

بررسی چندشکلی ژن‌های PPARGC1A و OPN در گاوهای هلشتاین استان‌های تهران و اصفهان

مجید پسندیده^{۱*}، محمد رضا محمدآبادی^۲، علیرضا ترنگ^۳، علی اسماعیلی زاده کشکوئیه^۴، رامین صیقلانی^۵، سعید انصاری مهیاری^۴ و رضا پسندیده^۵

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۷

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۲ دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۳ بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال کشور (رشت)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

^۴ استادیار گروه علوم دامی دانشگاه صنعتی اصفهان

^۵ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

*مسئول مکاتبه: Email: Majidpasandideh@gmail.com

چکیده

PPARGC1A عضوی از خانواده فعال‌کننده‌های کمکی رونویسی می‌باشد که نقش اساسی در تنظیم متابولیسم انرژی ایفا می‌نماید. OPN نوعی فسفو پروتئین است که در بافت‌ها و سلول‌های مختلف سنتز شده و در مایعات بدن ترشح می‌شود. در این مطالعه، استخراج DNA از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از ۳۹۸ رأس گاو هلشتاین از استان‌های تهران و اصفهان انجام شد. برای استخراج DNA از روش نمکی استفاده گردید. سپس SNPT>C در موقعیت ۱۸۹۲ و SNPA>C در موقعیت ۳۳۵۹ از ژن PPARGC1A و نیز SNPC>T در موقعیت ۸۵۱۴ از ژن OPN به روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. با استفاده از نرم افزار Pop Gene، فراوانی ژنوتیپ‌های TT، TC و CC در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۸۹۲ به ترتیب ۱۲، ۶۵ و ۲۳ درصد و همچنین شاخص‌های شانون و نئی به ترتیب ۰/۶۸ و ۰/۴۹ محاسبه شد. فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در موقعیت نوکلئوتیدی ۳۳۵۹ به ترتیب ۲۸، ۵۲ و ۱۰ درصد و همچنین شاخص‌های شانون و نئی به ترتیب ۰/۶۵ و ۰/۴۶ محاسبه شد. فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT از ژن OPN به ترتیب ۱۹، ۵۷ و ۲۴ درصد و همچنین شاخص‌های شانون و نئی به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۴۹ محاسبه شد. با استفاده از آزمون مربع کای، حالت تعادل برای جمعیت‌ها بررسی شد. ژنوتیپ‌ها در همه جایگاه‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گاو هلشتاین، OPN، PPARGC1A، RFLP-PCR

Analysis of bovine PPARGC1A and OPN genes polymorphism in Holstein dairy cows in Tehran and Esfahan provinces

M Pasandideh^{1*}, M Mohammadabadi², A Tarang³, A Esmailzade Koshkoiyeh², R Sayghalani³,
S Ansari Mehyari⁴ and R Pasandideh⁵

Received: October 19, 2010 Accepted: December 18, 2011

¹MSc Alumnus, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

²Associate professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

³Department of Genomics, Branch of North Region of Iran (Rasht), Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

⁴Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Iran

⁵MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdusi University of Mashhad, Iran

*Corresponding author: E mail: Majidpasandideh@gmail.com

Abstract

PPARGC1A is a member of a family of transcription coactivators that plays a central role in the regulation of cellular energy metabolism. OPN is a phosphoprotein that is synthesized in a variety of tissues and cells and secreted into body fluids. In this study DNA was isolated from blood samples collected from 398 Holstein cows of Tehran and Esfahan provinces. DNA isolation was performed using the Salting out method. RFLP-PCR method was used for genotyping of SNP T>C at position 1892 and SNP A>C at position 3359 in PPARGC1A gene, also SNPC>T at position 8514 in OPN gene. Using of Pop Gene soft ware frequencies of TT, TC and CC genotypes at position 1892 were calculated as 12, 65 and 23%, respectively. Also, Shanon and Nei indices were for this position 0.68 and 0.49, respectively. Frequencies of AA, AC and CC genotypes at position 3359 were calculated as 38, 52 and 10%, respectively. Also, Shannon and Nei indices were 0.65 and 0.46, respectively. Frequencies of CC, CT and TT genotypes of OPN gene were calculated as 19, 57 and 24%, respectively. Also, Shannon and Nei indices were 0.69 and 0.49, respectively. Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was evaluated using χ square test. The genotypes in all loci deviated from HWE.

