فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن کالپاستاتین در گوسفندان قزل، آرخامرینو و آمیخته‌های آن‌ها

قربان الیاسی زرین‌قبایی[1]، جلیل شجاع[2]، محمدرضا نصیری[3]، ام‌البنین پیراهری[4] و آرش جوانمرد[5]

چکیده

کالپاستاتین نقش تنظیمی در رشد ماهیچه‌ها و تردی گوشت بعد از کشتار دام دارد که ژن کنترل‌کننده آن بر روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند جای گرفته است. ارتباط برخی از شکل‌های آللی این ژن با افزایش وزن و صفات لاشه در گوسفند کشف شده است که این امر در نتیجه جانشینی ساده ۱ نوکلئوتید در اگزون I ژن کالپاستاتین است که با تکنیک RFLP با آنزیم‌های برشی *Msp*I و یا *Nco*I تشخیص داده می‌شود و می‌تواند به‌عنوان نشان‌گری در جهت اصلاح نژاد به‌کار گرفته شود. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ژن کالپاستاتین در گوسفند با روش *Msp*I/RFLP است. در این تحقیق نمونه‌های خون از ۱۳۷ رأس گوسفند (۶۵ رأس گوسفند قزل، ۴۲ رأس گوسفند آرخامرینو و ۳۰ رأس گوسفند آمیخته آرخامرینو× قزل) جمع‌آوری گردید. DNA ژنومی از ۵۰ میکرولیتر خون با روش سیلیکاژل استخراج گردید و برای ارزیابی کیفیت و کمیت DNA روش‌های ژل مونیتورینگ و اسپکتروفوتومتری مورد استفاده قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی، تکثیر ناحیه چندشکل ژن کالپاستاتین به طول ۵۷۰ جفت باز با آغازگرهای اختصاصی Ovine Calp-F و Ovine Calp-R صورت گرفت. جهت برش آنزیمی قطعات DNA تکثیر شده، از آنزیم *Msp*I استفاده گردید. محصولات هضم شده، بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شده و با اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی گردید. پس از تعیین ژنوتیپ تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، از نرم‌افزار Popgene 1.32 برای بررسی آماری داده‌ها استفاده گردید که فراوانی آلل M در گوسفند قزل ۶۹٪، گوسفند آرخامرینو ۴۸٪، و آمیخته‌های F1 این دو نژاد ۵۰٪ به‌دست آمد. بر اساس نتایج این مطالعه، جمعیت‌های مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشتند و این نشان می‌دهد که در جمعیت‌های گوسفندان مورد مطالعه، انتخاب ژنتیکی در راستای اصلاح نژاد برای ژن کالپاستاتین صورت نگرفته است.

واژه‌های کلیدی: کالپاستاتین، گوسفند، چندشکلی، ژنوتیپ، قزل، آرخامرینو

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۵

۱- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، Elyasi@Azaran.org.ir

۲- دکتری علوم دامی و عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۳- دکتری علوم دامی و عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۴- کارشناس ارشد معاونت امور دام سازمان جهاد کشاورزی استان آذربایجان شرقی

