تشخیص ژنوتیپ ژن کاپاکازئین در گاو نژاد گلپایگانی با روش PCR/RFLPs

- **مجید اسماعیل‌زاده**، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی (ژنتیک و اصلاح دام)
- **سیروس زینلی**، عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران ph.D در ژنتیک انسانی
- **جواد توکلیان**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور وابسته به وزارت جهادسازندگی ph.D اصلاح نژاد و بیوتکنولوژی
- **علی اکبر محمدی**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، Ph.D در میکروبیوژلوی با گرایش مهندسی ژنتیک
- **اسدالله آقائی**، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی (ژنتیک و اصلاح دام)

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۵، تابستان ۱۳۷۶

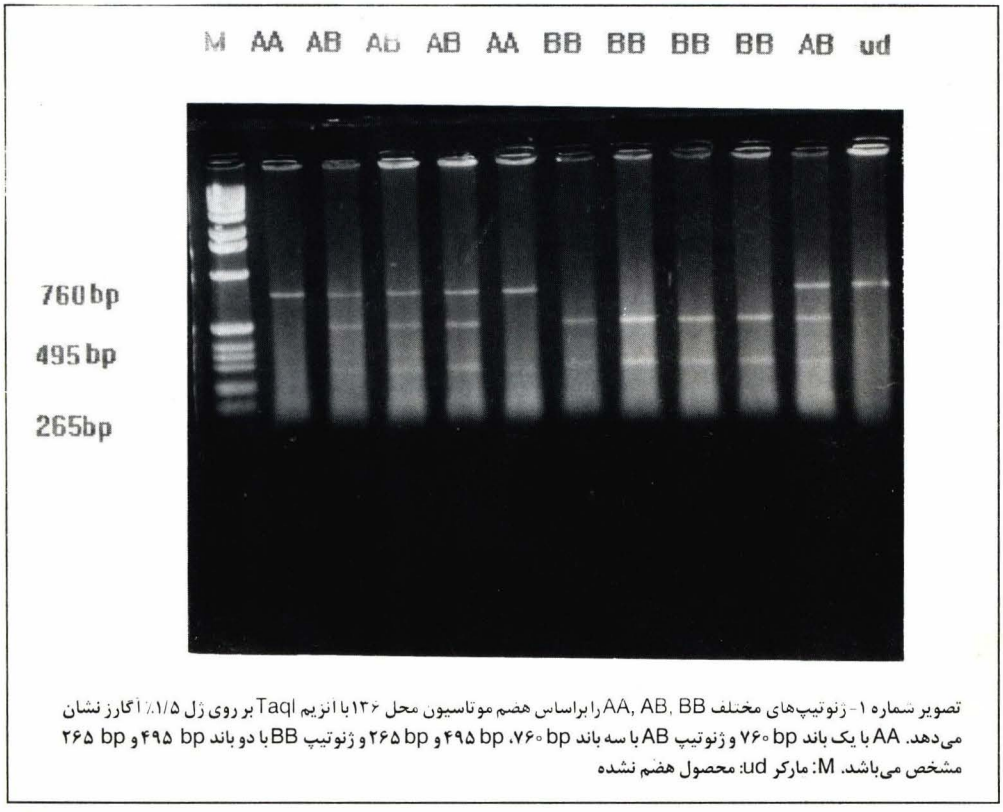
چکیده

تعیین ژنوتیپ کاپاکازئین در راستای اصلاح نژاد دام از اهمیت خاصی برخوردار است در تحقیق حاضر شناسائی ژنوتیپ کاپاکازئین با مطالعه الگوی مولکولی ژن، مورد نظر می‌باشد. در نخستین قدم دو آغازگر جهت تکثیر اگزون چهار که پلی‌مرفیسم اختصاصی هر الل در این منطقه قرار دارد طراحی و ساخته شد. نمونه‌های خون و اسپرم از تعداد ۱۲۷ گاو نژاد گلپایگانی گرفته شد و تخلیص DNA با سه روش فنل –کلرفرم و پروتئیناز K و جوشاندن انجام گرفت. DNA استخراج شده از هر نمونه به همراه آغازگرهای طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (RCR)[1] جهت تکثیر بخشی از ژن شامل اگزون چهار استفاده شد پس از بهینه کردن شرایط و ارزیابی کیفیت محصول تولید شده با دو آنزیم محدودگر اختصاصی برای الل B (Hind III, Taq I) مورد هضم قرار گرفت و براساس وجود و عدم وجود محل شناخت آنزیم بر روی رشته DNA تکثیر شده ژنوتیپ نمونه‌های فوق تعیین و درصد فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB، BB به ترتیب ۵۲٪، ۴۴٪ و ۴٪ محاسبه گردید.

مقدمه

