نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۲۳۹-۲۲۹

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 2, Summer 2017, p. 229-239

توالی یابی و آنالیز بیوانفورماتیکی ژن کاپا کازئین در جمعیت بزهای خلخالی ایران و سایر دام‌های اهلی

وحیده کریمی عوری[۱]- نعمت هدایت ایوریق[۲*]- رضا سید شریفی[۲]- سعید نیک‌بین[۲]- یونس زاهدی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۱۷

چکیده

در سال‌های اخیر به طور عمده چند شکلی‌های ژنتیک پروتئین شیر مورد توجه و تحقیق بیشتری بوده است. زیرا بین پروتئین شیر و صفات اقتصادی مهم در دام رابطه مستقیم وجود دارد. کاپا کازئین به‌عنوان عمده‌ترین پروتئین موجود در شیر نقش مهمی در شکل گیری میسل‌های موجود شیر و کمک به افزایش حلالیت کلسیم و فسفر ایفا می‌کند، از این رو این مطالعه با هدف و رویکرد بررسی ژنتیکی و فیلوژنتیکی ناحیه اگزون ۴ ژن کاپا کازئین با روش توالی یابی در جمعیت بز خلخالی و مقایسه آن با سایر گونه‌ها انجام گرفت. نتایج حاصل از توالی‌های منجر به شناسایی یک جهش در نمونه‌های توالی یابی شده گردید که باعث تغییر نوکلئوتید C به T در جایگاه اگزون چهار ژن کاپا کازئین گردید که منجر به تغییر کدون CCT به TCT می‌شود و باعث جایگزینی اسید آمینه پرولین به جای سرین می‌شود. آنالیز تنوع ژنتیکی در جمعیت بز خلخالی ۰/۵۲۴ به دست آمدکه نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی نسبتا مناسب می‌باشد. مقایسه توالی‌های جمعیت خلخالی با گونه‌های مختلف مانند بز، گاو ، گوسفند و گاو میش منجر به شناسایی ۴۱ جهش شد که ایجاد ۲۹ هاپلوتایپ مختلف با تنوع هاپلوتایپی ۰/۸۳۳ در گونه‌های مورد مطالعه می‌کند. تنوع نوکلئوتیدی و میانگین تفاوت نوکلئوتیدی (k) در بین گونه‌ها نیز به ترتیب برابر ۰/۰۴۴۶۹ و ۷۵۴۳۶/ ۱۱ به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: تنوع نوکلئوتیدی، توالی یابی، چند شکلی تک نوکلئوتیدی، کاپا کازئین، هاپلوتیپ.

مقدمه

بز خلخالی یک نژاد بومی بوده که منطقه پراکنش آن بیشتر در دشت مغان، اطراف شهرستان خلخال و بخش‌هایی از استان آذربایجان شرقی است. محصول اصلی این بز شیر است و جمعیت آن روند تنزلی دارد. بز خلخالی از شاخص‌ترین نژادهای بز منطقه می‌باشد که از سالیان بسیار دور در میان گله‌ها به چشم می‌خورد. به علت هزینه نگهداری نسبتا کم و سازگاری با شرایط اقلیمی منطقه نگهداری و پرورش این بز به صورت یک سنت در اکثر نقاط این منطقه انجام می‌گیرد. پرورش این دام از لحاظ اقتصادی اهمیت زیادی برای روستاییان و عشایر منطقه دارد و از نظر اشتغال‌زایی، خانوارهای زیادی در منطقه مشغول به پرورش این دام هستند.

شیر پستانداران حاوی ۳۵-۳۰ گرم پروتئین در هر لیتر می‌باشد. در شیر نشخوارکنندگان بیش از ۹۵ درصد این پروتئین‌ها توسط ۶ ژن ساختاری سنتز می‌شود (۹). دو پروتئین مهم آلفالاکتولبومین وبتالاکتوگلوبین به ترتیب توسط ژن LGB,LALBA رمز گذاری می‌شود (۱۲) و چهار پروتئین محلول در اسید شامل کازئین، آلفا کازئین S_1، بتا کازئین، آلفا کازئین S_2 و کاپا کازئین توسط ۴ ژنگاه کاملا پیوسته کازئین رمز گذاری می‌شود که بر روی کروموزوم شماره ۶ قراردارد (۴، ۹ و ۲۲). که طول آنها ۲۵۰ کیلو جفت باز می‌باشد. ژن آلفا کازئین S_1، بتا کازئین، آلفا کازئین S_2 از لحاظ تکاملی با هم ارتباط دارند ژن کاپا کازئین از لحاظ فیزیولوژیکی دارای اهمیت بوده و در پایداری میسل‌های کازئین نقش دارد (۱۵). ژن کاپا کازئین در منطقه پایین دست مجموعه کازئین و به فاصله ۶۳ کیلو جفت باز (kb ۶۳) از آلفا S1 و دارای ۵ اگزون می‌باشد.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی،
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی،
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی.
(*- نویسنده مسئول: (Email: nhedayat@uma.ac.ir
DOI: 10.22067/ijasr.v3i1.55630

