مجله تولیدات دامی، دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز ۱۳۸۹، ص ۶۷-۶۱

بررسی ژنوتیپ‌های بتالاکتوگلوبولین در گاوهای بومی و هلشتاین استان کرمان

محمدرضا محمدآبادی [*۱] و اکرم محمدی [۲]

(E-mail: mmohammadabadi@yahoo.ca)

تاریخ وصول مقاله: ۸۷/۹/۹ و تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۱۵

چکیده

بتالاکتوگلوبولین یکی از پروتئین‌های مهم در شیر پستانداران است که به وسیله سلول‌های پوششی غدد پستان سنتز شده و در کیفیت شیر و فرآیند لخته شدن آن نقش دارد. در این تحقیق، برای تعیین آلل‌های ژن بتالاکتوگلوبولین گاوهای بومی و هلشتاین استان کرمان از روش PCR-RFLP استفاده شد. چندشکلی ژنتیکی در جایگاه بتالاکتوگلوبولین به‌وسیله هضم محصولات PCR با اندونوکلئاز HaeIII، الکتروفورز در ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با استفاده از اتیدیوم بروماید در ۱۰۰ نمونه DNA گاوهای بومی و هلشتاین استان کرمان برای آلل‌های A و B تعیین شد. فراوانی آلل‌های A و B برای گاوهای هلشتاین به‌ترتیب ۰/۶۲ و ۰/۳۸ با متوسط هتروزایگوتی ۰/۴۷ و برای گاوهای بومی به‌ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۴۵ با متوسط هتروزایگوتی ۰/۴۶ تعیین شد. نتایج نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر جایگاه مزبور در تعادل هاردی - وینبرگ نبودند.

کلمات کلیدی: بتالاکتوگلوبولین، چندشکلی، روش PCR-RFLP، کرمان، گاو بومی

---

۱ - دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان - ایران **(نویسنده مسئول مکاتبات[*])**

۲ - کارشناس ارشد، علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل - ایران

مقدمه

برای بررسی وجود چندشکلی[1] توالی DNA روشهای مختلفی براساس واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ارائه شده است، لذا ژنوتیپ جایگاههای پروتئینهای شیر در دو جنس نر و ماده، در حال رشد یا حتی در جنین را میتوان تعیین نمود. از نشانگرهای ژنتیکی ملکولی میتوان برای انتخاب جنین برای انتقال، انتخاب حیوانات جوان برای آزمون نتاج یا انتخاب گوسالهها برای آمیزش و اصلاح نژاد استفاده نمود (۹). موتاسیونهای طبیعی (جانشینی و یا حذف) در توالیهای کدکننده ژنهای پروتئین شیر سبب ایجاد چندشکلی در توالی اسیدآمینهها و درنتیجه در پروتئینهای مربوط به آنها میشود. البته موتاسیونهای خاموش[2] در توالیهای غیرکدکننده (در اینترونها یا در نواحی موجود در فاصله '۵ و '۳[3]) ممکن است سبب تغییر پروتئینها نشوند (۹). بتالاکتوگلوبولین (LGB)[4] پروتئینی است که در شیر وجود دارد و پروتئین اصلی آب پنیر شیر گاو است. چندین واریانت ژنتیکی نظیر A، B، C، E، F و G برای این ژن شناسایی شده است (۷). وجود تفاوت در دو آلل A و B ژن بتالاکتوگلوبولین سبب بروز تفاوت در اسید آمینه در زنجیره پلیپپتیدی میشود. در این دو تغییر، اسید آمینه اسپارتیک (Asp) شماره ۶۴ (با توالی GAT) به گلایسین (Gly با توالی GGT) و والین (Val) شماره ۱۱۸ (با توالی GTC) به آلانین (Ala با توالی GCC) تبدیل میشود (۵ و ۸). در حیواناتی که در توالی نوکلئوتیدی ژن بتالاکتوگلوبولین باز T به C تغییر کرده است آنزیم *Hae*III در آن محل برش ایجاد میکند، لذا با آنالیز RFLP بررسی چند شکلی بتالاکتوگلوبولین ممکن میباشد (۴). مطالعات نشان داده که آللهای A و B بتالاکتوگلوبولین بر ترکیب و خصوصیات شیر مؤثر میباشند. تولید شیر توسط گاوهای دارای ژنوتیپ AA بتالاکتوگلوبولین بیشتر بوده ولی کازئین و چربی شیر آنها نسبت به شیر گاوهای با ژنوتیپ BB کمتر است (۲، ۳ و ۶). پنیر حاصل از شیر گاوهای با ژنوتیپ BB نسبت به گاوهای با ژنوتیپ AA بیشتر است (۱۰). در ضمن، پروتئینهای شیر حاصل از گاوهای با ژنوتیپ BB نسبت به گاوهای با ژنوتیپ AA و AB در برابر حرارت پایدارتر هستند. پایداری پروتئینهای شیر گاوهای هتروزیگوت (AB) در برابر حرارت حد واسط دو هموزیگوت است. وجود چندشکلی در ژن بتالاکتوگلوبولین بر مقاومت به بیماری ورم پستان[5] نیز تأثیر دارد. وجود رابطه منفی آلل B در ژنوتیپهای BB و AB با تعداد سلولهای سوماتیک (SCC)[6] گزارش شده است و این کمتر بودن سلولهای سوماتیک یک شاخص خوب در مورد سلامتی پستان میباشد (۹). لذا با تشخیص ژنوتیپهای مطلوب برای این ژن میتوان برای کنترل بیماری!ورم پستان و انتخاب حیوانات استفاده کرد. گاوهای بومی استان کرمان یک جمعیت مناسب برای مطالعه خصوصیات ژنتیکی هستند، چون این گاوها حاصل یک فرآیند طولانی انتخاب طبیعی میباشند و در آنها برای صفات تولید انتخاب ژنتیکی انجام نشده است. بنابراین، دارای خصوصیات ژنتیکی هستند که نسبت به شرایط منطقه سازگار و مقاوم میباشند، ولی در نژاد هلشتاین انتخاب مصنوعی انجام شده و برای صفات تولید در آنها انتخاب صورت گرفته است و از آنها میتوان برای مقایسه با دامهای بومی استفاده نمود. در این تحقیق، برای بررسی چندشکلی ژنتیکی در جمعیت گاوهای بومی و هلشتاین!ستان کرمان، ژنوتیپ آنها برای ژن بتالاکتوگلوبولین تعیین شده و نتایج با سایر نژادها، که با این نشانگرها تحقیق شدهاند مقایسه می-شود.