اصلاح نژاد دام با استفاده از رکوردگیری از صفات و پارامترهای تولیدی بوسیله روش‌های کلاسیک جهت تولید نسل آینده مدتها معمول بوده است ولی در دو دهه اخیر تکنیک‌هائی ابداع شده است که امکان دسترسی به الگوی ژنتیکی موجود در رشته‌های DNA را به طور مستقیم فراهم می‌کند و با این متد می‌توان اختلافات بین افراد و ژنوتیپ‌های مختلف را از طریق بررسی مستقیم ژن‌ها شناسائی نمود و سرعت شناسائی را از چند سال به چند روز تقلیل داد. از ژن‌هائی که شناسائی پلی‌مرفیسم در داخل آن زیاد مورد توجه قرار گرفته است و در انتخاب گاو نر در دنیا به عنوان یک وزنه اقتصادی در نظر گرفته می‌شود ژن تولید کننده پروتئین کاپاکازئین در شیر است که نقش محافظتی میسل کازئین را در شیر دارا می‌باشد همچنین در کیفیت پنیر تولید شده و سرعت لخته شدن و راندمان تبدیل شیر به پنیر اهمیت بسزائی دارد. به طوری که در گاوهای با ژنوتیپ BB راندمان تبدیل شیر به پنیر تا ۸٪ بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر می‌باشد (۱، ۴ و ۸).

از مزیت کاربرد این تکنیک‌ها در تشخیص پروتئین‌های شیر می‌توان به سرعت و دقت بالای آن اشاره نمود همچنین بدون در نظر گرفتن سن و جنس دام می‌توان این تست را حتی بر روی سلول‌های منجمد اسپرم و یا سلول‌های آماده برای کاشت در گاو گیرنده نیز انجام داد لذا با انجام این کار می‌توان ژنوتیپ گوساله‌ها را قبل از تولد تشخیص داد در نتیجه با شناسائی ژن‌های مطلوب و انتخاب گاوهای ممتاز می‌توان فرکانس ژن‌های مطلوب را در جامعه افزایش داده و در نهایت باعث بهبود سطح تولیدات دامی شد (۱۲).



تصویر شماره ۱- ژنوتیپ‌های مختلف AA, AB, BB را براساس هضم موتاسیون محل ۱۳۶ با انزیم TaqI بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز نشان می‌دهد. AA با یک باند bp ۷۶۰ و ژنوتیپ AB با سه باند bp ۷۶۰، bp ۴۹۵ و bp ۲۶۵ و ژنوتیپ BB با دو باند bp ۴۹۵ و bp ۲۶۵ مشخص می‌باشد. M: مارکر ud: محصول هضم نشده

ژن کاپاکازئین به همراه ژن αs1, αs2, ß کازئین در یک مجموعه ژنی (Gene cluster) بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار دارد. طول این ژن ۱۳ kb[2] می‌باشد که دارای ۵ اگزون است که سه اگزون آن کد کننده پروتئینی با ۱۶۹ اسید آمینه می‌باشد (۲ و ۷).