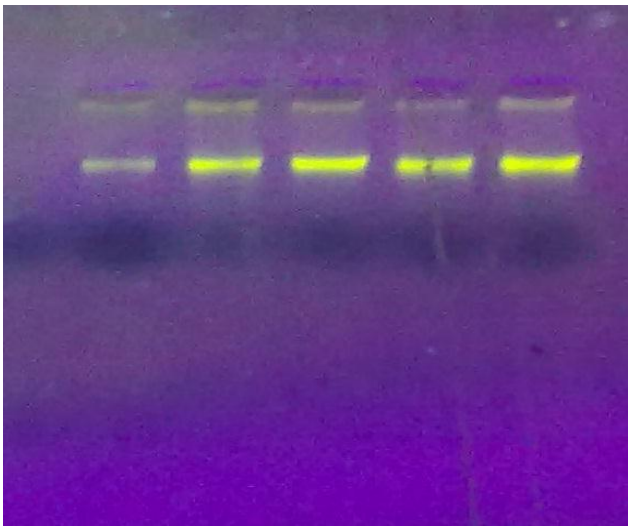
در نشخوار کنندگان کازئین حدود ۸۰ درصد از کل پروتئین شیر را تشکیل می‌دهد (۹). کاپا کازئین نیز ۱۵ ٪ کل کازئین‌ها را شامل می‌شود (۵، ۱۰ و ۱۱). ژن کاپا کازئین به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی سودمند در برنامه‌های بهبود ارزش اصلاحی ژنتیکی مطرح است و چند شکلی در ژن آن باعث بروز تأثیرات معنی‌داری بر روی تولید شیر می‌شود. عملکرد فرآیند تکنولوژی تولیدات پنیر به ساختار پروتئین کاپا کازئین وابسته است که به وسیله ژن CSN3 کد گذاری می‌شود (۶) و دارای ۱۷۱ آمینواسید می‌باشد. ۹۴ در صد این پروتئین‌ها توسط ژن‌های ناحیه اگزون ۴ کد می‌شوند. کاپا کازئین در حضور یون کلسیم حل می‌شود و یک بخش کوچکتری از تری فسفات نسبت به دیگر کازئین‌ها دارد، بنابراین ساختار و قابلیت هضم شیر را تغییر می‌دهد (۱۷).

چند شکلی کاپا کازئین در گونه‌های مختلف پستانداران مانند گوسفند (۱۳ و ۱۶)، گاو (۱)، بز (۸ و ۲۳) و گاو میش (۱۹) شناسایی شده و مقایسه شدند و ارتباط آن با صفات تولیدی شیر مشخص شده است (۱۸) تعدادی از مطالعات تاثیر چند شکلی‌های ژن‌های کازئین را بر روی تولید شیر و کیفیت شیر نژادهای مختلف بز بررسی کرده اند (۲) در بز تقریبا ۱۵ جایگاه چند شکلی در ژن کاپا کازئین مشخص شده است که منجر به ایجاد ۱۶ آلل در کاپا کازئین می‌شود (۳، ۷ و ۱۴) چند شکلی تک نوکلئوتیدی کاپا کازئین بر روی درصد چربی، پروتئین، تولید شیر و مزه شیر اثرات افزایشی معنی‌داری داشته‌اند. لذا این مطالعه با هدف بررسی اگزون ۴ ژن کاپا کازئین با استفاده از روش PCR-SSCP و توالی یابی آن جهت شناسایی چند شکلی‌های متفاوت در نژاد بزهای خلخالی و بررسی بیوانفورتیک توالی‌های حاصل با سایردام‌های مزرعه‌ای انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و استخراج DNA

از ۴ گله بز خلخالی به طور تصادفی از شهرستان خلخال به تعداد ۱۰۰ رأس نمونه گیری شد. خون‌گیری از ناحیه سیاهرگ وداج گردن با استفاده از لوله‌های حاوی EDTA انجام گردید. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (کیت ATP bioscience) از خون پستانداران تخلیص شد و برای تعیین کمیت وکیفیت DNA، از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱- DNA ژنومی استخراجی در جمعیت بزهای خلخالی

Figure 1- Extracted genomic DNA in populations of khalkhali goats

تکثیر و تعیین ژنوتیپ اگزون ۴ ژن کاپا کازئین

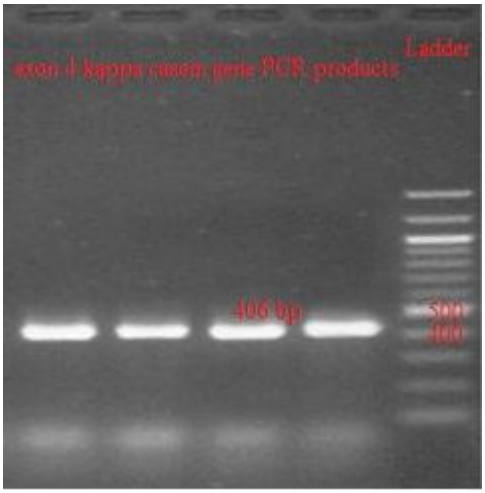
جهت تکثیر ناحیه اگزون ۴ ژن کاپا کازئین به طول ۴۰۶ جفت باز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی زیر تکثیر گردید.

F:5’-GGTATCCTAGTTATGGACTCAAT-3’
R:5’-GTTGAAGTAACTTGGGCTGTGT-3’

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن کاپا کازئین به ترتیب دمای واسرشت شدن اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و یک سیکل دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم و انجام شد.

غلظت‌های مورد استفاده از مواد بعد از بهینه سازی برای انجام PCR به ترتیب ۱۸ پیکو مول از هر جفت پرایمر، ۵ /۱۲ میکرولیتر مستر میکس pcr و ۲/۵ میکرلیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم) و

مابقی را تا رسیدن به ۲۵ میکرولیتر از آب مقطر استفاده شد. برای اطمینان ازعمل تکثیر، کیفیت و میزان DNA در واکنش، از الکتروفوز با ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد .جهت تعیین ژنوتیپ از روش SSCP محصولات PCR بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد غیر دناتوره کننده استفاده شد برای تهیه این ژل ۱۱/۴ گرم پودر اکریل آمید را با ۰/۶ گرم بیس اکریل آمید مخلوط شد و با ولتاژ ۲۲۰ به مدت ۲۱ ساعت الکتروفوز گردیده و برای مشاهده باندهای تک رشته‌ای از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.