۵- کارشناس ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور

مقدمه و بررسی منابع

در طول دهه‌های اخیر به‌کارگیری روش‌های مبتنی بر ژنتیک جمعیت و آمار منجر به توسعه حیواناتی با بازده بالا شده است و ترکیب این روش‌ها با علوم جدیدی هم‌چون نشانگرهای DNA پیشرفت‌های شگرفی را در اصلاح نژاد پدید آورده و در این میان چندشکلی‌های[1] موجود در ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی توانسته است به‌عنوان نشان‌گر ژنتیکی بکار برده شود. کالپاستاتین[2] در واقع یکی از آنزیم‌های تشکیل‌دهنده سیستم پروتئولیک کالپاین[3] است که یک سیستم وابسته به یون Ca^{2+}[4] می‌باشد. این سیستم در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی وابسته به کلسیم از قبیل تمایز مایوبلاست[5] و یاخته‌های چربی، توسعه و تجزیه عضلات، تردی گوشت بعد از کشتار، فرایند تمایز اندام، سیکل سلولی، تشکیل آب مروارید، نقل و انتقال سلولی و مرگ سلولی مؤثر است (۳). کالپاستاتین ممانعت‌کننده آندوژنوس و اختصاصی گروه آنزیم‌های پروتئیناز کالپاین می‌باشد. امروزه مشخص شده است که تجزیه پروتئین‌های میوفیبریل، مسئول ترد شدن گوشت پس از کشتار است و چنین به نظر می‌رسد که کالپاستاتین، ممانعت کننده آندوژنوس اختصاصی کالپاین بوده و مانع عمل کالپاین در بافت مرده می‌شود و به این ترتیب سرعت و میزان ترد شدن گوشت را کنترل می‌کند (٦). مقدار توسعه عضلات اسکلتی به سه عامل اصلی میزان سنتز پروتئین‌های عضله، میزان تجزیه پروتئین‌های عضله و تعداد سلول‌های عضله بستگی دارد. افزایش در میزان رشد عضلات اسکلتی می‌تواند در نتیجه کاهش میزان تجزیه پروتئین‌های عضله باشد که ممکن است ناشی از کاهش فعالیت سیستم کالپاین به دلیل افزایش فعالیت کالپاستاتین باشد. با توجه به این مطالب می‌توان ژن‌های بیان‌کننده کالپاین و کالپاستاتین را به عنوان ژن‌های کاندیدای مؤثر در تولید گوشت معرفی نمود (٤).

ژن کالپاستاتین که ارتباط آن با صفات تولیدی و به خصوص تردی گوشت و کیفیت لاشه کشف شده است، از ژن‌های مهم اقتصادی در دام‌های اهلی به‌شمار می‌رود. این ژن بر روی کروموزوم شماره ۷ گاو و کروموزوم ۵ گوسفند جای گرفته که در اگزون I آن دو آلل M و N کشف شده که نسبت به یکدیگر هم‌بارز می‌باشند (۷). گرین[1] (۱۹۹٦) توانست ارتباط معنی‌داری بین تردی گوشت گاو و ژنوتیپ کالپاستاتین با روش PCR-RFLP پیدا کنند و به نظر می‌رسد استفاده از این نشان‌گر در انتخاب می‌تواند دقت انتخاب ژنتیکی را برای تردی گوشت افزایش دهد (۵).

هدف از این تحقیق بررسی فراوانی آلل‌های M و N و هم‌چنین ژنوتیپ‌های حاصل از ژن کالپاستاتین در گوسفندان قزل و آرخامرینو و آمیخته‌های F1 حاصل از تلاقی آن‌ها با روش PCR-RFLP می‌باشد، تا در آینده زمینه‌ای برای تعیین ارتباط این ژن با صفات تولیدی در گوسفند و استفاده از آن در برنامه‌های MAS[2] فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

1. Polymorphism
2. Calpastatin
3. Calpain
4. CDP, Calcium Dependent Protease
5. Myoblast

1. Green
2. Marker Assisted Selection

تعداد ۱۳۷ نمونه خون از گوسفندان مورد مطالعه شامل ٦٥ رأس گوسفند قزل، ٤٢ رأس گوسفند آرخامرینو و ۳۰ رأس گوسفند آمیخته آرخامرینو× قزل که به‌طور تصادفی از گله اصلاحی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انتخاب شده بودند جمع‌آوری گردید. برای جلوگیری از انعقاد خون به میزان ۰/۱ حجم نمونه خون اخذ شده، محلول EDTA (۰/۵ مولار با PH ۸) به لوله‌های حاوی خون افزوده شد. استخراج DNA از ۵۰ میکرولیتر خون با متد سیلیکاژل و با روش بوم[1] و همکاران (۱۹۹۰) که توسط شیخایف[2] (۱۹۹۵) تغییراتی در آن داده شده بود انجام گرفت (۲، ۸). در این روش ابتدا سلول‌های خونی با استفاده از مواد شیمیایی لیز شده و سپس ذرات بسیار ریز شیشه که DNA را به خود جذب می‌کند به محلول اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به‌غیر از رسوب تشکیل شده که حاوی DNA می‌باشد بقیه مواد دور ریخته شد و در مرحله آخر DNA خالص‌سازی گردید. جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA از روش‌های الکتروفورز و اسپکتروفتومتری استفاده شد. در تکثیر کالپاستاتین گوسفند آغازگرهای Ovine Calp-F و Ovine Calp-R با توالی زیر مورد استفاده قرار گرفتند.