این ژن دارای الل‌های A, B, C, E, F, G می‌باشد (۳، ۹ و ۱۱). که نوع A, B آن ارزش تشخیصی در امر اصلاح نژاد دارد. تفاوت بین‌الل‌ها به علت تغییر باز آدنین و سیتوزین در الل نوع A به سیتوزین و تیمین در الل B می‌باشد که موجب تغییر اسید آمینه Asp, Thr در الل A به Ala, Ile در موقعیت‌های ۱۳۶ و ۱۴۸ در الل B می‌شود (۴).

تکنیک RFLPs یا پلی‌مرفیسم در قطعات محدود شده از تکنیک‌های تشخیص پلی‌مرفیسم در ساختمان DNA می‌باشد که جنبه کلینیکی نیز پیدا کرده است. همانطوری که در قسمت ساختمان ژن کاپاکازئین گفته شد در موقعیت ۱۳۶ در الل A محل شناخت آنزیم وجود ندارد ولی هنگام اتفاق افتادن موتاسیون در این منطقه باز سیتوزین به تیمین تبدیل شده که توالی به صورت محل قابل شناخت برای آنزیم TaqI در الل B در می‌آید و از محل مشخص شده بر روی شکل بریده می‌شود. همچنین در موقعیت ۱۴۸ در الل A که محل شناخت آنزیم HinfI وجود دارد در زمان وقوع موتاسیون در این ناحیه باز آدنین به سیتوزین تبدیل می‌شود که موجب از بین رفتن محل شناخت آنزیم HinfI و ایجاد یک محل شناخت آنزیم جدید Hind III می‌کند که برای الل B اختصاصی می‌باشد (۵ و ۱۰).

مواد و روشها

- نمونه گیری: از تعداد ۱۲۷ گاو گلپایگانی از هر دو جنس نمونه خون وریدی توسط سوزن‌ونوجکت‌حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از مناطق دلیجان ،نطنز،گلپایگان واصفهان‌گرفته‌شد.

طراحی آغازگرها

محل قرارگیری آغازگرها به گونه‌ای انتخاب شدند تا اولاً بتوانند در دو طرف منطقه چند حالتی (RFLP)[3] قرار گیرند و همچنین بعد از هضم آنزیمی، قطعات ایجاد شده بر روی ژل آگارز به خوبی از هم تفکیک پذیرباشند چندین پرایمر انتخاب و با برنامه‌های کامپیوتری (Oligo, DNAsis, Amplify) مورد بررسی قرار گرفتند و بهترین آغازگرها انتخاب شدند.

5′-CTGGCTGACTCTTGCGACC-3′

آغازگر جلودار با ترتیب توالی بر روی اینترون ۳ و در فاصله ۶۰ bp از اگزون چهار و آغازگر برگشتی با توالی 5′-CTGGCTGACTCTTGCGACC-3′ انتخاب گردیدند (شکل شماره ۱).

خالص‌سازی DNA

DNA ژنومیک از ۰/۵ میلی‌لیتر خون تخلیص گردید. برای این کار نخست گلبولهای قرمز توسط بافر لیز کننده حاوی (Sucrose ۰/۳۲ مولار ,Tris-Cl ۱۰ میلی‌مولار ,MgCL2 ۵۰ میلی‌مولار ,TritonX100 ۱٪) از بین رفته و با سانتریفوژ کردن به مدت ۳ دقیقه در ۶۰۰۰ دور گلبولهای سفید را جدا نموده، گلبولهای سفید را به مدت سه ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در مجاورت بافر هضم کننده (NaCl ۱۰۰ میلی‌مولار ,Tris-Cl ۱۰ میلی‌مولار ,EDTA ۲۰ میلی‌مولار ,SDS ۲٪) قرار داده سپس مراحل تخلیص با فنل کلروفرم را روی آن انجام داده سپس با اتانل ۱۰۰٪ DNA را رسوب داده با اتانل ۷۰٪ شستشو داده سپس پلیت حاوی DNA را در آب یا TE (۱۰ میلی‌مولار تریس و ۱ میلی‌مولار EDTA) حل نموده جهت PCR از آن استفاده گردید.

شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

جهت تکثیر قطعه DNA مورد نظر محدود به دو پرایمر طراحی شده واکنش به طریقه زیر آماده شد. مقدار DNA مورد استفاده در واکنش بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ نانوگرم ۰/۵ میکرومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از Tris-Cl, dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، MgCL2 ۱/۵ میلی‌مولار و KCl ۵۰ میلی‌مولار بعلاوه ۰/۵ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، حجم هر واکنش ۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

برنامه سیکل حرارتی مورد استفاده برای PCR به شکل زیر است:

دمای ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه جهت واسرشته شدن اولیه، ۶۹ درجه سانتیگراد بمدت ۱ دقیقه جهت طویل شدن و ساخت رشته جدید توسط آنزیم و تعداد سیکل مورد استفاده ۳۰ سیکل می‌باشد.

هضم آنزیمی

عمل هضم آنزیمی در حجم ۳۰ میکرولیتر با مصرف ۵ واحد آنزیم تحت شرایط بافری و دمای مناسب برای هر آنزیم انجام شد.

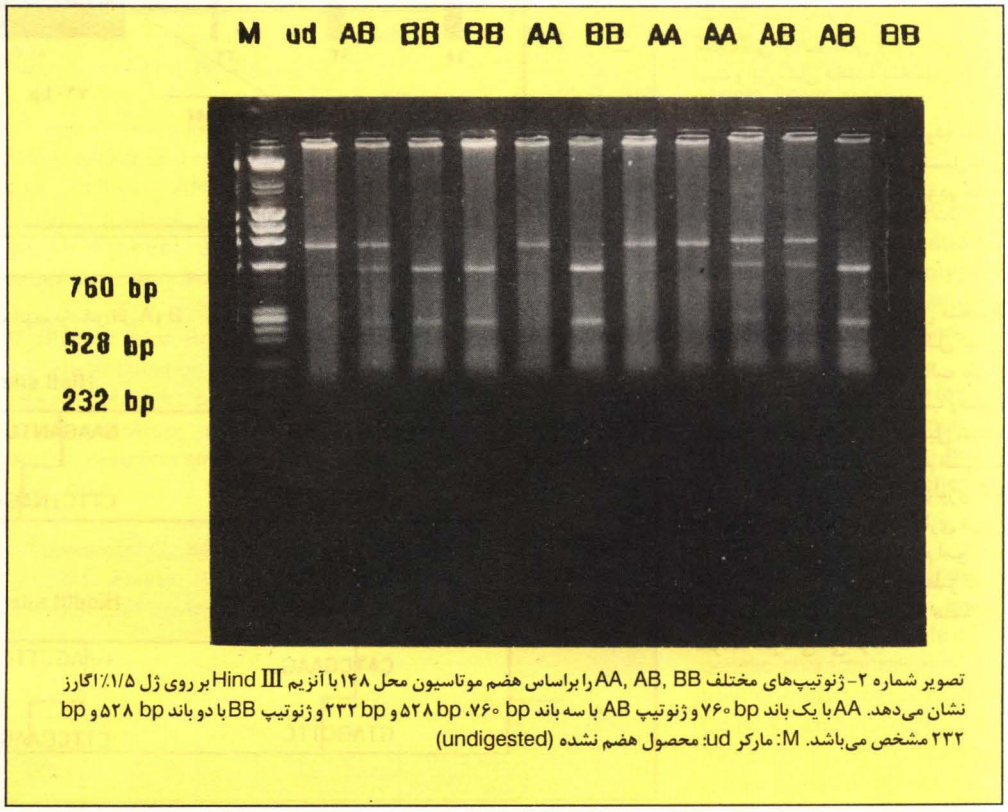
الکتروفورز: جهت آنالیز محصول هضم آنزیمی ژل ۱/۵٪ آگارز تهیه و نمونه‌ها به همراه بافر سنگین کننده داخل حفرات ژل قرار داده شد و به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۵۵ الکتروفورز گردید.

جهت رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید هنگام ساخت ژل استفاده شد و پس از پایان الکتروفورز ژل را بر روی لامپ UV قرار داده و توسط دوربین پلاراید عکس‌برداری شد.

