ارتباط چندشکلی اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین با صفات تولید شیر در گاومیش بومی استان آذربایجان شرقی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP

روناک صالحی[۱]، علی هاشمی[۲*]، مختار غفاری[۳] و قربان الیاسی‌زرین‌قبایی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۹

چکیده

صفات تولید شیر و ترکیبات آن جز صفات کمی و چند ژنی می‌باشند و تحت تأثیر تعداد زیادی ژن قرار دارند. این تحقیق به منظور تعیین چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین و ارتباط آن با صفات تولید شیر در گاومیش بومی استان آذربایجان شرقی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP انجام شد. بدین منظور از تعداد ۱۵۰ رأس گاومیش استان آذربایجان شرقی نمونه‌ی شیر تهیه و استخراج DNA نمونه‌ها از شیر به روش پروناز صورت گرفت. بعد از انجام مراحل استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر یک قطعه ۳۹۲ جفت بازی از اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. برای تعیین چندشکلی نمونه‌ها، الکتروفورز محصولات PCR پس از تک رشته شدن قطعات (روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز) و الکتروفورز روی ژل آکریلامید و رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد. الگوهای ژنوتیپی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب با فراوانی ۸۷/۵، ۱۰/۷۱، ۱/۷۸ مشاهده شد. آنالیز آماری نشان داد بین ژنوتیپ‌ها و صفات تولید شیر، درصد پروتئین، درصد چربی و لاکتوز شیر ارتباط معنی‌دار وجود ندارد. بر اساس نتایج این تحقیق انتخاب براساس چند شکلی ژن آلفالاکتالبومین نمی‌تواند در بهبود ژنتیکی صفات تولید و ترکیبات شیر در گاومیش‌های نژاد آذری مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: ژن، آلفالاکتالبومین، تولید شیر، چندشکلی، گاومیش

مقدمه

شیر و فرآورده‌های لبنی حاصل از آن که مهم‌ترین منابع غذایی مورد استفاده در تغذیه هستند، می‌توانند احتیاجات انرژی، پروتئین و انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی را برآورده سازند (Hecht and Geldermann 1996). در گذشته عمده برنامه‌های اصلاح نژاد دام‌های شیرده بر مبنای آزمون نتاج یا انتخاب نرهای ممتاز بر اساس رکورد تولیدی دختران استوار بوده است. در جمعیت دختران این دام‌های نر نیز رکوردگیری برای صفت تولید شیر صورت می‌گرفته و نهایتاً نرها با ارزش ژنتیکی افزایشی مناسب برای تولید شیر انتخاب می‌گردید. چنین انتخابی به این دلیل انجام می‌شد که تنها صفت تولید شیر ارزش اقتصادی داشت (Farhoomand 2002). امروزه ارزش دام‌های ماده منحصراً به وسیله‌ی تولید شیر تعیین نمی‌شود، بلکه چربی، پروتئین و درآمد ناشی از فروش شیر را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. درصد چربی و پروتئین شیر از نظر ارزش اقتصادی در قیمت‌گذاری شیر مؤثر می‌باشند. علاوه بر این، ترکیبات شیر بر خصوصیات کیفی شیر و فرآورده‌های حاصل از آن و روی ارزش تغذیه‌ای شیر نیز اثر دارد؛ بنابراین، در کنار سایر اهداف اصلاحی، این صفات نیز از اهمیت خاصی برخوردارند.

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲*] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران E-mail: a.hashemi50@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۴] کارشناس ارشد گروه پژوهش علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران

علی‌رغم این که انتخاب فنوتیپی و استفاده از مدل‌های حیوانی، همواره توانسته پیشرفت ژنتیکی مناسبی را در نسل‌های آتی به وجود آورد اما نیاز به روش‌هایی که منجر به کاهش فاصله‌ی نسلی و همچنین افزایش دقت ارزیابی-های ژنتیکی گردد، همواره احساس شده است. یکی از راهکارهای مناسب موجود برای دستیابی به این اهداف، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی می‌باشد که به طور مستقیم و یا غیرمستقیم بر تولید شیر و خصوصیات آن تأثیرگذار می‌باشد. ژن‌های کاندید یکی از جدیدترین محورهای تحقیقاتی برای بهبود خصوصیات شیر تولیدی در دام‌های شیرده می‌باشد که در دهه‌ی اخیر زمینه‌ی بسیاری از تحقیقات ژنتیک مولکولی در اصلاح نژاد گله‌های شیرده را به خود اختصاص داده است (Pirani 2004). آلفالاکتالبومین پروتئین کروی کوچکی با جرم مولکولی حدود ۱۴ کیلودالتون، اسیدی، هیدروفیل و حاوی یون کلسیم است که در شیر تمامی پستانداران وجود دارد (Permyakov and Berliner 2000) ژن آلفالاکتالبومین یک پروتئین آب پنیر شیر می‌باشد؛ که حدود ۳/۵ درصد کل پروتئین شیر و ۱۸ درصد از پروتئین آب پنیر در شیر گاومیش می‌باشد (Kumar et al. 2006). این پروتئین نقش کلیدی در سنتز لاکتوز در غده‌های پستانی بازی می-کند و می‌تواند در مقدار لاکتوز شیر نقش داشته باشد. ژن آلفالاکتالبومین مستقیماً کیفیت و حجم شیر را از طریق سنتز لاکتوز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Amigo et al. 2000)؛ و نقش مهمی در تنظیم حجم شیر بازی می‌کند. آلفا لاکتالبومین به طور خاص در شبکه‌ی آندوپلاسمی زبر از غده‌ی پستانی شیرده همراه با پروتئین دیگر شیر به عنوان یک پیش پروتئین با یک توالی پیش برنده آب‌گریز عمل می‌کند (Mercier and Vilotte 1993). این ژن نقش مهمی در ترشح آب به وزیکول‌های سلول‌های پستانی دارد. این پروتئین یکی از دو جزء کمپلکس آنزیم لاکتوز سنتاز را تشکیل می‌دهد که مرحله‌ی نهایی بیوسنتز لاکتوز را کاتالیز می‌کند. جزء دیگر این سیستم گالاکتوزیل ترانسفراز است که (GT) در سلول‌های ترشحی مختلف در انتقال گروه‌های گالاکتوزیل از UDP-galactose به گلیکوپروتئین‌های حاوی N-acetylglucosamin نقش دارد . در غدد مترشحه‌ی شیری برهمکنش با آلفالاکتالبومین ویژگی گالاکتوزیل ترانسفراز را تغییر داده و تمایل آن برای گلوکز افزایش می‌یابد. Dayal و همکاران در سال ۲۰۰۵، چندشکلی ژنتیکی ژن آلفا لاکتالبومین در نژادهای گاومیش با تکنیک SSCP در اگزون ۱ و ۲ را مطالعه کردند. دو قطعه از ژن آلفا لاکتالبومین در کل در ۴ نژاد گاومیش (Murrah، Bhadawari، Mehsana، Surti) به صورت چند شکلی یافت شد. Ramesha و همکاران در سال ۲۰۰۸، پلی-مورفیسم ژن آلفا لاکتالبومین در دو نژاد گاومیش رودخانه‌ای را (Murrah و South Kanara) با تکنیک SSCP در اگزون ۱، ۲، ۳ و ۴ مطالعه کردند. در اگزون ۱ چندشکلی مشاهده شد ولی در ۲، ۳ و ۴ مشاهده نشد. Vohra و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین بر تولید و ترکیبات شیر نژادهای گاومیش رودخانه‌ای هندی (Murrah، Surt) انجام دادند و دریافتند که در این دو نژاد چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین رابطه‌ی معنی‌داری با تولید و ترکیبات شیر داشت.

Sashikanth و Yadev در سال ۲۰۱۱، در گاوهای نژاد (Sahiwal, Hariana, Tharparkar) چندشکلی در ناحیه‌ی پروموتور ژن آلفالاکتالبومین و ارتباط آن با صفات تولید شیر را بررسی نتایج چندشکلی و ارتباط معنی‌داری ژنوتیپ BB را با تولید شیر نشان داد. Bleck و Bremel در سال ۱۹۹۳، در گاوهای نژاد هلشتاین چندشکلی در ناحیه‌ی غیر کدکننده ′۵ ژن آلفالاکتالبومین مشاهده کردند. Voelker و همکاران در سال ۱۹۹۷، چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین را در گاوهای هلشتاین و ارتباط آن با صفات تولید شیر را بررسی، نتایج چندشکلی و ارتباط معنی‌داری را با تولید شیر نشان داد.

