

بررسی چند شکلی پروتئین‌های آلكالین فسفاتاز، پیش ترانسفرین، سل استراز، کاتالاز و هموگلوبین در دو جمعیت اسب عرب و اسبچه خزرایران

• فضل‌الله افراز، موسسه تحقیقات علوم دامی
• سعید اسماعیل‌خانیان، موسسه تحقیقات علوم دامی
• حمیدرضا سیدآبادی، دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۳

چکیده

این تحقیق به منظور تعیین چند شکلی پنج پروتئین پلاسما و گلبول قرمز خون شامل آلكالین فسفاتاز (Alp)، پیش ترانسفرین (Ptf)، سل استراز (CEs)، کاتالاز (Cat) و هموگلوبین (Hb) در دو جمعیت اسب عرب و اسبچه خزرایران انجام شد. فراوانی ژن‌ها، متوسط هتروزیگوسیت و تعداد آلل‌های موثر هر ژنگاه، بین دو جمعیت نیز مقایسه شدند. الکتروفورز پلاسما و گلبول قرمز با استفاده از ژل نشاسته و آکرلامید انجام گرفت. از پنج ژنگاه مورد آزمایش، فقط ژنگاه Cat چند شکلی نشان داد که شامل فنوتیپ‌های FS، FF، SS بود. اختلاف فراوانی دو آلل F و S در هر دو نژاد بسیار جزئی مشاهده گردید. ژنگاه‌های Alp، Ptf، CEs و Hb به ترتیب در آلل‌های ۱، F، A و ۱ تثبیت شده بودند. متوسط هتروزیگوسیت و تعداد آلل‌های موثر در هر ژنگاه در اسبچه خزر و عرب به ترتیب ۰/۱۰۰۳، ۱/۱۹۹۸ و ۰/۰۹۷۳، ۱/۱۸۷۴ برآورد گردیدند. از اطلاعات بدست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که اسب‌های عرب مورد بررسی آمیخته‌ای از عرب‌های ایرانی با نژادهای نظیر ترورد، عرب و آنگلو عرب نمی‌باشند.

کلمات کلیدی: اسب عرب، اسبچه خزر، الکتروفورز، پروتئین، تنوع ژنتیک

Pajouhesh & Sazandegi No 66 pp: 33-38

Polymorphisms of alkaline phosphatase, pretransferrin, cell esterase, catalase and hemoglobin proteins of Arab and Caspian miniature, horses in Iran

By : F. Afraz, Animal Science Research Institute Karaj, Iran , S. Esmailkhanian, Animal Science Research Institute Karaj, Iran and H.R. Seydabady, Islamic Azad University, Karaj, Iran

The present research has been carried out to identify polymorphism at five blood plasma and erythrocyte proteins in Arab and Caspian miniature horse population. Gene frequencies were analyzed at five loci controlling blood proteins; alkaline phosphatase (Alp), catalase (Cat), cell esterase (CEs), hemoglobin (Hb) and pretransferrin (Ptf). In addition, heterozygosity and effective allele numbers within each population have also been determined. Plasma and erythrocyte

were electrophoresed for the mentioned proteins, using starch and polyacrylamid gels. Among of five examined loci, only Cat locus showed polymorphism that phenotypes were FF, FS and SS. Allele frequency difference F and S for two populations was too slight. Alp, CE, Hb and Ptf were fixed at A, 1, 1 and F alleles, respectively. The average heterozygosity and effective allele numbers were calculated 0.1003, 1.1998 and 0.0973, 1.1874 in Caspian miniature and Arab populations, respectively. From these data it was concluded that the examined Arab horses are not cross-bred of Iranian Arab and exotic race horse such as Arab, Anglo-Arab and Thoroughbred

Key words: Arab horse, Caspian miniature, Electrophoresis, Protein, Genetic diversity.

مواد و روش‌ها

اسب

نژادهای اسب، محل نمونه برداری، روش نمونه برداری، تعداد نمونه‌ها و چگونگی جدا سازی پلاسماها، قبلا رایج گردید (۱).

الکتروفورز

چهار پروتیین Alp, CE, Hb, Cat و گلبول‌های قرمز خون از طریق الکتروفورز زل نشاسته آزمایش شدند.