هنگام هضم نمونه‌های محل شناخت آنزیم TaqI در صورت هموزیگوت بودن، محصول PCR به دو قطعه شکسته می‌شود و دو باند bp[4] ۴۹۵ و ۲۶۵ bp و در صورت هتروزیگوت بودن کروموزوم‌ها سه باند bp ۷۶۰ bp ۴۹۵ و ۲۶۵ bp روی ژل مشاهده می‌گردد.

برای هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم TaqI ابتدا ۳۰ میکرولیتر از محصول PCR را با ۵ واحد آنزیم در شرایط بافری خاص آنزیم در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت آنکوبه گردید.

همچنین هنگام هضم آنزیمی با آنزیم Hind III در صورت وجود محل



تصویر شماره ۲- ژنوتیپ‌های مختلف AA, AB, BB را براساس هضم موتاسیون محل ۱۴۸ با آنزیم Hind III بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز نشان می‌دهد. AA با یک باند bp ۷۶۰ و ژنوتیپ AB با سه باند bp ۷۶۰، bp ۵۲۸ و bp ۲۳۲ و ژنوتیپ BB با دو باند bp ۵۲۸ و bp ۲۳۲ مشخص می‌باشد. M: مارکر ud: محصول هضم نشده (undigested)

شناخت آنزیم در حالت هموزیگوت محصول PCR به دو قطعه bp ۵۲۸ و bp ۲۳۲ و در صورت هتروزیگوت بودن سه قطعه bp ۷۶۰، bp ۵۲۸ و bp ۲۳۲ بر روی ژل مشاهده می‌شود. برای هضم آنزیم ۳۰ میکرولیتر محصول PCR را با ۵ واحد آنزیم Hind III در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ ساعت آنکوبه گردید.

نتایج

یک قطعه bp ۷۶۰ از ژن کاپا کازئین شامل اگزون ۴ توسط PCR تکثیر شد پس از هضم آنزیمی و الکتروفورز DNA حاصل بر روی ژل ۱/۵٪ آگارز نتایج بر روی دو موتاسیون واقع شده در موقعیت TaqI و Hind III مورد آنالیز قرار گرفت.

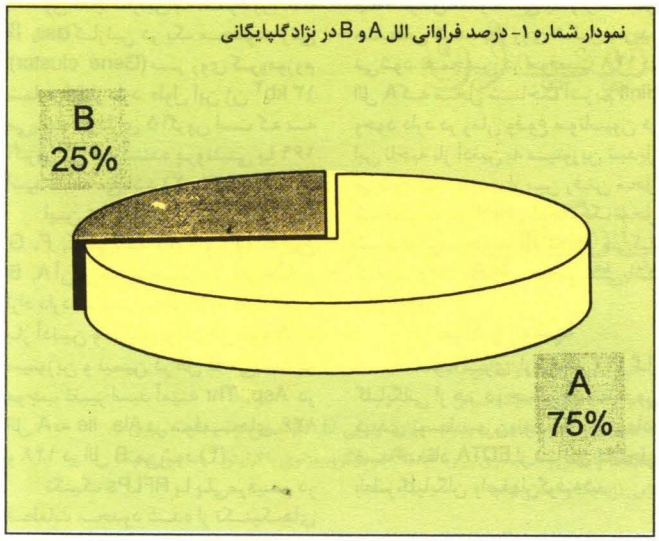
بر روی نمونه‌های آنالیز شده با موتاسیون واقع در محل شناخت آنزیم TaqI موتاسیون ۱۴۸ که اختصاصی الل B و محل شناخت آنزیم Hind III می‌باشد نیز بررسی گردید.

در این تحقیق ۱۲۷ گاو نژاد گلپایگانی از هر دو جنس نر و ماده مورد آزمایش برای هر دو موتاسیون واقع در محل شناخت آنزیم TaqI و Hind III قرار گرفتند که به عبارتی ۲۵۴ کروموزوم و در مجموع ۵۰۸ محل شناخت آنزیم بر روی اگزون چهار بررسی گردید که براساس نتایج به دست آمده زیر فراوانی ژنی نمونه‌ها در نمودار شماره ۴ آمده است.