Ovine Calp-F (5′-CCT TGT CAT CAG ACT TCA CC-3′)

Ovine Calp-R (5′-ACT GAG CTT TTA AAG CCT CT-3′)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[3] با ۳۵ چرخه (٩٤°C به مدت ٤٥ ثانیه برای واسرشته کردن[4]، ٥٣ °C به مدت ٤٥ ثانیه برای اتصال آغازگرها[5] و ۷۲°C به مدت ٦٠ ثانیه برای پلی‌مریزاسیون[6]) در دستگاه ترموسایکلر[7] شرکت Biotech و در حجم‌های ۲۵ میکرولیتری واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (بافر PCR 1X، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مول، ۰/۲میلی‌مول از هر dNTP، ۱۰ میکرومول از هر آغازگر و ۱ واحد Taq DNA Polymerase به‌همراه ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده) صورت گرفت. لازم به ذکر است آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر یک قطعه ۵۷۰ جفت بازی از اگزون‌های ژن 1C و 1D کالپاستاتین گوسفند طراحی شده بودند. جهت تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۱٪ با رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید استفاده گردید. برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن کالپاستاتین، برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از ۵ واحد آنزیم محدودگر MSPI به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۳۷°C انجام گرفت. محصولات هضم شده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به مدت ٤ ساعت با ۷۵ ولت الکتروفورز شده و با اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی شدند. فراوانی آللی و ژنوتیپی و هم‌چنین تعداد آلل‌های مؤثر در هر جمعیت و وجود تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Popgene 1.32 (۹) برآورد گردیدند.

نتایج و بحث

استخراج DNA با روش سیلیکاژل مقادیر بالایی از DNA ژنومی (حدود ۵۰ng/µl) حاصل کرد که در کنار λDNA به‌راحتی قابل ارزیابی بود. هر چند که تعیین دقیق طول قطعات DNA ممکن نبود ولی به نظر می‌رسد که اندازه این مولکول‌ها به علت

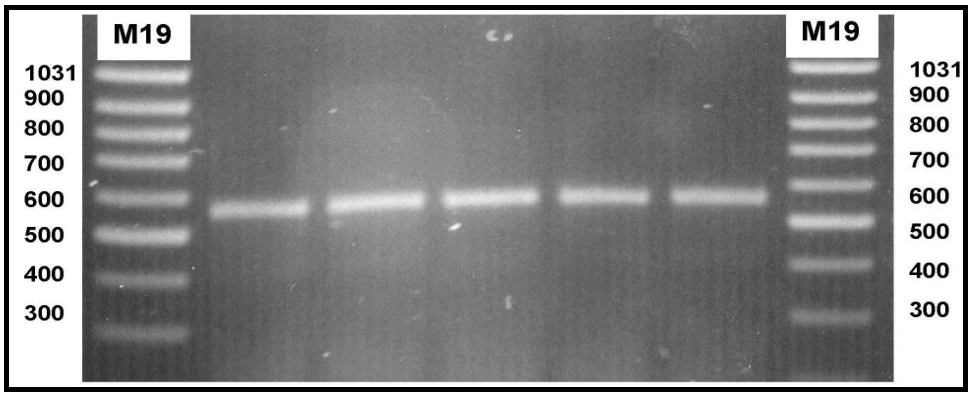
1. Boom
2. Shaikhayev
3. Polymerase Chain Reaction
4. Denaturation
5. Anealing
6. Extension
7. Thermocycler