شکل ۲- تکثیر ناحیه اگزون ۴ ژن کاپا کازئین تکثیر شده در جمعیت بز خلخالی
Figure 2- Amplification of exon 4 zone of κ-casein gene in khalkhali goat

توالی یابی جایگاه کاپا کازئین و آنالیز توالی‌ها

سه نمونه از هر الگوی متفاوت شناسایی شده جهت توالی یابی ارسال گردید. توالی‌های به دست آمده برای بررسی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار MEGA 6.0 (۲۱) با استفاده از روش Clustal W همتراز شدند و با استفاده از روش حداقل درستنمایی، درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. سپس از نرم افزار DnaSp 5.10 جهت شناسایی هاپلوتیپ‌ها استفاده شد. برای بررسی خنثی بودن یا اثر داشتن انتخاب (مصنوعی یا طبیعی) بر روی جهش یک ژن آزمون آماره تاجیما D به‌عمل آمد (۲۰). جهت آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌های به دست آمده از نرم افزار Network V.4.6.1.2 (fluxus-engineering.com) استفاده شد.

آنالیز بیوانفورماتیکی و فیلوژنتیکی بین گونه‌های اهلی

در این مطالعه، جهت مقایسه توالی‌های ژن کاپا کازئین بز خلخالی حاصل از توالی یابی با توالی‌های دیگر گونه‌ها که از بانک ژن مؤسسه اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) با کد دسترسی که در جدول یک آمده است، مورد تجزیه و تحلیل قرار داده شد. همه توالی‌ها با استفاده از روش W در نرم افزار MEGA 6.0 هم ردیف شدند و تک نوکلئوتیدهای چندشکلی از این طریق شناسایی شدند. سپس درخت فیلوژنی توالی‌های به دست آمده با استفاده از مدل کیمورا ۲ و روش حداکثر درست نمایی به دست آمد. هاپلوتایپ‌ها، تنوع توالی، میانگین تعداد تفاوت‌های نوکلئوتیدی و میانگین تعداد جانشینی‌های نوکلئوتیدی به ازای هر جایگاه بین نژادها با استفاده از نرم افزار DnaSP 5.10 حاصل شد. برآورد فاصله‌های ژنتیکی بین هاپلوتایپ‌های مشاهده شده و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA 6.0 و آنالیز شبکه‌ای هاپلوتیپ‌ها با نرم افزار NETWORK 4.163 انجام گرفت.

نتایج و بحث

بخش اگزون ۴ ژن کاپا کازئین بز (۴۰۶ جفت باز) تکثیر و با روش PCR-SSCP تعیین ژنوتیپ شد که در این جایگاه دو الگوی متفاوت مشاهده گردید (شکل ۳) مطابق تحقیقات انجام گرفته در بز بربری[1] هندوستان می‌باشد که با استفاده روش SSCP دو الگوی متفاوت A و B را با فراوانی ۳۸/۴۶ و ۶۱/۵۴ درصد به دست آوردند (۲۶) که تقریبا با فراوانی مشاهده شده در این مطالعه برابر می‌باشد.

توالی یابی الگوهای مختلف از ژن کاپا کازئین و آنالیز آن منجر به شناسایی یک جایگاه جهش یافته شد منجر به تغییر اسید آمینه پرولین به سرین در جایگاه ۲۴۸ شد (جدول ۲). بر اساس رفرنس AB93556601 در جایگاه ۳۷۲ جهش رخ داده که باعث تغییر باز سیتوزین به باز تیمین گردید این جهش ایجاد شده باعث ایجاد دو

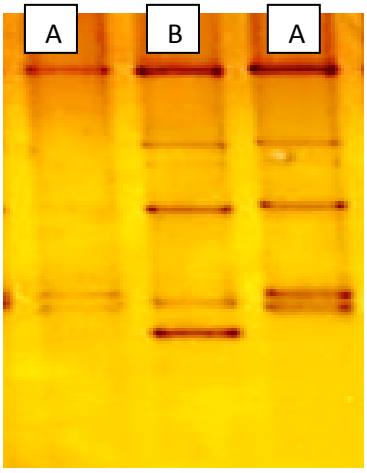
1- Barbari

هاپلوتیپ با فراوانی ۰/۶۳ و ۰/۳۷ در جمعیت مورد بررسی گردید. این جهش در بزهای نژادهای آفریقای جنوبی (۱۸)، آفریقای شرقی (۱۰)، نژادهـای اسـپانیای (مورسـیانا گرانـادا (۲)، قنـاری (۲۷) و ایتالیـایی (ترامان، سردا) (۲۷) شناسایی شـده اسـت کـه ارتبـاط معنـی‌داری بـا ترکیبات شیر داشته است.