بحث

نتایج نشان داد که در الل B در این نژاد همواره دو محل شناخت آنزیم TaqI, Hind III وجود دارد و سه ژنوتیپ AA, AB, BB با هر یک از آنزیم‌های محدود کننده مورد استفاده در این تحقیق قابل شناسائی است و با بررسی هر دو موقعیت می‌توان احتمال خطای آزمایش را از بین برد و به طور قطع بر روی ژنوتیپ قضاوت نمود.

نمودار شماره ۱- درصد فراوانی الل A و B در نژاد گلپایگانی



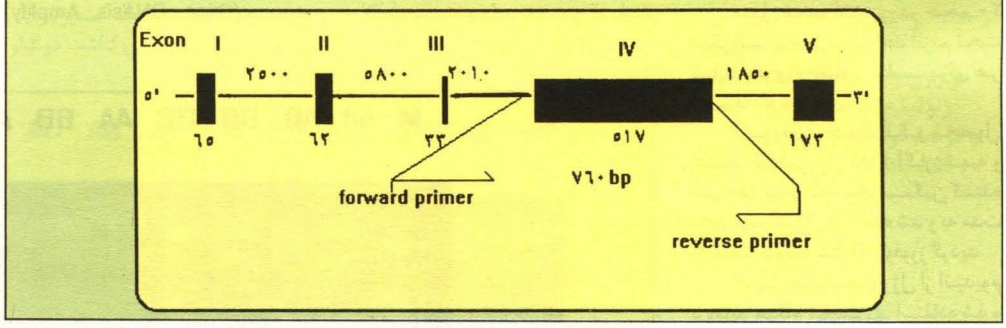
طبق مشاهده نتایج به دست آمده در نمودار شماره (۲) ۴۴٪ ژنوتیپ AB نشان دهنده پتانسیل خوب این نژاد است ولی فراوانی ژنوتیپی BB حدود ۴٪ است که در حد نسبتاً پائین قرار دارد و این لزوم انجام تست کاپاکازئین را بر روی گاو نر در برنامه‌های تولید مثلی را نشان می‌دهد و با توجه به ژنوتیپ بالای AA حدود ۵۵٪ نیاز به برنامه‌های مدون اصلاحی با لحاظ نمودن ژنوتیپ کاپا کازئین در این برنامه‌ها می‌باشد و با مشاهده نمودار (۳) که فراوانی ژنی الل‌های A و B را در نژادهای مختلف با نژاد گلپایگانی مقایسه کرده است مشخص شده که فراوانی اللی B در نژاد گلپایگانی از هلشتاین و ایرشایر بالاتر است و این نشان دهنده پتانسیل خوب این نژاد می‌باشد.

امید است که با بررسی توده دامی کشور هر چه بیشتر به پتانسیل‌های ذخائر دامی شناخت پیدا کرده و در حفظ و اصلاح آن بکوشیم.

