یابد به عنوان محافظت کننده جنین در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Litman et al. 2000). هدف از این تحقیق مطالعه چندشکلی اگزون ۱۴ ژن ABCG2 در گاوهای نر هلشتاین ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

DNA ژنومی از ۱۰۵ نمونه اسپرم گاوهای نرآزمون نتاج شده هلشتاین ایران استخراج شد. در این تحقیق از کیت شرکت Roche^۷ آلمان با شماره شناسایی ۱۱۷۹۶۸۲۸۰۰۱ برای استخراج DNA استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دو روش ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتر تعیین شد. میانگین غلظت DNA استخراج شده در کل نمونه‌ها حدود ۵۰۰ ng/μl بود. آغازگرها توسط نرم افزار Oligo طراحی و صحت آن‌ها در بانک جهانی ژن (NCBI) بررسی شد. توالی آغازگرها بدین صورت بود:

Forward: 5'-GTATTCACGAGACTGTCAGGG-3'

Reverse: 5'-GGCTTTATTCTGGCTGTTTCC-3'

بهینه‌سازی PCR در دو حالت با استفاده از کیت PCR آماده از شرکت Ampliqon کشور دانمارک و کیت PCR به صورت جدا

^۶ Placenta

^۷ Roche Kit

اگزون ۱۴ این ژن از ۹۰ جفت باز تشکیل شده که جهش A/C در باز شماره ۸۶ این اگزون و باز شماره ۶۲۵۶۹ از جایگاه AJ871176 ایجاد شده و در اثر آن اسیدآمینه تیروزین به سرین تبدیل می‌شود^۱. این چندشکلی در NCBI با شناسه rs43702337 (ID) معرفی شده است^۲. مطالعه جایگاه ژن ABCG2 و ارتباط آن با صفات تولید شیر در گاوهای شیری نشان داد، آلل A این ژن که توانایی رمز اسیدآمینه تیروزین (اسید آمینه در موقعیت ۵۸۱) را دارد مقدار و درصد چربی و پروتئین را افزایش و مقدار تولید شیر را کاهش می‌دهد. این آلل در اثر جهش به آلل C و اسید آمینه سرین تبدیل می‌شود که موجب کاهش درصد چربی و پروتئین و افزایش میزان تولید شیر می‌شود (Cohen-Zinder et al. 2005; Olsen et al. 2007). ارتباط شش جایگاه ژن‌های ABCG2، OLR1، SCD1 و PPARGC1A با ترکیب شیر را بر روی گاوهای نر هلشتاین لهستانی بررسی شد. نتایج تحقیق نشان داد، جهش A/C (Y581S) اگزون ۱۴ ژن ABCG2 به عنوان بیشترین جایگاه تأثیر گذار بر روی صفات تولیدی شیر، بین جایگاه‌های دیگر است (Dorynek 2009) (Komisarek and). نوعی مسمومیت در کبد گوسفند^۳ بوسیله سم قارچ Sporidesmin^۴ با نام علمی Facial eczem (FE) بوجود می‌آید. مقاومت به این بیماری تحت تأثیر چند ژن قرار دارد. مطالعه جایگاه صفات کمی (QTL)^۵ مرتبط با این صفت در کروموزم‌های گوسفند نشان می‌دهد که ژن ABCG2 به عنوان یک ژن کاندیدا در انتقال مواد دارویی بر روی این صفت موثر می‌باشد (Duncan et al. 2007). تحقیقات نشان می‌دهد پروتئین ABCG2 نقش مهمی در ترشح مواد بالینی و دارو به داخل شیر گوسفند و گاو دارد و مقدار آن در دوران آبستنی افزایش می‌یابد (Olsen et al. 2007). ABCG2 به عنوان انتقال دارو به پلاسما، کلسترول به شیر و انتقال مواد بالینی از مادر به نوزاد از طریق شیر مؤثر است (Cohen et al. 2004). آنالیز مواد بالینی در مراحل مختلف رشد پستان نشان می‌دهد ABCG2 در