جدول ۱- توالی‌های ژن کاپا کازئین استخراج شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI و کد دسترسی آنها

Table 1- Sequences of κ-casein gene extracted from the NCBI database and their access number

گونه Species	تعداد توالی Number of sequence	شماره دسترسی در بانک ژن Access number in Gene Bank
گاو ایندیکوس Bos indicus	14	AY367770, KR149429, HQ589919, HQ589915, HQ589921, EU595512, EU595511, HQ589922, EU365833, AY367769, EU595508, HQ589914, EU595509, EU595510
گاو تارئوس Bos taurus	18	AJ841941, AJ849456, EF378700, BC102120, HQ589920, M36641, HQ589916, AJ619772, HQ589917, X00565, NM174294, AY380228, KP897162, KP897163, AF123250, AJ841942, AJ841944
گاومیش Bubalus bubalis	12	KC577239, AM900443, XM006071122, GU991533, JQ670673, GU991532, FJ770200, NM001290972, AY750857, DQ645429, JX862177, AJ011387
بز Capra hircus	21	AY090465, AY027868, AY090466, AY090467, AY166708, JX889421, JX889422, JX889424, KF644565, AB935566, AB935571, AB935601, AB935599, AB935598, AB935594, AB935593, AB935591, AB935590, AB935589, AB935588, AB935587
گوسفند Ovis	14	KC963137, KC963134, KC963133, FJ936315, FJ936265, FJ936310, FJ936278, FJ936274, FJ936259, FJ936256, FJ936257, AY237637, AY670679, NM001009378



شکل ۳- شناسایی الگوهای متفاوت از آنالیز ژن کاپا کازئین در بز با استفاده از روش PCR-SSCP

Figure 3- Identification of different patterns of κ-casein gene in goat using PCR-SSCP method

جدول ۲- جهش تشخیص داده شده در ژن کاپا کازئین در بز خلخالی

Table 2- Identification of mutation of K-casein gene in Khalkhali goat

جایگاه ژن Gene site	تعداد جهش Number of mutations	هاپلوتایپ Haplotype	تنوع هاپلوتایپی Haplotype diversity	جایگزینی Replacement	موقعیت Mutation position	تغییر اسید آمینه Amino acid change	تغییر کدون Codon change
اگزون 4 Exon 4	1	2	0.510	C → T	248	پرولین به سرین Prolin to serin	CCT → TCT

بررسی توالی مورد نظر بین گونه‌های مزرعـه‌ای نشـان داد کـه طول کلی توالی پس از ردیف بندی۴۰۶ جفت باز بود ۴۱ جایگاه چند شکلی وجـود دارد. در۶ جایگـاه ازجایگـاه چندشـکلی، یـک جهـش مشـاهده گردیـد (۵۲، ۶۲، ۶۳، ۲۳۲، ۲۳۷ و ۲۴۲) و در ۳۵ جایگـاه

بیش از یک جهش رخ داده است. درجایگاه ۱۵۶ بیش ازیک جهش، با سه متغیر دیده شد.

با آنالیز ۱۲۹ توالی مربوط به ژن کاپا کازئین مربوط به گونه‌های مختلف با استفاده از ۴۱ جهش، ۲۱ نوع هاپلوتیپ شناسایی شد. بزرگترین گروه هاپلوتیپ ۱ و ۲ بودند که به ترتیب ۳۶ و ۳۵ فراوانی را شامل می‌شدند. گروه هاپلوتیپی ۱ و ۲ مربوط به بز خلخالی وکاپرا می‌باشند. ۱۰ هاپلوتیپ یک فراوانی را نشان دادند. گاو تارئوس بیشترین فراوانی هاپلوتیپ با فراوانی ۹ را نشان داد که فراوانی زیاد هاپلوتیپ در بین گونه‌های مورد بررسی نشان از تفاوت زیاد این ژن در بین گونه‌های اهلی می‌باشد.

تنوع هاپلوتیپ در کل نمونه‌ها، واریانس تنوع هاپلوتیپی، تنوع نوکلئوتیدی در هر مکان، متوسط تعداد تنوع نوکلئوتیدی (k) و مقدار تاجیما D به ترتیب ۰/۸۳۳، ۰/۰۰۰۴، ۰/۰۴۴۷، ۱۱/۷۵۴۴ و ۱/۵۸۹۹۶ به دست آمد که در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار نبود، معنی‌داری تاجیما D ممکن است به دلیل تعداد اندک نمونه‌های به کار گرفته شده در این آنالیز باشد. نتایج تست مقدار تتا در هر مکان و در هر توالی به ترتیب ۰/۰۲۹۴ و ۰/۰۲۸۷ محاسبه گردید. به منظور مقایسه گونه‌ها، کل مشخصات مربوط به هر گونه در جدول ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول ۳- اطلاعات مربوط به جایگاه چند شکلی کاپا کازئین در گونه‌های مزرعه‌ای

Table 3- Information of polymorphisms loci of K-casein gene in livestock species

دام گونه Species	تعداد جایگاه گمشده Number of missing data	تعداد جایگاه چند شکلی Number of polymorphic	تعداد جهش منفرد Number of singleton variable site	تعداد جهش چندگانه Number of parsimony informative
گاوایندیکوس Bos indicus	20	4	0	4
گاوتارئوس Bos taurus	11	9	5	4
گاومیش Bubalus bubalis	11	3	1	2
بز Capra hircus	5	1	0	1
بز خلخالی Khalkhali goat	1	1	0	1
گوسفند Ovis aries	5	1	1	0
کل Total	20	41	6	35

جدول ٤- آماره‌های جمعیت بین گونه‌های مختلف اهلی مربوط به ژن کاپا کازئین

Table 4- Population parameters of K-casein gene in different domestic species

گونه Species	تعداد هاپلوتیپ Number of haplotypes	تنوع هاپلوتیپی Variance of haplotype	واریانس تنوع هاپلوتایپی Variance of haplotype diversity	تنوع نوکلئوتیدی Nucleotide diversity	تاجیما D Tajima's D
گاوایندیکوس Bos indicus	7	0.846	0.00550	0.00706	1.56963 P > 0.10
گاوتارئوس Bos taurus	9	0.869	0.00373	0.00666	-1.09176 P > 0.10
گاومیش Bubalus bubalis	4	0.682	0.01039	0.00434	0.62211 P > 0.10
بز Capra hircus	2	0.524	0.00129	0.00188	1.56567 P > 0.10
بزخلخالی Khalkhali goat	2	0.510	0.00020	0.00181	1.72683 P>0.05<0.10
گوسفند Ovis aries	2	0.143	0.01412	0.00051	1.15524 P > 0.10
کل Total	21	0.833	0.00042	0.04469	1.58996 P > 0.10

