ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ٤، زمستان ١٣٨٩
صفحه ٢٢-١٩

شناسایی چند شکلی ناحیه اگزون و اینترون 4 ژن بتالاکتوگلوبولین در گاو هلشتاین

ربیع رهبر*[1]، قدرت ا... رحیمی میانجی[2]، زربخت انصاری پیرسرائی[3]

۲،۱و۳- دانش‌آموخته کارشناس ارشد، اعضاء هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rahbarrabie@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۳ - تاریخ پذیرش:)

چکیده

بتالاکتوگلوبولین عمده‌ترین پروتئین آب پنیر شیر نشخوار کنندگان است. هدف از این پژوهش، شناسایی چند شکلی ناحیه اگزون و اینترون 4 ژن بتالاکتوگلوبولین در گاو هلشتاین بود. خون-گیری، به‌طور تصادفی از ٤٨ راس گاو هلشتاین مزرعه آستان قدس رضوی انجام شد و نمونه-های خون در دمای ٢٠- درجه سانتی گراد ذخیره شد. استخراج DNA، با روش نمکی بهینه شده انجام شد. قطعه ٤٣٤ جفت بازی ناحیه اگزون و اینترون ٤ ژن بتالاکتوگلوبولین، به‌وسیله آغازگر اختصاصی و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تکثیر شد. فرآورده‌های PCR، به-وسیله آنزیم محدودکننده *Hae*III هضم و روی ژل پلی آکریلامیدِ ۱۲ درصد بارگذاری شد. پس از واکنش هضمی، آلل A با اندازه قطعات ۳۰۰، ۱۱۳ و ۲۱ جفت باز و آلل B با اندازه قطعات ۲۲٦، ۱۱۳، ٧٤ و ۲۱ جفت باز شناسایی شدند. فراوانی آلل A و B به‌ترتیب ۳۹ و ٦۱ درصد و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به‌ترتیب ۱۵/۲۱، ٤٧/۵۸ و ۳۷/۲۱ درصد بود. میانگینِ هتروزایگوتی جمعیت ۰/٤٧ برآورد شد.

واژه‌های کلیدی
بتالاکتوگلوبولین،
چند شکلی،
هلشتاین

مقدمه

از آنجا که عوامل محیطی در بروز صفات، به ویژه صفات اقتصادی موثرند، لذا شناسایی ژن‌های مرتبط با آنها، برای ایجاد تغییرات مهم اقتصادی و افزایش سرعت اصلاح نژاد و انتخاب مستقیم موجودات برای این‌گونه صفات ضروری است (۱۴). شناخت ژن‌های مرتبط با صفات اقتصادی، تنها به کمک نشانگرهای ژنتیکی امکان پذیر است که به طور چشم‌گیری می‌توانند سرعت پیشرفت ژنتیکی حیوانات اهلی را افزایش دهند (۱۵ و ۶). مطالعات گسترده روی جایگاه‌های ژنی پروتئین شیر در گاو، نشان داد که آلل‌های این جایگاه‌ها می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای صفت تولید و ترکیبات شیر استفاده شوند (۱۶). بتالاکتوگلوبولین پروتئینی محلول در آب و کروی شکل بوده که حاوی ۱۶۲ اسید امینه در زنجیره پپتیدی و با وزن مولکولی ۱۸/۳ کیلو دالتون است (۴). این پروتئین در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.7.4]