اگر چه برخی گزارش‌ها در ژن آلفا لاکتالبومین در گاو، بز، خوک و گوسفند در دسترس هستند ولی اطلاعات کمی در سطح مولکولی برای گاومیش وجود دارد (Blumberg and Tombs 1958). با توجه به این که تولیدات گاومیش به خصوص تولید شیر آن در کشور ما از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است ولی تحقیقات صورت گرفته روی گاومیش نسبت به گاو و گوسفند کم‌تر می‌باشد، ضرورت دارد که مطالعات مولکولی در زمینه‌ی ژن‌های تأثیرگذار روی صفات شیر انجام شود. در راستای این اهداف، تحقیق حاضر به منظور مطالعه‌ی چندشکلی ناحیه‌ی اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین و ارتباط آن با صفات تولید و ترکیبات شیر در گاومیش‌های دامداری‌های محلی استان آذربایجان شرقی با استفاده از روش SSCP (چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز) انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۱۵۰ رأس گاومیش‌های دامداری‌های محلی استان آذربایجان شرقی یک میلی‌لیتر نمونه شیر تهیه گردید. نمونه‌های شیر تا زمان استخراج DNA در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. جهت استخراج DNA از نمونه‌های شیر از روش پروناز و پروتکل بایلس و همکاران استفاده شد (Bailes et al. 2007). جهت تعیین کیفیت DNA نمونه‌های استخراج شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. توالی آغازگرها با استفاده از سایت NCBI طراحی گردید و صحت اتصال آغازگرها انتخاب شده از طریق نرم‌افزار Oligo Version5 مورد بررسی قرار گرفت (Weiss et al. 1999). تمامی آغازگرها از شرکت سیناژن (ایران) به صورت لیوفیوزه تهیه گردید. جهت تکثیر قطعه ۳۹۲ جفت بازی اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین از آغازگرهای توصیف شده که ترتیب توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است استفاده شد.

جدول ۱: آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر بخش اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین

نام آغازگر	توالی
Forward primer	CTCTCTGCTCCTGGTAGGCA
Reverse primer	TGAGGACCTGTATTCCCAGACA

جهت تعیین دمای اتصال بهینه‌ی آغازگر از شیب حرارتی از ترموسایکلر (T Gradient) ساخت کشور آمریکا استفاده شده و واکنش نهایی PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (بافر PCR ۱x، ۵/۱ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱ واحد Taq DNA Polymerase، ۷۵ نانوگرم DNA استخراج شده) و با برنامه‌ی حرارتی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی اولیه‌ی DNA به مدت ۳ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه و به تعداد ۳۶ سیکل انجام شد. صحت طول قطعه به دست آمده از PCR با استفاده از ژل آگارز ۵/۱ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید صورت گرفت. جهت نشان دادن چندشکلی در قطعه‌ی ۳۹۲ جفت بازی ژن آلفالاکتالبومین از تکنیک SSCP استفاده گردید. بدین منظور مقدار ۵ میکرولیتر از هر یک محصولات PCR با ۱۰ میکرولیتراز بافر در یک میکروتیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط

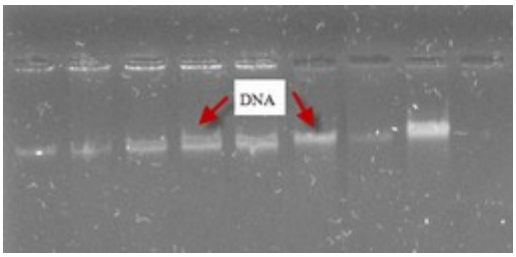
شد سپس به منظور انجام واکنش SSCP رشته‌های DNA تکثیر شده، با استفاده از بافر SSCP (formamid 99% (1960 میکرولیتر)، m0.5 EDTA (۴۰ میکرولیتر) Bromophnol blue (0.025%)، Xyleno cyanol (0.25%) به نسبت ۱ به ۲ به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تک‌رشته‌ای شدند که بلافاصله پس از این مرحله در داخل یخ قرار گرفتند. الکتروفورز محصولات تک‌رشته‌ای شده، روی ژل آکریلامید ۸ درصد، با ولتاژ ۱۳۰ ولت به مدت ۱۸ ساعت جهت بررسی چندشکلی انجام شد و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور صورت گرفت. پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی، تعیین فراوانی الگوهای ژنوتیپی با استفاده از شمارش مستقیم مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق برای بررسی ارتباط تنوع در صفات مرتبط با تولید و ترکیبات شیر با الگوهای ژنتیکی جایگاه ژن آلفالاکتالبومین از مدل خطی ثابت با رویه‌ی GLM نرم‌افزار SAS (نسخه‌ی ۹/۱) و مقایسه‌ی بین میانگین‌ها با آزمون دانکن مورد بررسی قرارگرفت. معادله‌ی مدل به شکل زیر بود.