^۱ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&val=70671396>

^۲ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?subsnp_id=65624775

^۳ Hepatogenous Mycotoxicosis

^۴ Fungal Toxin Sporidesmin

^۵ Quantitative Trait Loci

جدول ۳- غلظت استفاده شده در واکنش PCR با استفاده از کیت PCR به

صورت مجزا

غلظت استوک	حجم مورد استفاده در واکنش	اجزاء واکنش
۱۰ x	۵ µl	بافر (Buffer)
۱۰ mM	۱ µl	dNTPs
۱۰ pM	۱ µl	Primer Forward
۱۰ pM	۱ µl	Primer Reverse
۵ Unit/ µl	۰/۲ µl	آنزیم Taq DNA Polymerase
-	۱۱ µl	Water
۱/۵ mM	۰/۸ µl	MgCl ₂
۵۰ ng / µl	۵ µl	DNA
-	۲۵ µl	حجم نهایی واکنش

جدول ۴- چرخه حرارتی تنظیم شده برای ترموسایکلر

تعداد سیکل	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	مراحل PCR
۱	۱۵ دقیقه	۹۵	واششت اولیه
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۵	واششت
۳۵	۳۰ ثانیه	۵۰	اتصال آغازگر
۳۵	۴۰ ثانیه	۷۲	بسط
۱	۵ دقیقه	۷۲	بسط نهایی

نتایج و بحث

کشورهای مختلفی روی ژن *ABCG2* مطالعه کرده و گزارشاتی را منتشر کرده‌اند، تمامی تحقیقات از نمونه خون برای بررسی جایگاه مورد نظر استفاده کرده‌اند (Olsen 2007; Komisarek J and Dorynek Z 2009; Cohen-Zinder et al. 2005; Tantia et al. 2006). در این تحقیق برای اولین بار از نمونه اسپرم استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت جایگاه این ژن و بالا بودن هزینه‌های تعیین توالی، شناسایی آنزیم برشی برای جایگاه مورد نظر و استفاده از تکنیک RFLP که هزینه پائین‌تری دارد، حائز اهمیت است. آنزیم برشی *StyLT1* با استفاده از نرم‌افزار MAPDRAW، برای جایگاه مورد نظر شناسایی شد که پیش از این گزارش نشده بود. توالی شناسایی آنزیم برشی *StyLT1* به صورت CAGAG می‌باشد که با توجه به توالی تکثیر شده، جایگاه موتانت (*CTCTG*) ژن را به صورت اختصاصی شناسایی کرده و آن را برش می‌دهد. تحقیقات زیادی برای شناسایی آنزیم برشی *StyLT1* انجام شده است. نتایج نشان می‌دهد این آنزیم در باکتری *Sahmonella-Typhimurium* وجود داشته و توالی 5'-CAGAG-3' را شناسایی می‌کند (Backer and Colson 1991a; Backer and Colson 1991b; Ryan, and Reggie 1999) در این پژوهش قطعه ۲۴۰ جفت بازی مربوط به جایگاه قسمت

از شرکت کیاژن آلمان استفاده شد. جدول یک اجزاء واکنش و غلظت آن‌ها را با استفاده از کیت PCR آماده نشان می‌دهد. به منظور بهینه‌سازی PCR و تعیین مناسب‌ترین دمای اتصال آغازگرها از شیب حرارتی استفاده و مناسب‌ترین دمای اتصال برای آغازگرها مشخص شد. در پایان مناسب‌ترین زمان لازم برای واسرشته‌سازی، اتصال و گسترش تعیین شد (جدول ۲).

جدول ۱- غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR با استفاده از کیت PCR آماده

مواد مورد استفاده	غلظت استوک	حجم مورد استفاده
آغازگر رفت	۱۰ PM	۳ µl
آغازگر برگشت	۱۰ PM	۳ µl
کیت PCR		۱۲/۵ µl
DNA		۵ µl
ddH ₂ O		۱/۵ µl
حجم نهایی		۲۵ µl

جدول ۲- چرخه حرارتی تنظیم شده برای ترموسایکلر

مراحل PCR	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد مرحله
واششت اولیه	۹۵	۴ دقیقه	۱
واششت	۹۵	۶۰ ثانیه	۳۵
اتصال آغازگر	۶۰	۴۵ ثانیه	۳۵
بسط	۷۲	۶۰ ثانیه	۳۵
بسط نهایی	۷۲	۷ دقیقه	۱