1 - Polymorphism

2 - Silent mutation

3 - Introns, or 5'- and 3'-flanking regions

4 - Beta-lactoglobulin

5 - Mastitis

6 - Somatic Cell Count

مواد و روشها

از تعداد ۵۰ رأس گاو هلشتاین، از دو گله دارای ۲۵ رأس مولد در شهرستان کرمان و ۵۰ رأس گاو بومی از دو گله دارای ۲۵ رأس در شهرستان بم خون‌گیری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت دیاتوم دی. ان. ا. پرپ[1] به روش گوانیدین – سیلیکاژل انجام شد. در این روش به ۴۰۰ میکرولیتر خون، ۴۰۰ میکرولیتر عامل لیزکننده اضافه و در درجه حرارت ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت پنج دقیقه انکوباسیون شد. سپس ۲۰ میکرولیتر ماده جاذب (به نام نوکلئوز) اضافه و بعد از انجام سانتریفیوژ رسوب را نگه داشته و باقیمانده بیرون ریخته شد و ۴۰۰ میکرولیتر بافر نمکی به رسوب اضافه و به خوبی مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ رسوب را نگه داشته و مابقی بیرون ریخته شد. مرحله قبل مجدداً تکرار شده و رسوب خشک شد و به آن ۱۰۰ میکرولیتر اکسترا ژن[2] اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. محلول باقیمانده سانتریفیوژ شد و محلول بالایی که حاوی DNA بود در لوله دیگری ریخته شد. راندمان استخراج DNA خالص با الکتروفورز در ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. برای انجام واکنش‌های PCR، مواد مورد استفاده (به‌جز DNA و آب مقطر) به صورت تیوب‌های آماده بودند که از یک شرکت تجاری تهیه شد. برای هر مخلوط واکنش، مقدار سه میکرولیتر DNA به ۱۷ میکرولیتر از مخلوط اضافه گردید و مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری برای انجام PCR استفاده شد. از آغازگرهای 5'- GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT -3' و- 5'- TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G -3' برای تکثیر اگزون چهار ژن بتالاکتوگلوبولین دام‌ها استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از کیت PCR یونیورسال[3] انجام شد. محتوای هر میکروتیوب شامل یک واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز غیرفعال، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP و ۲/۵ میلی‌مول $Mgcl_2$ و بافر استاندارد بود. شرایط واکنش PCR شامل واسرشت کردن اولیه DNA به مدت چهار دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، انجام ۳۳ سیکل با واسرشت کردن DNA طی ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به DNA طی ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بسط آغازگر طی ۶۰ ثانیه در ۷۳ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام عمل PCR و تکثیر ۲۴۷ جفت باز از ناحیه موردنظر ژن قطعه تکثیر یافته در معرض اندونوکلئاز برشی *Hae*III در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت تا آلل‌ها مشخص شود. برای تشخیص آلل‌های A و B محصولات هضم در ژل آگارز دو درصد به مدت دو ساعت با جریان ۲۲۰ ولت الکتروفورز گردید. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس باندها در زیر نور ماوراءبنفش مشاهده و از آنها عکس‌برداری شد. سپس ژنوتیپ تمام نمونه‌ها تعیین و تعداد آن‌ها شمارش شد. برای تعیین فراوانی آللی، بررسی تعادل هاردی – واینبرگ، هتروزایگوتی و هموزایگوتی مشاهده شده در دو نژاد از نرم‌افزار PopGene32 استفاده شد (۱۲).