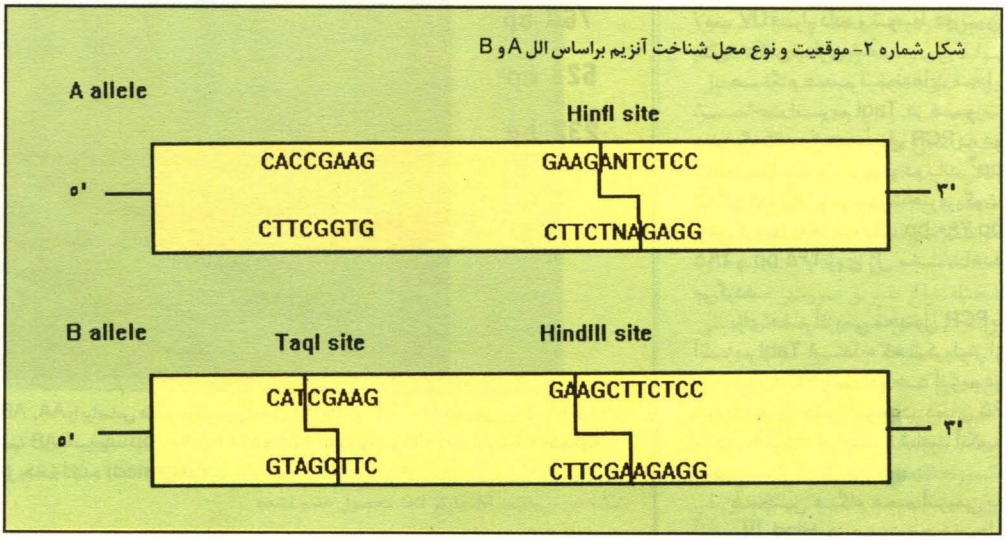
سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات علوم دامی کل کشور که پروژهٔ ارائه شده را در قالب طرح تحقیقاتی آن مؤسسه به تصویب رسانده و بخشی از هزینه پروژه را متقبل شدند همچنین از مسئولین محترم انستیتو پاستور خصوصاً بخش بیوتکنولوژی که در طول انجام کار از هیچ همکاری دریغ نکردند. و از مسئولین محترم امور دام اصفهان، دلیجان، گلپایگان و نطنز که در امر نمونه گیری صمیمانه همکاری نمودند قدردانی می‌شود.

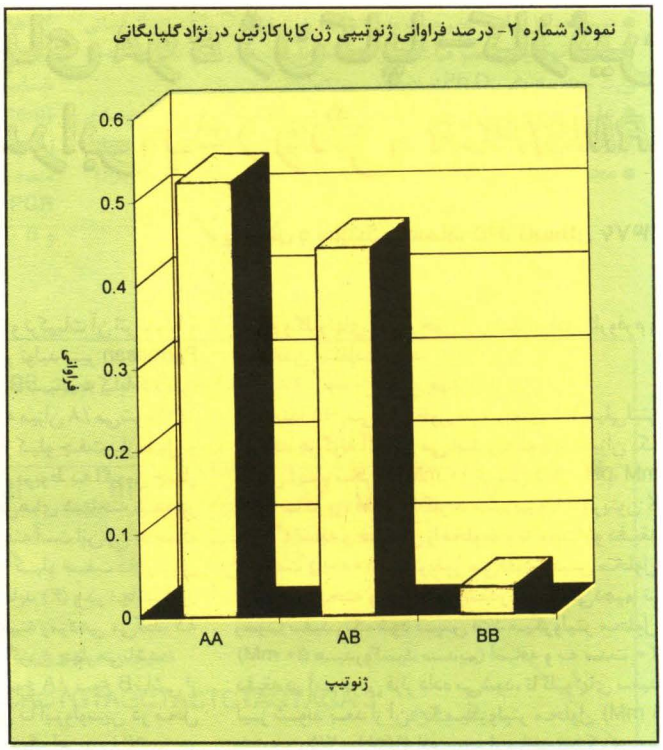
شکل شماره ۱- شماتیک ژن کاپاکازئین و محل قرارگیری پرایمرها برای انجام PCR



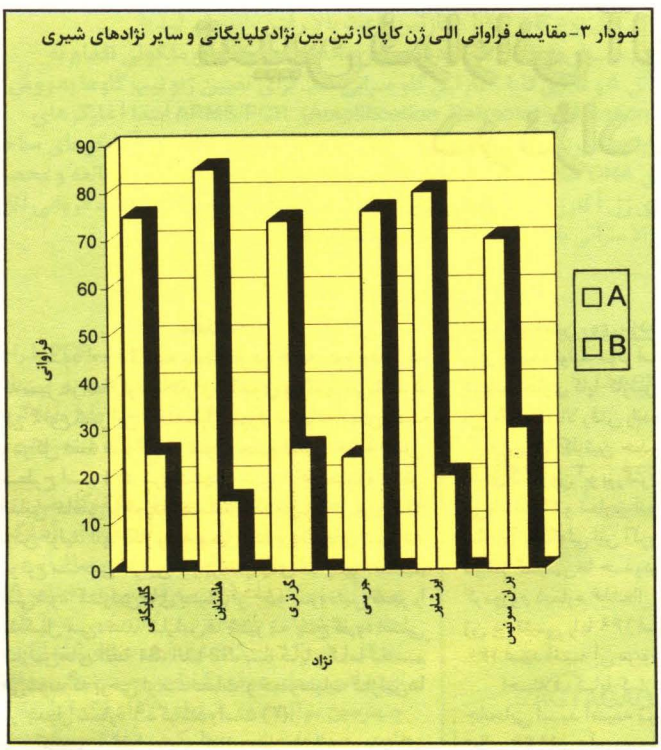
شکل شماره ۲- موقعیت و نوع محل شناخت آنزیم براساس الل A و B



