نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۲، شماره ۲، سال ۱۳۸۹، ص. ۱۶۹-۱۶۳

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 2, No. 2, 2010, p. 163-169

بررسی وفور ژنوتیپی جایگاه های ژنی کالپاستاتین، کالپین و بتالاکتوگلوبولین در گوسفندان نژاد کردی خراسان شمالی

محمد رضا نصیری[۱]- رضا ولی زاده[۲] - مجتبی طهمورث پور[۳]- علی جوادمنش[۴] - صاحب فروتنی[۵]

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۴
تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۲۵

چکیده

در این آزمایش ژن های کاندیدای کالپاستاتین، کالپین و بتالاکتوگلوبولین که در صفات مهم اقتصادی نظیر تولید شیر، کیفیت و کمیت گوشت و صفات رشد نقش دارند در گوسفند کردی بررسی شد. از تعداد ۱۰۰ گوسفند ایستگاه اصلاح نژاد گوسفند کردی واقع در شیروان بطور تصادفی خونگیری بعمل آمد. استخراج DNA از خون و واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) جهت تکثیر ناحیه چند شکل ژن های کالپاستاتین،کالپین و بتا لاکتوگلوبولین انجام گرفت. واکنش های هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژنهای کالپاستاتین و بتا لاکتوگلوبولین بترتیب بوسیله آنزیمهای محدودگر *Nco*I و *Rsa*I انجام گردید. فراوانی آللهای M و N ژن کالپاستاتین در این نژاد بترتیب ۰/۸۸ و ۰/۱۲ و برای آللهای A و B ژن بتا لاکتوگلوبولین بترتیب ۰/۵۱ و ۰/۴۹ بدست آمد. برای بررسی چند شکلی های تک نوکلئوتیدی ژن کالپین از روش SSCP استفاده شد و فراوانی آللهای a و b به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۰۴ بود. آزمون χ^2 تعادل هاردی – واینبرگ را برای هر سه جایگاه ژنی کالپاستاتین و بتالاکتوگلوبولین و کالپین در جمعیت مورد مطالعه نشان داد. متوسط هتروزیگوسیتی برای جایگاه های ژنی کالپاستاتین، کالپین و بتا لاکتوگلوبولین بترتیب ۰/۲۱، ۰/۰۸ و ۰/۵۰ به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: گوسفند کردی، کالپاستاتین، کالپین، بتا لاکتوگلوبولین، چند شکلی

مقدمه

صفات کمی صفاتی هستند که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند و هر یک از این ژنها تأثیر جزئی بر روی صفات کمی دارند. برخی ژن های کوچک اثرات بزرگی بر تغییرات ژنتیکی دارند که به آنها ژنهای عمده گفته می‌شود. این ژنها می‌توانند ارتباط نزدیکی با مارکرهای ژنتیکی داشته باشند، چون قادر هستند به صورت یک واحد با هم منتقل شوند. از جمله این ژنها می‌توان به کالپاستاتین و کالپین در ارتباط با رشد و کیفیت لاشه و بتا لاکتوگلوبولین مرتبط با صفات تولیدشیر اشاره کرد.

د در سالهای اخیر توجه به افزایش و بهبود کیفیت گوشت بیشتر شده است، بطوریکه گزارشات متعددی وجود ارتباط بین سطح کالپاستاتین در عضله و تردی گوشت را تایید می کند (۸). بسیاری ازتحقیقات رابطه بین چند شکلی ژن کالپاستاتین و صفات کیفیت لاشه را نشان داده اند، در عین حال در برخی از گزارشات رابطه بین چند شکلی این ژن و صفات رشد در گوسفند و گاو نیز مورد بررسی قرار گرفته است طهمورث پور و همکاران (۳) بهترین ژنوتیپ برای افزایش وزن را در گوسفند AC معرفی کردند. پالمر و همکاران گزارش کردند که ژنوتیپ AC بمیزان ۱۸٪ (۱۲۳ گرم در روز) افزایش وزن بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA در گوسفند آمیخته دورست و کوپ ورث دارد(۲۷). بنابراین وجود پلی مورفیسم در ژن کالپاستاتین در گوسفند می‌تواند بعنوان یک مارکر تولیدی و مرتبط با افزایش وزن و کیفیت گوشت مورد مطالعه قرار گیرد. اخیرا گارسیا و همکاران (۱۸) ارتباط معنی داری را بین چندشکلی کالپاستاتین و صفات تولید مثلی و طول عمر اقتصادی درگاوهای شیری گزارش کردند (۱۷). موریس و همکاران (۲۵) و کاس و همکاران (۹) ارتباط بین ژنوتیپ های کالپاستاتین وکالپین با صفات لاشه را در برخی نژادهای گاو گزارش کردند (۲۴ و ۸). ژن کالپاستاتین، روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند قرار دارد (۲۸).