داشتن طول زیاد و خلوص بالا، جهت کارهای مهندسی ژنتیک و آزمایش‌های مولکولی بسیار مناسب باشد. همان‌طور که انتظار می‌رفت یک قطعه ۵۷۰ جفت بازی از ژن کالپاستاتین شامل قسمتی از اگزون 1C، بخشی از اگزون 1D و ناحیه اینترون مابین آن‌ها تکثیر شده است که جهت تشخیص از نشان‌گر استاندارد 100bp استفاده گردید (شکل۱). هضم محصولات PCR با آنزیم *Msp*I، چندشکلی در ناحیه مورد بررسی در ترکیبات ژنتیکی مختلف مورد مطالعه را نشان داد. هم‌چنین وجود دو آلل M و N که به‌صورت هم‌بارز عمل می‌کنند، مشاهده گردید. هم‌چنین مشخص گردید که آنزیم برشی مورد استفاده آلل M را برش می‌دهد ولی بر آلل N تأثیری ندارد (شکل۲).

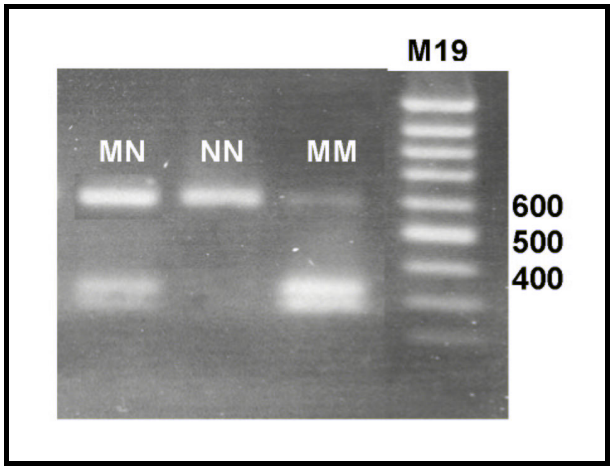
نتیجه حاصل از این تحقیق نشان داد که ژن کالپاستاتین در ترکیبات ژنتیکی مورد آزمایش دارای چندشکلی بوده و هر سه ژنوتیپ حاصل از ۲ آلل، قابل مشاهده است که در این تحقیق فراوانی آلل M در گوسفند قزل ٦٩٪، گوسفند آرخامرینو ٤٨٪، و آمیخته‌های F1 این دو نژاد، ۵۰٪ به‌دست آمد، علاوه بر این اندازه مؤثر آللی که تصویر نسبتاً واضحی از میزان تنوع ژنتیکی یک جمعیت است در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود فراوانی آلل‌های M و N تقریباً به هم نزدیک بوده و بیان‌گر آن است که در این جمعیت‌ها هیچ انتخابی برای ژن کالپاستاتین صورت نگرفته است. در صورتی که افتخار شاهرودی و همکاران (۱۳۸۳) فراوانی آلل M را در گوسفند قره‌گل ۲۱٪ به‌دست آوردند و ابراز داشتند که پایین بودن فراوانی این آلل و هم‌چنین پایین بودن شاخص هتروزیگوتی به دلیل بسته بودن جمعیت و پرورش خویشاوندی بوده که شاید برای ژن دیگری که با این ژن ارتباط ژنتیکی دارد انتخاب صورت گرفته است (۱). با توجه به این‌که وراثت‌پذیری فعالیت کالپاستاتین بالاست بنابراین ژنتیک حیوان بر فعالیت کالپاستاتین و نرمی گوشت تأثیر می‌گذارد که میزان تأثیر بین نژادهای مختلف و در درون یک نژاد بین حیوانات مختلف متفاوت است (٦). وجود تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت‌های مورد مطالعه دلیلی بر صحت نمونه‌گیری بوده و از طرفی دیگر بیان‌گر عدم انتخاب ژنتیکی در جمعیت در راستای اصلاح نژاد برای ژن کالپاستاتین می‌باشد. به دلیل این‌که در این تحقیق فقط چندشکلی موجود مورد مطالعه بوده و ارتباط این چندشکلی با صفات تولیدی بررسی نشده است لذا هیچ نظری نمی‌توان در مورد مطلوب بودن آلل‌ها ابراز داشت و تنها می‌توان به نتایج حاصل از مطالعات قبلی که در بررسی منابع آورده شده است اکتفا نمود.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایجی که از این تحقیق حاصل گردید PCR-RFLP با آنزیم *Msp*I روش مناسبی جهت انتخاب ژنوتیپ‌های مختلف گوسفند در راستای اصلاح نژاد بر اساس ژن کالپاستاتین بوده و *Msp*I آنزیمی اختصاصی بسیار کارآمد برای تشخیص ژنوتیپ‌های این ناحیه از ژن کالپاستاتین در نژادهای گوسفند می‌باشد. اما تعیین ارتباط این چندشکلی با کیفیت گوشت و لاشه در نژادهای بومی و تشخیص جایگاه‌های چند شکل دیگر از فعالیت‌های مورد انتظاری است که باید در تحقیقات بعدی صورت پذیرد.



