شناسایی جهش آللی در جایگاه ژن بتا– کازئین درگاوهای بومی گیلان(تالشی)

مجید غلامی*[1]، سیدحسن حافظیان[1]، قدرت الله رحیمی[1]، زهره رحیمی[2]

۱–دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ۲–دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

* نویسنده مسئول: مجید غلامی، **m.gholami.g@gmail.com**

چکیده

هضم بتاکازئین A1 منجر به تولید بتاکازومورفین۷ می‌شود که فعالیت شبه مورفین دارد و به شیطان در شیر معروف است، که منجر به بسیاری از بیماری‌ها ازجمله دیابت نوع ۱، بیماری‌های قلبی عروقی، سندروم مرگ ناگهانی و جنون می‌شود. به منظور شناسایی جهش آللی در جایگاه ژن بتا– کازئین با استفاده از آلل اختصاصی در گاوهای جنگلی گیلان(تالشی) ، از ۸۱ رأس گاو در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که درصد ژنوتیپ‌های A1A2 ،A1A1 و A2A2 در گاوهای تالشی به ترتیب برابر با ۶۱/۳۷ ،۱۸/۵ و ۱۹/۷۵ درصد و فراوانی هر یک از آلل‌های A1 و A2 به ترتیب برابر با ۴۹/۱۸ و ۵۰/۸۲ درصد می‌باشد. با توجه به احتمال اثر نامطلوب آلل A1 بر سلامت انسانی، باید با استفاده از برنامه‌های اصلاحی جهت افزایش فراوانی ژنی و ژنوتیپی مطلوب در این جایگاه ژنی تلاش نموده تا بتوان از پتانسیل ژنتیکی مذکور جهت افزایش خصوصیات کمی و کیفی شیر در گاوهای بومی ایران بهره جست. برتری نسبی الل A2 نسبت به A1 گاوهای تالشی از نکات جلب توجه در این تحقیق بود. بنابراین این نژاد می‌تواند یک منبع مناسب در کارهای اصلاحی جهت بهبود کیفیت شیر در گاوهای ایرانی و مخصوصا گاوهای سیستانی باشد.

کلمات کلیدی: بتاکازئین، بتاکازومورفین، مارکر اختصاصی، گاو تالشی

مقدمه

گاو از قدیمی‌ترین حیواناتی است که بشر به اهلی کردن و سپس اصلاح آن پرداخت. در ایران گاو بومی گیلان به گاو جنگلی موسوم است و با دیگر نژادهای گاو بومی(به غیر از مازندرانی) تفاوت دارد. مثلاً، هم گاو نر و هم گاو ماده شاخ دارند. در جنس نر کوهانی بر جسته روی شانه‌ها به چشم می‌خورد و اختلافی فاحش و به لحاظ وزن و قد بین نر و ماده وجود دارد (۱).

به طور معمول در برنامه های اصلاح نژادی، عمدتاً از روش‌های ژنتیک کمی وپارامترهای مربوط به فنوتیپ حیوان و یا خویشاوندان آن استفاده می‌شود اما چون فنوتیپ نتیجه برآیند عامل ژنتیکی و محیطی است، لذا اگر انتخاب صرفاً بر اساس فنوتیپ صورت گیرد میزان اشتباه آن بالا و سودمندی انتخاب کاهش می‌یابد. علاوه بر این، برنامه‌های اصلاح نژادی که در قالب ژنتیک کمی صورت می‌گیرد زمانبر می باشند. امروزه، به کمک علم ژنتیک مولکولی بسیاری از این مشکلات حل شده است (۲و۳).

طبیعتاً با افزبیش جمعیت انسان، تقاضای مواد غذایی مختلف نیز افزایش می یابد و در این میان شیر و فرآورده‌های آن به علت نقش در توازن اسیدآمینه‌ای و دارا بودن مقادیر قابل توجه مواد معدنی، ویتامین، کربوهیدرات و لیپید از موقعیت ویژه‌ای برخوردار است (٤).