یکی دیگر از ژنهای مرتبط با صفات رشد و کیفیت لاشه ژن کالپین می‌باشد. سیستم کالپین به طور کلی شامل سه ملکول است:

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانشیار، استاد، دانشیار، مربی و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: nassiryr@gmail.com)

دو پروتئاز وابسته به کلسیم به نام های m-کالپین و μ-کالپین و یک پلی پپتیدی به نام کالپاستاتین که فعالیت پروتئاز های ذکر شده را مهار می‌کند. m-کالپین و μ-کالپین و کالپاستاتین در تمام بافت‌ها وجود دارند، اما نسبت این سه در بافت‌ها و سلول‌های مختلف بسیار متفاوت است (۱۹). به طور کلی کلیه عضلات اسکلتی حیوانات اهلی محتوی تقریباً مقدار برابر m-کالپین و μ-کالپین هستند و فعالیت کالپاستاتین بیشتر از فعالیت هر دو کالپین با هم است (۳۴). مطالعات اخیر به اتفاق تایید می‌کنند که پروتئاز کالپین یکی از مهمترین فاکتورها در بهبود تردی و کیفیت گوشت است، که این کار را بیشتر با تجزیه پروتئین های تیتین و توبولین انجام می‌دهد. تاکنون تحقیقات بسیاری بر روی توالی زیر واحد تنظیمی ژن کالپینII انجام گرفته است، که همگی پلی مورف بودن این ناحیه را تایید می کنند. علاوه براین، مطالعات دیگری نیز برای بررسی اثر این چندشکلی ها بر کیفیت گوشت بعد از کشتار و صفات رشد انجام شده است. چانگ و همکاران (۱۹۹۹) قسمت‌های از ژن کالپین ۳ از ژنوم گوسفند را تکثیر کردندو جهش نقطه‌ای این ناحیه را با روش PCR-SSCP مورد بررسی قرار دادند (۱۰). علاوه بر این چانگ و همکاران (۱۳) دریافتند که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر چربی اطراف لگن، کلیه و قلب اختلاف معنی داری وجود دارد. چانگ و همکاران (۱۱) همین ناحیه را در گاوهای آنگوس تکثیر و ارتباط آن را با تردی گوشت و خصوصیات لاشه مورد بررسی قرار دادند. زهنگ و همکاران (۳۵) پلی مورفیسم آللی زیر واحد تنظیمی کالپین را در گاو با روش PCR-RFLP و بوسیله آنزیم *Hha*I گزارش دادند. در این مطالعه هضم قطعه bp ۱۸۰۰ سه ژنوتیپ AA، AB وBB را مشخص کرد.

چند شکلی‌های موجود در پروتئین‌های شیر نیز می‌تواند بعنوان نشانگر ژنتیکی بکار برده شود. بتالاکتوگلوبولین پروتئین اصلی آب‌پنیر شیر نشخوارکنندگان است. تحقیقات نشان داده که این پروتئین در بسیاری از نژادها دارای چندشکلی است. آلل B ژن بتالاکتوگلوبولین با تولید بالای شیر در ارتباط است (۵) و در عوض آلل A راندمان تولید پنیر را افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد که ژنوتیپ BB بتالاکتوگلوبولین با تولید بالای شیر و ژنوتیپ‌های AA و AB با میزان بالای کازئین و پروتئین در شیر همراه هستند (۱۸). آلل A و B در اسیدآمینه شماره ۲۰ با همدیگر اختلاف دارند (۲۰). این ویژگی در نتیجه جانشینی ساده یک باز در ژن بتالاکتوگلوبولین می‌باشد. کومار و همکاران (۲۲) به بررسی چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبین در بزهای هندی و اثر آن بر تولید شیر پرداختند. محمدی و همکاران (۴) چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین را در چند نژاد از گوسفندان روسیه و ایران مورد مطالعه قرار دادند. همچنین الماسی و همکاران (۱۶) با مطالعه چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبین با استفاده از RFLP در سه نژاد گوسفند بومی ترکی، سه ژنوتیپ AA، AB و BB را شناسایی کردند.

هدف از این آزمایش بررسی چند شکلی ژنتیکی ژن‌های کاندیدای کالپاستاتین، بتالاکتوگلوبولین و کالپین که کنترل کننده صفات مهم اقتصادی نظیر تولید شیر، کیفیت و کمیت گوشت می‌باشند، در گوسفند کردی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری و استخراج DNA

از ۱۰۰ گوسفند کردی موجود در ایستگاه تحقیقاتی شیروان خون گیری شد. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرو لیتر نمونه ها به روش گوانیدین تیو سینات-سیلیکاژن با کیت دیاتوم محصول شرکت Biokom (مسکو) صورت گرفت (۶). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش طیف سنجی و روش مقایسه ای (ژل آگارز) تعیین شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[۱] با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *کالپاستاتین* جهت تکثیر قطعه ۶۲۲ جفت بازی از اگزون وقسمتی از اینترون۱ ناحیه L ژن *کالپاستاتین* (Gene Bank accession No. AY834765) توسط دستگاه ترموسایکلر (T-Personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد.

