مقایسه چندشکلی موجود در ناحیه اینترون ۲ ژن لپتین (Leptin) در گاوهای تالشی و هلشتاین با استفاده از تکنیک PCR-RFLP

علیرضا دهناد[۱]، آرش جوانمرد[۱]، فضل‌اله افراز[۲] و قربان الیاسی زرین‌قبایی[۳]

چکیده

اختلافات عمده‌ای در تولید شیر، گوشت و صفات تولیدمثلی گاوهای تالشی و هلشتاین مشاهده می‌شود. در این تحقیق به‌منظور شناخت مکانیزم‌های مولکولی به‌وجود آورنده این تفاوت‌ها در سطح ژن‌ها، چندشکلی موجود در ناحیه اینترون۲ ژن لپتین در دو جمعیت گاو مذکور مورد مقایسه قرار گرفت. برای این منظور استخراج DNA به کمک روش تغییر یافته نمکی از نمونه‌های خون ۱۰۰ رأس گاو (۷۰ رأس گاو تالشی و ۳۰ رأس گاو هلشتاین) صورت گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت بازی از اینترون ۲ ژن لپتین انجام گرفت. قطعه تکثیر شده سپس به‌وسیله آنزیم محدودالاثر Sau3AI جهت تشخیص ژنوتیپ‌های این ژن مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به‌ترتیب ۶۱/۴۲، ۳۱/۴۲ و ۷/۱۶ درصد در گاوهای تالشی و ۵۶/۷، ۴۳/۳ و صفر درصد در گاوهای هلشتاین به‌دست آمد. فراوانی‌های آللی برای آلل‌های A و B نیز به‌ترتیب ۷۷/۱ و ۲۲/۹ درصد در گاوهای تالشی و ۷۸/۳ و ۲۱/۷ درصد در گاوهای هلشتاین برآورد گردید. در هیچ‌کدام از دو جمعیت مورد مطالعه از نظر جایگاه ژنی لپتین تعادل هاردی- واینبرگ برقرار نبود. هم‌چنین هتروزیگوتی پایین بود و این امر ممکن است در آینده مشکلات اصلاح نژادی را سبب شود.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن لپتین، تالشی، هلشتاین، گاو، PCR-RFLP

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/٤/۲٦ تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۵

۱- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور

۲- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۳- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان‌شرقی

مقدمه و بررسی منابع

لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی می‌باشد که از بافت‌های آدیپوز به‌خصوص آدیپوز سفید، ترشح می‌شود. این پروتئین اولین بار در موش کشف شد. اعتقاد بر این است که لپتین اصلی‌ترین کنترل‌کننده اشتها، متابولیسم انرژی، باروری، ایمنی و افزایش وزن می‌باشد (۸ و ۱۷). ژن لپتین با استفاده از تکنیک Positional Cloning هویت‌یابی و تعیین ساختار شده است و جهش‌هایی در روی این ژن باعث بروز فنوتیپ چاقی در موش‌ها شده است.