Key words: Single nucleotide polymorphism, Holstein cattle, OPN, PPARGC1A, RFLP-PCR

مقدمه

انتخاب بر اساس مدل‌های حیوانی، پیشرفت ژنتیکی مناسبی را به وجود آورده است. با این حال، نیاز به روش‌هایی که فاصله نسل را کاهش و صحت ارزیابی-های ژنتیکی را افزایش دهد، همواره احساس شده است. یکی از راهکارهای مناسب، کاربرد نشانگرهای ژنتیکی است (دکرز و هاسپیتال ۲۰۰۲). نقشه‌یابی ژن‌ها، مهمترین مرحله برای شناسایی جایگاه‌های صفات کمی^۱ یا QTL های موثر بر صفات تولیدی در دام است. مرحله بعد تشخیص ژن یا آلی است که موجب ایجاد یک فنوتیپ خاص در جمعیت می‌شود (دکونینگ ۲۰۰۶). در گاو شیری بیشترین تأکید بر تشخیص QTL های است که عهده‌دار تولید شیر، چربی و پروتئین شیر هستند (خاتکار و همکاران ۲۰۰۴).

ژن‌های PPARGC1A و OPN در میانه‌ی کروموزوم ۶ گاو قرار دارند و تقریباً ۱۲ سانتی مورگان از یکدیگر فاصله دارند (خاتکار و همکاران ۲۰۰۴). ژن PPARGC1A (که PGC-1 α نیز نامیده می‌شود) عضوی از خانواده فعال‌کننده‌های کمکی رونویسی است و نقش اساسی در تنظیم متابولیسم انرژی ایفا می‌کند. این ژن موجب افزایش سنتز میتوکندریایی در سلول می‌شود، همچنین در تنظیم متابولیسم چربی و کربوهیدرات نقش دارد (لیانگ و وارد ۲۰۰۶). احتمالاً این ژن تأثیر قابل توجه‌ای در اختلالاتی مانند چاقی، دیابت و کاردیومیوپاتی^۲ (تحلیل عضله مایوکاردیوم قلب) دارد (لیانگ و وارد ۲۰۰۶). به علت نقش تنظیمی آن در متابولیسم چربی، می‌توان از آن در داروسازی برای تهیه داروهای موثر در درمان چاقی و دیابت نوع ۲ استفاده کرد (لیانگ و وارد ۲۰۰۶). این ژن نقش کلیدی در فعال‌سازی گیرنده‌های مختلف هورمون هسته‌ای و همچنین در رونویسی فاکتورهای تنظیمی تعادل انرژی دارد. نشان داده شده است که این ژن نقش میانجی‌گری در بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم اکسیداسیون و گلوکونئوزنیز ایفا می‌کند (پویی سرور و همکاران

۱۹۹۸). ژن PPARGC1A روی کروموزوم شماره ۵ درموش، کروموزوم شماره ۴ در انسان و کروموزوم شماره ۶ در گاو مکان‌یابی شده است و پروتئینی شامل ۷۹۷ اسید آمینه در موش و ۷۹۸ اسید آمینه در انسان را کد می‌کند (لیانگ و وارد ۲۰۰۶). این ژن در ۱۳ اگزون شامل ۶۲۶۱ جفت باز سازمان‌دهی شده است و در سطح وسیعی در بافت‌هایی که دارای میتوکندری زیاد و متابولیسم اکسیداسیون فعال هستند، مانند بافت‌های چربی، قلب و ماهیچه اسکلتی بیان می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد که این ژن در سطح وسیعی در مغز و کلیه و در سطح کمتر در کبد بیان می‌شود (ویکار و همکاران ۲۰۰۵).

OPN (که SPP1 نیز نامیده می‌شود) نوعی فسفو پروتئین با وزن مولکولی ۶۰ کیلودالتون است که ژن کد-کننده آن در بسیاری از گونه‌ها توالی‌یابی شده است (پاریک و همکاران ۲۰۰۸). ابتدا OPN به عنوان پروتئین ماتریس استخوانی تشخیص داده شده است، اما بعدها به عنوان سیتوکین^۳ تولید شده از فعالیت سلول‌های T معرفی شد (پاتارسا و همکاران ۱۹۹۳ و دنهاوت و همکاران ۲۰۰۱). وجود پروتئین OPN در شیر و بیان گسترده این ژن در سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی عامل مهمی برای تحقیق در زمینه چندشکلی این ژن فراهم آورده است (لئونارد و همکاران ۲۰۰۵). غلظت پروتئین OPN در شیر انسان حدود ۱۰-۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر (سنجر و همکاران ۱۹۸۹) و در شیر گاو حدود ۸ میلی-گرم بر لیتر (بایلس و همکاران ۱۹۹۷) است. این ژن در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود و پروتئین آن در بافت‌های روده، معده، تیروئید، کلیه، پستان، بیضه، لوله فالوپ، رحم، تروفوبلاست و جفت تشخیص داده شده است. منبع اصلی این پروتئین سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی و مونوسیت‌ها و ماکروفاژهای شیر هستند (یانگ و همکاران ۱۹۹۰). این پروتئین موتیفی از سه اسید آمینه آرژنین-گلیسین-آسپاراتات (Arg-Gly-Asp) است و فاقد ساختار ثانویه می‌باشد. پروتئین OPN در چسبندگی سلولی، انتشار و انتقال سلولی نقش دارد و