در این تحقیق زل نشاسته با غلظت ۱۲٪ مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور ۳۶ گرم نشاسته هیدرولیز شده را با ۳۰۰ میلی لیتر بافر زل در داخل فلاسک ته گرد ریخته و برای حل شدن به مدت چند دقیقه حرارت داده شد تا نشاسته کاملاً شفاف و چسبنده گردد. سپس توسط پمپ خلا دار به مدت ۶۰-۴۰ ثانیه هواگیری گردید. آنگاه در قالبی ۶×۱۳۰×۱۸۰ میلیمتر ریخته شد و پس از دو ساعت که زل در محیط آزاد قرار گرفت آماده انجام الکتروفورز گردید. برای الکتروفورز هموگلوبین، سل استراز، کاتالاز از نمونه‌های گلبول خون و برای آلکالین فسفاتاز از پلاسما استفاده شد که برای هموگلوبین نمونه‌ها ۱۰ بار و برای کاتالاز ۱۰۰ بار رقیق شدند. پیش ترانسفرین از طریق الکتروفورز زل آکرلامید آزمایش شد. زل مربوطه بر اساس الکتروفورز ترانسفرین آماده گردید (۱).

اسامی پروتیین‌های مورد بررسی و منابع استفاده شده جهت الکتروفورز در جدول ۱ ارائه شده است. الکتروفورز با کمی اصلاح در روش‌های منابع جدول مذکور انجام پذیرفت.

محاسبه فراوانی ژن‌ها و برآورد تنوع ژنتیکی

محاسبه فراوانی ژن‌ها از روش شمارش مستقیم فنوتیپ‌ها انجام پذیرفت. تنوع ژنتیک از طریق متوسط هتروزیگوسیت در هر فرد و تعداد آلل‌های موثر هر جایگاه برآورد گردید (۱۵، ۱۶). متوسط هتروزیگوسیت با استفاده از فرمول $H = \frac{1}{2n} (1 - \sum x_i^2)$ بدست آمد. که x_i آلل i ام در یک جایگاه و n تعداد اسبان هر جمعیت و علامت بار متوسط کل جایگاه‌های آزمایش شده می باشد. تعداد آلل‌های موثر با استفاده از فرمول $N_e = 1 / \sum x_i^2$ محاسبه شد. که فراوانی آلل i ام در یک جایگاه و علامت بار متوسط کل جایگاه‌های آزمایش شده می باشد.

نتایج

چند شکلی پروتیین

معیار چند شکلی بودن هر ژنگاه در این پژوهش، این بود که وفور فراوان

مقدمه

الکتروفورز پروتیین‌های خون اسب با استفاده از زل نشاسته و پلی آکرلامید نشان داد که اغلب ژنگاه‌های مربوطه چند شکلی هستند (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲). آلکالین فسفاتاز به صورت دو آلل A و B در نژادهای اروپایی، تایلندی و هوکایدو و تایشو ژاپنی مشاهده گردید، که فراوانی B در مقایسه با فراوانی A بسیار کم بود (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۱۴، ۱۶، ۱۸). پیش ترانسفرین به صورت سه آلل F، D و S در اکثر نژادهای آسیایی گزارش شد، که بیشترین فراوانی مربوط به آلل F بود (۱۶). سه آلل ۱، ۲ و ۳ در سیستم سل استراز پنج نژاد اسب مغولی گزارش گردید (۱۶). تاکنون هموگلوبین به صورت چند شکلی گزارش نشده است (۲، ۴، ۵، ۱۱، ۱۴، ۲۱). چند شکلی کاتالاز تقریباً در ۴۰ نژاد مورد بررسی قرار گرفت، که آلل S فقط در دو نژاد تروبرد (Thoroughbred) و پونی هکنی (Hackney pony) تثبیت شده بود ولی بقیه نژادها دو آلل F و S را با فراوانی مناسب نشان دادند (۳، ۴، ۵، ۱۱، ۱۳، ۱۶، ۲۰).

تنوع ژنتیکی با برآورد متوسط هتروزیگوسیت و یا تعداد آلل‌های موثر در هر لوکوس، در بسیاری از نژادهای بومی و اصلاح شده جهان گزارش گردیده است (۱، ۴، ۵، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۶).

