

## مقایسه چندشکلی موجود در ناحیه اینترون ۲ ژن لپتین (Leptin) در گاوهای تالشی و هلشتاین با استفاده از تکنیک PCR-RFLP

علیرضا دهناد<sup>۱</sup>، آرش جوانمرد<sup>۱</sup>، فضل‌اله افراز<sup>۲</sup> و قربان الیاسی زرین‌قبایی<sup>۳</sup>

### چکیده

اختلافات عمده‌ای در تولید شیر، گوشت و صفات تولیدمثلی گاوهای تالشی و هلشتاین مشاهده می‌شود. در این تحقیق به منظور شناخت مکانیزم‌های مولکولی به وجود آورنده این تفاوت‌ها در سطح ژن‌ها، چندشکلی موجود در ناحیه اینترون ۲ ژن لپتین در دو جمعیت گاو مذکور مورد مقایسه قرار گرفت. برای این منظور استخراج DNA به کمک روش تغییر یافته نمکی از نمونه‌های خون ۱۰۰ رأس گاو (۷۰ رأس گاو تالشی و ۳۰ رأس گاو هلشتاین) صورت گرفت و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت بازی از اینترون ۲ ژن لپتین انجام گرفت. قطعه تکثیر شده سپس به وسیله آنزیم محدودالایتر Sau3AI جهت تشخیص ژنوتیپ‌های این ژن مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AB و BB به ترتیب ۶۱/۴۲، ۳۱/۴۲ و ۷/۱۶ درصد در گاوهای تالشی و ۵۶/۷، ۴۳/۳ و صفر درصد در گاوهای هلشتاین به دست آمد. فراوانی‌های آللی برای آلل‌های A و B نیز به ترتیب ۷۷/۱ و ۲۲/۹ درصد در گاوهای تالشی و ۷۸/۳ و ۲۱/۷ درصد در گاوهای هلشتاین برآورد گردید. در هیچ کدام از دو جمعیت مورد مطالعه از نظر جایگاه ژنی لپتین تعادل هاردی-واینبرگ برقرار نبود. هم‌چنین هتروزیگوتی پایین بود و این امر ممکن است در آینده مشکلات اصلاح نژادی را سبب شود.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، ژن لپتین، تالشی، هلشتاین، گاو، PCR-RFLP

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۵

۱- عضو هیأت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور

۲- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۳- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی

## مقدمه و بررسی منابع

لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی می باشد که از بافت های آدیپوز به خصوص آدیپوز سفید، ترشح می شود. این پروتئین اولین بار در موش کشف شد. اعتقاد بر این است که لپتین اصلی ترین کنترل کننده اشتها، متابولیسم انرژی، باروری، ایمنی و افزایش وزن می باشد (۸ و ۱۷). ژن لپتین با استفاده از تکنیک Positional Cloning هویت یابی و تعیین ساختار شده است و جهش هایی در روی این ژن باعث بروز فنوتیپ چاقی در موش ها شده است.

ژن لپتین دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون بوده و در کل ۵۰۱۰ نوکلئوتید طول داشته و اینترون ۲ آن ۲ کیلوباز می باشد. ناحیه پروموتور این ژن ۳ کیلو باز می باشد که تنها ۲۱۷ جفت باز آن برای تظاهر ژن لپتین در بافت های چربی مورد نیاز است (۱۴). mRNA ژن چاقی ۲۴۴۷ جفت باز است که شامل توالی کدکننده کامل است. cDNA ژن Ob حدود ۳/۳ کیلو باز است. دو نوع cDNA متفاوت در این ژن شناخته شده است که علت آن، تفاوت در وجود یا فقدان کدون گلوتامین در موقعیت +۴۹ می باشد. کروموزوم ژن لپتین در گاو روی کروموزوم ۶، در انسان روی کروموزوم ۷ و در موش روی کروموزوم ۶ قرار دارد. گیرنده ژن لپتین در خوک، گاو و انسان به ترتیب روی کروموزوم های ۱، ۳ و ۶ قرار دارد (۱۳). تزریق خارجی هورمون لپتین به موش های دارای ژنوتیپ Ob/Ob باعث بهبود تولیدمثل و وضعیت هورمون های درون ریز<sup>۱</sup>، کاهش مصرف خوراک و اتلاف وزن می شود (۱۱). لپتین از سلول های بافت چربی سفید<sup>۲</sup> به داخل خون ترشح می شود. لپتین به