در این مطالعه در تمام گونه‌ها تنوع نوکلئوتیدی کم می‌باشد. گاو ایندی کوس بالاترین تنوع نوکلئوتیدی و گوسفند کمترین تنوع را نشان می‌دهد. در حالی که در بز خلخالی تنوع هاپلوتیپی ۰/۵۱۰ و تنوع نوکلئوتیدی ۰/۰۰۰۱۸۱ مشاهده گردید. تست تاجیما D به منظور شناسایی هر گونه انحراف از فرضیه صفر تکامل خنثی و شناسایی اثرات انتخاب طبیعی بر این ژن‌ها محاسبه می‌گردد. مقدار تاجیما D در گاو تارئوس منفی و معنی‌دار نبود که ممکن است به دلیل تعداد اندک نمونه‌های به کار گرفته شده در این آنالیز باشد .

تمایز ژنتیکی F_{ST} و فاصله ژنتیکی D_{XY} میان گونه‌ها برای ژن کاپا کازئین به وسیله نرم افزار DNAsp محاسبه و معنی‌داری این فواصل ارزیابی شد. همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود تمایز ژنتیکی بین گوسفند و گاو میش بیشترین و بین گونه‌های کاپرا و بز خلخالی کمترین و منفی می‌باشد که وجود F_{ST} منفی می‌تواند به دو دلیل باشد، نخست این که جایگاه چندشکلی دارای آلل تفکیکی در دو جمعیت مورد بررسی بوده باشد در حالی که توزیع فراوانی آلل‌ها بین دو جمعیت متفاوت نباشد که در این حالت در نظر گرفتن عدم تمایز ژنتیکی می‌تواند منطقی بوده باشد. دوم اینکه F_{ST} منفی زمانی می‌تواند مشاهده گردد که توزیع فراوانی آلل‌ها در جایگاه نشانگر به مقدار زیادی چولگی نشان دهد و این چولگی زمانی ایجاد می‌شود که جایگاه نزدیک به حالت مونومورف بوده باشد و چند شکلی توسط تعداد کمی از افراد مشاهده شود که نتیجه آن در نظر گرفتن عدم تمایز ژنتیکی می‌باشد (۱۸). بیشترین فاصله ژنتیکی نیز بین گوسفند و گاو ایندیکوس و کمترین بعد از کاپرا و بز خلخالی بین گاو ایندیکوس و گاو تارئوس می‌باشد که نشان‌دهنده حفاظت بیشتر این ژن در این گونه‌ها می‌باشد.

جدول۵- مقایسه تمایز ژنتیکی (Fst) و فاصله ژنتیکی (D_{XY}) (مثلث بالایی و پایینی به‌ترتیب نشان‌دهنده Fst و DXY می‌باشند)

Table 5- Comparation of genetic differentiation (F_{ST}) and genetic distance (D_{XY}) (upper and bottom triangle represent Fst and D_{XY}, respectively)

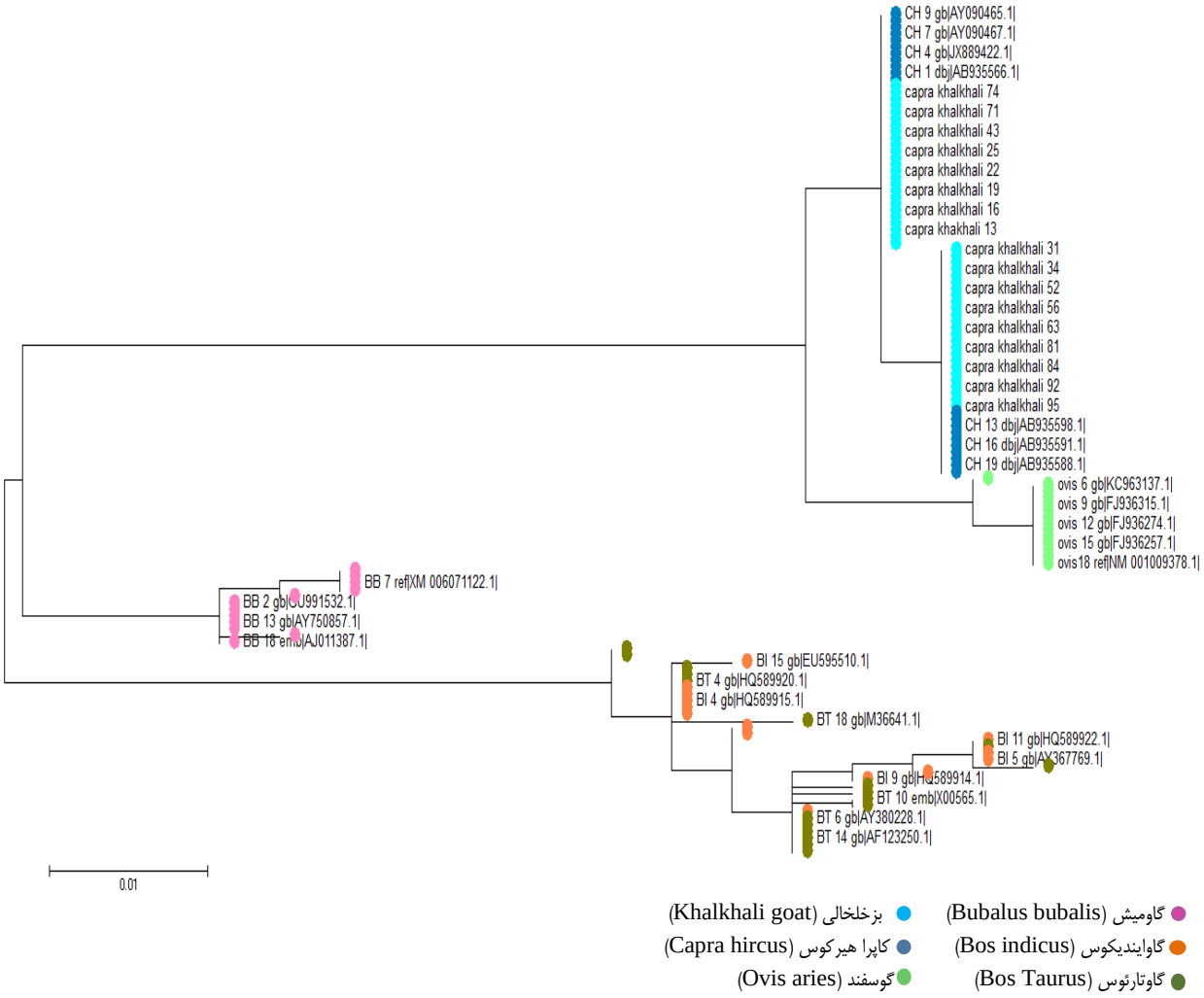
Fst / DXY	بز خلخالی Khalkhali goat	گاومیش Bubalus bubalis	گاو ایندیکوس Bos indicus	گاو تارئوس Bos taurus	بز Capra hircus	گوسفند Ovis aries
بزخلخالی Khalkhali goat	-	0.95119	0.95097	0.95147	-0.03401	0.93985
گاومیش Bubalus bubalis	0.06591	-	0.90028	0.90111	0.95073	0.96648
گاو ایندیکوس Bos indicus	0.09180	0.05794	-	0.06074	0.95064	0.95930
گاو تارئوس Bos taurus	0.090803	0.05753	0.00742	-	0.95109	0.95984
بز Capra hircus	0.00190	0.06582	0.09171	0.09074	-	0.93833
گوسفند Ovis ariea	0.02064	0.07514	0.09343	0.09246	0.02055	-