Ovine 1C: 5`TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG 3`

Ovine 1D: 5`GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC3`

قطعه ۱۹۰ جفت بازی ژن کالپین (Gene Bank accession No. J05065) با آغازگرهای طراحی شده زیر در واکنش واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر شدند.

CAPN456F 5'-AACATTCTCAACAAAGTGGTG-3'

CAPN456R 5'-ACATCCATTACAGCCACCAT- 3'

قطعه ۳۰۱ جفت بازی از اگزون II ژن بتالاکتوگلوبولین (Gene Bank accession No. X12817)؛ توسط آغازگرهای طراحی شده زیر زیر در واکنش با واکنش زنجیره ای پلیمراز تکثیر شدند.

BLG1 (5'- CTCTTTGGGTTCAGTGTGAGTCTGG –3')

BLG2 (5'- CACCATTTCTGCAGCAGGATCTC – 3')

طراحی آغازگرهای فوق با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5.0 و با توجه به توالی تعیین شده ژن که در بانک ژنی ثبت شده است، انجام گرفت.

۱- polymerase chain reaction

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر نواحی چند شکل جایگاه ژنی کالپاستاتین،کالپین و بتا لاکتوگلوبولین با ۳۵ چرخه (۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه برای واسرشته کردن، ۶۲°C به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها و ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه برای امتداد زنجیره DNA) در دستگاه ترموسایکلر مدل T-personal شرکت Biometra انجام گرفت. این واکنش در حجم ۲۰ میکرولیتر با محتویات (۲ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۲/۵ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرو مول مخلوط نوکلئوتیدها، ۴ میکرولیتر مخلوط آغازگرها (۱۰ پیکومول از هر آغازگر)، ۱ واحد از آنزیم Taq پلیمراز، ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت ۵۰ نانوگرم (باقیمانده تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر) صورت گرفت.

محصولات PCR برای تعیین اختصاصیت و راندمان توسط ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش هضم آنزیمی

هضم آنزیمی ژن کالپاستاتین: جهت تشخیص چند شکلی در ژن کالپاستاتین از آنزیم *NcoI* شرکت Sibenzyme استفاده گردید. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر و در دمای ۳۷°C و بمدت ۳ ساعت انجام گرفت. واکنش گرها شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. الگوی هضمی ژنوتیپ‌های مختلف به این صورت است که ژنوتیپ MM یک قطعه ۶۲۲ جفت بازی، MN دارای سه قطعه ۶۲۲، ۳۷۴ و ۲۴۸ جفت باز و ژنوتیپ NN دارای قطعات ۳۷۴ و ۲۴۸ جفت بازی بود.

هضم آنزیمی ژن بتالاکتوگلوبولین: برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن بتالاکتوگلوبولین، برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودگر *RsaI* شرکت Sibenzyme به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷°C انجام گرفت که در تیوب‌های واکنش مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۴ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. الگوی هضمی شامل ژنوتیپ AA دارای قطعات ۱۷۵، ۶۶ و۶۰ جفت باز،AB دارای قطعات ۲۴۱، ۱۷۵، ۶۶ و ۶۰ جفت بازی و ژنوتیپ BB دارای قطعات ۲۴۱ و ۶۶ بود.

پس از هضم آنزیمی، محصولات هضم با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و اکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و نیترات نقره مشاهده و تائید شدند.

SSCP ژن کالپین

برای آنالیز محصولات PCR توسط روش (SSCP) [1] از ژل اکریل سرد استفاده شد. به این منظور دو میکرو لیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر SSCP dye (شامل ۱۰ میکرو لیتر بروموفنل ۱۰ درصد + ۲ میکرو لیتر EDTA نیم مولار + ۱۹۰ میکرو لیتر گلیسرول + ۸۰۰ میکرو لیتر فرم آمید) مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ^{0}C ۹۵ در دستگاه PCR قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به سرعت و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل به یکدیگر ممانعت به عمل آید. نمونه ها در ژل اکریل آمید سرد ۸ درصد با ولتاژ ۳۲۰ و مدت زمان ۱۵۰ دقیقه جهت مشاهده تفاوت های تک نوکلوئیدی الکتروفورز گردیدند. رنگ آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره صورت گرفت.