¹ - Quantitative trait loci

² - Cardiomyopathy

³ - Cytokine

گزارش کردند. پاریک و همکاران (۲۰۰۸) فراوانی‌های ژنوتیپ‌های CC، CT و TT در این موقعیت در گاوهای فریزین-هلشتاین لهستان، به ترتیب ۲۴، ۵۰ و ۲۶ درصد محاسبه کردند. به دلیل نقش اساسی این ژن‌ها در متابولیسم گلوکز، چربی و انرژی، مطالعه چندشکلی این ژن‌ها در گاوهای هلشتاین ایران، ضروری به نظر رسید. از این رو در این تحقیق، چندشکلی ژن PPARGC1A در مکان T>C در موقعیت نوکلئوتیدی ۱۸۹۲ و مکان A>C در موقعیت نوکلئوتیدی ۳۳۵۹ و نیز چندشکلی ژن OPN در مکان C>T در موقعیت ۸۵۱۴ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق روی ۳۹۸ رأس گاو هلشتاین گاوداری‌های استان‌های تهران و اصفهان انجام شد. ابتدا نمونه‌گیری خون از ۱۰ گاوداری این دو استان (هر استان ۵ گاوداری) با استفاده از ونوزیکت حاوی EDTA انجام شد. سپس استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش نمکی^۱ انجام شد (میلر و همکاران ۱۹۸۸). برای بررسی کیفی DNA از ژل الکتروفورز ۱٪ استفاده شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعه ۱۹۵ جفت بازی واقع در اینترون ۹ و نیز تکثیر قطعه ۳۵۷ جفت بازی واقع در ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' (3'UTR) از ژن PPARGC1A و همچنین تکثیر قطعه ۲۹۰ جفت بازی واقع در اینترون ۴ از ژن OPN انجام پذیرفت. توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو برای تکثیر قطعه ۱۹۵ جفت بازی در مکان ۱۸۹۲ ژن PPARGC1A به صورت زیر بود (خطیب و همکاران ۲۰۰۷).

1892F5'-
CATAGCCGCGCCCCAGGTAAGATGCACG
TTGGC-3'
1892R 5'-CTGGTACTCCTCGTAGCTGTC-3'
توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو برای تکثیر قطعه ۳۵۷ جفت بازی در مکان ۳۳۵۹ ژن PPARGC1A به صورت زیر بود (خطیب و همکاران ۲۰۰۷).

موجب تحریک انتقال کلسیم و فسفاتیدیل اینوزیتول می‌شود (لیائو و همکاران ۱۹۹۵). این پروتئین در انسان، مسئول رشد و توسعه جنینی، آغاز و نگهداری آبستنی، تنظیم التهاب، چسبندگی سلولی، تغییر وضع بافتی و بقای سلولی است (دنهارت و همکاران ۲۰۰۱). ژن OPN (SPP1) روی کروموزوم ۴ انسان، کروموزوم ۵ موش و کروموزوم ۶ گاو مکانیابی شده است و طول پروتئین آن تقریباً ۳۰۰ اسیدآمینو (۲۷۸ در گاو، ۲۸۰ در بوفالو، ۲۹۷ در موش و ۳۱۴ در انسان) است (نمیر و همکاران ۲۰۰۰).