نتایج و بحث

از دانسیته نوری (OD)[4] با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر برای برآورد مقدار و کیفیت نمونه DNA استفاده شد. به‌طور متوسط عدد OD برابر چهار بود و چون هر OD برابر ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر است، لذا مقدار غلظت DNA در حدود ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. در اثر الکتروفورز DNA در ژل آگارز باندهایی واضح با وزن ملکولی زیاد ظاهر شد (شکل ۱).

با آنالیز هضم برشی محصول PCR بتالاکتوگلوبولین با اندازه ۲۴۷ جفت باز، سه نوع الگوی برشی مشخص شد. از

1 - Diatom DNA Prep

2 - Extra Gene

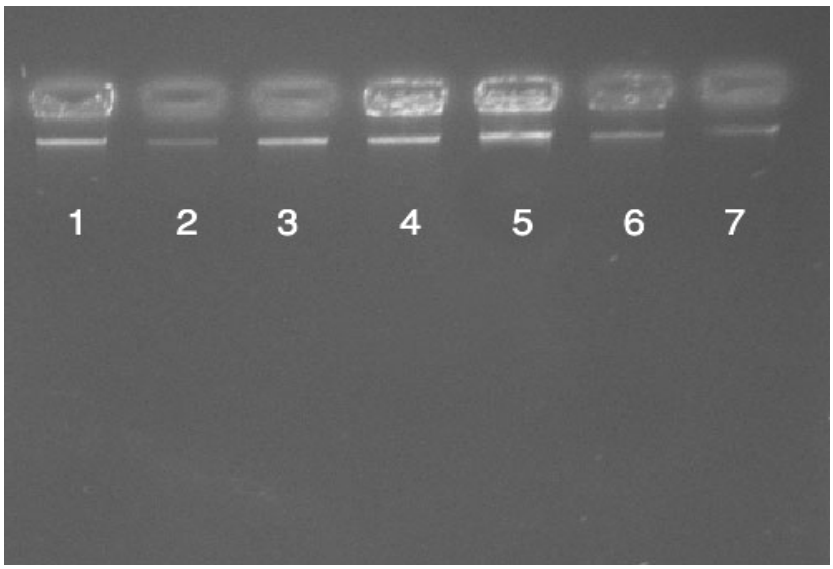
3 - Universal PCR

4 - Optical Density

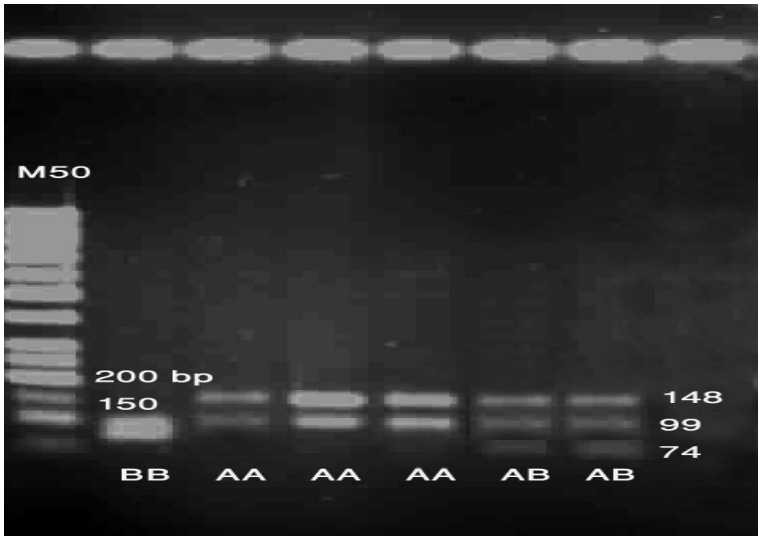
آن‌جا که آلل A در یک نقطه برش می‌خورد دو قطعه ۱۴۸ و ۹۹ جفت بازی را تولید می‌کند و چون آلل B در دو نقطه برش می‌خورد سه قطعه ۹۹، ۷۴ و ۷۴ جفت بازی را ایجاد می‌کند. لذا الگوی اول شامل دو قطعه ۱۴۸ و ۹۹ جفت باز (ژنوتیپ AA)، الگوی دوم شامل دو قطعه ۹۹ و ۷۴ جفت باز (ژنوتیپ BB) و الگوی سوم شامل سه قطعه ۱۴۸، ۹۹ و ۷۴ جفت باز (ژنوتیپ AB) بود (۱۴۸ و ۹۹ از آلل A و ۹۹ و ۷۴ از آلل B) (شکل ۲). البته قطعه ۷۴ جفت باز دو عدد است که چون رویهم قرار گرفته‌اند، به صورت یک باند دیده می‌شود. تعداد ژنوتیپ‌ها، فراوانی‌های ژنوتیپی و ژنی در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱ - تعداد ژنوتیپ‌ها و فراوانی‌های ژنوتیپی و ژنی دام‌های مورد مطالعه

	تعداد حیوان	تعداد ژنوتیپ			فراوانی ژنوتیپی			فراوانی ژنی	
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	A	B
هلشتاین	۵۰	۲۸	۶	۱۶	۰/۵۶	۰/۱۲	۰/۳۲	۰/۶۲	۰/۳۸
بومی	۵۰	۲۵	۵	۲۰	۰/۵۰	۰/۱۰	۰/۴۰	۰/۵۵	۰/۴۵



شکل ۱ - الکتروفورز ۷ نمونه (۱ تا ۷) از DNA استخراج شده گاوهای مورد مطالعه روی ژل آگارز



شکل ۲ – الکتروفورز نتایج هضم محصولات PCR اگزون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین. ستون M50 نشانگر اندازه (شاخص) و سایرین ژنوتیپ چند دام مورد مطالعه

