لینک های مفید

سرویس های ویژه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

فیلم های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی STRS

کارگاه های آموزشی

عضویت درخبرنامه

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

شناسایی چند شکلی ژنهای لپتین و بتا- دیفنسین در گاو بومی مازندرانی

س.پ. موسوی، ق. رحیمی، ح. حافظیان، ع. خان احمدی، ح. رسولی
ایران، ساری، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم کشاورزی، گروه علوم دامی، آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دامی

چکیده:
با توجه به اثر لپتین بر کاهش چربی و غلظت LH ، این هورمون مي تواند نقش مهمی در تعادل انرژی، تولید شیر، وزن زنده و همچنین میزان باروری داشته باشد. بخاطر اهمیت نقش دفاعی پروتیینهای سلولی (دیفنسینها) بدلیل فعالیت آنتی بیوتیکی و سم ردایي در برابر باکتریها، ویروسها و قارچها، ممکن است از آنها بعنوان یک نشانگر مولکولی مناسب در ارتباط با سلامت حیوانات در صنعت دامپروری استفاده شود. هدف از این تحقیق تشخیص چند شکلی ژنهای لپتین و بتا- دیفنسین در نژاد گاو بومی مازندرانی است. از تعداد ۱۶۰ راس گاو بومی، نمونه خون تهیه و با استفاده از روش نمکی، DNA ژنومی استخراج گردید. توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای بخشي از جایگاه ژنهای لپتین و دیفنسین تکثیر شد. قطعات DNA تکثیر شده بطول ۴۲۲ جفت باز برای لپتین و ۵۰۰ جفت باز برای دیفنسین، بترتیب با استفاده از آنزیمهای برش دهنده MboI و TaqI برش داده شد و قطعات ۳۲ و۳۹۰ جفت بازی برای لپتین و ۱۵۰ و ۱۹۰ جفت بازی برای دیفنسین بدست آمد. فراوانی آللی بدست آمده از +MboI و -MboI برای ژن لپتین بترتیب ۰/۲۵ و ۰/۹۷۵ و فراوانی آللی +TaqI و -TaqI برای ژن بتا- دیفنسین ۰/۷۲ و ۰/۳۸ بوده است. در این تحقیق جایگاه برش برای هر دو ژن لپتین و بتا- دیفنسین جدید بوده و با نتایجی که محققین دیگر تا کنون بدست آورده اند متفاوت بوده است.

کلمات کلیدی: گاو بومی مازندرانی، لپتین، دیفنسین، چند شکلی

Abstract:
As leptin affects both fat deposition and LH concentrations, it could play an important role in energy balance, milk production, live weight, and fertility traits.The important defensive role of cell peptides (defensins), due to their antibiotic and cytotoxic activity against bacteria, viruses and fungi, may candidate them as a suitable molecular markers related to the health status of animals in livestock industry. The objective of the present study was to characterize the leptin and β-defensin gene polymorphisms in Mazandarani native cattle breed. Blood samples were taken from 160 individuals and genomic DNA was extracted by salting out method. Using specific primers for each locus, DNA fragments were amplified from both leptin and defensin gene by polymerize chain reaction (PCR). The resulted DNA fragments with the length of 422bp from leptin gene and 500bp from defensin gene were digested with *Mbol* and *TaqI* restriction enzymes, respectively. The PCR products digested by *Mbol* and *TaqI* enzymes resulted two bands (32 & 390) bp on leptin and two bands (150 & 190) bp on defensin gene, respectively. The estimated allelic frequency for leptin gene ($MboI^+$ and $MboI^-$) ranged from 0.25–0.975 and for defensin gene ($TaqI^+$ and $TaqI^-$) ranged from 0.72-0.38 respectively. The restriction sites for both leptin and defensin loci is new and different from other research groups where have been reported.