خطیب و همکاران (۲۰۰۷) با تحقیق روی گاوهای هلشتاین، فراوانی ژنوتیپ‌های TT، TC و CC در موقعیت c.1892T>C از ژن PPARGC1A را به ترتیب ۱/۹، ۶۵ و ۳۳/۱ درصد و فراوانی ژنوتیپ‌های AA، AC و CC در موقعیت c.3359A>C از این ژن را به ترتیب ۱۶/۳، ۵۰/۶ و ۳۳/۱ درصد برآورد کردند. کوالوسکا و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی SNPT>C از ژن PPARGC1A در نژاد جرسی فراوانی‌های ژنوتیپی را برای TT، TC و CC به ترتیب ۲۷، ۷۲ و ۱ درصد به دست آوردند. همچنین آن‌ها فراوانی‌های ژنوتیپی را برای AA، AC و CC در محل SNPA>C به ترتیب ۷۶، ۲۴ و صفر درصد گزارش کردند. کومیسارک و دورینک (۲۰۰۹) با بررسی دو جایگاه T>C و A>C از ژن PPARGC1A در گاوهای نژاد فریزین-هلشتاین لهستان، فراوانی آلی برای SNPT>C به صورت T=۰/۲۷ و C=۰/۷۳ و برای SNPA>C به صورت A=۰/۶۴ و C=۰/۳۶ گزارش کردند. همچنین با بررسی جانیشینی تک نوکلئوتیدی T>C در گاوهای گوشتی ایالات متحده، فراوانی آلل T و C به ترتیب ۱۵/۴ و ۸۴/۶ درصد گزارش شد (وایت و همکاران ۲۰۰۷). شنینک و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی T>C در گاوهای فریزین-هلشتاین هلند فراوانی آلل T و C را به ترتیب ۰/۲۵ و ۰/۷۵ گزارش کردند. خطیب و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی SNPC>T از ژن OPN در گاوهای هلشتاین دانشگاه ویسکانسین فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT به ترتیب ۲۳، ۵۱ و ۲۶ درصد

^۱ - Salting Out

NheI و در مکان $C>T$ ، با آنزیم برشی *BseNI* (*BsrI*) هضم شدند (خطیب و همکاران ۲۰۰۷ و لئونارد و همکاران ۲۰۰۵). ترکیب واکنشگرهای هضم آنزیمی، به صورت ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱ میکرولیتر بافر R(10X) و ۲ واحد آنزیم استفاده شد. برای آنزیم *HaeIII* و *NheI* به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای آنزیم *BsrI* به مدت ۵ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه حمام خشک قرار داده شد. نمونه‌های هضم شده روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. در چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی $T>C$ ، آلل T (برش نخورده) به وسیله باند ۱۹۵ جفت بازی و آلل C توسط باند ۱۶۳ جفت بازی تشخیص داده شد. همچنین در چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی $A>C$ ، آلل A (برش نخورده) به وسیله باند ۳۵۷ جفت بازی و آلل C توسط باند ۳۱۹ جفت بازی تعیین شد. در مکان چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی $C>T$ ، آلل T (برش نخورده) به وسیله باند ۲۹۰ جفت بازی و آلل C توسط باند ۲۰۰ جفت بازی مشخص شد. برای حصول اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده و نیز قطعات حاصل از برش، از نشانگرهای pUC Mix,8 و GeneRuler 100 bp استفاده شد. برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، شاخص نئی و شانون، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار، تعداد آلل واقعی و مؤثر و آزمون هاردی-واینبرگ با نرم افزار Pop Gene انجام شد (یه و همکاران ۱۹۹۹).

نتایج و بحث

حداکثر غلظت DNA ی استخراج شده، ۸۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر و حداقل آن ۱۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود. نتایج واکنش PCR برای تکثیر قطعات مورد نظر در شکل ۱ ارائه شده است.

3359F5'-
GCGAGCACGGTGTACATTACTAAGGAGA
GTTGGCTAG-3'
3359R 5'-GTTGTGTTGCACTCAATGGAC-3'
توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو برای تکثیر قطعه ۲۹۰ جفت بازی در مکان ۸۵۱۴ ژن OPN به صورت زیر بود (لئونارد و همکاران ۲۰۰۵).

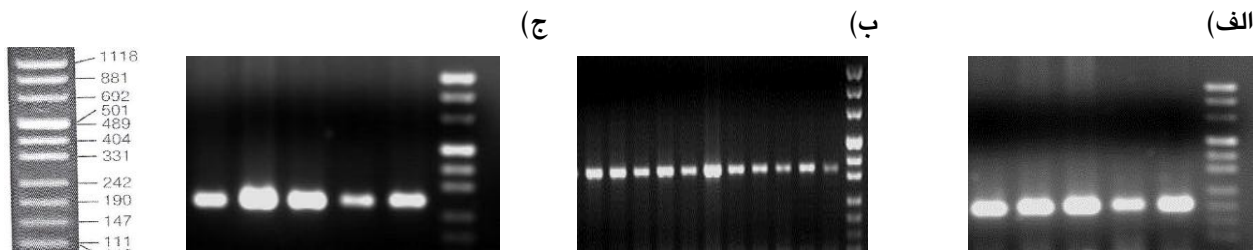
8514F5'-GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC-3'
8514R5'-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-3'

واکنش تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۶ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPS، ۲ میکرولیتر PCR بافر 10X، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱/۵ واحد *Taq* پلیمرز صورت پذیرفت. چرخه‌های واکنش PCR برای تکثیر جایگاه‌های ژن PPARGC1A به صورت زیر بود.

واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال به روش تاج‌دان^۱ از دمای ۶۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد (۰/۵) درجه سانتی‌گراد کاهش به ازای هر چرخه) به مدت ۵۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام پذیرفت. چرخه‌های واکنش PCR برای تکثیر جایگاه ژن OPN به صورت زیر انجام گرفت.

واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال به روش تاج‌دان از دمای ۶۰ تا ۵۳ درجه سانتی‌گراد (۰/۷) درجه سانتی‌گراد کاهش به ازای هر چرخه) به مدت ۴۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه انجام پذیرفت. با انجام این واکنش، قطعات ۱۹۵ و ۳۵۷ جفت بازی از ژن PPARGC1A و نیز قطعه ۲۹۰ جفت بازی از ژن OPN تکثیر شد. محصولات PCR برای تعیین ژنوتیپ در مکان $T>C$ ، با آنزیم برشی *HaeIII* (*BsuRI*) و در مکان $A>C$ ، با آنزیم برشی

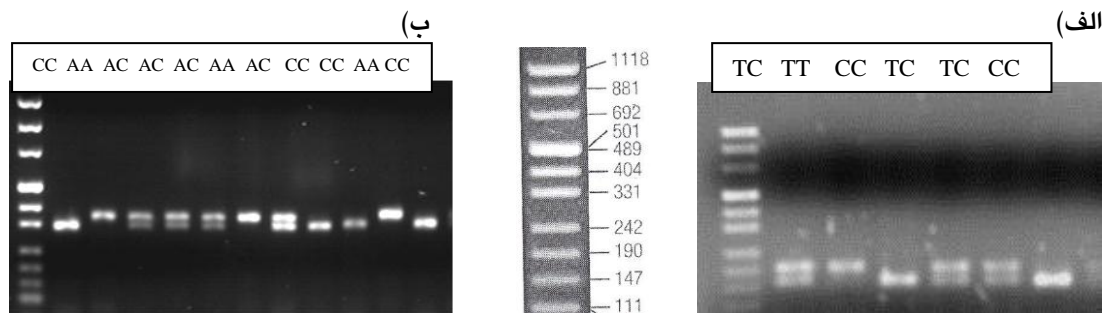
²- Touchdown



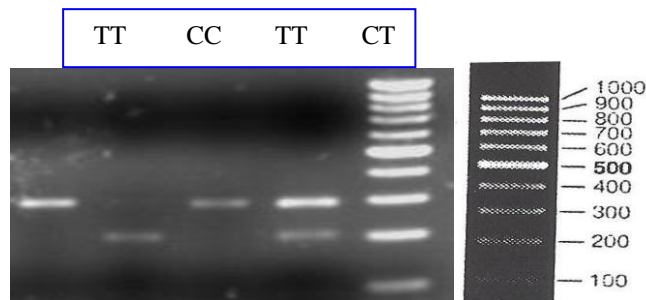
شکل ۱- نتایج تکثیر الف) قطعه ۱۹۵ جفت بازی از ژن *PPARGC1A*، ب) قطعه ۳۵۷ جفت بازی از ژن *PPARGC1A* و ج) قطعه ۲۹۰ جفت بازی از ژن *OPN* پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید

ژنوتیپ *AA* می باشد و دو قطعه ۳۱۹ و ۲۸ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ *CC* است. همچنین سه قطعه ۳۱۹، ۳۵۷ و ۲۸ جفت بازی، نشان‌دهنده ژنوتیپ *AC* می‌باشد. قابل ذکر است که قطعات ۳۲ و ۳۸ جفت بازی، به علت کوچک و سبک بودن، در ژل آگارز مشاهده نشدند (شکل ۲). با استفاده از آنزیم *BsrI* در موقعیت *c.8514C>T* سه نوع ژنوتیپ *CC*، *CT* و *TT* مشخص شد. قطعه برش نخورده ۲۹۰ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ *TT* و دو قطعه ۲۰۰ و ۹۰ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ *CC* است. همچنین سه قطعه ۲۹۰، ۲۰۰ و ۹۰ جفت بازی، نشان‌دهنده ژنوتیپ *CT* می‌باشد (شکل ۳).

محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند تا ژنوتیپ افراد تعیین شود. با توجه به قطعات حاصل از برش آنزیم، ژنوتیپ‌های افراد در هر موقعیت تعیین شد. با استفاده از آنزیم *HaeIII* در مورد موقعیت *c.1892T>C* سه نوع ژنوتیپ *TT*، *TC* و *CC* مشخص شد. قطعه برش نخورده ۱۹۵ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ *TT* می‌باشد و دو قطعه ۱۶۳ و ۳۲ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ *CC* است. همچنین سه قطعه ۱۹۵، ۱۶۳ و ۳۲ جفت بازی، نشان‌دهنده ژنوتیپ *TC* می‌باشد. با تاثیر آنزیم *NheI* در موقعیت *c.3359A>C* ژنوتیپ‌های *AA*، *AC* و *CC* تشخیص داده شد. قطعه برش نخورده ۳۵۷ جفت بازی، بیانگر



شکل ۲- هضم آنزیمی الف) قطعه ۱۹۵ جفت بازی با آنزیم *HaeIII* و ب) قطعه ۳۵۷ جفت بازی با آنزیم *NheI*



شکل ۳- هضم آنزیمی قطعه ۲۹۰ جفت بازی با آنزیم *BsrI*.

در مورد موقعیت C>T، c.1892T از بین ۳۹۸ گاو تعیین ژنوتیپ شده، ۴۶ گاو ژنوتیپ TT، ۲۵۹ گاو ژنوتیپ TC و ۹۳ گاو ژنوتیپ CC نشان دادند. در مورد موقعیت A>C، c.3359A از بین ۱۵۱ گاو ژنوتیپ AA، ۲۰۷ گاو ژنوتیپ AC و ۴۰ گاو ژنوتیپ CC داشتند. در مورد موقعیت C>T، c.8514C از بین ۷۵ گاو ژنوتیپ CC، ۲۲۶ گاو ژنوتیپ CT و ۹۷ گاو ژنوتیپ TT نشان دادند. پراکندگی ژنوتیپها در گلهها در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ جمعیت در جدول ۲ آورده شده است.

در مورد موقعیت C>T، c.1892T از بین ۳۹۸ گاو تعیین ژنوتیپ شده، ۴۶ گاو ژنوتیپ TT، ۲۵۹ گاو ژنوتیپ TC و ۹۳ گاو ژنوتیپ CC نشان دادند. در مورد موقعیت A>C، c.3359A از بین ۱۵۱ گاو ژنوتیپ AA، ۲۰۷ گاو ژنوتیپ AC و ۴۰ گاو ژنوتیپ CC داشتند. در مورد موقعیت C>T، c.8514C از بین ۷۵ گاو ژنوتیپ CC، ۲۲۶ گاو ژنوتیپ CT و ۹۷ گاو ژنوتیپ TT نشان دادند. پراکندگی ژنوتیپها در گلهها در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ جمعیت در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- پراکندگی ژنوتیپها برای جانشینیهای تک نوکلئوتیدی C>T و A>C از ژن PPARGC1A و C>T از ژن OPN در گلههای مورد مطالعه

موقعیت	گله ژنوتیپ	جمع	گلشهر	امداد	نامفر	فکا	تکنوشیر	تلیسه	لبن	زرین	رضایی	دهیران
	TC	۲۵۹	۲۹	۳۱	۲۶	۳۹	۱۷	۱۵	۱۷	۲۵	۳۰	۳۰
	CC	۹۳	۳	۳	۱۶	۲۲	۱	۱۱	۱۳	۸	۴	۱۲
c.3359A>C	AA	۱۵۱	۱۰	۱۹	۱۸	۲۰	۹	۹	۱۰	۸	۲۳	۲۵
	AC	۲۰۷	۱۶	۲۱	۲۴	۴۷	۱۰	۱۴	۱۷	۲۴	۱۴	۲۰
	CC	۴۰	۸	۵	۶	۳	-	۶	۴	۲	۲	۴
c.8514C>T	CC	۷۵	۱۵	۵	۸	۲۱	۱	۶	۹	۴	۵	۱
	CT	۲۲۶	۱۸	۲۹	۲۶	۳۲	۱۴	۱۷	۱۸	۱۸	۲۶	۲۸
	TT	۹۷	۱	۱۱	۱۴	۱۷	۴	۶	۴	۱۲	۸	۲۰