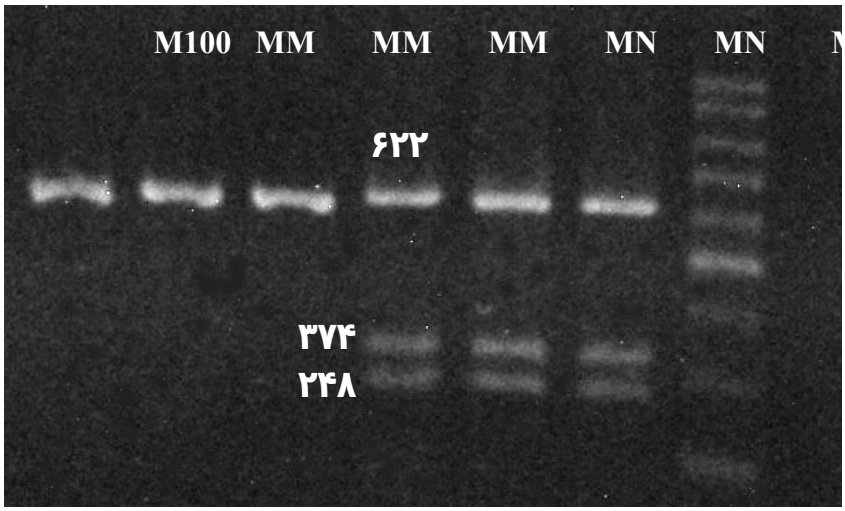
در انتها فراوانی آللی، ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار توسط نرم افزار Pop Gene32 نسخه ۱/۳۱ محاسبه گردید (۲۶).

نتایج و بحث

کالپاستاتین: قطعه ۶۲۲ جفت بازی تکثیر شده از جایگاه ژنی CASTI توسط آنزیم محدودالاثر *NcoI* هضم شده و دو ژنوتیپ MM و MN شناسایی شدند (شکل ۱). در بررسی مولکولی ژن کالپاستاتین، هیچگونه ژنوتیپ NN مشاهده نگردید. از طرفی بیشترین ژنوتیپ مشاهده شده مربوط به MM و با فراوانی ۰/۷۶ بود. در نتیجه بیشترین فراوانی مشاهده شده مربوط به آلل M به میزان ۰/۸۸ بود (جدول ۱). چند شکلی این جایگاه ژنی با استفاده از روش RFLP توسط محققان دیگری هم مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۲، ۲۴ و ۲۸). پالمر و همکاران نتایج مشابهی را در گوسفند نژاد دورست گزارش کردند. این محققین فراوانی آلل‌های M و N را بترتیب ۰/۷۷ و ۰/۲۳ گزارش نمودند (۲۸). اسلمی نژاد و همکاران(۱) فراوانی آللی M و N را در گوسفند قره گل به ترتیب ۰/۷۹ و ۰/۲۱ گزارش کردند. چانگ و همکاران(۱۰) چند شکلی ژنتیکی کالپاستاتین را با استفاده از روش SSCP بررسی کردند، آنها دو آلل a و b را به ترتیب با فراوانی ۰/۲۹ و ۰/۷۱ مشاهده کردند. همچنین شنکل و همکاران(۳۱) یک SNP (جایگزینی G به C) را در ژن کالپاستاتین گاوهای گوشتی شناسایی و فراوانی آلل C و G را به ترتیب ۰/۶۳ و ۰/۲۷ گزارش کردند.

در بررسی سطح هتروزیگوسیتی ژن کالپاستاتین، سطح پایینی در نژاد کردی مشاهده شد. بطوریکه هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار نی و متوسط هتروزیگوسیتی بترتیب ۰/۲۴، ۰/۲۱ و ۰/۲۱ بود (جدول ۲)، که تنوع پایین این جایگاه را در گوسفند کردی نشان می‌دهد.

[1]- single strand conformation polymorphism



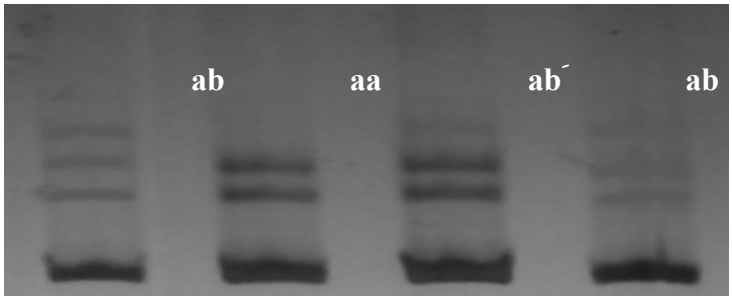
(شکل ۱)- محصولات هضمی ژن کالپاستاتین. نشانگر وزنی مولکولی مورد استفاده M100 می باشد