وجود تعداد بیشتر شاخه‌های درخت نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالاست که مربوط به جمعیت گاو ایندیکوس است و تعداد کمتر شاخه‌های درخت نشان دهنده تنوع ژنتیکی کم که مربوط به کاپراهیرکوس و بز خلخالی می‌باشد. تنوع ژنتیکی نزدیک جمعیت‌ها بیانگر منشأ مشترک و یا وجود جریان ژنی میان آنها است و یا شرایط زیستگاهی مشابه می‌باشد. بز خلخالی با کاپرا هیرکوس در یک شاخه قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده منشأ مشترک بین آنها می‌باشد.

شبکه روابط هاپلوتایپی در گونه‌ها با استفاده از نرم افزار Network در شکل ۵ آورده شده است. شبکه از طریق خوشه‌های مجزا هاپلوتیپ مشخص شد. هاپلوتیپ با فراوانی بالا دایره بزرگتر و هاپلوتیپ‌های با فراوانی پایین دایره کوچکتر را نشان دادند.

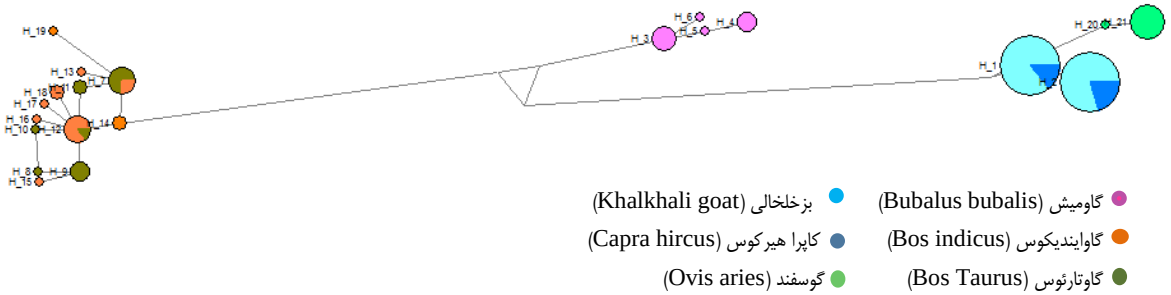
نتیجه گیری کلی

با توجه به جهش شناخته شده در ژن کاپا کازیین در این مطالعه که منجر به تغییر اسید آمینه می‌شود و این جهش در جمعیت بزهای مختلف در جهان نیز مشاهده شده است و ارتباط معنی‌داری آن در جمعیت‌های مورد نظر به اثبات رسیده است و از طرف دیگر ژن کاپا کازئین به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی سودمند در برنامه‌های بهبود ارزش اصلاحی ژنتیکی مطرح است توصیه می‌شود ارتباط جهش مورد نظر با صفات تولیدی شیر در جمعیت بز خلخالی بررسی گردیده و در صورت معنی‌دار بودن در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده گردد.



شکل ٤– درخت فیلوژنتیکی ژن کاپا کازئین در بز خلخالی و دام‌های اهلی

Figur4- Neighbour-joining tree of K-Casein gene in Khalkhali goat and domestic animal



شکل۵– شبکه به‌هم پیوسته ۲۱ هاپلوتیپ مربوط به ژن کاپا کازئین در بین گونه‌های اهلی (اندازه دایره هامتناسب بافراوانی آنها است)

Figure 5- Median joining network of 21 haplotype in K-Casein gene in livestock species (the size of the circle is in proportion to their frequency).