ژن لپتین دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون بوده و در کل ۵۰۱۰ نوکلئوتید طول داشته و اینترون ۲ آن ۲ کیلوباز می‌باشد. ناحیه پروموتور این ژن ۳ کیلو باز می‌باشد که تنها ۲۱۷ جفت باز آن برای تظاهر ژن لپتین در بافت‌های چربی مورد نیاز است (۱۴). mRNA ژن چاقی ۲۴۴۷ جفت باز است که شامل توالی کدکننده کامل است. cDNA ژن Ob حدود ۳/۳ کیلو باز است. دو نوع cDNA متفاوت در این ژن شناخته شده است که علت آن، تفاوت در وجود یا فقدان کدون گلوتامین در موقعیت ۴۹+ می‌باشد. کروموزوم ژن لپتین در گاو روی کروموزم ۶، در انسان روی کروموزم ۷ و در موش روی کروموزم ۶ قرار دارد. گیرنده ژن لپتین در خوک، گاو و انسان به‌ترتیب روی کروموزوم‌های ۱، ۳ و ۶ قرار دارد (۱۳). تزریق خارجی هورمون لپتین به موش‌های دارای ژنوتیپ Ob/Ob باعث بهبود تولیدمثل و وضعیت هورمون‌های درون‌ریز[1]، کاهش مصرف خوراک و اتلاف وزن می‌شود (۱۱). لپتین از سلول‌های بافت چربی سفید[2] به داخل خون ترشح می‌شود. لپتین به مغز منتقل شده و در آن‌جا به‌وسیله تحریک و یا ممانعت از رها شدن نوروپپتیدهایی چون نوروپپتید Y، (NPY) عمل می‌کند که NPY مصرف خوراک، تولید حرارت و فعالیت فیزیکی را در جوندگان تحریک می‌کند که نتیجه چنین اعمالی کاهش توده چربی یا تحریک بعضی از سیگنال‌های آندوکراین یا اتوکراین دیگر است که سنتز لپتین و ترشح آن را به‌وسیله سلول‌های چربی ممانعت می‌کند. هم‌چنین لپتین ممکن است روی متابولیسم و عمل بافت‌های محیطی مانند کبد و ماهیچه اسکلتی به خوبی سلول‌های چربی اثر کند (۳). لپتین عامل تنظیم‌کننده مهمی در عملکرد تولید مثلی است و تأثیرات مستقیمی روی هیپوتالاموس، هیپوفیز و تخمدان دارد. این اثرات از توانایی لپتین در افزایش هورمون آزادکننده گنادوتروپین‌ها (GRH) از هیپوتالاموس، هورمون‌های لوتئینه‌کننده (LH) و هورمون تحریک‌کننده فولیکول (FSH) از هیپوفیز پیشین ناشی می‌شود. جالب است که غلظت بالای لپتین، رهاسازی هورمون‌ها را کاهش می‌دهد (۱۲ و ۱۶). بنابراین هیپوتالاموس و هیپوفیز جایگاه و حالت تغذیه‌ای و مقدار ذخیره متابولیکی غذایی را توسط لپتین حس می‌کنند. لپتین برای بهینه کردن تولید مثل لازم است، اما زیادی آن باعث چاقی می‌شود و ممکن است تأثیر آن بر عملکرد تولید مثلی کاهش یابد (۶). لیندرسون[1] و همکاران (۱۹۹۸)، مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی (QTL) برای صفات تولید شیر را در ۸۲/۸، درصد چربی را در ۷۵ و پروتئین شیر را در فاصله ۹۵ سانتی مورگان از ژن لپتین مکان‌یابی کردند (۱۰). لیفرس[2] و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که

1. Endocrine
2. White Adiposity

1. Liendersson
2. Liefers

تلیسه‌های با ژنوتیپ AB، ۱/۳۲ کیلوگرم در روز شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA تولید می‌کنند (۹). آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که آلل B باعث افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش بیش از حد باروری در گاوهای هلشتاین می‌گردد. تحقیق حاضر به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های ژن لپتین و فراوانی آللی آن در گاوهای نژاد تالشی و مقایسه آن با نژاد هلشتاین به کمک نشان‌گرهای مولکولی طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

از تعداد ۷۰ راس گاو تالشی پراکنده در استان گیلان، از هر دو جنس نمونه خون گرفته شد. ۳۰ نمونه خون نیز از گاوهای هلشتاین ایستگاه اصلاح نژاد شمال‌غرب و غرب کشور و گاوداری‌های مناطق اطراف اخذ گردید. با توجه به این‌که نمونه‌های خون از مکان‌های مختلف اخذ شده است لذا انتظار می‌رود که در بین نمونه‌ها رابطه خویشاوندی قابل توجهی حاکم نباشد. خون‌گیری در گاوهای بزرگ از ورید دمی و در گوساله‌ها از ورید وداجی با استفاده از لوله‌های حاوی خلا و ماده ضد انعقاد EDTA صورت گرفته و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج DNA بر اساس روش تغییر یافته نمکی انجام گردید و به دنبال آن کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتوفتومتری و ژل مونیتورینگ مورد بررسی قرار گرفت (٤). جهت حصول محصولات مناسب در واکنش زنجیره پلی‌مراز از۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم DNA استفاده گردید. آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش هر کدام ٢٤ نوکلئوتید طول داشتند (۹) که برای تکثیر قطعه‌ای به طول ٤٢٢ جفت باز از اینترون دو ژن لپتین گاوی طراحی شده بودند (شکل۱). در داخل این قطعه دو ناحیه برشی برای آنزیم Sau3AI (یک ناحیه تک‌شکل و یک ناحیه اصلی چندشکل) وجود دارد (۲). توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