محافظت از رتینول شیر نقش داشته و در ایمنی نوزادان و تنظیم سوخت و ساز فسفر در غده پستان نیز شرکت می‌کند (۱۳ و ۱۲). ژن بتالاکتوگلوبولینِ گاو روی کروموزوم شماره ۱۱ قرار دارد که با ۴۷۰۰ جفت باز واحد قابل ترجمه، دارای ۷ اگزون، ۶ اینترون بوده و دو آلل عمده آن A و B می‌باشد (۷). تفاوت پروتئین نوع A بتالاکتوگلوبولینِ گاو با نوع B آن، تنها در دو اسیدآمینه می‌باشد، بطوری که در نوع A در مقایسه با B در موقعیت‌های ۶۴ و ۱۱۸ اسید آمینه‌های آسپارژین و والین به‌ترتیب با گلایسین و آلانین جایگزین شده است (۴). بوبه و همکاران (۱۹۹۹)، پس از تکثیر قطعه‌ای از ناحیه پروموتور ژن بتالاکتوگلوبولین، به بررسی اثر ژنوتیپ‌های آن بر ترکیب پروتئین شیرِ نژاد هلشتاین- فریزین پرداختند. آنها دریافتند که جایگزین شدن آلل A بتالاکتوگلوبولین با آلل B باعث افزایش سهم بتالاکتوگلوبولین در شیر تولیدی و کاهش سهم سایر پروتئین‌ها می‌شود. ایکونن و همکاران (۱۹۹۹)، به بررسی ارتباط بین چند شکلی این پروتئین و صفات تولید شیر در دوره شیردهی اول گاوهای آیرشایر پرداختند. آنها گزارش کردند که ژنوتیپ AA ژن بتالاکتوگلوبولین بر تولید شیر و پروتئین آن، و ژنوتیپ BB بر مقدار چربی شیر اثر مطلوبی داشت. استرازالکوسکا و همکاران (۲۰۰۲)، با تکثیر اگزون و اینترون 4 ژن بتالاکتوگلوبولین، به بررسی ارتباط چند شکلی این ناحیه با صفت تولید شیر و ترکیبات آن در گاوهای نژاد سیاه و سفید لهستانی پرداختند. برطبق این گزارش، هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های این ژن روی تولید و ترکیب شیر تاثیر معنی‌دار نداشت و تنها اثر معنی‌دار دیده شده، افزایش مقدار پروتئین شیر در ژنوتیپ AA بود. کلیک (۲۰۰۳)، چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین نژادهای براون سوئیس و هلشتاین را بررسی و بیان کرد که در افراد دارای ژنوتیپ BB، مقدار کل مواد جامد و چربی شیر بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از ژنوتیپ‌های دیگر بیشتر بود. جیگلی و همکاران (۲۰۰۷)، ارتباط بین چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین و میزان بیماری ورم پستان با علایم کلینیکی آن در گوسفند را بررسی کردند. آنها دریافتند که ورم پستان در افراد دارای ژنوتیپ BB و AB، نسبت به افراد دارای ژنوتیپ AA بیشتر است. از آنجائی که تاثیر چند شکلی ژن‌های پروتئین‌های شیر روی میزان بیان ژن و صفات مربوط به شیردهی و همچنین در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب گاوهای شیری بسیار بالاست، در نتیجه هدف از این پژوهش، شناسایی چند شکلی ناحیه اگزون و اینترون 4 ژن بتالاکتوگلوبولین در گاو هلشتاین است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و استخراج DNA

در این پژوهش، به‌طور تصادفی از ورید زیر دمی ۴۸ راس گاو هلشتاین خون‌گیری انجام شد. نمونه‌های خون در ظرف حاوی یخ قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل یافت و تا زمان استخراج DNA در ۴ درجه سانتی¬گراد نگهداری شد. استخراج DNA با روش نمکی بهینه یافته که توسط میلر و همکاران (۱۹۸۸) ارائه شده، انجام گرفت.

طراحی آغازگرها

بخشی از ناحیه اگزون و اینترون 4 ژن بتالاکتوگلوبولین، به طول ۴۳۴ جفت باز توسط آغازگرهای زیر تکثیر شد (۱۶).

F: 5′- CGCTCCCCACCCCGTCCTCACC -3′
R: 5′-CCCGTCCCCAGTCACCCACAGG-3′

شرایط بهینه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم نمونه DNA، ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرو مول از هر یک از نوکلئوتید تری فسفات، یک واحد آنزیم پلی مراز، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و بافر PCR (۱x) انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر در ۳۵ چرخه با شرایط دمایی ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ دقیقه برای واسرشته سازی اولیه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه برای واسرشته سازی، ۷۰ درجه سانتی-گراد در یک دقیقه برای اتصال، ۷۲ درجه سانتی‌گراد در یک دقیقه برای بسط و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۷ دقیقه برای بسط نهایی انجام شد.

هضم آنزیمی فرآورده‌های PCR

در بررسی چند شکلی جایگاه ژنی بتالاکتوگلوبولین از آنزیم محدودگر *Hae*III استفاده شد. این آنزیم دارای توالی شناسایی چهار بازی بصورت ´3... CC ↓ GG ... ´5 است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.7.4]

برای انجام هضم آنزیمی، حجم نهایی واکنش ۱۴ میکرولیتر و میزان محصول PCR و آنزیم مورد استفاده برای هضم به‌ترتیب ۷ و ۰/۷ میکرولیتر در نظر گرفته شد (نسبت ۱۰ به یک). همچنین ۲ میکرولیتر از بافر آنزیم اضافه گردید و سرانجام توسط آب مقطر حجم نهایی به ۱۴ میکرولیتر رسانده شد. نمونه‌ها در بن ماری و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. پس از این مدت نمونه‌ها از بن ماری خارج و روی ژل پلی آکریلامید ۱۲ درصد بارگذاری شد. پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره، محصولات هضم مورد شناسایی قرار گرفتند.