منابع

1- Alim, M. A., T. Dong., Y. Xie., X. P. Wu., Y. Zhang., S. Zhang, and D. X . Sun. 2014. Effect of polymorphisms in the CSN3 (k-casein) gene on milk. Molecular Biology Reports, 41: 7585–7593.
2- Caravaca, F., J. Carrizosa., B. Urrutia., F. Baena., J. Jordana., M. Amills, and J. Serradilla. 2009. Short communication: Effect of α S1-casein (CSN1S1) and κ-casein (CSN3) genotypes on milk composition in Murciano-Granadina goats. Journal of Dairy Science, 92(6): 2960-2964.
3- Chiatti, F., S. Chessa., P. Bolla., G. Cigalino., A. M. Caroli, and G. Pagnacco. 2007. Effect of κ-casein polymorphism on milk composition in Orobica goat. Journal of Dairy Science, 90: 1962-1966.
4- Dagnachew, B., G .Thaller., S. Lien, and T. Adnoy. 2011. Casein SNP in Norwegian goats: additive and dominance effects on milk composition and quality. Genetics Selection Evolution, 43: 31-42.
5- Ferretti, L., P. Leone, and V. Sgaramella. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein genes. Nucleic Acids Research, 18: 6829–6833.
6- Furet, J. P., J. C. Mercier., S. Soulier., P. Gaye., D. Hue-Delahaie, and J. L. Vilotte. 1990. Nucleotide sequence of ovine k-casein cDNA. Nucleic Acids Research, 18: 5286-5296.
7- Hayes, B., N. Hagesaether., T. Adnoy., G. Pellerud., P. R. Berg, and S. Lien. 2006. Effects on production traits of haplotypes among casein genes in Norwegian goats and evidence for a site of preferential recombination. Genetics, 174: 455–64.
8- Jann, O. C., E. M. Prinzenberg., G. Luikart., A. Caroli, and G. Erhardt. 2004. High polymorphism in the k-casein (CSN3) gene from wild and domesticated caprine species revealed by DNA sequencing. Journal of Dairy Research, 71: 188-195.
9- Khatami, N. R., S. Yousefi, and A. M. Ahani. 2013. Survey of single strand conformation polymorphism of kappa-casein gene in Alpine and Saanen goats in Iran. Animal Science Papers and Reports, 31(2): 173-177.
10- Kiplagat, S., M. Agaba., I. Kosgey., M. Okeyo., D. Indetie., O. Hanotte, and M. Limo. 2010. Genetic polymorphism of kappa-casein gene in indigenous Eastern Africa goat populations. International Journal of Genetics and Molecular Biology, 2(1): 001-005.
11- Mercier, J. C., G. Brignonand, and B. Ribadeau-Duman. 1973. Structure primaire de la caseine κB bovine. Sequence complete. European Journal of Biochemistry, 35: 222–235.
12- Mercier, J. C., F. Addeo, and J. P. Pelissier. 1976. Primary structure of the casein macropeptide of caprine k-casein. Biochemistry, 58: 1303-1310.
13- Ng-Kwai-Hang, K. F., F. Grosclaude, and P. Fox. 1992. Genetic polymorphism of the milk proteins. Advanced Dairy Chemistry, 1: 405-455.
14- Othman, O. E., S. A. El-Fiky., N. A. Hassan., E. R. Mahfouz, and E. A. Balabel. 2013. Genetic variations of K-casein genes in Egyptian sheep breeds. Journal of Applied Biosciences, 64: 4858-4866.
15- Martin, P., M. Szymanowska., L. Zwierzchowski, and C. Leroux. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. Reproduction Nutrition Development, 42: 433-459.
16- Prinzenberg, E. M., K. Gutscher., S. Chessa., A. Caroli, and G. Erhardt. 2005. Caprine κ-casein (CSN3) polymorphism: New developments of the molecular knowledge. Journal of Dairy Science, 88: 1490-1498.
17- Rijnkels, M., L. Elnitski., W. Miller, and J. M. Rosen. 2003. Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. Genomics, 82: 417–32.
18- Roesti, M., W. Salzburger, and D. Berner. 2012. Uninformative polymorphisms bias genome scans for signatures of selection. BMC Evolutionary Biology, 12: 94-112.
19- Scheepers, R. C., E. V. Marle-Köster, and C. Visser. 2010. Genetic variation in the kappa-casein gene of South African goats. Small Ruminant Research, 93(1): 53-56.
20- Selvaggi, M., V. Laudadio., C. Dario, and V. Tufarelli. 2014. Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: a useful tool for dairy production. Science of Food and Agriculture, 94(15): 3090-3099.
21- Singh, L.V., S. Jayakumar., A. Sharma., S. K. Gupta., S. P. Dixit., N. Gupta, and S. C. Gupta. 2015. Comparative screening of single nucleotide polymorphisms in β-casein and κ-casein gene indifferent livestock breeds of India. Science Direct Meta Gene, 4: 85-91.
22- Stafuzza, N. B., K. J. Kochan., P. K. Riggsb, and M. E. J. Amaral. 2013. Single Nucleotide Variations in the Buffalo Kappa-Casein Gene (CSN3). Buffalo Bulletin, 32(2): 675-679.
23- Tajima, F .1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by dna polymorphism. Genetics, 123: 585-595
24- Tamura, K., D. Peterson., N. Peterson., G. Stecher., M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance, maximum parsimony methods. Molecular Biology Evolution, 28(10): 2731-2739.
25- Threadgill, D. W, and J. E. Womack. 1990. Genomic analysis of the bovine milk protein genes. Nucleic Acids Research, 18: 6935–6942.