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + M_j + P_k + H_l + e_{ijklm}$$

در رابطه‌ی بالا، Y_{ij}: هر یک از مشاهدات مربوط به مقدار شیر، درصد چربی، درصد پروتئین، درصد لاکتوز، μ: میانگین کل جامعه، G_i: اثر iامین ژنوتیپ، M_j: اثر jامین ماه رکوردگیری، P_k: اثر kامین دوره‌ی شیردهی، H_l: اثر گله، e_{ijkl}: اثر خطای آزمایشی

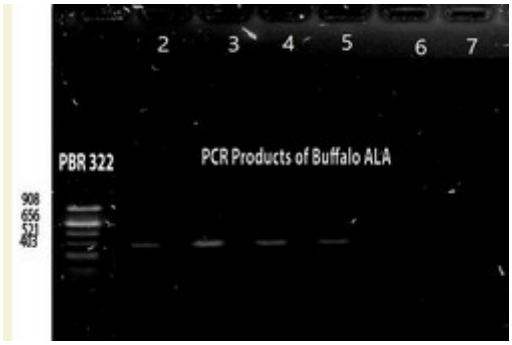
نتایج

در مرحله‌ی بررسی کیفی DNA استخراج شده با استفـاده از ژل آگارز ۱/۵درصد نمونه‌هایی که باند روشن با وضوح کامل ایجاد کردند قابل قبول بودند (شکل ۱).



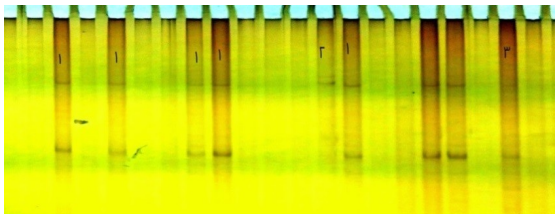
شکل ۱: نمونه‌های DNA استخراج شده از شیر گاومیش و تعیین کیفیت شده روی ژل آگارز ۱/۵درصد

محصولات به دست آمده از واکنش PCR، جهت حصول اطمینان از تکثیر قطعات ۳۹۲ جفت بازی از ژن آلفالاکتالبومین، روی ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شدند. نمونه‌های تکثیر شده، باند روشن و واضحی در موقعیت‌های ۳۹۲ جفت بازی ایجاد کردند که برای ادامه‌ی تحقیق انتخاب شدند (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج الکتروفورز محصولات PCR (قطعه ۳۹۲ جفت بازی) برای ژن آلفالاکتالبومین بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد: چاهک ۱ از سمت چپ: مارکر PBR322، ستون ۲ تا ۷ محصولات PCR برای ۶ نمونه DNA استخراجی از نمونه‌های شیر گاومیش

محصولات تکثیر شده PCR با توجه به کیفیت آن‌ها مستقیماً برای آنالیز SSCP استفاده شدند. با انجام تکنیک SSCP، سه الگوی مختلف چند شکلی برای ژن آلفالاکتالبومین در این جایگاه شناسایی شد الگوهای باندی متفاوت حاکی از وجود تنوع در این جایگاه می‌باشد که فراوانی آن‌ها محاسبه و برای الگوهای ۱ تا ۳ به ترتیب ۸۷/۵، ۱۰/۷۱، ۱/۷۸ درصد بود (شکل ۳).



شکل ۳: الگوهای PCR-SSCP برای ژن آلفالاکتالبومین بر روی ژل پلی اکریلامید (۱۰ درصد) غیر دناتوره که به وسیله‌ی نیترات نقره رنگ‌آمیزی شده است.

علاوه بر این، الگوهای مختلف مشاهده شده در صفات مختلف تولید و ترکیبات شیر به وسیله‌ی آزمون دانکن مورد آنالیز قرار گرفت. جدول ۲ مقایسه‌ی میانگین تأثیر الگوهای مختلف ژن آلفالاکتالبومین برای صفات تولید و ترکیبات شیر گاومیش را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود، اثر الگو برای صفات تولید شیر و چربی و پروتئین و لاکتوز غیرمعنی‌دار است.