ژن کالپین: محصولات واکنش PCR با روش SSCP تعیین ژنوتیپ شد. در این جایگاه ژنی دو آلل a و b و دو ژنوتیپ aa و abشناسایی شدند، ولی ژنوتیپ bb یافت نشد(شکل ۲). ژنوتیپ aa بیشترین فراوانی (۰/۹۲) و ژنوتیپ هتروزیگوت ab فراوانی پایینی (۰/۰۸) را در گله مورد بررسی نشان داد. ژنوتیپ bb در گله مورد آزمایش یافت نشدکه این می‌تواند به دلیل کم بودن نمونه ها و یا فراوانی پایین آلل b باشد. بیشترین فراوانی آللی به میزان ۰/۹۶ برای آلل a بدست آمد. اسلمی نژاد و همکاران(۱) با مطالعه این جایگاه ژنی در گوسفند نژاد قره گل با استفاده از SSCP، فراوانی آللی a و b را به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۱۵ گزارش کردند. این محققان نتوانستند ژنوتیپ bb را در نژاد مورد بررسی مشاهده کنند که با نتایج ما مطابقت دارد. چانگ و همکاران (۱۰) با مطالعه همین جایگاه در گوسفند به ترتیب برای آلل‌های a و b فراوانی های ۰/۳۱ و ۶۹ /۰ را گزارش کردند. همچنین چانگ و همکاران (۱۱) نیز چند شکلی آللی ژن زیر واحد تنظیمی کالپین II را با استفاده از SSCP در گوسفند polypay مورد بررسی قرار دادند. آنها فراوانی آلل a و b را به ترتیب ۰/۸۹ و ۰/۱۱ گزارش کردند. این نتایج برخلاف نتایج به دست آمده توسط طهمورث پور (۲۰۰۵) در گوسفند بلوچی است، که فراوانی دو آلل a و b را به ترتیب ۰/۵۶ و ۰/۴۴ گزارش کرد. در مطالعه بر روی گوسفند بلوچی ژنوتیپ bb یافت نشد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳). چانگ و همکاران (۱۰) طی تحقیقی قسمتهایی از ژن کالپین ۳ (CAPN31011 و CAPN31112) ژنوم گوسفند را تکثیر و جهش نقطه ای این ناحیه را با روش PCR-SSCP مورد بررسی قرار داد. فراوانیهای آللی A و B به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۵۳ برای CAPN31011 و ۰/۳۱ و ۰/۶۹ برای ژن CAPN31112 گزارش شدند. زهنگ و همکاران (۳۵) پلی مورفیسم آللی زیر واحد تنظیمی کالپین را با روش PCR-RFLP و بوسیله آنزیم *Hha*I در نژادهای مختلف گاو بررسی کردند وسه ژنوتیپ AA، AB وBB را به ترتیب با فراوانی ژنوتیپی ۰/۳۵، ۲۵/ و ۰/۴۰ گزارش کردند. آلل B در نژادهای هرفورد، آنگوس ووگی یو کمترین فراوانی(۰/۲۶ تا ۰/۰۵) و در نژادهای براهمن، براون سوئیس، جرسی و لیموزین بالاترین فراوانی را داشت (۰/۹۰ تا ۰/۹۴) (۳۵). اخیرا سروینی و همکاران (۹) SNPهای مختلف ژن کالپین را درگاو Nellore مورد مطالعه قرار دادند. آنها SNP های مختلفی را در این ژن شناسایی کردند که فقط دوتا از آنها (در موقعیت ۳۱۶ و ۵۳۰) باعث تغییر در توالی اسیدهای آمینه شدند.

هتروزیگوسیتی مشاهده شده ، هتروزایگوسیتی مورد انتظار، هتروزیگوسیتی مورد انتظار نی و متوسط هتروزیگوسیتی مربوط به ژن زیر واحدتنظیمی کالپین II در گله مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. سطح هتروزیگوسیتی یکی از شاخص های معرفی میزان تنوع ژنتیکی در یک جمعیت به حساب می‌آید. متوسط هتروزیگوتی، هتروزیگوتی مورد انتظار نی و هترزیگوتی مشاهده شده بترتیب به میزان ۰/۰۸، ۰۷۹/ و۰/۰۷۹مشاهده شد. همانطور که ملاحظه می‌شود در ژن زیر واحد تنظیمی کالپین II سطح هتروزایگوسیتی پایینی در گله مورد مطالعه بدست آمد.

بتا لاکتوگلوبولین: اطلاعات حاصل از تعیین توالی نشان داده که یک محل برشی آنزیم برای *RsaI* در آلل A وجود دارد که در آلل B موجود نیست. در محل اسیدآمینه شماره ۲۰ در آلل A تیروزین (Tyr) قرار دارد که با کدون TAC کد می‌شود در صورتیکه در آلل B در همان ناحیه کدون CAC قرار گرفته که مسئول کدکردن اسیدآمینه هیستیدین (His) است و می‌تواند توسط تکنیک RFLP و با استفاده از آنزیم *RsaI* تشخیص داده شود. نتایج حاصل در جداول ۱ و ۲

آورده شده است.