نمودار شماره ۲- درصد فراوانی ژنوتیپی ژن کاپاکازئین در نژاد گلپایگانی



نمودار ۳- مقایسه فراوانی اللی ژن کاپاکازئین بین نژاد گلپایگانی و سایر نژادهای شیری



genomic variants by the polymerase chain reaction method. Animal Genetics 21. 215-16.

11- Erhardt G. 1996. Detection of a new K-Casein variant in milk of pinzgauer cattle. Animal Genetics 27. 105-7.

12- Medrano J. F. and Aguilar-Cordova E. 1990. Genotyping of bovine kappa casein loci following DNA sequence amplification. Biotechnology 8. 144-5.

Gorodetsky S.I. 1988. Isolation and charaterization of the bovine K-Casein gene. Europian journal of Biochemistry 178, 395-401.

8- Kumosinski T.F., Gregoryking, and H.M. Farrell, Lre. 1994. AN energy minimized casein sub micelle working model. Journal of protein chemistry Vol. 13 no., 8.

9- Shlee P. and Rottmann O. 1992. Identification of bovine k casein using the polymerase chain reaction. Journal of Animal Breeding and Genetics 109, 153-5.

10- Denicourt D., Sabour. M. P. and MC Allister A. J. 1990. Detection of bovine K-casein

4- P. F. Fox. 1992 Advanced dairy Chemistry: Proteins-1 London, U.K, Elsevier Applied science.

5- Schlieben S., Erhardt G., and Senft G 1991. Genotyping of bovine K-Casein following DNA sequence amplification and direct sequencing of K-CNEPCR product. Animal Genetics 22, 333-347.

6- Pinder S.J., Skidmore c.j. Perry B. N. and Savvad. 1991. Analysis of polymorphism in the bovine casein genes by use the polymerase chain reaction. Animal Genetics 22, 11-20.

7- Alexander I.J. Stewart A.F. Mackinlag A. G. Kapelinskaya T.V. Tkach T.M. and

پاورقی‌ها

1- PCR= Polymerase chain reaction
2- Kb= Kilo base pair
3- RFLP= Restriction Fragment Length Polymorphism
4- bp= base pair

منابع مورد استفاده

1- Zadworney D., and Kuhnlein U., 1990. The identification of the kappa casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction.

2- Eggen A., and Fries R., 1995. An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome. Animal Genetics 26, 215-236.

3- E-M. Prinzenberg., S Hiesdleder. T Ikonen, and G Erhardt. 1996. Molecular genetic characterization of new bovine kappa casein alleles CSN3F and CSN3G and genotyping by PCR/RFLP, Animal Genetics 27, 347-349.

نمودار شماره ۴- فراوانی ژنی نمونه‌ها

فراوانی ژنوتیپی	AA	AB	BB	فراوانی ژنی	A	B
موقعیت Taq I	۰/۵۲۴	۰/۴۴۳	۰/۳۲	موتاسیون محل Taq I	۰/۷۴۵۵	۰/۲۵۳۵
موقعیت Hind III	۰/۵۲۴	۰/۴۴۳	۰/۰۳۲	موتاسیون محل Hind III	۰/۷۴۵۵	۰/۲۵۳۵