با توجه به نژادها و جمعیت‌های مختلف با ارزش در کشور، مولفین قبلاً مبادرت به تحقیق ژنتیک در خصوص چند شکلی پروتیین‌های خون دو نژاد معروف یعنی عرب و اسبچه خزر نمودند که وسیله معتبر جهت انتخاب گله با هتروزیگوسیت بالا به عنوان ذخیره ژنتیکی و رد اعقاب می باشد (۱). به منظور تکمیل این اطلاعات و تعیین دقیق تر ساختار ژنتیک دو نژاد مذکور، چند شکلی پروتیین‌های آلکالین فسفاتاز، بیش ترانسفرین، سل استراز، هموگلوبین و کاتالاز و نیز برآورد میزان تنوع ژنتیکی، از طریق الکتروفورز زل پلی آکرلامید و نشاسته مورد تحقیق قرار گرفتند.

تنوع ژنتیک هر جمعیت با استفاده از فراوانی ژن‌های پنج ژنگاه کنترل کننده پروتیین‌های مورد بررسی برآورد و در جدول ۳ ارایه شده است. متوسط هتروزیگوسیت و تعداد آلل موثر در هر ژنگاه در نژاد عرب (به ترتیب ۰/۱۰۰۳ و ۱/۱۹۹۸) تقریباً مشابه با نژاد اسپچه خزر (به ترتیب ۰/۰۹۷۳ و ۱/۱۸۷۴) بود.

بحث

وجود بیش از ۲۰ نژاد، جمعیت و اکوتیپ اسب در کشور، مخصوصاً ویژگی‌های منحصر به فرد بعضی از جمعیت‌ها، منبع ژنتیکی بسیار غنی‌ای را پدید آورده است که لزوم تحقیقات ژنتیک را تایید می‌نماید، زیرا جهت معرفی به جهان، گزینش جمعیت‌ها برای حفظ ذخیره ژنتیک و اصلاح نژاد

ترین آلل کمتر از ۰/۹۹ باشد. در الکتروفورز از پنج ژنگاه ارایه شده در جدول ۱ فقط ژنگاه *Cat* به صورت چند شکلی مشاهده شد و تغییراتی را در داخل و بین دو نژاد نشان داد. نمونه‌های الکتروفوریک فنوتیپ‌های پروتیین‌های مشاهده شده و فراوانی آلل‌های محاسبه شده دو نژاد به ترتیب در جدول ۲ و تصاویر ۵-۱ ارایه گردیده است. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در این پژوهش برای سیستم *Cat* سه فنوتیپ *SS* و *Ff*، *FS* و *SS* ملاحظه گردید. گرایش فراوانی دو آلل *F* و *S* در دو جمعیت متفاوت بود. برای سیستم *Alp* فقط فنوتیپ *AA* که به وسیله آلل *A* کنترل می‌شود در دو نژاد مشاهده گردید (شکل ۲). در این پژوهش فنوتیپ ظاهر شده سیستم *Ptf* برای دو نژاد *Ff* بود (شکل ۳). *CES* و *Hb* نیز فقط به صورت فنوتیپ ۱-۱ در دو نژاد مشاهده گردیدند (شکل‌های ۴ و ۵).