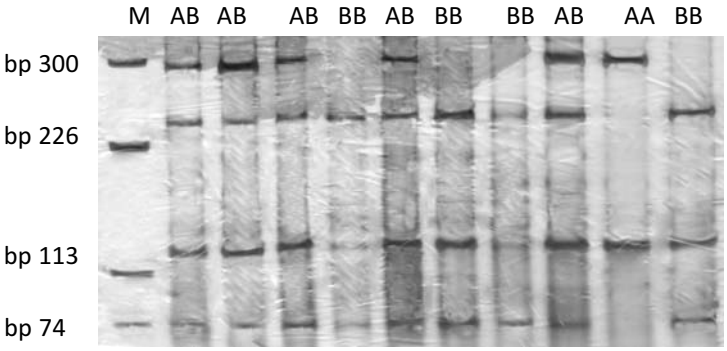
نتایج

پس از هضم آنزیمی براساس تعداد و اندازه نوارهای بوجود آمده، ژنوتیپ حیوانات شناسایی شد. ژنوتیپ AA، سه قطعه‌ی ۳۰۰، ۱۱۳ و ۲۱ جفت بازی را بوجود آورد و برای ژنوتیپ BB، قطعه ۳۰۰، به دو قطعه ۲۲۶ و ۷۴ جفت بازی تقسیم شد. ژنوتیپ AB شامل قطعات ژنوتیپ AA و ژنوتیپ BB بود. شکل ۱ الگوهای هضمی سه ژنوتیپ AA، AB و BB را نشان می‌دهد. فراوانی آلل‌های A و B به‌ترتیب ۳۹ و ۶۱ درصد و متوسط هتروزایگوتی جمعیت، ۰/۴۷ برآورد شد. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به‌ترتیب ۱۵/۲۱، ۴۷/۵۸ و ۳۷/۲۱ درصد بود. با توجه به نتایج بدست آمده، جایگاه ژنی مطالعه شده در این جمعیت، در تعادل هاردی- واینبرگ بود.

بحث

هر سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB در جمعیت مورد مطالعه، مشاهده شد و همانطور که قبلا بیان گردید فراوانی آنها به‌ترتیب ۱۵/۲۱، ۴۷/۵۸ و ۳۷/۲۱ درصد و فراوانی دو آلل A و B به‌ترتیب ۳۹ و ۶۱ درصد بود. ژانگ و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی ۱۶۱ نمونه از گاوهای نژاد هلشتاین چینی با روش PCR-RFLP و با کمک آنزیم *Hae*III در ناحیه اگزون و اینترون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین، فراوانی دو آلل A و B را به‌ترتیب برابر با ۲۷ و ۷۳ درصد و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB را به‌ترتیب برابر با ۱۳، ۲۸ و ۵۹ درصد برآورد کردند. اما در پژوهش حاضر، فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۳۹ و ۶۱ درصد و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به‌ترتیب ۱۵/۲۱، ۴۷/۵۸ و ۳۷/۲۱ درصد بدست آمد. تی آرس و همکاران (۲۰۰۵) اثر جایگاه ژنی بتالاکتوگلوبولین را بر صفات تولیدی شیر و عملکرد تولید مثلی در گاوهای هلشتاین، مطالعه کردند. آنها فراوانی دو آلل A و B را به‌ترتیب ۵۲ و ۴۸ درصد و فراوانی سه ژنوتیپ AA، AB و BB را به‌ترتیب برابر با ۲۸/۴، ۴۷/۱ و ۲۴/۵ درصد گزارش کردند که با فراوانی های آللی و ژنوتیپی این پژوهش متفاوت است. کلیک (۲۰۰۳) با به‌دست آوردن واریانت‌های ژنتیکی بتالاکتوگلوبولین در نژادهای براون سوئیس و هلشتاین، فراوانی آلل A وB را در نژاد هلشتاین، به‌ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۷۳ و در نژاد براون سوئیس

شکل ۱- نمونه‌هایی از محصولات هضم برای ژن بتالاکتوگلوبولین



[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.7.4]