جدول ۲- نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ جمعیت برای جانشینیهای تک نوکلئوتیدی C>T و A>C از ژن PPARGC1A و C>T از ژن OPN

SNP	فراوانی آلی		فراوانی ژنوتیپی			هتروزیگوسیتی		شاخص		تعداد آلل		تعداد تعادل
	T	C	TT	TC	CC	Obs ¹	Exp ²	Nei	Shannon	na ³	ne ⁴	
c.1892T>C	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۱۲	۰/۶۵	۰/۲۳	۰/۶۵	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۶۸	۲	۱/۹۷	۸/۵۱
c.3359A>C	۰/۶۴	۰/۳۶	۰/۳۸	۰/۵۲	۰/۱۰	۰/۵۲	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۶۵	۲	۱/۸۵	۶/۰۱
c.8514C>T	۰/۴۷	۰/۵۳	۰/۱۹	۰/۵۷	۰/۲۴	۰/۵۷	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۶۹	۲	۱/۹۹	۷/۵۰

^۱- هتروزیگوسیتی مشاهده شده

^۲- هتروزیگوسیتی مورد انتظار

^۳- تعداد آلل واقعی

^۴- تعداد آلل مؤثر

متابولیسم چربی، گلوکز و انرژی، برای این تحقیق انتخاب شدند. دلیل دیگر برای انتخاب این ژنها، نتایج

به دلیل نقش کلیدی ژنهای PPARGC1A و OPN در پاسخهای بیولوژیکی مانند بیورنیز میتوکندریایی و

آلی به دست آمده در این تحقیق، با نتایج کومیسارک و همکاران (۲۰۰۹) که فراوانی‌های آلی در موقعیت $C>3359A$ را به صورت $A=0/64$ و $C=0/36$ گزارش کردند، یکسان است. همچنین در این مطالعه، بیشترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت $C>8514T$ ژن OPN، برای ژنوتیپ CT و کمترین فراوانی برای ژنوتیپ CC محاسبه شد. این نتایج با مطالعات قبلی توسط پاریک و همکاران (۲۰۰۸) و خطیب و همکاران (۲۰۰۷) که بیشترین فراوانی را برای ژنوتیپ CT و کمترین فراوانی برای ژنوتیپ CC به دست آوردند مطابقت دارد.

هرسه جانیشینی تک نوکلئوتیدی مورد مطالعه در این تحقیق، دارای تعداد آلل مؤثر بالایی بودند و از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگر تعداد آلل-های مؤثر آن آغازگر است، بنابراین می‌توان از این آغازگرها برای مطالعات بعدی استفاده نمود. همچنین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده و نیز هتروزیگوسیتی مورد انتظار ناریب (شاخص نئی) برای هر سه موقعیت مورد مطالعه، در سطح بالایی قرار داشت و بیانگر تنوع ژنتیکی مناسب و همچنین مقاومت اکثر افراد جمعیت در مقابل عوامل محیطی می‌باشد. با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2)، انحراف ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ، در هر سه موقعیت مورد بررسی مشخص شد. از دلایل احتمالی این انحراف از تعادل، می‌توان به نمونه‌گیری از جمعیت که خود نوعی انتخاب است و نیز تلاقی‌های غیر تصادفی اشاره کرد که هر دو از عوامل برهم زننده تعادل می‌باشند. از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات مشابه، می‌توان به تفاوت ظرفیت ژنتیکی افراد مورد مطالعه و نیز اختلاف در اندازه نمونه اشاره نمود.

حاصل از مطالعات QTL بود به طوری که این تحقیقات نشان داده بودند که QTL مؤثر بر صفات تولیدی شیر در نزدیکی این ژن‌ها قرار گرفته‌اند (خاتکار و همکاران ۲۰۰۴، اولسن و همکاران ۲۰۰۵، ویکارد و همکاران ۲۰۰۵ و خطیب و همکاران ۲۰۰۷).