26- Vacca, G. M., M. L. Dettori., G. Piras., F. Manca., P. Paschino, and M. Pazzola. 2014. Goat casein genotypes are associated with milk production traits in the Sarda breed. Animal Genetics, 45: 723-731.
27- Vyas, M., M. Singh., S. Singh, and S. Dixit. 2010. Polymorphism at Kappa-casein gene in Barbari goats studied by PCR-SSCP. Indian Journal of Animal Sciences, 80(6): 572-574.
28- Yahyaoui, M., A. Angiolillo., F. Pilla., A. Sanchez, and J. Folch. 2003. Characterization and genotyping of the caprine κ-casein variants. Journal of Dairy Science, 86(8): 2715-2720.
29- Yahyaui, M. H., A. Angiolillo., F. Pilla., A. Sanchez, and J. M. Folch. 2003. Characterization and genotyping of the Caprine k-casein variants. Journal of Dairy Science, 86: 2715-2720.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 9, No. 2, Summer 2017, p. 229-239

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۲۳۹-۲۲۹

Detection of Polymorphism of Kappa Casein Gene in Iranian Khalkhali Goats

V. Karimi[1]- N. Hedayet Evrigh*[2]- R. Seyed Sharifi[2]– S. Nikbin[2] – Y. Zahedi[3]

Received: 03-04-2016
Accepted: 07-09-2016

Introduction In compare with other dairy animal, the most important components of goat milk are protein and fat. Due to association between milk proteins and economic traits, there are a lot of studies about genetic structure of milk proteins. Nowadays, the effect of genetic polymorphisms in goats and other species and association with production traits and health widely was investigated. One of the most important topics for the genetic characterization of dairy breeds is investigation of the casein genes. The goat casein genes including CNS1S1, CSN2, CSN1S2 and CSN3 are clustered on chromosome 6. The Ks1-casein protein encoded by theCSN1S1 gene and known as candidate gene. The funding of different studies indicates the effect of ks1-casein gene on milk traits in goat. Khalkhali goat is one of the native dairy goats in Iran that is distributed in North West at Ardabil province. Due to less economically viable, the population of this breed have a declining trend. Therefore consider and attention to this breed is very important. K-casein gene is a useful genetic marker to improve animal breeding programs. The polymorphisms of k-casein gene have significant effect on milk composition and production. To the best of our knowledge, no study has yet considered the about casein gene in Khalkhali goats. This study aimed to assess the variation and polymorphisms at CSN3 loci on Khalkhali goats.

Materials and Methods In this study for analyzing of polymorphisms in Kappa casein gene, 100 blood samples were collected from Khalkhali goats. Genomic DNA was extracted using DNA isolation kit for mammalian blood and the exon 4 of Kappa casein gene amplified using specific primers including: Forward primer F: 5'-GGT ATC CTA GTT ATG GAC TCA AT-3' and revers primer R:5'-GTT GAA GTA ACT TGG GCT GTG T -3'. Genotyping were determined using PCR-SSCP and were sequenced through detection of different pattern. The sequences were analyzed using bioinformatics software's. Estimates of evolutionary divergence between the sequences were conducted using the maximum composite likelihood method by using MEGA version 6.10 software. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method by using the same software. Haplotype analysis and the network analysis of haplotypes was constructed using DnaSp 5.10 and Network 4.613 respectively.

Results and Discussion The results of sequencing lead to identification of one polymorphic site in kappa casein gene sequences, that nucleotide C substituted by T in exon 4 of kappa casein gene which caused changing CCT codon to TCT, subsequently, based on IUPAC standard genetic code lead to conversion of Proline with Serine amino acid. Genetic diversity of Khalkhali goat was 0.524 which evidences intermediate genetic diversity in this breed. Comparison between species identified 41 mutations that cause 29 haplotype with 0.833 haplotype diversity. Nucleotide diversity and average nucleotide differences (K) among species were 0.04469 and 11.75436 respectively. The analyzing of 129 sequences of farm animal showed that the biggest haplotype is belong to Hap 1 and Hap 2 with 35 and 36 frequency respectively in capra hircus and Khalkhali goat population. Haplotype diversity, haplotype diversity variance, nucleotide diversity in each loci, , average of the number of nucleotide diversity (k) and tajima D were 0.833, 0.0004, 0.0447, 11.7544 and 1.5899 respectively. Tajima D was non-significant at $p>0.1$ that could be due to use of less samples in this analysis.

Genetic differentiate (Fst) and Genetic distance (DXY) between farm animal based on CSN3 gene were analyzed and the most genetic differentiate were observed between sheep and buffalo and also we estimated less and negative genetic differentiate between Khalkhali goat and capra hircus. That could be because of allele frequencies distribution in marker loci is not normal.

Conclusion Results illustrated in this study could be useful in characterization of specific dairy products linked to the Khalkhali breed, which are certainly a suitable tool to conserve local breeds and biodiversity. based

1- MSc. Student of Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, Iran,
2- Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, Iran,
3- Assistant Professor of Food Science and Technology Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardebil, Iran.
(*-Corresponding Author Email: nhedayat@uma.ac.ir)

on mutation identified in k-casein gene and this substation caused changing in Amino acids and based on reports about this gene as good marker genetics in animal breeding programs, recommended that association of this mutation with milk traits would be investigated and if that is significant should be used in Khalkhali goat breeding program. These results could be preferred in future planning of breeding programs and selection schemes for enhancing economic traits.

Keywords: Haplotype, Kappa casein, Nucleotide diversity, Sequencing, Single nucleotide polymorphism.