(شکل ۲)- ژنوتیپ های ab،aa بر اساس قطعه ۱۹۰ جفت بازی بر روی ژل ۸٪ آکریل آمید

(جدول۱)- فراوانی ژنوتیپ‌ها، فراوانی آلل‌ها و آزمون χ^2 و برای ژنهای کالپاستاتین،کالپین و بتا لاکتوگلوبولین در نژادکردی

جایگاه ژنی	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		χ^2
	۱*	۲	۳	۴**	۵	
کالپاستاتین	۰/۷۶	۰/۲۴	۰/۰	۰/۸۸	۰/۱۲	۱/۷۷۴۳
کالپین	۰/۹۲	۰/۰۸	۰/۰	۰/۹۶	۰/۰۴	۰/۱۳۳۶
بتالاکتوگلوبولین	۰/۲۴	۰/۵۴	۰/۲۲	۰/۵۱	۰/۴۹	۰/۵۶۸۶

*- اعداد ۱، ۲ و ۳ بترتیب ژنوتیپ‌های MM، MN و NN در ژن کالپاستاتین، AA، AB و BB در ژن بتالاکتوگلوبولین و aa، ab و bb در ژن کالپین هستند.

**- اعداد ۴ و ۵ بترتیب نماینده آللهای M و N در ژن کالپاستاتین، A و B در ژن بتالاکتوگلوبولین و a و b در ژن کالپین می‌باشند.

(جدول ۲)- میزان هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، هتروزیگوسیتی ژنی ، متوسط هتروزیگوسیتی جایگاه‌های ژنی کالپاستاتین،کالپین و بتا لاکتوگلوبولین در گوسفند کردی

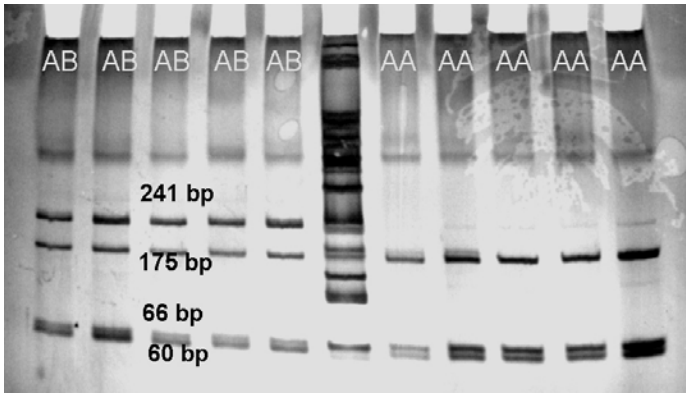
جایگاه ژنی	هتروزیگوستی مشاهده شده	هتروزیگوستی مورد انتظار	هتروزیگوستی مورد انتظار نی	متوسط هتروزیگوستی
کالپاستاتین	۰/۲۴	۰/۲۱۲۳	۰/۲۱۱۲	۰/۲۱۱۲
کالپین	۰/۰۸۰۲۴	۰/۰۷۹۴	۰/۰۷۹	۰/۰۷۹
بتالاکتوگلوبولین	۰/۵۴	۰/۵۰۲۳	۰/۴۹۹۸	۰/۴۹۹۸

فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب۰/۲۴، ۰/۵۴ و ۰/۲۲ محاسبه شد. بیشترین فراوانی برای آلل A به میزان ۰/۵۱ بدست آمده در صورتیکه آلل B با فراوانی ۰/۴۹ مشاهده گردید. با توجه به رابطه بین سطح بالای فرآوری پنیر از شیر و ژنوتیپ‌های دارای آلل A، سطح بالای این آلل در این نژاد، توانایی بالای تولید پنیر از شیر این نژاد را نشان می‌دهد. تحقیقات بسیاری نتایج مشابهی را گزارش کردند، بطوریکه ولتکا و همکاران نیز نتیجه مشابهی را بدست آوردند (۳۳). ریکو و همکاران نیز فراوانی ۰/۵۸ و ۰/۴۱ را بترتیب برای آللهای A و B در نژاد مرینوس و فراوانی ۰/۵۳ و ۰/۴۷ را در نژاد ماسز گزارش کردند (۳۰). همچنین دی استاسیو و همکاران نیز فراوانی ۰/۳۵ و ۰/۶۵ را برای آلل‌های A و B گزارش کردند (۱۵). اسلمی نژاد و همکاران (۱) فراوانی ۰/۸۹ و ۰/۱۱ را به ترتیب برای آلل‌های A و B در نژاد قره گل گزارش کردند. الماسی و همکاران فراوانی ژنی A و B را به ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۲۲ در نژاد گوسفند Kıvırcık ، ۰/۷۷ و ۰/۲۳ در نژاد گوسفند Gökçead و ۰/۹۸ و ۰/۲ در نژاد Sakız گزارش کردند (۱۶). راچاجانی و همکاران (۲۹) فراوانی آللی A و B را در نژاد گاو Sahiwal به ترتیب ۰/۱۷ و ۰/۸۳ و در نژاد گاو Tharparkar به ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۶۱ گزارش کردند. برای این جایگاه ژنی نیز تنوع ژنتیکی متوسطی مشاهده گردید. متوسط هتروزیگوسیتی ۰/۵۰ می‌تواند مربوط به بسته بودن

گله باشد. الیاسی و همکاران (۲) با بررسی سطح هتروزیگوسیتی این ژن در نژادهای آرخامرینوس، ماکویی، مغانی و افشاری واقع در آذربایجان شرقی ایران، سطوح مشابهی را بدست آوردند.