در تحقیق حاضر، بیشترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت $C>1892T$ از ژن PPARGC1A، برای ژنوتیپ TC و کمترین فراوانی برای ژنوتیپ TT مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های خطیب و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. با این حال، نتایج این مطالعه، با نتایج ویکارد و همکاران (۲۰۰۵) و کوالوسکا و همکاران (۲۰۱۰) که بیشترین فراوانی ژنوتیپی در این موقعیت را به ترتیب برای CC و TC و کمترین فراوانی ژنوتیپی را به ترتیب برای TT و CC گزارش کردند، تفاوت نشان داد. نتایج این تحقیق با یافته‌های کومیسارک و همکاران (۲۰۰۹)، وایت و همکاران (۲۰۰۷) و شنینگ و همکاران (۲۰۰۹) که بیشترین فراوانی آلی در موقعیت $C>1892T$ را برای آلل C به دست آوردند مشابهت دارد. در این مطالعه بیشترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت $C>3359A$ از ژن PPARGC1A، برای ژنوتیپ AC و کمترین فراوانی برای ژنوتیپ CC محاسبه شد. خطیب و همکاران (۲۰۰۷) و ویکارد و همکاران (۲۰۰۵) بیشترین فراوانی ژنوتیپی را در این موقعیت، برای ژنوتیپ AC به دست آوردند و کوالوسکا و همکاران (۲۰۱۰) کمترین فراوانی ژنوتیپی را برای ژنوتیپ CC مشاهده کردند. از این نظر، نتایج تحقیق حاضر با مطالعات قبلی مطابقت دارد. اما تفاوت‌هایی نیز بین نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات قبل مشاهده شد، به طوری که خطیب و همکاران (۲۰۰۷) و ویکارد و همکاران (۲۰۰۵) کمترین فراوانی ژنوتیپی را برای ژنوتیپ AA به دست آوردند در حالی که کوالوسکا و همکاران (۲۰۱۰) بیشترین فراوانی ژنوتیپی را برای این ژنوتیپ مشاهده کردند. قابل توجه است که فراوانی‌های

منابع مورد استفاده

- Bayless KJ, Davis GE and Meininger GA, 1997. Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk. *Protein Expr Purif* 9: 309-314.
- Dekkers JCM and Hospital F, 2002. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nat Rev Genet* 3: 22-32.
- De Koning DJ, 2006. Conflicting candidates for cattle QTLs. *Trends Genet* 22: 301-305.
- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin DV and Berman JS, 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival *J Clin Invest* 107: 1055-61.
- Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM and Rosa GJM, 2007. The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations *J Dairy Sci* 90: 2966-2970.
- Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I and Raadsma HW, 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: Review and meta-analysis. *Genet Sel Evol* 36: 163-190.
- Komisarek J and Dorynek Z, 2009. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet* 50: 125-132.
- Kowalewska I, Kulig H and Kmiec M, 2010. Associations between the bovine PPARGC1A gene and milk production traits. *Czech J Anim Sci* 55: 195-199.
- Leonard S, Khatib H, Schutzkus V, Chang YM and Maltecca C, 2005. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 88: 4083-4086.
- Liang H and Ward w, 2006. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ* 30: 145-151.
- Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresch DA and Schwartz SM, 1995. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. *J Clin Invest* 95: 713-724.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF, 1988. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215-1220.
- Nemir M, Bhattacharyya D, Li X, Singh K, Mukherjee AB and Mukherjee BB, 2000. Targeted Inhibition of Osteopontin Expression in the Mammary Gland Causes Abnormal Morphogenesis and Lactation Deficiency. *J Biol Chem* 275: 969-976.
- Olsen HG, Lien S, Gautier M, Nilsen H, Roseth A, Berg PR, Sundsaasen KK, Svendsen M and Meuwissen TH, 2005. Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics* 169: 275-283.
- Pareek CS, Czarnik U, Pierzchała M and Zwierzchowski L, 2008. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (SPP1) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim Sci Pap Rep* 26. 4, 251-257
- Patarca R, Saavedra RA and Cantor H, 1993. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early Tlymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit Rev Immunol* 13: 225-46
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M and Spiegelman BM, 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829-839

- Schennink A, Bovenhuis H, Leon-Kloosterziel KM, Arendonk AM and Visker MHP, 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Anim Genet* 40: 909-916.
- Senger DR, Perruzzi CA, Papadopoulos A and Tenen DG, 1989. Purification of a human milk protein closely similar to tumorsecreted phosphoproteins and osteopontin. *Biochim Biophys Acta* 996: 43-48.
- Weikard R, Kuhn C, Goldammer T, Freyer G and Schwerin M, 2005. The bovine PPARGC1A gene: Molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol Genomics* 21: 1-13.
- White SN, Casas E, Allan MF, Keele JW, Snelling WM, Wheeler TL, Shackelford SD, Koohmaraie M and Smith TPL, 2007. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. *J Anim Sci* 85: 1-10.
- Young MF, Kerr JM, Termine JP, Weever UM, Wang MG, McBride OW and Fisher LW, 1990. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 7: 491-502.
- Yeh FC, Yang R and Boyle T, 1999. Pop Gene version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.