۰/۴۴ و ۰/۵۶ بدست آورد. در پژوهش حاضر، فراوانی دو آلل A و B به ترتیب برابر با ۳۹ و ۶۱ درصد بود، که این اختلاف ممکن است به‌دلیل تعداد نمونه‌های به‌کار برده در پژوهش باشد. استرازالکوسکا و همکاران (۲۰۰۲) پلی مورفیسم ژن بتالاکتوگلوبولین را در ۱۰۲ گاو سیاه و سفید لهستانی مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران قطعه ۲۴۷ جفت بازی از اگزون و اینترون ۴ را تکثیر و توسط آنزیم *Hae*III هضم آنزیمی انجام شد. فراوانی آلل A در این جمعیت، ۳۷ و آلل B، برابر ۶۳ درصد بود. در پژوهش حاضر، فراوانی دو آلل A و B به‌ترتیب برابر با ۳۹ و ۶۱ درصد بود که تقریبا مشابه با پژوهش استرازالکوسکا و همکاران (۲۰۰۲) است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش و نتایج حاصله از پژوهش‌هایی که در مورد سایر جایگاه‌های مرتبط با صفات تولید شیر انجام شده است، می‌توان با یک برنامه منظم و بلند مدت، افراد دارای ژنوتیپ‌های مطلوب برای صفات مورد نظر را شناسایی و با انتخاب آنها، میانگین گله را برای دوره‌های بعد بهبود بخشید.

منابع

1. Bobe, G., D.C. Beitz, A.E. Freeman and G.L. Lindberg. 1999. Effects of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. J. Dairy Sci. 82: 2797-2804.
2. Celik, S. 2003. β-lactoglobulin genetics variant in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. Int. Dairy J. 13: 727-731.
3. Gigli, I., V. Riggio and G. Monteleone. 2007. Relationship between beta lactoglobulin and subclinical mastitis in Valle del Belice sheep breed. J. Anim. Sci. 6: 140-142.
4. Hernandez-Ledesma, B., I. Recio and L. Amigo. 2007. β-lactoglobulin as source of bioactive peptides. Review. Printed in the Netherlands.
5. Ikonen, T., M. Ojala and O. Ruottinen. 1999. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in finish Ayrshire cows. J. Dairy Sci. 82: 1026-1033.
6. Li, C., J. Basarab, W.M. Snelling, B. Benkel, B. Murdoch, C. Mansen and S.S. Moore. 2004. Assessment of positional candidate genes MYF-5 and IGF-1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of Bos Taurus. J. Anim. Sci. 82: 1-7.
7. Mercier, J.C., and J.L. Vilotte. 1993. Structure and function of milk protein genes. J. Dairy Sci. 76: 3079-3098.
8. Miller, S.A., D.D. Dykes and H.F. Paletsky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research.
9. SAS. 2003. SAS User's Guide: Statistics. SAS Inst. Inc., Cary, NC
10. Strazalkowska, N., J. Kuzewski and Z. Ryniewicz. 2002. Effect of kappa- casein and beta-lactoglobulin polymorphism cows age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and White cattle. Anim. Sci. 20: 21-35.
11. Tsiaras, A.M., G.G. Bargouli, G. Banos and C.M. Boscos. 2005. Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance of Holstein cows. J. Dairy Sci. 88: 327-334-.
12. Vyas, H.K., J.M. Izco, and R. Jimenez-Flores. 2002. Scale-up of native β-lactoglobulin affinity separation process. J. Dairy Sci. 85: 1639-1645.
13. Wang, Q., J.C. Allen and H.E. Swaisgood. 1997. Binding of vitamin D and cholesterol to β-lactoglobulin. J. Dairy Sci. 80: 1054-1059.
14. Weller, J.I., Y. Kashi and M. Soller. 1990. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. J. Dairy Sci. 73: 2525-2537.
15. Yangerman, S.M., S.P. Oliver, A.M. Saxton, J.L. Edwards, F.N. Schrick, C.J. Davies and G.M. Pighetti. 2003. A novel candidate genetic marker for mastitis resistance in Jersey cattle. J. Anim. Sci.
16. Zhang, R.F., H. Chen, C.Z. Lei, X.T. Fang, Y.D. Zhang, S.R. Hu and L.H. Su. 2007. Association between PCR-RFLP polymorphisms of five gene loci and milk traits in Chinese Holstein. Asian-Aust. J. Anim. Sci. vol. 20: 166-171.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.7.4]