تحقیق حاضر وجود چند شکلی ژنتیکی برای ژن‌های کالپاستاتین، کالپین و بتالاکتوگلوبولین را بخوبی در نژاد گوسفند کردی ایران نشان داد. می‌توان از وجود این چند شکلی‌ها در جهت بررسی ارتباط بین چند شکلی ژنی با صفات تولیدی از قبیل تولید شیر، گوشت و کیفیت گوشت بعنوان مارکرهای ژنتیکی استفاده کرد. برقراری تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برای ژن‌های کالپاستاتین، کالپین و بتالاکتوگلوبولین نشان می‌دهد که در این جمعیت به نفع یا ضرر ژنوتیپ خاصی انتخاب صورت نگرفته است.

پایین بودن سطح هتروزیگوسیتی برای سه جایگاه ژنی در گوسفندان ایستگاه کردی نشان می‌دهد که احتمالا به دلیل سیستم بسته پرورش در این ایستگاه و عدم استفاده از قوچ‌های اصلاحی از سایر گله‌ها، سطح همخونی افزایش یافته است و بنابراین کاهش هتروزیگوسیتی را مشاهده می‌کنیم. بنابراین توصیه می‌گردد که جهت افزایش هتروزیگوسیتی و سطح تنوع ژنتیکی، نسبت به وارد کردن خون جدید (مثلا وارد کردن قوچ) اقدام گردد.



(شکل۳)- الگوهای هضمی مربوط به ژن بتالاکتوگلوبولین. مارکر مولکولی مورد استفاده pUC/*MspI* می‌باشد

منابع

۱- اسلمی نژاد، ع. ا.، م. ر. نصیری، ف. افتخاری شاهرودی، ر. ولی زاده، ع. جوادمنش، ا. نوروزی، ع. سامعی و ح. قیاسی. ۱۳۸۵. بررسی چندشکلی ژنهای کاندیدا در گوسفند قره گل. مجله علمی- پژوهشی علوم و صنایع کشاورزی.۲۰ (۴)

۲- الیاسی زرین قبایی، ق. ۱۳۸۱. بررسی چند شکلی ژن بتاگلوبولین در گوسفند بروش PCR-RFLP. پایان نامه کاشناسی ارشد. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۳- طهمورث پور، مجتبی. ۱۳۸۴. بررسی چند شکلی ژن کالپین و کالپاستاتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. پایان نامه دکتری. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- محمدی، ا.، م. ر. نصیری، ق. الیاسی، ج. شجاع و ر. بهمرام. ۱۳۸۵. مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی جایگاه ژنتیکی بتالاکتوگلوبین و مقایسه آن در برخی نژادهای گوسفند ایران و روسیه. اولین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه.

5- Ali, S., M. McGlenaghan, J. P. Simons, and A. J. Clark. 1990. Characterization of the alleles encoding ovine Beta-Lactoglobulin A and B. J. of Gene. 91: 202-207.

6- Bolla, P., A. Caroli, A. Mezzelani, R. Rizzi, G. Pagnacco, A. Fraghi, and S. Casu. 1989. Milk protein markers and production in sheep. Anim. Gen., 20: (Suppl. 1) - 78.

7- 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. J. Clinical Microbiology. 28: 495-503.

8- Bor-Rung, R., H. M. Howard, and N. E. Forsberg. 1991. Effects of age and castration on activities of calpains and calpastatin in sheep skeletal muscle. J. Anim. Sci. 69:1919-1924.

9- Casas, E., S. N. White, T. L. Wheeler, S. D. Shackelford, M. Koohmaraie, D. G. Riley, C. C. Chase Jr, D. D. Johnson and T. P. L. Smith. 2006. Effects of calpastatin and μ-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. J. Anim. Sci. 84: 520-525.