جدول ۲: مقایسه‌ی میانگین تأثیر الگوهای مختلف ژن آلفالاکتالبومین بر صفات تولید و ترکیبات شیر

الگو	تولید شیر(kg)	درصد چربی	درصد پروتئین	درصدلاکتوز
۱	۷/۸۶۳±۰/۳۳۵	۵/۸۹۹±۰/۱۷۳	۳/۰۸۸±۰/۰۰۸	۲/۵۳۱±۰/۰۹۶
۲	۷/۵۹۷±۰/۴۰۴	۶/۳۰۰±۰/۳۴۶	۳/۰۶۸±۰/۰۱۷	۲/۳۵۶±۰/۱۹۲
۳	۸/۱۱۹±۰/۴۹۶	۵/۸۸۰±۰/۵۹۶	۳/۰۸۷±۰/۰۲۹	۲/۶۱۵±۰/۳۲۶
P.value	۰/۴۴۹۹^{ns}	۰/۴۸۷۰^{ns}	۰/۴۶۰۸^{ns}	۰/۶۱۰۴^{ns}

بحث

چندشکلی در سطح DNA نقش کلیدی در تنوع ژنتیک حیوانات دارد. در این تحقیق، الگوهای چندشکلی از ژن آلفالاکتالبومین به روش PCR-SSCP تعیین شد و سپس ارتباط آن‌ها با صفات تولید و ترکیبات شیر در گاومیش‌های استان آذربایجان شرقی مورد بررسی قرار گرفت. تکنیک SSCP روش مؤثری در شناسایی تنوع توالی تکثیر شده می‌باشد (Orita et al. 1989). اساس این تکنیک مهاجرت رشته‌های DNA از میان ژل آکریل آمید بر اساس اندازه و توالی آن می‌باشد؛ بنابراین، وجود حتی یک جهش نقطه‌ای، با تفاوت حرکت روی ژل قابل مشاهده می‌باشد. نتایج حاصل از SSCP و رنگ‌آمیزی پلی‌اکریل‌آمید بیان‌گر ۳ الگوی باندی متفاوت بود که در شکل ۳ مشاهده می‌شود؛ بنابراین، الگوهای باندی متفاوت حاکی از وجود تنوع بالا در قطعه تکثیر شده اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین می‌باشد که فراوانی آن‌ها محاسبه و برای الگوهای ۱ تا ۳ به ترتیب ۸۷/۵ درصد، ۱۰/۷۱ درصد، ۱/۷۸ درصد بود. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود الگوی ۱ با فراوانی ۸۷/۵ درصد بیش‌ترین فراوانی رو به خود اختصاص داده است. الگوهای ژنوتیپی متفاوت بین افراد درون این نژاد، ناشی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی بین افراد می‌باشد. در مطالعات گذشته هم تعداد قابل توجهی چندشکلی در این ژن توسط محققان مختلف گزارش شده است. همان طور که ذکر شد، در این مطالعه هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین این الگوهای ژنتیکی با صفات تولید و ترکیبات شیر یافت نشد؛ بنابراین انتخاب بر اساس چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین نمی‌تواند در بهبود ژنتیکی صفات تولید و ترکیبات شیر گاومیش‌های استان آذربایجان شرقی مؤثر باشد. در گاومیش به دلیل مشکلاتی که در جمع‌آوری اطلاعات وجود دارد بررسی ارتباط بین ژن‌های کاندید و صفات تولید شیر و همچنین بهبود پیشرفت ژنتیکی مربوط به این صفات با محدودیت‌هایی همراه است. همچنین در بررسی حاضر، عوامل مختلفی مانند نوع نژاد، اندازه جمعیت، حجم نمونه‌برداری، شرایط محیطی و غیره