جدول ۱- اسامی پروتیین‌های آزمایش شده

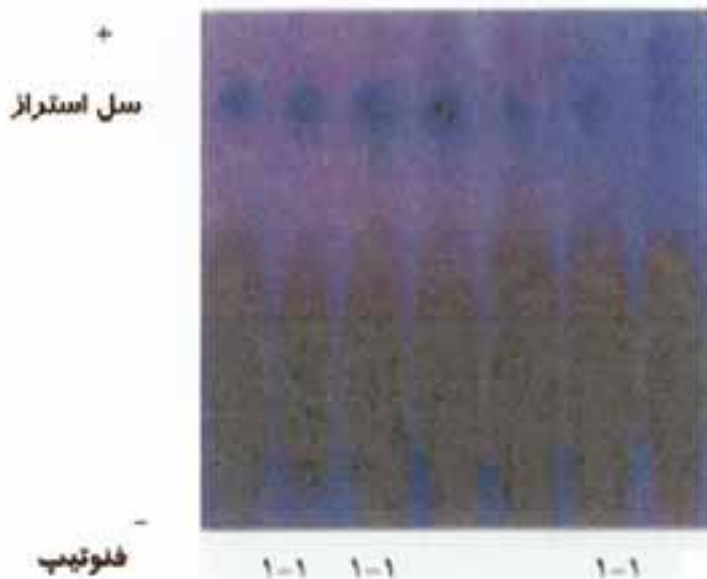
پروتیین	لوکوس	منبع
آلکالین فسفاتاز	Alp	Nozawa و همکاران (۱۹۹۸)
پیش ترانسفرین	Ptf	Nozawa و همکاران (۱۹۹۸)
سل استراز	CES	Shaw و همکاران (۱۹۷۰)
کاتالاز	Cat	Kelly و همکاران (۱۹۷۱)
هموگلوبین	Hb	Nozawa و همکاران (۱۹۷۵)

جدول ۲- فراوانی آللی ۵ ژنگاه در دو نژاد اسب عرب و اسپچه خزر

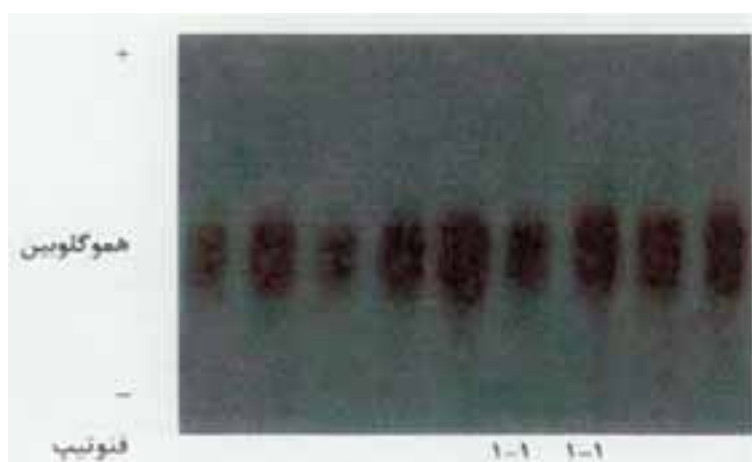
ژنگاه	آلل	اسبچه خزر	اسب عرب
آلکالین فسفاتاز	A	۱	۱
	B	۰	۰
	D	۰	۰
پیش ترانسفرین	F	۱	۱
	S	۰	۰
	1	۱	۱
	2	۰	۰
سل استراز	3	۰	۰
	F	۰/۴۱	۰/۵۱
	S	۰/۵۹	۰/۴۹
کاتالاز	1	۱	۱
	0	۰	۰

جدول ۳- متوسط هتروزیگوسیت و تعداد آلل موثر در دو نژاد

نژاد	متوسط هتروزیگوسیت	تعداد آلل موثر
اسب عرب	۰/۱۰۰۳	۱/۱۹۹۸
اسبچه خزر	۰/۰۹۷۳	۱/۱۸۷۴



شکل ۴- نمونه‌های الکتروفور تیک سل استراز در دو جمعیت اسب عرب و اسپچه خزر (عرب ۳-۱، اسپچه خزر ۶-۴)



شکل ۵- نمونه‌های الکتروفور تیک هموگلوبین در دو جمعیت اسب عرب و اسپچه خزر (عرب ۴-۱، اسپچه خزر ۸-۵)

درداری و دکتر امینی به خاطر همکاری صمیمانه در تهیه نمونه‌های خون سپاسگزاری می‌گردد. ونیز از آقای مهندس یوسف نیا که با در اختیار گذاشتن شجره نامه اسب‌های عرب و تهیه نمونه‌ها ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند صمیمانه قدردانی می‌شود. از آقای مهندس صدیقی که در امور کامپیوتر و امور گرافیک همکاری صمیمانه داشته‌اند از صمیم قلب سپاسگزاری می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱- افراز، ف.، س. اسماعیل خانیان، ا. رستگاری و ف. امینی، ۱۳۸۱. بررسی نشانگرهای ژنتیکی