در شیر دو گروه از پروتئین‌های بزرگ شامل کازئین ها و پروتئین های آب پنیر وجود دارند که کازئین ها قسمت عمده آن را تشکیل می دهد (۱۳).ژن‌های بخش کازئین شیر به چهار گروه عمده **αS1- ،β-casein،K-casein**

casein و **αS2-casein** تقسیم می‌شوند. که در گاو، روی کروموزم شماره ٦ و در گوسفند و بز روی شماره ٤ قرار گرفته‌اند (١٥).

سیزده نوع مختلف از بتا کازئین شامل**D, E, F, H1, H2, I, G A1, A2, A3, B, C,** و نوع **A4** در گاوهای بومی کره گزارش شده است (٨). پپتیدهای بیواکتیو از جنس اسیدهای آمینه، در پروتئین‌های شیر شناخته شده‌اند. واکنش‌های مانند آنهایی که به وسیله آنزیم های هضم کننده کاتالیز می‌شوند منجر به آزاد شدن پپتیدهای بیواکتیو می‌گردند. این پپتیدها مستقیماً تأثیرات متعدد بیولوژیکی از جمله، پاسخ‌های رفتاری، گوارشی، هورمونی، ایمنی، عصبی، و تغذیه‌ای را سبب می‌شوند (٦). در شرایط آزمایشگاهی پپتید بیواکتیو بتا کازومورفین ٧ (بتا کازومورفین ٧ (**Tyro-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile**) را برای اولین بار به عنوان ترکیبی که دارای فعالیتی شبیه به مورفین است، شناسایی کردند (٦)از هضم پروتئولیتیک بتا کازئین گاوی نوع **A1** تولید می‌شود. اما در نوع **A2** این چنین نیست (١٤).

در آزمایشی اثر بتا کازئین **A1** روی دیابت نوع یک و وابستگی آن با دیگر بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که یک همبستگی قوی بین مصرف بتا کازئین **A1** و وقوع دیابت نوع یک وجود دارد (**r**٢=٠/٨٤). گزارش شده است مصرف بالای شیر (از نوع بتا کازئین **A1)** در کودکان ارتباط بالایی با وقوع دیابت و به دنبال آن بروز بیماری های قلبی دارد(١١)، همچنین گزارش شده است که بتا کازئین **A1** در گاوهای نژاد خالص آسیایی و آفریقایی وجود ندارند (١٢).

در این پژوهش، ژن بتاکازئین به منظور شناسائی فراوانی آلل‌های **A1** و **A2** در گاوهای بومی جنگلی گیلان(تالشی) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

خون گیری

در این تحقیق، از ٨١ رأس گاو جنگلی گیلان(تالشی) استفاده شد. به میزان ٥ تا ٧ میلی لیتر خون از سیاهرگ زیر دم گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد خون از ماده ضد انعقاد EDTA[1] (٠/٥ مولار و PH=٨) به نسبت ١ به ١٠ (حجم ماده ضد انعقاد به حجم نمونه خون) استفاده شد. نمونه های گرفته شده بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ٢٠- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته[2] انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[3]

واکنش PCR در حجم ٢٥ میکرولیتر شامل ترکیبات با غلظت‌های، ٢/٥ میکرولیتر بافر،١ میکرولیتر کلرید منیزیم (٢/٥ میلی مولار)، ٠/٧٥ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (١٠ پیکو مول در هر میکرولیتر)، ٠/٢ میکرولیتر از آنزیم تک پلیمراز (٥ واحد در هر میکرولیتر)، ٠/٥ میکرولیتر مخلوط dNTPs (٢٥ میلی مولار در هر میکرولیتر)، ١/٥ میکرولیتر DNA (با غلظت ٥٠ نانوگرم) و آب استریل دو بار تقطیر تا رسیدن به حجم مورد نظر انجام گرفت(جدول١ و٢).