Keywords: Mazandarani native cattle breed, Leptin, Defensin, polymorphism

مقدمه:

لپتین هورمون پروتیینی بسیار آب گریز است با وزن مولکولی kDa ۱٦ و ۴۶۱ اسید آمینه که توسط بافت چربی سفید سنتز شده و جزء خانواده سیتوکینها می‌باشد. این هورمون شامل ٤ حلقه مارپیچ A, B, C, D است. يك باند دی‌سولفیدی که حلقه‌های C و D را بهم متصل می‌کند در پایداری ساختار لپتین نقش مهمی دارد (Liefers et al., 2004). بخش انتهايي نیتروژنی (N ترمینال) این پروتئین در عمل بیولوژيكی و نیز اتصال آن به گیرنده نقش بسیار مهمی بازی می‌کند (Wallace. 2000). این هورمون بر میزان مصرف غذا، تعادل انرژی، قابلیت باروری و ایمنی موثر است (Liefers et al. 2002). دیفنسینها خانواده بزرگی از پپتیدهای کاتیونی غنی از سیستیین هستند که توانایی زیادی در مقابله و ازبین بردن عفونتها و انوع مختلف باکتریها، قارچها و ویروسهای کپسول دار دارند (Kaiser, et al. 2000). در گاو ژن β-دیفنسین شامل ۲ اگزون و یک اینترون بوده که روی کرموزوم شماره ۲۷ واقع است (Ryniewicz, et al. 2002). نتایج تحقیقات مختلف نشان دهنده بیان شدن ژن بتا- دیفنسین در سلولهای اپیتلیالی و همچنین در سلولهای نوتروفیلی میباشد (Kaiser, et al. 2000). در سالهای اخیر نوع β۱- دیفنسین در سلولهای بافت پستانی مشاهده شده است (Goldammer, et al. 2004).

مواد و روشها:

از تعداد ۱۶۰ راس گاو بومی ۵ منطقه مختلف مازندران، نمونه خون جمع آوری و برای جلوگیری از لخته شدن آنها از ماده ضد انعقاد EDTA استفاده شد. استخراج ماده ژنتیکی (DNA) به روش نمکی (saltiog out) انجام شده و نمونه های استخراج شده برای مراحل بعدی در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شد.
جفت آغازگر F: TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT و R: GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT
برای تکثیر قطعه مشخصی از ژن لپتین و برای تکثیر قسمتی از ژن بتا- دیفنسین، از جفت آغازگرهاي F:GCCAGCATGAGGCTCCAT و R:AACAGGTGCCAATCTGT استفاده شد.

نتایج:

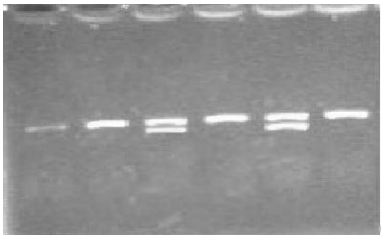
در این تحقیق با استفاده از جفت آغازگر بکار رفته برای ژن لپتین توانستیم قسمتی از این ژن که از باز شماره ۱۹۴۰ تا ۲۳۶۲ (۴۲۲جفت باز) را شامل میشده، تکثیر کنیم. قطعه تکثیر شده در قسمت اینترون ۲ ژن لپتین واقع است. پس از انجام واکنش PCR، با استفاده از آنزیم MboI، محصولات مورد هضم قرار گرفت و برش آنزیمی محصولات، دو باند ۳۹۰ و ۳۲ جفت بازی را نتیجه داد (شکل۱). فراوانی آللی بدست آمده برای +MboI و -MboI بترتیب برابر ۰/۲۵ و ۰/۹۷۵ بوده است. با استفاده از جفت پرایمر بکار رفته برای ژن دیفنسین توانستیم قطعه ای از ژن بتا-دیفنسین بطول حدود ۵۰۰ جفت باز را تکثیر کنیم. هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با استفاده از آنزیم TaqI منجر به ایجاد دو قطعه به اندازههای حدود ۱۵۰ و ۲۰۰ جفت باز شد (شکل۲). قطعه ای از ژن که آنزیم توانسته آن را برش دهد با علامت +TaqI و قطعه ای که برش نخورده با علامت -TaqI نشان گذاری شد. فراوانی محاسبه شده برای آللهای +TaqI و -TaqI بترتیب برابر ۰/۷۲، ۰/۴۵ بوده است.