مغز منتقل شده و در آنجا به وسیله تحریک و یا ممانعت از رها شدن نوروپپتیدهایی چون نوروپپتید Y، (NPY) عمل می کند که NPY مصرف خوراک، تولید حرارت و فعالیت فیزیکی را در جوندگان تحریک می کند که نتیجه چنین اعمالی کاهش توده چربی یا تحریک بعضی از سیگنال های آندوکراین یا اتوکراین دیگر است که سنتز لپتین و ترشح آن را به وسیله سلول های چربی ممانعت می کند. هم چنین لپتین ممکن است روی متابولیسم و عمل بافت های محیطی مانند کبد و ماهیچه اسکلتی به خوبی سلول های چربی اثر کند (۳). لپتین عامل تنظیم کننده مهمی در عملکرد تولید مثلی است و تأثیرات مستقیمی روی هیپوتالاموس، هیپوفیز و تخمدان دارد. این اثرات از توانایی لپتین در افزایش هورمون آزادکننده گنادوتروپین ها (GRH) از هیپوتالاموس، هورمون های لوتئینه کننده (LH) و هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH) از هیپوفیز پیشین ناشی می شود. جالب است که غلظت بالای لپتین، رهاسازی هورمون ها را کاهش می دهد (۱۲ و ۱۶). بنابراین هیپوتالاموس و هیپوفیز جایگاه و حالت تغذیه ای و مقدار ذخیره متابولیکی غذایی را توسط لپتین حس می کنند. لپتین برای بهینه کردن تولید مثل لازم است، اما زیادی آن باعث چاقی می شود و ممکن است تأثیر آن بر عملکرد تولید مثلی کاهش یابد (۶). لیندرسون<sup>۱</sup> و همکاران (۱۹۹۸)، مکان های کنترل کننده صفات کمی (QTL) برای صفات تولید شیر را در ۸/۸۲، درصد چربی را در ۷۵ و پروتئین شیر را در فاصله ۹۵ سانتی مورگان از ژن لپتین مکان یابی کردند (۱۰). لیفرس<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که

باز از اینترون دو ژن لپتین گاوی طراحی شده بودند (شکل ۱). در داخل این قطعه دو ناحیه برشی برای آنزیم **Sau3AI** (یک ناحیه تک‌شکل و یک ناحیه اصلی چندشکل) وجود دارد (۲). توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بودند از:

5'-TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT-3'  
5'-GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT-3'

برای به دست آوردن نتایج مطلوب در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۲۰-۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومولار **1X PCR Buffer dNTP**، ۱/۵ میلی‌مولار **MgCl<sub>2</sub>** به همراه ۰/۵ واحد آنزیم **Taq DNA Polymerase** مورد استفاده قرار گرفت. برنامه حرارتی ۹۴ درجه سلسیوس جهت واسرشته شدن **DNA** به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سلسیوس جهت اتصال پرایمرها به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس جهت سنتز قطعه مورد نظر به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ چرخه به کار برده شد. هضم آنزیمی در حجم ۳۰ میکرولیتر با مصرف ۱۵ واحد آنزیمی تحت شرایط بافری و دمای مناسب با استفاده از آنزیم برشی **Sau3AI** (دارای سایت برشی **GATC**) صورت گرفت. جهت مشاهده محصولات **PCR** از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸٪ و قدرت ۱۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت استفاده گردید و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام گرفت. برای برآورد فراوانی آل‌ها، محاسبه هتروزیگوسیتی و آزمون کای اسکور ( $\chi^2$ ) از نرم افزار **PopGene<sub>32</sub>** و روابط استاندارد محاسباتی استفاده گردید.

### نتایج و بحث

همان‌گونه که از روی توالی موجود در بانک ژن برای ژن لپتین انتظار می‌رفت قطعه ۴۲۲ جفت بازی مورد نظر با صحت کامل تکثیر گردید (شکل ۲).

تلیسه‌های با ژنوتیپ **AB**، ۱/۳۲ کیلوگرم در روز شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ **AA** تولید می‌کنند (۹). آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که آل **B** باعث افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش بیش از حد باروری در گاوهای هلشتاین می‌گردد. تحقیق حاضر به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های ژن لپتین و فراوانی آللی آن در گاوهای نژاد تالشی و مقایسه آن با نژاد هلشتاین به کمک نشان‌گرهای مولکولی طراحی و اجرا گردید.