نژاد مورد بررسی یعنی عرب و اسپچه خزر مشاهده گردید. در پژوهش حاضر برای سیستم Hb همانند پژوهش‌های محققان دیگر فقط آلل I مشاهده شد (۲، ۴، ۵، ۱۱، ۱۴، ۲۱). اولین گزارش مربوط به چند شکلی Cat در سال ۱۹۷۱ توسط Kelly و همکاران ارایه گردید (۱۳). آنها با الکتروفورز گلوبول‌های قرمز در ژل نشاسته (pH= ۸) دو آلل همباز را در اسب‌های کوارتر (Quarter)، تروبرد (Thoroughbred) و Shetland پیدا نمودند. در سال ۱۹۷۲ Schleger و همکاران نیز این دو آلل را در اسب‌های اطریشی پیدا نمودند (۲۰). در سال ۱۹۹۰ Bowling و همکاران تنوع Cat را در ۲۷ نژاد اسب اهلی و ۷ جمعیت اسب وحشی بررسی نمودند (۳). آنها نیز دو آلل مشاهده نمودند که آلل S فراوان‌ترین آلل در همه جمعیت‌ها بود. از طرفی این دو آلل یعنی F و S در ۲۶ نژاد آسیایی (شرق، جنوب شرقی و جنوب) دارای فراوانی متعادل بودند، هر چند که گرایش فراوانی دو آلل مذکور در همه جمعیت‌ها یکسان مشاهده نگردید (۱۶). فراوانی دو آلل F و S در دو جمعیت عرب و خزر نیز متفاوت بود ولی کلاً از نظر میزان فراوانی با اکثر نژادهای آسیایی مشابهت داشتند. نکته قابل توجه این‌که فراوانی آلل S در بومی‌های اروپایی گرایش افزایشی نشان داد بطوری که در پونی هکنی تثبیت شده بود یعنی وضعیت متفاوتی را با خزر داشت، در حالیکه آلل‌های F و S در اسب‌های باری (Draft horse) پرچون (Perchro) و برتن (Breton) فراوانی مشابه با فراوانی این آلل‌ها در خزر داشتند (۳، ۱۶، ۱۹). بنابراین تحقیق نیاز به بررسی دقیق‌تر از طریق تجزیه DNA دارد. فراوانی آلل S در اسب‌های مسابقه یعنی عرب، آنگلو عرب بسیار اندک گزارش گردید که میل به تثبیت شدن دارد و در تروبرد تثبیت شده است (۳، ۱۶، ۲۰) که از این نظر کاملاً متفاوت با عرب ایرانی می‌باشد.

برآورد متوسط هتروزیگوسیتته (H) معیار مناسبی برای معرفی تنوع ژنتیک در داخل جمعیت یا نژاد می‌باشد (۱۵). متوسط هتروزیگوسیتته و تعداد آلل‌های موثر هر لوکوس در دو جمعیت مورد بررسی نسبتاً پایین بود که دلیل عمده آن تثبیت شدن چهار لوکوس Alp، CE، Ptf، و Hb در یکی از آلل‌های مربوط به خودشان می‌باشد، ولی میزان برآورد شده مشابه هتروزیگوسیتته بسیاری از نژادهای بومی آسیایی می‌باشد (۱۶)، هر چند که در صورت افزودن اطلاعات سایر لوکوس‌ها، متوسط هتروزیگوسیتته افزایش خواهد یافت (۱). نتایج این پژوهش نشان داد که I- کاتالاز در هر دو جمعیت از فراوانی مطلوبی برخوردار می‌باشد، لذا می‌تواند در تعیین آزمون انساب مورد استفاده قرار گیرد. II- اسب‌های عرب ایرانی بررسی شده فاقد خون‌های اسب‌های مسابقه نظیر تروبرد، عرب و آنگلو عرب می‌باشند.