---

[1] . Ethylene Diamine Tetracetic Acid
[2] . Modified salting – out
[3] . Polymerase Chain Reaction

جدول ۱- پروتکل حرارتی PCR

زمان	درجه حرارت	مرحله (۳۵چرخه)
۲ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد	واسرشت سازی اولیه
۱ دقیقه	۹٤ درجه سانتی گراد	واسرشت سازی
۱ دقیقه	۵۸ درجه سانتی گراد	اتصال آغازگرها
۱ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد	تکثیر
۵ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد	تکثیر نهایی

جدول ۲– مواد مورد استفاده در واکنش PCR

ماده مصرفی	DNA	آب استریل	بافر	Mgcl2	dNTP	Primer F	Primer R	Taq
میزان مصرف به میکرولیتر	۱/۵	۱۸/۰۵	۲/۵	۱	۰/۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۲

جهت تعیین چند شکلی ژن مورد نظر در این تحقیق از تکنیک AS-PCR استفاده شد (جدول ۳).

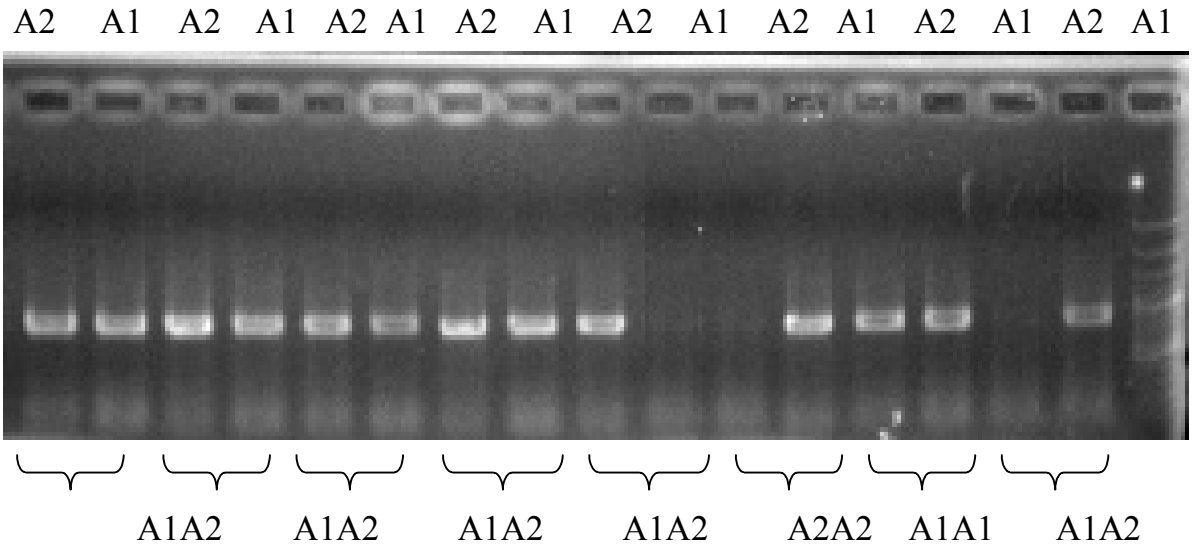
جدول ۳- پرایمر های اختصاصی مورد استفاده

منبع	توالی پرایمر	پرایمر
۱۰	F:5'-GCCCAGATGAGAGAAGTGAGG-3' R:5'-GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAT-3' R:5'-GATGTTTTGTGGGAGGCTGTTAG-3'	Primer F Primer R1(A1) Primer R2(A2)