5́-TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT-3́
5́-GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT-3́

برای به‌دست آوردن نتایج مطلوب در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ۲۰-۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار dNTP 1X PCR Buffer، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ به همراه ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase مورد استفاده قرار گرفت. برنامه حرارتی ۹٤ درجه سلسیوس جهت واسرشته شدن DNA به مدت ٤٥ ثانیه، دمای ٥٥ درجه سلسیوس جهت اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس جهت سنتز قطعه مورد نظر به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ چرخه به‌کار برده شد. هضم آنزیمی در حجم ۳۰ میکرولیتر با مصرف ۱۵ واحد آنزیمی تحت شرایط بافری و دمای مناسب با استفاده از آنزیم برشی Sau3AI (دارای سایت برشی GATC) صورت گرفت. جهت مشاهده محصولات PCR از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸ ٪ و قدرت ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت استفاده گردید و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. برای برآورد فراوانی آلل‌ها، محاسبه هتروزایگوسیتی و آزمون کای اسکور (χ۲) از نرم افزار $PopGene_{32}$ و روابط استاندارد محاسباتی استفاده گردید.

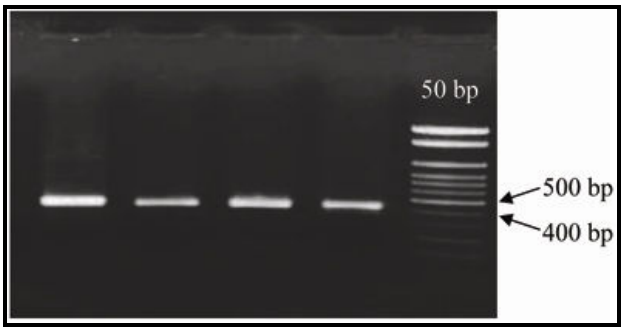
نتایج و بحث

همان‌گونه که از روی توالی موجود در بانک ژن برای ژن لپتین انتظار می‌رفت قطعه ٤٢٢ جفت بازی مورد نظر با صحت کامل تکثیر گردید (شکل۲).

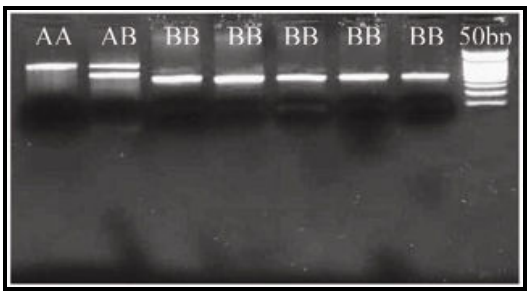
هنگام هضم آنزیمی محصولات PCR، در صورت هتروزیگوت بودن (AB)، قطعات ۳۹۰، ۳۰۳، ۸۸ و۳۲ جفت بازی، در صورت هموزایگوسیتی AA، قطعات ۳۹۰ و۳۲ و در صورت هموزایگوسیتی BB، قطعات ۳۰۳، ۸۸ و۳۲ جفت بازی به‌دست آمد (شکل ۳). فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به‌ترتیب ٦۱/٤، ۳۱/٥ و ۷/۱ درصد در گاوهای تالشی و ٥٦/۷، ٤۳/۳ و صفر درصد در گاوهای هلشتاین به‌دست آمد. فراوانی‌های آللی نیز برای آلل‌های A و B به ترتیب ۷۷/۱، ۲۲/۹ درصد در گاوهای تالشی و ۷۸/۳ و ۲۱/۷ درصد در گاوهای هلشتاین برآورد گردید (جدول۱). با توجه به این‌که جایگاه ژنی مورد مطالعه دارای دو شکل آللی می‌باشد به‌نظر می‌رسد که تعداد نمونه برای برآورد فراوانی‌های محاسبه شده مناسب باشد. در هیچ کدام از دو جمعیت مورد مطالعه تعادل هارد- واینبرگ در مورد ژن لپتین مشاهده نشد. عدم وجود تعادل هاردی- واینبرگ، هتروزیگوتی پایین Nei و تعداد آلل مؤثر پایین (جدول۱) نشان‌دهنده این است که جمعیت نمونه‌برداری شده به مرور به سوی هم‌خونی سوق داده می‌شود که این امر ممکن است در آینده مشکلات اصلاح نژادی را سبب شود.

TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCTCCCAACAAGATCTTCCCAACCCAGGGATTGAA
CCTGGGTCTTCTAAATTGCAGGCAGATTCTTTACCGTCTGAGCCACCAGGGAAACCCA
TAAGACCTTGTGAAGACTATTAAGATAGTCATCTAGACAACAAGACTATCTTAATAG
TCTTCATAAGGTCCTCATGAGACTAAATTAGATAAAGCAAGTGACCCTCCCTGAATA
CCCTTGCAGAACCAGAACTGTGTGTGCCCTCTTTCAAGGTTTTCAGTCATGACTTTTG
ATAGCTTCCCACCTTAAAAGCCAACTTGCTCACCTGCGTGGAGCAATCTGGAGACTTC
CACATCTCCTGACCACTCTATATTTCTAACAGTGGCTTTGGGAAGCCAGAGAGCAGT
TAGGTAGCCAGAAGCGGGGAC

شکل۱- توالی ناحیه مورد نظر از ژن لپتین جهت تکثیر به همراه محل جهش و نواحی برش برای آنزیم Sau3AI



شکل۲- تکثیر قطعه ٤۲۲ جفت باز از ژن لپتین در کنار سایز مارکر 50bp



شکل۳- ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین پس از هضم آنزیمی

جدول۱- تعداد ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی برای ژن لپتین در گاوهای تالشی و هلشتاین

نژاد	تعداد ژنوتیپ مشاهده شده			فراوانی ژنوتیپ مشاهده شده			فراوانی آللی		تعداد آلل	شاخص	هتروزیگوتی	χ^2
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B	مؤثر	شانون	نی	
تالشی	٤٣	٢٢	٥	٦١/٤	٣١/٥	٧/١	٧٧/١	٢٢/٩	١/٥٣	٠/٥٤	٠/٣٥	٠/٩٥*
هلشتاین	١٧	١٣	٠	٥٦/٧	٤٣/٣	٠	٧٨/٣	٢١/٧	١/٥١	٠/٥١	٠/٣٤	٢/٠٩*

منابع مختلف، آلل B را به‌عنوان آلل خوب و مطلوب جهت اصلاح نژاد در جهت افزایش تولید شیر معرفی کرده‌اند. لیفرس و همکاران (۲۰۰۲) ژنوتیپ AB لپتین را مقدار تولید شیر مرتبط دانسته و تولید شیر در ژنوتیپ AB را بیشتر از ژنوتیپ AA معرفی کردند (۹). به گزارش آن‌ها، ژنوتیپ AB ۱/۳۲ کیلوگرم شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA در هر روز تولید می‌کند و در قبال آن ۰/۳۷ کیلوگرم خوراک بیشتری هم مصرف می‌کند. انتظار می‌رود که این رابطه در این تحقیق هم صادق باشد و اگر به فراوانی ژنوتیپی به‌دست آمده در دو نژاد توجه شود انتظار می‌رود که تولید شیر در گاوهای هلشتاین بیشتر از گاوهای تالشی باشد که در حالت کلی هم‌چنین است.

هم‌چنین جوانمرد[1] و همکاران (۲۰۰۸) فراوانی آلل B را در دو جمعیت از گاو سرابی که در شهرستان‌های سراب و شبستر نگهداری می‌شدند به ترتیب ۵۸٪ و ۳۷٪ برآورد نمودند (۷). با وجود این‌که میانگین تولید شیر روزانه در گاو سرابی (۷/٦ کیلوگرم) بیشتر از گاو تالشی (٤/٥-٤ کیلوگرم) گزارش شده است (۱) و فراوانی آللی به‌دست آمده برای آلل B در جمعیت گاو سرابی هم بیشتر از گاو تالشی گزارش شده است، لیکن به‌دلیل عدم وجود مدرک علمی، شاید نتوان بالا بودن تولید گاو سرابی نسبت به گاوهای تالشی را به ژن لپتین نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که در هیچ‌کدام از دو جمعیت گاو مورد مطالعه تعادل هارد- واینبرگ در مورد ژن لپتین وجود نداشته و هتروزیگوتی و تعداد آلل مؤثر پایین است. این امر نشان‌دهنده احتمال افزایش هم‌خونی در آینده بوده و ممکن است مشکلات اصلاح نژادی را سبب شود.