### مواد و روش‌ها

از تعداد ۷۰ راس گاو تالشی پراکنده در استان گیلان، از هر دو جنس نمونه خون گرفته شد. ۳۰ نمونه خون نیز از گاوهای هلشتاین ایستگاه اصلاح نژاد شمال‌غرب و غرب کشور و گاوداری‌های مناطق اطراف اخذ گردید. با توجه به این‌که نمونه‌های خون از مکان‌های مختلف اخذ شده است لذا انتظار می‌رود که در بین نمونه‌ها رابطه خویشاوندی قابل توجهی حاکم نباشد. خون‌گیری در گاوهای بزرگ از ورید دمی و در گوساله‌ها از ورید وداجی با استفاده از لوله‌های حاوی خلا و ماده ضد انعقاد **EDTA** صورت گرفته و همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج **DNA** در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. استخراج **DNA** بر اساس روش تغییر یافته نمکی انجام گردید و به دنبال آن کمیت و کیفیت **DNA** استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتوفوتومتری و ژل مونیتورینگ مورد بررسی قرار گرفت (۴). جهت حصول محصولات مناسب در واکنش زنجیره پلی‌مرز از ۲۰۰-۱۰۰ نانوگرم **DNA** استفاده گردید. آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش هر کدام ۲۴ نوکلئوتید طول داشتند (۹) که برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۲۲ جفت

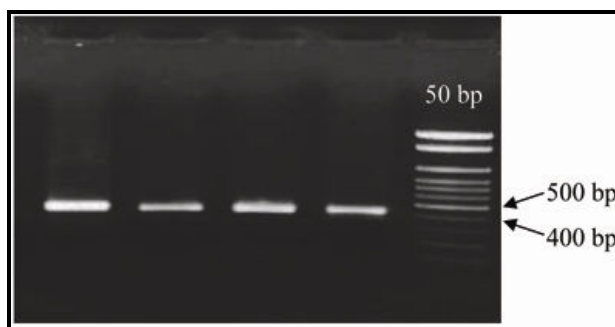
دهناد، ع. مقایسه چندشکلی موجود در ناحیه ایترون ۲ ژن لپتین...

(جدول ۱). با توجه به این که جایگاه ژنی مورد مطالعه دارای دو شکل آلی می باشد به نظر می رسد که تعداد نمونه برای برآورد فراوانی های محاسبه شده مناسب باشد. در هیچ کدام از دو جمعیت مورد مطالعه تعادل هارد- واینبرگ در مورد ژن لپتین مشاهده نشد. عدم وجود تعادل هاردی- واینبرگ، هتروزیگوتی پایین Nei و تعداد آلل مؤثر پایین (جدول ۱) نشان دهنده این است که جمعیت نمونه برداری شده به مرور به سوی هم خونی سوق داده می شود که این امر ممکن است در آینده مشکلات اصلاح نژادی را سبب شود.

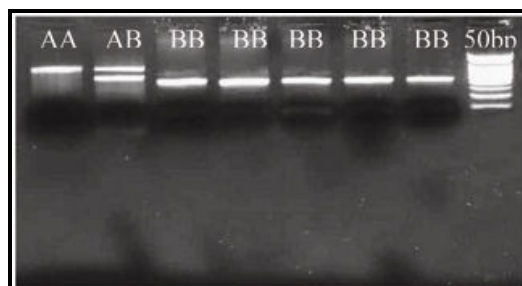
هنگام هضم آنزیمی محصولات PCR، در صورت هتروزیگوت بودن (AB)، قطعات ۳۹۰، ۳۰۳، ۸۸ و ۳۲ جفت بازی، در صورت هموزایگوسیتی AA، قطعات ۳۹۰ و ۳۲ و در صورت هموزایگوسیتی BB، قطعات ۳۰۳، ۸۸ و ۳۲ جفت بازی به دست آمد (شکل ۳). فراوانی ژنوتیپ های AA، AB و BB به ترتیب ۶۱/۴، ۳۱/۵ و ۷/۱ درصد در گاوهای تالشی و ۴۳/۳ و ۵۶/۷ درصد در گاوهای هلستاین به دست آمد. فراوانی های آلی نیز برای آلل های A و B به ترتیب ۷۷/۱، ۲۲/۹ درصد در گاوهای تالشی و ۷۸/۳ و ۲۱/۷ درصد در گاوهای هلستاین برآورد گردید