می‌تواند باعث ایجاد تناقض بین نتایج به دست آمده و بررسی‌های انجام شده باشد. حسین‌زاده و همکاران در سال ۱۳۹۳، ارزیابی ژنتیکی قطعه‌ی ۶۵۰ جفت بازی در قسمتی از ژن آلفالاکتالبومین در گاومیش‌های منطقه‌ی آذربایجان را با استفاده از تکنیک SSCP بررسی کردند. نتایج چندشکلی آن با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. در مطالعه‌ای که Rosero و همکاران در سال ۲۰۱۱، در گاو نژاد (Creole Colombian) به روش PCR-SSCP را انجام دادند چند شکلی این ژن را تأیید کردند و با نتایج تحقیق ما مطابقت داشت. Vohra و همکاران در سال ۲۰۱۲، اثر چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین بر روی نژادهای گاومیش رودخانه‌ای هندی (Murrah، Surt) انجام دادند و دریافتند که در این دو نژاد چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین رابطه‌ی معنی‌داری با تولید شیر و درصدهای چربی و پروتئین دارد. Dayal و همکاران در سال ۲۰۰۵، اثر پلی‌مورفیسم ژن آلفالاکتالبومین بر صفت تولید شیر در گاومیش‌های رودخانه‌ای (Bhadawari و Murrah) را با تکنیک SSCP در اگزون ۱ گزارش کردند. نتایج نشان داد که در گاومیش (Murrah) ۵ ژنوتیپ (AB, BB, BC, CC و CD) و ۴ تا آلل (A, B, C و D) یافت شد. در گاومیش (Bhadawari) دو تا ژنوتیپ و سه تا آلل یافت شد. ژنوتیپ‌ها ارتباط معنی‌داری با تولید شیر در گاومیش‌های Bhadawari داشت، ولی در گاومیش‌های Murrah ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعه‌ی انجام گرفته در گاومیش‌های نژاد مازندرانی مطابقت اما با نتایج حاصل از تحقیقات در سایر نژادهای گاومیش ذکر شده در بالا مغایرت داشت. در تحقیق حاضر، با وجود استفاده از یک مدل مختلط و در نظر گرفتن کواریانس ژنتیکی بین افراد، ارتباط معنی‌داری بین الگوهای ژنتیکی ژن آلفالاکتالبومین با صفات تولید و ترکیبات شیر یافت نشد که از بین دلایل احتمالی آن می‌توان به اندازه‌ی جمعیت، تفاوت پتانسیل ژنتیکی افراد مورد مطالعه، عدم اطمینان از صحت و دقت در برداشت اطلاعات و تأثیر عوامل محیطی کنترل نشده اشاره کرد.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۷، چندشکلی ژن آلفا-لاکتالبومین و ارتباط آن با صفات عملکرد شیر در گاو هلشتاین چینی با تکنیک PCR-SSCP را بررسی کردند نتایج دو جهش تک نوکلئوتیدی در منطقه‌ی flanking۵′ و اینترون ۳ از ژن آلفا لاکتالبومین نشان داد و هیچ ارتباطی بین این چندشکلی‌ها با تولید شیر یافت نشد. جعفری در سال ۱۳۸۸، چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین در ناحیه‌ی اگزون و اینترون و ارتباط آن با مجموعه‌ی کاملی از صفات شیرواری (میزان تولید شیر، لاکتوز، پروتئین و ماده‌ی جامد خام شیر به جز چربی) در گاوهای هلشتاین ایران را بررسی کردند نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میان واریانت‌های (variants) مختلف یک جایگاه در برخی چندشکلی‌های یافت شده اختلاف آماری معنی-داری در صفات شیرواری (میزان تولید شیر، لاکتوز، پروتئین و ماده جامد خام شیر به جز چربی) وجود دارد. Zhou و Dong در سال ۲۰۱۳، ارتباط ژن آلفا لاکتالبومین با تولید شیر در گاوهلشتاین چینی در مناطق ۵′ و ۳′ کدکننده و اگزون‌های ۴-۳-۲-۱ را گزارش کردند. یک چندشکلی در اگزون ۴ ژن آلفا لاکتالبومین یافت شد؛ و هیچ ارتباطی بین این ژن با تولید شیر یافت نشد که با نتایج ما مطابقت داشت. Balcan و همکاران در سال ۲۰۰۸، در مطالعه‌ی خود چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین در نژاد گاو خال خال سیاه رومانیایی با تکنیک PCR-RFLP را گزارش کردند نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل RFLP تنها ژنوتیپ BB را شناسایی نمود و جایگاه مورد مطالعه مونومورف بود که با نتایج ما مطابقت نداشت و عدم تطابق به نظر می‌رسد که مربوط به تعداد نمونه‌های اخذ شده از گاو رومانیایی باشد که در این نمونه‌های ۶۰ تایی جهش ژنی لازم به منظور چندشکلی انجام نگرفته باشد که این جهش در نمونه‌ی ۱۵۰ تایی تحقیق حاضر مشاهده شده است. البته بدیهی است استفاده از تعداد نمونه‌ها و آنزیم‌های بیش‌تر و نیز سایر نواحی ژنی می‌تواند نتایج