شکل۱- تکثیر قطعه ۵۷۰ جفت بازی از ژن کالپاستاتین



شکل۲- ژنوتیپ‌های کالپاستاتین پس از برش آنزیمی با *MspI*

جدول۱- تعداد ژنوتیپ‌ها، فراوانی آلل‌ها و آزمون $\chi 2$ برای ترکیب‌های ژنتیکی مورد مطالعه

ترکیب ژنتیکی	تعداد ژنوتیپ			فراوانی آللی		$\chi 2$	تعداد آللهای موثر
	NN	MN	MM	N	M		
قزل	۱۵	۱۷	۳۳	٪۳۱	٪۶۹	۷/۱۴۷	۱/۷۴
آرخامرینو	۱۲	۲۰	۱۰	٪۵۲	٪۴۸	۰/۱۰۲۵	۱/۹۹
آمیخته‌های آرخامرینو× قزل	۸	۱۴	۸	٪۵۰	٪۵۰	۰/۱۵۳۶	۲

منابع

۱- افتخار شاهرودی، ف.، م. نصیری، ع. جوادمنش و م. نصرتی. ۱۳۸۳. بررسی پلی‌مورفیسم اگزون I ژن کالپاستاتین در گوسفندان قره‌گل. مجموعه مقالات اولین کنگره علوم دامی و آبزیان کشور، ۱۲-۱۰ شهریور، دانشگاه تهران، ۸۱۸-۸۲۰.

2. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen, and J. Van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiogy 28(3): 495-503.
3. Chung, H. Y. 2003. Relationship of a PCR-SSCP at the bovine Calpastatin locus with Calpastatin activity and meat tenderness. Research and reviews, Beef and Sheep, 266-268. http://ohioline.osu.edu/sc181/sc181_5.html
4. Goll, D. E., V. F. Thompson, R. G. Taylor and A. Ouali. 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. Canadian Journal of Animal Science 78: 503-512.
5. Green. M. 1996. Association of TaqI Calpastatin polymorphism whit postmortem measure of beef tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus*, Bos Taurus steers and heifers. Journal of Animal Science 74: 113.
6. Koohmariae, M., S. D. Shackelford, T. L. Wheeler, S. M. Lonergan and M. E. Doumit. 1995. A muscle hypertrophy condition in lamb (Callipage): characterization of effects on muscle growth and meat quality trait. Journal of Animal Science 73: 3596-3607.
7. Palmer, B. R., N. Roberts, J. G. H. Hickford and R. Staffe. 1998. Rapid Communication: PCR-RFLP of *MSP*I and *Nco*I in the ovine Calpastatin gene. Journal of Animal Science 76: 1499-1500.
8. Shaikhayev, G. O. 1995. Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. Gene Biology, Moscow, 120 pp.
9. Yeh, F., R. Yang, and T. Boyle. 1997. POPGENE, Version 1.32. University of Alberta. Alberta, USA.