سپاسگزاری

از سرکار خانم فیروز و آقایان دکتر میریان، دکتر

- three Lithuanian native horse breeds. *Acta Agri. Scan.*, 53:180-186.
- 13-Kelly, E.p., C. Stormont, and Y. Suzuki, 1971; Catalase polymorphism in the red cells of horses. *Anim. Blood Grps and Biochem. Genet.* , 2:135-143.
- 14-Lubas. G., and G. Groce, 1980; Study of enzymes and Iso. enzymes in the horse according to breeds aptitude and productive ability . *Annali Della facolta Di Medicina Veterinaria Dispisa.* 33:159-173
- 15-Nei, M., 1978; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet.*, 89: 583-590.
- 16-Nozawa, K., T. Shotake, S. Ito and Y. Kawamodo, 1998. Phylogenetic relationship among Japanese native and alien horses estimated by protein polymorphisms. *J. Equine Sci.*, 9: 53-69
- 17- Nozawa, K., T. Shotake, and Y. Ohkura, 1975. Blood protein variations within and between the East Asian and European horse populations. *Trerzuchty ziichtysivl.* q3: 60-74.
- 18-Ouragh, L., Je. Meriau, JP. Braun, 1994; Genetic blood markers in Arabian , Barb and Arab- Barb horse in Morocco. *Anim. Genet.*, 25:45-47.
- 19-Podliachouck, L., H. Balbierz, M. Kaminski, M. Nikalajczuk, and A. Strzelecka, 1972. Immunogenetic study of the Mur-Island horses. *Proc. 12th European Conf. Anim. Blood Grps and Biochem. Polymorphysm.* Budapest, PP. 533-536.
- 20-Schleger, W., P. Kramser and E. Dworak, 1972; Catalase and ceruloplasmin polymorphism in three Austrian horse breeds. *Anim. Blood Grps and Biochem. Genet.* ,3(Suppl.1):48.
- 21-Shaw, C.R., and R. Prasad, 1970; Starch gel electrophoresis of enzymes a compilatin of recipes. *Biochem. Genet.* , 4:297-320.
- 22-Uzun, M., A. Karkhane, A. Kopar, 2001; Study of eight blood protein polymorphic system in Arabic horses from Turkey *Rus.J.Genet.* 37:1403 – 1408.
- 2-Bowling, A.T. and R.S. Clark, 1985; Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in The United States. *Anim. Blood Grps. and Biochem. Genet.*, 16:93-108.
- 3-Bowling , A.T., L. Gordon, M.C.T. Penedo, E. Wietum and J. Beebout .1990; A single gel for determing genetic variations of equine erythrocyte carbonic anhydrase (CA) and catalase (Cat). *Anim. Genet.*, 21:191-197.
- 4-Cholewinski, G., B. Gralak, E.G. Cothran, and E. Iwanczyk, .2002; Genetic diversity of two rare horse breeds from Poland. *Proc. 28 th ISAG Conf. Germany*, P.90
- 5-Cothran, E. G., 2002; Genetic diversity in feral horse and burro populations. *Proc. 28 th ISAG Conf. Germany*, P.92.
- 6-Cothran, E.G. and M. Kovac, 1997; Genetic analysis of the Croatian. Trakehner and Posavina horse breeds. *Zivocisna Vyroba*, 42:207-212. 7-Cothran, E.G., S.A. Santos, M.C.M. Mazza, T.L. Lear, J.R.B. Sereno, 1998; Genetics of the Pantanerio horse of the Pantanal region of Brazil. *Genetic and Mol., Bio.*, 21:343 – 349.
- 8-Cothran E. G., E. van Dyk. 1998; Genetic analysis of three South African horse breeds. *J. S. Afr. Vet. Association*, 69:120-125.
- 9-Cunningham, P., 1991; The genetics of Thoroughbred horses. *Sci . Am .* , 246:92 98
- 10-Diaz, S., F.N. Dulout and P. Peral- Garcia, 2002; Greater genetic variability in Argentine Creole than in Thoroughbred horses based on serum protein polymorphisms. *Genet. Mol. Res.* 1(3):261-265.
- 11-Ertugrul , O., B. Akyuz., and A. Kopar, 2002; Blood protein polymorphism in some native horse types in Turkey. *Proc. 28 th ISAG Conf. Germany*, P.94.
- 12-Juras, R., E.G. Cothran, R. Klimas, 2003; Genetic analysis of