مطالعات مختلف نشان داده که فراوانی آلل B ژن بتالاکتوگلوبولین در نژادهای مختلف از ۰/۸۳ تا ۰/۴۳ متغیر است. به عنوان مثال، فراوانی آلل B ژن بتالاکتوگلوبولین در سویه‌های هلشتاین هند، لهستان، استرالیا، ایتالیا، کانادا، نیوزیلند، آنگوس، سیمنتال، کارولیس، کاراکو و جرزی به‌ترتیب ۰/۷۴، ۰/۶۳، ۰/۶۱، ۰/۵۹، ۰/۶۵، ۰/۵۵، ۰/۸۳، ۰/۵۴، ۰/۴۵، ۰/۴۳ و ۰/۷۰ گزارش شده است (۱، ۲، ۸، ۹ و ۱۱). در مطالعه حاضر، فراوانی آلل B در جمعیت گاوهای بومی بیشتر از نژاد هلشتاین بود. لذا فراوانی ژنوتیپ BB و مجموع فراوانی ژنوتیپ‌های BB و AB در گاوهای بومی بیشتر از گاوهای هلشتاین بود. این امر مقاومت بیشتر دام‌های بومی به بیماری ورم پستان نسبت به نژاد هلشتاین را توجیه می‌کند، زیرا ثابت شده است که مقاومت دام‌های با ژنوتیپ BB و AB نسبت به دام‌های AA به بیماری ورم پستان بیشتر است. انحراف فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و فراوانی مورد انتظار برای گاوهای بومی و هلشتاین در شرایط تعادل هاردی – وینبرگ معنی‌دار بود ($p<$ ۰/۰۵)، یعنی جمعیت‌های مورد مطالعه برای جایگاه بتالاکتوگلوبولین در تعادل نبودند ($\chi^2_{(1,\ 0.05)}=37.79$ برای جمعیت هلشتاین و $\chi^2_{(1,\ 0.05)}=31.82$ برای جمعیت بومی) که بیانگر وجود نیروهای برهم‌زننده تعادل، یعنی انتخاب، مهاجرت و جهش و یا اندازه جمعیت و روش نمونه‌گیری می‌باشد. برای اطمینان از این‌که کدام نیرو یا نیروها در این امر دخیل هستند، باید آنها را تک تک بررسی نمود. به عنوان نمونه، اگر انتخاب برای این جایگاه در جریان باشد، ممکن است باعث کاهش یا افزایش فراوانی یک آلل شود و تعادل را برهم زند و یا هنگامی که از تلقیح مصنوعی استفاده می‌شود (مهاجرت)، اگر فراوانی آللی اسپرم‌های استفاده شده با فراوانی آللی جمعیت یکسان نباشد، فراوانی آللی جمعیت تغییر می‌کند و تعادل جمعیت از بین می‌رود. باتوجه به این‌که ما اطلاعاتی از جمعیت‌های والدی جمعیت‌های مورد مطالعه نداریم و اطلاعات حاصل از این تحقیق نیز برای این امر به کار برده نشده‌اند، لذا با اطلاعات موجود نمی‌توان مشخص نمود که کدام فاکتور یا فاکتورها باعث برهم زدن تعادل شده‌اند.