دقیق‌تری را در مطالعه بالکان و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دهد. Kumar و همکاران در سال ۲۰۰۶، چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین در اگزون ۱ در بزهای شیری هندوستان با تکنیک PCR-SSCP را بررسی و نتایج چند شکلی در نمونه‌های خون را نشان داد و این موضوع بیان-گر این است که بزهای شیری هندوستان تنوع ژنتیکی بالا در جایگاه، اگزون ژن آلفا لاکتالبومین دارند و روش PCR-SSCP یک ابزار مناسب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بز است. Agaoglu و همکاران در سال ۲۰۱۴، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن آلفا لاکتالبومین در اگزون ۳ در بعضی نژادهای بز (Honamli, Kilis, Saanen, Hair) در ترکیه با کمک تکنیک PCR-RFLP بررسی و یافته‌های این مطالعه حضور چندشکلی ژنتیکی در ژن آلفا لاکتالبومین در نژادهای (Kilis و Honamli) را نشان داد. Ma و همکاران در سال ۲۰۱۰، به ارزیابی چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین در بزهای شیری چینی و همچنین ارتباط این چندشکلی با صفت تولید شیر پرداختند و بیان کردند که ژنوتیپ‌های مشاهده شده هیچ گونه ارتباط معنی‌داری با تولید شیر نداشتند.

در تحقیق حاضر، چون اثر الگوهای ژنتیکی ژن آلفالاکتالبومین بر تولید و ترکیبات شیر معنی‌دار نشده است نمی‌توان اظهار داشت که کدام الگو مطلوب می‌باشد. به منظور بررسی دقیق‌تر این جایگاه‌ها با تولید و ترکیبات شیر، افزایش تعداد نمونه‌ها برای انجام آنالیزهای آماری دقیق‌تر و کاهش واریانس خطا توصیه می‌شود. همچنین با توجه به این که صفات کمی توسط فرآیند تعداد زیادی ژن با اثرات کم و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها کنترل می-شود، لذا با بررسی تنوع ژنتیکی در سطح یک لوکوس نمی‌توان بر عملکرد یک صفت در یک نژاد اظهار نظر کرد و بررسی وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی به خاطر تخصیص اعتبار و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی صمیمانه‌شان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Amigo, L.; Recio, I. and Ramos, M. (2000). Genetic polymorphism of ovine milk protein: its influence on technological properties of milk, International Dairy Journal, 10: 135-149.

Bailes, S.; Devers, M.; Kirby, J.D. and Rhoads, D.D. (2007). An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. Poultry Science, 86: 102-106.

Balcan, R.A.; Georgescu, S.E.; Manea, M.A.; Dinischiotu, A.; Tesio, C.D. and Costache, M. (2008). Alpha-lactalbumin genotypes identification in Romanian black spotted cattle breed. Lucrări stiinnifice Zootehnie si Biotehnologii, 41(1): 169-173.

Bleck, G.T. and Bremel, R.D. (1993). Sequence and single-base polymorphisms of the bovine a-lactalbumin 5' flanking region. Gene, 126: 213-218.

Blumberg, B.S. and Tombs, M.P. (1958). Possible polymorphism of bovine a-lactalbumin. Nature, 181: 683-684.

Dayal, S.; Bhattacharya, T.K.; Vohra, V.; Kumar, P. and Sharma, A. (2005). Genetic polymorphism of alpha-lactalbumin gene in riverine buffalo. DNA Sequence, 16(3): 173-179.

Farhumand, P. (2002). Buffalo breeding. Urmia University Press. Pp: 66-68. (In Persian).

Hecht, C. and Geldermann, H. (1996). Variants within 5- Flanking region and the intron I of bovine growth hormone gene. Animal Genetic, 27: 329-332.

Korkmaz Agaoglu, Ö.; Saatci, M.; Elmaz, Ö.; Çolak, M.; Kocamütoglu, M. and Zeytunlu, E. (2014). MvaI PCR-RFLP identifies single nucleotide polymorphism of the alpha-lactalbumin gene in some goat breeds reared in Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38: 225-229.

Kumar, D.; Gupta. N.; Ahlawat, S.P.S.; Satyanarayana, R.; Sunder, S. and Gupta, S.C. (2006). Single strand confirmation polymorphism (SSCP) detection in exon I of the α-lactalbumin gene of Indian Jamunapari milk goats (Capra hircus). Genetics and Molecular Biology, 29(2): 287-289.