در این روش پس از تکثیر قطعه مورد نظر به منظور شناسایی آلل ها و تعیین ژنوتیپ هر یک از افراد، محصولات PCR (آلل A1 و A2) برای ژن مورد نظر دارای طول ۸۵٤ باز بوده است روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. به منظور شناسایی باندها از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. برآورد فراوانی ژنی و ژنوتیپی با شمارش مستقیم باندها از روی ژل انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق، از ۸۱ رأس گاو بومی گاوهای بومی جنگلی گیلان(تالشی) استفاده شد. نتایج مربوط به تعیین ژنوتیپ گاوهای مورد مطالعه در جدول ۳ نشان می‌دهد که درصد ژنوتیپ‌های A1A1، A1A2 و A2A2 به ترتیب برابر با ٦١/٣٧، ١٨/٥ و ١٩/٧٥ درصد بوده است (شکل شماره ۲). در نتیجه در گاوهای بومی جنگلی گیلان(تالشی) اگر چه هر سه نوع ژنوتیپ یافت شد اما فراوانی ژنوتیپ‌ها در بین گاوهای مذکور متفاوت بود و فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت از ۲ ژنوتیپ دیگر بیشتر بود.



شکل شماره ۲- نمونه ای از ژنوتیپ‌های گاوهای بومی جنگلی گیلان(تالشی) (M= سایز مارکر)

جدول ۳ – فراوانی آللی و ژنوتیپی در جایگاه ژن بتا– کازئین در گاوهای بومی جنگلی گیلان(تالشی)

	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی زنی	
نژاد	A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
تالشی	۱۸/۵	٦۱/۳۷	۱۹/۷۵	٤۹/۱۸	۵۰/۸۲

در تحقیقی که توسط غلامی و همکاران به منظور شناسایی جهش آللی در جایگاه بتا– کازئین با استفاده از آلل اختصاصی درگاوهای بومی سیستانی انجام گرفت نشان داده شد که در جمعیت گاوهای سیستانی وفور هر یک از آلل-های A1 و A2 به ترتیب برابر با ٥٤/٥ و ٤٥/٥ درصد و فراوانی هر یک ژنوتیپ‌های A1A1،A1A2 و A2A2 به ترتیب برابر با ٧٤/٥، ١٦/٩ و ٨/٦ درصد بوده است که نشان دهنده برتری الل نامطلوب A1 در گاوهای سیستانی بود(٥) .

در تحقیق حاضر با توجه به نتایج جدول ۳ می‌توان به بالا بودن نسبی فراوانی الل مطلوب A2 در گاوهای جنگلی گیلان (تالشی) پی برد. که این موضوع نشاندهنده مطلوب بودن شیر گاوهای تالشی در مقایسه با گاوهای سیستانی است.با توجه به احتمال اثر نامطلوب آلل A1 بر سلامت انسانی، باید با استفاده از برنامه های مطالعاتی جهت افزایش فراوانی آللی و ژنوتیپی مطلوب در این جایگاه ژنی اقدام تا بتوان از پتانسیل ژنتیکی مذکور جهت افزایش خصوصیات کمی و کیفی شیر در جمعیت گاوهای شیری ایران بهره جست.

آزمون مربع کا

این آزمون با استفاده از نرم افزار SAS نیز برای نمونه های مورد بررسی انجام گرفت (جدول ۳).با توجه به جدول X^2(۳) به دست آمده با توجه به درجه آزادی ۱ و اعداد جدول در سطح احتمال ۰/۰۵ که برابر ۰/۰۰۳۹۳ می باشد نشان می دهد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی ـ واینبرگ نمی باشد. دلیل عدم تعادل برای این جایگاه می تواند اندازه کوچک جمعیت باشد و در آن همواره انتخاب صورت می گیرد که هر دو از عوامل بر هم زننده تعادل می باشد.