**TGGAGTGGCTTGTATTTTCTTCTCCCAACAAGATC**TTCCCAACCCAGGGATTGAA  
CCTGGGTCTTCTAAATTGCAGGCAGATTCTTTACCGTCTGAGCCACCAGGGAAACCCA  
TAAGAC**CC**TGTGAAGACTATTAAGATAGTCATCTAGACAACAAGACTATCTTAATAG  
TCTTCATAAGGTCCTCATGAGACTAAATTAGATAAAGCAAGTGACCCTCCCTGAATA  
CCCTTGCAGAACCAGAACTGTGTGTGCCCTCTTTCAAGGTTTTTCAGTCATGACTTTTG  
ATAGCTTCCACCTTAAAAGCCAACCTTGCTCACCTGCGTGGAGCAATCTGGAGACTTC  
CACATCTCTGACCACTCTATATTTCTAACAGTGGCTTTGGGAAGCCAGAGAGC**AGT**  
**TAGGTAGCCAGAAGCGGGGAC**

شکل ۱- توالی ناحیه مورد نظر از ژن لپتین جهت تکثیر به همراه محل جهش و نواحی برش برای آنزیم Sau3AI



شکل ۲- تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت باز از ژن لپتین در کنار سایز مارکر 50bp



شکل ۳- ژنوتیپ های مختلف ژن لپتین پس از هضم آنزیمی

جدول ۱- تعداد ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی برای ژن لپتین در گاوهای تالشی و هلشتاین

نژاد	تعداد ژنوتیپ مشاهده شده			فراوانی ژنوتیپ مشاهده شده			تعداد آلل شاخص هتروزیگوتی			$\chi^2$	
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	مؤثر	شانون	نی		
تالشی	۴۳	۲۲	۵	۶۱/۴	۳۱/۵	۷/۱	۲۲/۹	۱/۵۳	۰/۵۴	۰/۳۵	۰/۹۵*
هلشتاین	۱۷	۱۳	۰	۵۶/۷	۴۳/۳	۰	۲۱/۷	۱/۵۱	۰/۵۱	۰/۳۴	۲/۰۹*

نسبت به گاوهای تالشی را به ژن لپتین نسبت داد.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که در هیچ‌کدام از دو جمعیت گاو مورد مطالعه تعادل هارد- واینبرگ در مورد ژن لپتین وجود نداشته و هتروزیگوتی و تعداد آلل مؤثر پایین است. این امر نشان‌دهنده احتمال افزایش هم‌خونی در آینده بوده و ممکن است مشکلات اصلاح نژادی را سبب شود.

با توجه به این تحقیق، فراوانی آللی در هر دو نژاد تقریباً یکسان بود و نمی‌توان هیچ نظری در مورد علت ژنتیکی اختلاف تولید شیر دو نژاد هلشتاین و تالشی ارائه نمود. از طرفی اگرچه ارتباط چندشکلی موجود در این ناحیه با صفات لاشه مطالعه شده است (۱۸) ولی نمی‌توان این ارتباط ژنتیکی را به نژادهای بومی تعمیم داد. با توجه به پتانسیل بالای ژنتیکی دام‌های بومی کشور به‌خصوص در مورد مقاومت به بیماری‌ها و سازگاری با شرایط نامناسب جوی و مدیریتی، ضرورت حفظ و استفاده از این پتانسیل‌ها احساس می‌شود.

### سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کارشناسان محترم امور دام استان‌های آذربایجان شرقی و گیلان که ما را صمیمانه در تهیه نمونه‌های خون یاری فرمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مختلف، آلل B را به‌عنوان آلل خوب و مطلوب جهت اصلاح نژاد در جهت افزایش تولید شیر معرفی کرده‌اند. لیفرس و همکاران (۲۰۰۲) ژنوتیپ AB لپتین را مقدار تولید شیر مرتبط دانسته و تولید شیر در ژنوتیپ AB را بیشتر از ژنوتیپ AA معرفی کردند (۹). به گزارش آن‌ها، ژنوتیپ AB ۱/۳۲ کیلوگرم شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ AA در هر روز تولید می‌کند و در قبال آن ۰/۳۷ کیلوگرم خوراک بیشتری هم مصرف می‌کند. انتظار می‌رود که این رابطه در این تحقیق هم صادق باشد و اگر به فراوانی ژنوتیپی به‌دست آمده در دو نژاد توجه شود انتظار می‌رود که تولید شیر در گاوهای هلشتاین بیشتر از گاوهای تالشی باشد که در حالت کلی هم‌چنین است.