References

1 . Dadhich S, Patel RK, Soni KJ, Singh KM and Chauhan JB (2006) Estimation of allelic frequency of κ-casein and β-lactoglobulin genes in Bos indicus cattle breeds. International J. Cow Sci. 2: 48-51.

2 . Hill JP (1993) The relationship between p-lactoglobulin phenotype and milk composition in New Zealand dairy cattle. Dairy Sci. 76: 282-286.

3 . McLean DM, Graham ERB and Ponzoni RW (1984) Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. Dairy Res. 51: 531-546.

4 . Medrano JF and Aquilar-Cordova E (1990) Polymerase chain reaction amplification of bovine P-lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. Anim. Biotech. 1: 73-77.

5 . Melea M, Conte G, Serra A, Buccioni A and Secchiari P (2007) Relationship between beta-lactoglobulin polymorphism and fatty acid composition in milk of Massese dairy ewes. Small Ruminant Res. 73: 37-44.

6 . NG-Kwai-Hang KF, Hayes JF, Moxley EJ and Monardes HG (1986) Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. Dairy Sci. 69: 22-26.

7 . Patel G, Patel RK and Soni KJ (2007) Detection of κ-casein and β-lactoglobulin variants in Holstein Friesian cattle by PCR-RFLP assays. Hariyana Veterinary. In press.

8 . Rajesh KP, Jenabhai BC, Krishna MS and Kalpesh JS (2007) Allelic Frequency of Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Indian Crossbred (Bos Taurus × Bos indicus) Dairy Bulletins Turkey J. Vet. Anim. Sci. 31: 399-402.

9 . Strzalkowska N, Krzyzewski J, Zwierzchowski L and Ryniewicz Z (2002) Effects of K-casein and (3-lactoglobulin loci 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. Papers and Reports 20: 21-35.

10 . Van Der Berg G, Escher JTM, De Koning PJ and Bovenhuis H (1992) Genetic polymorphism of K-casein and P-lactoglobulin in relation to milk composition and processing. Nether land Milk Dairy J. 46: 145-168.

11 . Vasconcellos LPMK, Tambasco-Talhari D, Pereira AP, Coutinho LL and Regitano LCA (2003) Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. Genet. and Molec. Biolog. 26: 133-137.

12 . Yeh FC, Yang R and Boyle T (1999) PopGene version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.

Journal of Animal Production, Vol. 12, No. 2, Autumn 2010

Study of beta-lactoglobulin genotypes in native and Holstein cattle of Kerman province

M. R. Mohammad Abadi [1] and A. Mohammadi [2]

(E-mail: mmohammadabadi@yahoo.ca)

Abstract

Beta-lactoglobulin (LGB) is one of the proteins in the mammals' milk synthesized by the epithelial cells of the mammary glands and affects the quality and coagulation of the milk. The aim of this study was to determine allele frequencies in LGB gene of Native and Holstein cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. Genetic polymorphism, for 100 DNA samples in the locus was determined by digestion of PCR products with endonuclease *Hae*III (LGB), followed by electrophoresis in agarose gel stained with ethidium bromide. Allele frequency for the A and B alleles in Holstein cattle was 0.62 and 0.38 and in Native cattle was 0.55 and 0.45, respectively. Average heterozygosity in Holstein and Native cattle was 0.47 and 0.46, respectively. Results indicated that the studied populations were not in Hardy-Weinberg equilibrium for the LGB locus.

Keywords: Beta-lactoglobulin, Kerman, Native cattle, PCR-RFLP, Polymorphism

1 - Associated Professor, Department of Animal Sciences, Shahid Bahonar Uni. of Kerman, Kerman – Iran

(Corresponding Author*)

2 - M.Sc. Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol - Iran