Ma, R.N.; Deng, C.J.; Zhang, X.M.; Yue, X.P.; Lan, X.Y.; Chen, H. and Lei, C.Z. (2010). A novel SNP of α-lactalbumin gene in Chinese dairy goats. Molecular Biology, 44 (4): 536-540.

Mercier, J.C. and Vilotte, J.L. (1993). Structure and function of milk protein genes. Journal Dairy Science,76: 3079- 3098.

Orita, M.; Suzuki, Y.; Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 5: 874-879.

Permyakov, E.A. and Berliner, L.J. (2000). α_lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett*, 473: 269-274.

Pirani, N. (2004). Text book Workshop on Application of Biotechnology in Animal Science, Faculty of Agriculture. Tabriz University. (In Persian).

Ramesha, K.P.; Khosravinia, H.; Gowda, Sh. and Rao, M.R.S. (2008). Alpha-lactalbumin gene polymorphism: a preliminary study on two breeds of the river buffalo (*Bubalus bubalis*). Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 16 (2): 47-52.

Rosero-Alpala, J.A.; Alvarez-Franco, L.A. and Munoz-Florez, J.E (2011). Genetic polymorphism of beta-lactoglobulin and alpha-lactoalbumin in Colombian Creole cattle by PCR-SSCP. Acta Agronómica, (60) 4: 339-346.

Sashikanth, A.M. and Yadav, B.R. (1998). Alpha lactalbumin polymorphism in three breeds of Indian zebu cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics, 115: 403-405.

Voelker, G.R.; Bleck, G.T. and Wheeler, M.B. (1997). Single-base polymorphisms within the 5` flanking region of the bovine α-lactalbumin gene. Journal of Dairy Science, 80: 194-197.

Vohra, V.; Dayal, S. and Bhattacharya, T.K. (2012). SSCP typing of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin gene and its association with milk production and constituent traits in Indian riverine buffalo. Indian Journal of Animal Sciences, 82 (8): 884-888.

Weiss, B.; Davidkova, G. and Zhou, L.W. (1999). Antisense RNA gene therapy for studing and modulating biological processes. Cellular and Molecular Life Science, 55: 334-358.

Zhang, J.; Sun, D.; Womack, J.E.; Zhang, Y.; Wang, Y. and Zhang, Y. (2007). Polymorphism identification, RH mapping and association of α-lactalbumin gene with milk performance traits in Chinese holstein. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 20(9): 1327- 1333.

Zhou, J.P. and Dong, C.H. (2013). Association between a polymorphism of the α-lactalbumin gene and milk production traits in Chinese Holstein cows. Genetics and Molecular Research, 12 (3): 3375-3382.

Polymorphism of alpha-lactalbumin gene in exon 1 and intron 2 and its association with milk production traits in buffaloes of Eastern Azarbaijan province by PCR–SSCP technique

Salehi, R.[1]; Hashemi, A.[2]; Ghafari, M.[3] and Elyasi Zarin Ghabaei, Gh.[4]

Received: 11.04.2017 Accepted: 31.10.2017

Abstract

Milk production traits and its components belong to quantitative and polygenic traits and affected by many genes. This study was conducted to determine the polymorphism in alpha-lactalbumin gene and its association with milk production traits using PCR-SSCP method in Eastern Azarbaijan native buffaloes. Milk samples were collected from 150 buffaloes of Eastern Azarbaijan province and then DNA samples were extracted using pronase method. After DNA extraction specific primers used for amplification of 392 bp fragment of exon 1 and intron 2 alpha-lactalbumin gene. To identify the polymorphism, PCR products were electrophoresed on polyacrylamide gel (single strand conformation polymorphism method) and stained with silver nitrate method. The frequency of the 1, 2 and 3 genotypic patterns were 87.5%, 10.71% and 1.78% respectively. The statistical analysis indicated that the effect of genotypes on milk production, lactose, fat percentage and protein percentage had no significant effect. Based on current results, the analysis of alpha-lactalbumin gene polymorphism cannot be used for improving milk yield and composition of buffalo in Azari population.

Key words: Gene, Alpha-lactalbumin, Milk production, Polymorphism, Buffalo

1- MSc Student of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3- Assistant Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
4- MSc, Department of Animal Science, East Azerbaijan Agriculture and Natural Resources Research Centre, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Hashemi, A., E-mail: a.hashemi50@gmail.com