به منظور بهینه‌سازی PCR، در مرحله اول برای تعیین مناسب‌ترین دمای اتصال آغازگرها از شیب حرارتی استفاده و مناسب‌ترین دمای اتصال برای آغازگرها مشخص شد. در مرحله دوم به منظور حذف باندهای غیراختصاصی و تعیین مناسب‌ترین غلظت کلرید منیزیم از شیب غلظتی (۱/۵ تا ۴/۵ میلی‌مولار) استفاده شد و مناسب‌ترین غلظت یون منیزیم مشخص شد. جدول ۳ اجزاء واکنش و غلظت آن‌ها را با استفاده از کیت PCR به صورت جدا را نشان می‌دهد. در مرحله سوم، پس از انجام آزمایشات و برنامه‌های مختلف مناسب‌ترین زمان لازم برای واسرشته‌سازی، اتصال و بسط به دست آمد (جدول ۴). پس از انجام عملیات PCR، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با استفاده از کیت کیاژن خالص سازی شدند. در نهایت نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت MWG آلمان و مایکروژن کره جنوبی فرستاده و نتایج تعیین توالی با توالی موجود در NCBI مقایسه شدند.

چند شکلی ژن *ABCG2* و *DGAT1* در گاوهای بومی هندی و بوفالو نشان داد که فراوانی آلل‌های *DGAT1*^A و *ABCG2*^A در جمعیت تثبیت شده‌اند، که با تولید پائین شیر، و در صد بالای چربی و پروتئین شیر آن‌ها متناسب است (Tantia et al. 2006). بررسی تحقیقات انجام شده بر روی ژن *ABCG2* در نژادهای مختلف نشان داد که آلل *A* به صورت غالب در همه جمعیت‌ها وجود دارد (Ron et al. 2006). در بررسی چندشکلی این ژن در گاوهای اروپایی^۲ و هندی^۳ گزارش شد که آلل *A*، آلل اجدادی می‌باشد و جایگزین شدن آلل مزبور با آلل *C* احتمالاً پس از انشعاب گاوهای اروپایی و هندی از یکدیگر رخ داده است (Ron et al. 2006). نتایج حاصل از فراوانی جهش *A/C* در گاوهای هلستاین ایران مشخص می‌کند، آلل *A* مشابه نتایج کشورهای مختلف بر روی نژادهای متفاوت به صورت غالب بوده و نشان دهنده روند شاخص انتخاب برای صفات مقدار و درصد چربی و پروتئین در ایران می‌باشد. با توجه به نقش کلیدی و کرموزومی ژن *ABCG2* در صفات تولید، تولید مثلی و مقاومت به بیماری در موجودات مختلف، مطالعات بیشتر چندشکلی این ژن به‌ویژه در دام توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از مرکز اصلاح نژاد دام کشور، آزمایشگاه بیوتکنولوژی سازمان دامپزشکی، دکتر کسری اصفهانی و خانم سمیه رئوف زاده به خاطر همکاری در این تحقیق صمیمانه سپاسگذاری می‌شود.

^۲ Bos tarus.

^۳ Bos indicus

انتهای ایترون ۱۳ (از باز ۴۱۰۵ تا ۴۱۴۱)، اگزون ۱۴ و قسمت ابتدایی ایترون ۱۴ (۶۸ باز ابتدایی) ژن *ABCG2* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده، تکثیر شدند. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. استاندارد وزن مولکولی استفاده شده در کنار محصولات PCR، صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تایید می‌کند. نتایج حاصل از تعیین توالی، با توالی موجود در بانک جهانی ژن^۱ مقایسه شدند (NCBI→BLAST→Align). نتایج تحقیق بر روی ژن *ABCG2* نشان می‌دهد، چندشکلی در باز ۸۶ اگزون ۱۴ (*A/C*) این ژن موجب تغییر اسیدآمینه تیروزین به اسیدآمینه سرین در موقعیت ۵۸۱ شده که بر روی ترکیب شیر موثر می‌باشد (Cohen-Zinder et al. 2005; Olsen 2007; Komisarek and Dorynek 2009). وزن مولکولی اسیدآمینه تیروزین و سرین به ترتیب برابر با ۱۸۱/۲ و ۱۰۵/۱ می‌باشد و هر دو اسیدآمینه قطبی و بدون بار هستند (Yazdisamadi and vagizadeh 2004). جهش *A/C* در جایگاه مورد مطالعه ژن *ABCG2* در گاوهای هلستاین ایران با فراوانی ۲ درصد مشاهده شد و توالی آن با شناسه JQ398810 در بانک ژن جهانی ثبت شد. فراوانی آللی *ABCG2*^A در گاوهای هلستاین فلسطین اشغالی در سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۰ از هفتاد و پنج درصد به شصت و دو درصد و از ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۲ به هفتاد و هفت درصد افزایش داشته است، این موضوع نشان دهنده تغییر روند شاخص انتخاب برای میزان تولید شیر در این سال‌ها می‌باشد (Cohen-Zinder et al. 2005). مطالعه