جدول ۳ – نتیجه آزمون مربع کای ژن بتاکازئین

	ژنوتیپ	مشاهده شده O	Eمورد انتظار	$X^2 = \sum (E - O)^2/E$
تالشی	A_1A_1	۱۸/۵	۲۴/۴۰	۵/۶۱
	$A_1 A_2$	۶۱/۷۳	۴۹/۹۰	
	A_2A_2	۱۹/۷۵	۲۵/۷۰	

منابع

۱. **شماع م. ۱۳۷۲. پرورش گاو گوشتی. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی.**
۲. **شهریاری ذ. ۱۳۸۳. نشانگرهای مولکولی درمهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی. دانشگاه شیراز.**
۳. **قره یاضی ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. ۷-٤ شهریور. دانشگاه صنعتی اصفهان.**
٤. **کاظمی ح. ۱۳۷۷. اصول ژنتیک. چاپ دوم. دانشکده کشاورزی تبریز.**
۵ . **غلامی م. حافظیان ح ، رحیمی ق، رحیمی ز شناسایی جهش آللی در جایگاه ژن بتا– کازئین درگاوهای بومی گیلان(تالشی).پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام .دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ساری.**

6 Brantl, V., Teschemacher, H., Henschen, A., Lottspeich, F. 1979. Novel opioid peptides derived from casein (β-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptone. Hoppe Seylers Z Physiol Chem، 360: 1211–1216.

7 Clare ,D.A ., Swaisgood, H.E. 2000.Bioactive milk peptides. *J Dairy Sci*, 83:1187-1195.

8 Farrell ,H.,M.Jr., Jimenez-Flores. R., Bleck, GT., Brown, EM., Butler, JE., Creamer, LK. 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk: sixth revision. *J Dairy Sci*, 87: 1641–1674.

9 Kamiński1, S., Ruść, AA., Cieślińska, A. 2006. note on frequency of A1 and A2 variants of bovine beta-casein locus in Polish Holstein bulls. *Journal of Animal and Feed Science*, 15: 195–198.

10 Keating1, AF., Smith, TJ., Ross, RPMT., Cairns, A. 2008. Note on the evaluation of a beta-casein variant in bovine breeds by allele-specific PCR and relevance to casomorphin. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 47: 99–104.

11 Keith ,Woodford. 2008. Beta-casein, Type 1 Diabetes and Links to other Modern Illnesse. Woodford paper to IDF Congress. April 2008.

12 Kwai-Hang, Ng and Grosclaude , KF. 2002. Genetic polymorphism of milk proteins.

13 Niki ,R., Kim, GY., Kimura, T., Takahashi, K., Koyama, K.، Nishinari ,K. 1994. Physical.

14 Stanis ,aw., Kamiñski1, Ann., Cieoeliñska1, El., bieta, Kostyra. 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *J Appl Genet*, 48: 189–198.

15 .Szymanowska, M., Malewske ,T .,Zwierzchowski L. 2003. Transcription factor binding to variable nucleotide sequences in 5 flanking rejoins of bovine casein genes. International Dairy journal.

The Identification of allelic mutiaons of β-Casein in Taleshi Bovines by Using Allele Specific PCR

Majid Gholami[1*], Seyed Hasan Hafeziyan[1], Ghodratolah Rahimi[1], Zohre Rahimi[2]

1- Department Of Agriculture Science, Sari University, 2- Kermanshah University of Medical Science

*** Corresponding E-mail address: m.gholami.g@gmail.com**

Abstract:

The digestion of A1 casein leads to the production of β-casomorphin 7 which it has action like morphine. β-casomorphin 7 cause to many diseases, including type 1 diabetes, cardiovascular disease syndrome, sudden death and madness . In order to detect the mutant alleles in the beta - casein in 81 bovine Gilan (taleshi), allele-specific PCR were used. Results showed that the percentage of genotypes A1A2, A1A1 and A2A2 in taleshi's bovines are 61/37, 18/5 and 19/75 percent respectively. Abundance of each allele A1 and A2 were 49/18 and 50/82 respectively. Regarding the adverse effects of allele of A1 on human health, programs for increasing abundance of favorable allele and genotype in native cows of Iran is suggested. The relative superiority of A1 to A2 allele in taleshi's bovines was interesting in this study. So this race could be a good source of corrective actions to improve the quality of milk in other races, especially Sistani in Iran.

Key words: β-Casein; β-Casomorphin; Allele Specific; Taleshi Bovines