10- Cervini, M., J. R. E. Matheucci, F. Henrique-Silva, N. Mortari. 2006. Allelic frequencies of two SNPs in

the CAPN1 gene of Nellore cattle (Bos indicus). Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Brazil.
11- Chung, H. Y., M. E. Davis and H. C. Hines. 1999. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. Animal Genetics 30: 66
12- Chung, H.Y., M. Davis, and H., Hine. 2000. Relationship of genetic variants in the ovine calpain regulatory gene with growth. J. Anim. Sci. vol. 28. supplement2.
13- Chung, H. Y., M. E. Davis and H. C. Hines. 2001. Genetic variants detected by PCR-RFLPin intron 6 of the bovine calpastatin gen. Animal Genetics, 32: 40
14- Chung, H. Y., M. S. Davis and H. C. Hines. 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.
15- Davis, M.E., H.Y. Chung, and H.C. Hines. Effect of the calpain system on the growth of Angus bulls. 2000. J. Anim. Sci. vol. 30, pp: 1050-1058.
16- Di Stasio, I., B. Portolano, M. Todaro, P. Fiandra, P. Giaccone, R. Finocchiaro, and M.L Alicata. 1997. Effect of ovine β-lactoglobulin phenotype on cheese yield and composition. In milk protein polymorphism. Brussels, Belgium: International Dairy Federation. pp. 324-327.
17- Elmaci C., Y. Oner and M. S. Balcioglu. 2006. Genetic Polymorphism of β-Lactoglobulin Gene in Native Turkish Sheep Breeds. Biochemical Genetics. 6: 1573-4927
18- Garcia, M. D., J. J. Michal, C. T. Gaskins J. J. Reeves, T. L., Ott, Y., Liu and Z., Jiang. 2006. Significant association of the calpastatin genewith fertility and longevity in dairy cattle. Animal Genetics, 37, 293–307
19- Garzon, A. I. and J. Martinez. 1992. Beta-Lactoglobulin in Manchega sheep breed: Relationship with milk technological index in handcraft manufacture of manchego cheese. XXIII. Int. Conf. Anim. Genet. Interlaken.
20- Goll, D. E., V. F. Thompson, R. G. Taylor, and T. Zalewaska. 1992. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin?, Bioassays. 14: 549–556.
21- Kolde, H. J., and G. Braunitzer. 1983. The primary structure of ovine Beta-Lactoglobulin. Milckwissenschaft. Vol. 38: 70-72.
22- Koohmaraie, M., The role of the Ca++ dependent protease (calpains) in postmortom proteolysis and meat tenderness. 1992. Biochimine, vol. 74, pp: 239
23- Kumar, A., K. R. Pramod and R. Roy. 2006. Polymorphism of β-lactoglobulin gene in Indian goats and its effect on milk yield. Journal of Applied Genetics 47: 49 – 53
24- Montgomery, G. W., M. G. Susan, G. H. Davis, and K. P. McNatty. 2001. Genes controlling ovulation rate in sheep. Reproduction.121: 843-52.
25- Morris, C. A., N. G. Cullen, S. M. Hickey, P. M. Dobbie, B. A. Veenvliet, T. R. Manley, W. S. Pitchford, Z. A. Kruk, C. D. K. Bottema and T. Wilson. 2006. Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked M. longissimus dorsi steaks from Jersey Limousin, Angusand Hereford-cross cattle. Animal Genetics, 37: 411–414
26- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of the restriction endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science. USA. 76: 5269-5273.
27- Palmer, B. R., J. G. H. Hickford and R. Bickerstaffe. 1997. A candidate gene approach to animal quality traits. Proc. of the New Zealand Society of Animal Production. 57: 294-296.
28- Palmer, B. R., J. D. Morton, N. Roberts, M. A. Ilian, and R. Bickerstaffe. 1999. Marker –assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. Proc. of the New Zealand Society of Anim. Prod. 59: 266-268.
29- Rachagani, S., I. D. Gupta, N. Gupta, and S. C. Gupta. 2006. Genotyping of β-Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. BMC Genet. 2006; 7: 31
30- Recio, I., A. Fernandez-Fournier, P.J. Martin-Alvarez, and M. Ramos. 1997. Beta-lactoglobulin polymorphism in ovine breeds: Influence of cheese making properties and milk composition. Lait. 77: 259-265.
31- Schenkel, F. S., S. P. Miller, Z. Jiang, I. B. Mandell, X. Ye, H. Li, and J. W. Wilton. 2006. Association of a single nucleotide polymorphim in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J. Anim. Sci. 84: 291-299.
32- Sensky, P. L., T. Parr, P. Y. Bardsley, and P. Y. Buttery. 2001. Meat tenderization-the role of calpains.

www.bsas.org.uk/meetings/annlproc/Pdf/239.
33- Vlatka, M., J. Feligini, C. I. Lukac-Havranek, and E. Guiseppe. 2002. Genetic polymorphism of β-Lactoglobulin in native sheep from the Island of Pag. Food Technol. Biotechnol. 40: 75-78.
34- Wheeler, T. L. and M. koohmaraei. 1999. The extent of proteolysis is Independent of sarcomer length in lamb longissimus and psoas major. J Anim. Sci. 77: 2444-2451.
35- Zhang, H.Z., and S. K. Denise. 1996. Rapid communication: A novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR_SSCP analysis. J. Anim. Sci. 74-1441.