^۱ NCBI (www.ncbi.com)

منابع

- Yazdisamadi B, vagizadeh M (2004) Genetics University of Tehran, press., Tehran, Iran. (In Farsi).
 Backer OD Colson C (1991a) Transfer of the genes for the StyLT1 restriction modification system of *Salmonella typhimurium* to strains lacking modification ability results in death of the recipient cells and degradation of their DNA. J Bacteriol 173:1328-30.
 Backer OD Colson C (1991b) Identification of the recognition sequence for the M.StyLTI methyltransferase of *Salmonella typhimurium* LT7: an asymmetric site typical of type-III enzymes. Gene 2:97 (1):103-7.
 Backer OD Colson C (1991) Two-step cloning and expression in *Escherichia coli* of the DNA restriction-

modification system StyLT1 of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol 173:1321-7.

Cohen M, Reichenstein M, Wind A E, Heon-Lee J, Shani M, Lewin H A, Weller J I, Ron M, Seroussi E (2004). Cloning and characterization of FAM13A1-A gene near a milk protein QTL on BTA6: Evidence for population-wide linkage-disequilibrium in Israeli Holsteins. Genomics 84: 374-383.

Cohen M, Seroussi E, Band MR, Lewin H A, Drackley JK, Larkin D M, Everts-van der Wind A, Heon-Lee J, Looor JJ, Shani M: (2004). SPP1 is a candidate gene for the QTL affecting milk protein concentration on BTA6 in Israeli Holstein. 29th Int Conf Ani Gen, ISAG, F015, Tokyo, Japan.

Cohen-Zinder M, Seroussi E, Larkin DM, Looor JJ, Wind A E, Lee JH, Drackley JK, Band MR, Hernandez AG, Shani M, Lewin HA, Weller JI, and Ron M (2005) Identification of a missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res* 15:936-944.

Duncan EJ, Dodds KG, Henry HM, Thompson MP, Phua SH (2007). Cloning, mapping and association studies of the ovine *ABCG2* gene with facial eczema disease in sheep. *Anim Genet* 38(2):126-31.

Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel A H (2005) The breast cancer resistance protein BCRP (*ABCG2*) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med* 11:127-129.

Komisarek, Dorynek Z (2009) Effect of *ABCG2*, *PPARGC1A*, *OLR1* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet* 50(2), 125-132.

Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetch P, Abati A, Ross DD, Miyake K, Resau JH and Bates SE (2000) The multidrug resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (*ABCG2*). *J. Cell Sci* 113:2011-2021.

Olsen H G, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg P R, Sundsaasen M, Svendsen KK and Meuwissen T H (2005) Mapping of a milk production QTL to a 420 kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169:275-283.

Olsen HG, Nilsen H, Hayes B, Berg PR, Svendsen M, Lien S, Meuwissen T (2007) Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the *ABCG2* gene affecting milk composition of dairy cattle. *BMC Genet* 8: 32.

Robey R, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem T, Runge S, Risbood M, Poruchynsky M, Bates S (2003) Mutations at amino-acid 482 in the *ABCG2* gene affect substrate and antagonist specificity. *BJ of Cancer* 89: 1971 – 1978.

Ron M, Cohen-Zinder M, Peter C, Weller JI, Erhardt G (2006) Short Communication: A Polymorphism in *ABCG2* in *Bos indicus* and *Bos taurus* Cattle Breeds. *J Dairy Sci* 89:4921-4923.

Ron M, Kliger D, Feldmesser E, Seroussi E, Ezra E, Weller JI (2001). Multiple QTL analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. *Genetics* 159: 727-735.

Ryan KA, and Reggie YC (1999) Characterization of a CACAG pentanucleotide repeat in *Pasteurella haemolytica* and its possible role in modulation of a novel type III restriction-modification system. *Nucleic Acids Research* 27: 1505-1511.

Sarkadi B, OzvegyLaczka C, Nemet K, Varadi A (2004) Minireview *ABCG2* – a transporter for all seasons. *FEBS Letters* 567 (2004) 116-120.

Tantia MS, Vijnh RK, Mishra BP, Mishra B, Kumar STB, Sodhi M (2006). *DGAT1* and *ABCG2* polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *BMC Veterinary Research* doi:10.1186/1746-6148-2-32.