هم‌چنین جوانمرد<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۸) فراوانی آلل B را در دو جمعیت از گاو سرابی که در شهرستان‌های سراب و شبستر نگهداری می‌شدند به ترتیب ۵۸٪ و ۳۷٪ برآورد نمودند (۷). با وجود این‌که میانگین تولید شیر روزانه در گاو سرابی (۷/۶ کیلوگرم) بیشتر از گاو تالشی (۴-۴/۵ کیلوگرم) گزارش شده است (۱) و فراوانی آللی به‌دست آمده برای آلل B در جمعیت گاو سرابی هم بیشتر از گاو تالشی گزارش شده است، لیکن به‌دلیل عدم وجود مدرک علمی، شاید نتوان بالا بودن تولید گاو سرابی

## منابع

- ۱- توکلیان، ج. ۱۳۷۸. نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور بومی ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، ۴۶ صفحه.
2. Almeida, E., A. Almeida, J. C. F. Morqes and T. weimer. 2003. Molecular marker in the Leptin gene and reproductive performance of beef cattle. *Animal Genetic and Breeding* 120 (2): 106.
  3. Belby, C. R. and L. Macmillan. 1998. Comparative study of ovarian function in American Holstein. *Journal of Dairy Science* 22: 2-8.
  4. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (3): 495-503.
  5. Chenoweth, P. J. 1994. Aspect of reproduction in female *Bos indicus* cattle. A review of *Australian Veterinary Journal* 71: 422-426.
  6. Frubeck. G. S., A. Jebb and A. M Prentic. 1998. Review: Leptin physiology and pathophysiology. *Clinical Physiology* 48 (5): 399-419.
  7. Javanmard, A., M. R. Mohammadabadi, G. Elyasi Zarringabayi, A. A. Gharahedaghi, M. R. Nassiry, A. Javadmanesh and N. Asadzadeh. 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine Leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics* 44 (4): 495-497.
  8. Lagonigro, R. P., F. Wiener, J. A. Pilla and J. Woolliams. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine Leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetic* 34 (5): 371-374.
  9. Liefers, S. C. M., F. W. Tepas and R. F. Veerkamp. 2002. Association between Leptin gene polymorphism and protein, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein. *Journal Dairy Science* 85: 1633-1638.
  10. Liendersoon, M., L. Anderson and D. J. de-konine. 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. *Journal Dairy Science* 81: 1454-461.
  11. Lucy, M. C. 2000. Reproductive physiology in High-yielding dairy cattle. [www.Missouri.edu](http://www.Missouri.edu).
  12. Niasarti, N. 1995. Control of follicle growth hormone before super ovulation and subsequent size and number of recruited follicles in Brahman and Holstein heifers. *Australian Society of Reproduction Biology* 27: 83-90.
  13. Pfister-Geneskow, M. H., A. Hayes, M. Eggen and D. Bishop. 1996. Chromosal location of bovine obesity gene. *Mammalian Genome* 7: 398-405.
  14. Pomp, D., A. C. Clutter and W. Barendse. 1997. Mapping of Leptin to bovine chromosome 1 by linkage analysis of a PCR- based polymorphism. *Journal of Animal Science* 75: 1427-1434.
  15. Pryce, J. E., M. P. Coffey and S. Brotherston. 2000. The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in Holsteins. *Journal Dairy Science* 83: 2664-2671.
  16. Veerkamp, R. F. and J. K. Oldenbrok. 2000. Genetic correlation between days until starts of luteal and milk yield, energy balance and live weight. *Journal of Dairy Science* 83: 577-583.
  17. Zwierzchowski L., J. Krzyzewski, N. Strzalkowska, E. Siadkowska and Z. Rynieweaz. 2002. Effects of polymorphism of growth hormone, Pit-1, Leptin gene, cow age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish black- white cows. *Animal Science Papers and Reports* 20 (4): 213-227.
  18. Zwierzchowski L., J. Oprzadek, E. Dymnicki and P. Dzierzbicki. 2001. An association of growth hormone,  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin, Leptin and Pit-1 loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. *Animal Science Papers and Reports* 19: 65-78.