با توجه به این تحقیق، فراوانی آللی در هر دو نژاد تقریباً یکسان بود و نمی‌توان هیچ نظری در مورد علت ژنتیکی اختلاف تولید شیر دو نژاد هلشتاین و تالشی ارایه نمود. از طرفی اگرچه ارتباط چندشکلی موجود در این ناحیه با صفات لاشه مطالعه شده است (۱۸) ولی نمی‌توان این ارتباط ژنتیکی را به نژادهای بومی تعمیم داد. با توجه به پتانسیل بالای ژنتیکی دام‌های بومی کشور به‌خصوص در مورد مقاومت به بیماری‌ها و سازگاری با شرایط نامناسب جوی و مدیریتی، ضرورت حفظ و استفاده از این پتانسیل‌ها احساس می‌شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارشناسان محترم امور دام استان‌های آذربایجان شرقی و گیلان که ما را صمیمانه در تهیه نمونه‌های خون یاری فرمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

1. Javanmard

منابع

۱- توکلیان، ج. ۱۳۷۸. نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور بومی ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، ٤٦ صفحه.

2. Almeidate, E., A. Almeida, J. C. F. Morqes and T. weimer. 2003. Molecular marker in the Leptin gene and reproductive performance of beef cattle. Animal Genetic and Breeding 120 (2): 106.
3. Belby, C. R. and L. Macmillan. 1998. Comparative study of ovarian function in American Holstein. Journal of Dairy Science 22: 2-8.
4. Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen and J. Van Der Noordaa. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology 28 (3): 495-503.
5. Chenoweth, P. J. 1994. Aspect of reproduction in female *Bos indicus* cattle. A review of Australian Veterinary Journal 71: 422-426.
6. Frubeck. G. S., A. Jebb and A. M Prentic. 1998. Review: Leptin physiology and pathophysiology. Clinical Physiology 48 (5): 399-419.
7. Javanmard, A., M. R. Mohammadabadi, G. Elyasi Zarringhabayi, A. A. Gharahedaghi, M. R. Nassiry, A. Javadmanesh and N. Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine Leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). Russian Journal of Genetics 44 (4): 495-497.
8. Lagonigro, R. P., F. Wiener, J. A. Pilla and J. Woolliams. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine Leptin gene associated with feed intake. Animal Genetic 34 (5): 371-374.
9. Liefers, S. C. M., F. W. Tepas and R. F. Veerkamp. 2002. Association between Leptin gene polymorphism and protein, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein. Journal Dairy Science 85: 1633-1638.
10. Liendersoon, M., L. Anderson and D. J. de-konine. 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. Journal Dairy Science 81: 1454-461.
11. Lucy, M. C. 2000. Reproductive physiology in High-yielding diary cattle. www.Missouri.edu.
12. Niasarti, N. 1995. Control of follicle growth hormone before super ovulation and subsequent size and number of recruited follicles in Brahman and Holstein heifers. Australian Society of Reproduction Biology 27: 83-90.
13. Pfister-Geneskow, M. H., A. Hayes, M. Eggen and D. Bishop. 1996. Chromosal location of bovine obesity gene. Mammalian Genome 7: 398-405.
14. Pomp, D., A. C. Clutter and W. Barendse. 1997. Mapping of Leptin to bovine chromosome 1 by linkage analysis of a PCR- based polymorphism. Journal of Animal Science 75: 1427-1434.
15. Pryce, J. E., M. P. Coffey and S. Brotherston. 2000. The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in Holsteins. Journal Dairy Science 83: 2664-2671.
16. Veerkamp, R. F. and J. K. Oldenbrok. 2000. Genetic correlation between days until starts of luteal and milk yield, energy balance and live weight. Journal of Dairy Science 83: 577-583.
17. Zwierzchowski L., J. Krzyzewski, N. Strzalkowska, E. Siadkowska and Z. Rynieweaz. 2002. Effects of polymorphism of growth hormone, Pit-1, Leptin gene, cow age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish black- white cows. Animal Science Papers and Reports 20 (4): 213-227.
18. Zwierzchowski L., J. Oprzadek, E. Dymnicki and P. Dzierzbicki. 2001. An association of growth hormone, κ-casein, β-lactoglobulin, Leptin and Pit-1 loci polymorphism with growth rate and carcase traits in beef cattle. Animal Science Papers and Reports 19: 65-78.