بحث:

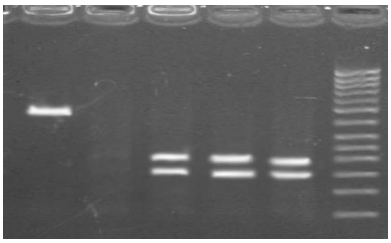
از آنجایی که در این تحقیق جفت آغازگر بکار رفته برای تکثیر قسمتی از ژن لپتین، از مقاله Liefers و همکاران گرفته شده، انتظار میرفت که نتایج بدست آمده، مشابه نتایج بیان شده در تحقیق Liefers باشد. اما طول قطعه تکثیر شده در این تحقیق ۴۲۲ جفت باز بوده که حدود ۲۲ جفت باز از قطعه تکثیر شده توسط Liefers بلندتر بوده است و هضم آنزیمی قطعه مورد نظر تولید دو قطعه ۳۹۰ و ۳۲ جفت بازی را کرده است بطوری که در تحقیق Liefers، قطعه ۴۰۰ جفت بازی با برش آنزیمی تبدیل به دو قطعه ۳۰۰ و ۱۰۰ جفت بازی شده است. بررسی های بیشتر نشان دهنده جایگاه صحیح برش آنزیمی روی باز شماره ۱۹۷۱ بوده که نتایج بدست آمده در این تحقیق را تایید میکند. از مقایسه جایگاه برش بدست آمده در این تحقیق با مقالات مشابه در این زمینه و نیز جهشهای تک نوکلئوتیدی ذکر شده در مقالات مختلف تا سال ۲۰۰۴، میتوان گفت که ژنوتیپهای بدست آمده در این تحقیق در هیچکدام از منابعی که تاکنون ارایه و بررسی شده است وجود نداشته و یک جایگاه برش جدید در ژن لپتین گاو شناسایی شده است.
بدلیل مشابه بودن توالی آغازگر بکار رفته برای ژنهای β1, β4, β5 و β12، در مراحل اولیه آزمایش پس از انجام واکنش PCR، ما چندین باند مختلف از محصولات را مشاهده کردیم. اما برای سهولت تفسیر نتایج بدست آمده، شرایط PCR را طوری تنظیم کردیم که درنهایت تنها یک باند تکثیر شده روی ژل مشاهده شود. بررسیهای بیشتر نشان دهنده تطابق بسیار نتایج بدست آمده با ژن بتا-دیفنسین۱۲ میباشد. در این ژن دو جایگاه برش برای آنزیم TaqI وجود دارد که قطعه تکثیر شده بطول حدود بیش از ۵۳۴ جفت باز (قسمتی از اگزون یک و دو و تمام اینترون بینشان) را به اندازههای ۱۵۳، ۱۹۱ و یک باند دیگر که اندازه آن باید برابر با یکی از دو قطعه قبل باشد تقسیم میکند. به احتمال زیاد باند سوم باید حدود ۱۹۰ جفت باز داشته باشد چون این قطعه روی ژل روشن تر از قطعه ۱۵۳ جفت بازی است. بنابراین با وجود ۳ باند، ما عملا ۲ باند روی ژل مشاهده میکنیم. در این صورت ما فرم دیگري از ژن بتا- دیفنسینها را گسترش داده ایم و میتوان گفت که علاوه بر چهار ژن نام برده در بالا که آغازگر یکسان دارند یکی دیگر از بتا- دیفنسینها وجود دارد که با همان آغازگر تکثیر میشود (احتمالا بتا- دیفنسین ۱۳). تشابه چشمگیر جفت آغازگر بکار رفته برای چندین ژن بتا-دیفنسین این فرضیه را که منشا همگی آنها از یک ژن بوده و در طی زمان هریک دچار تغییراتی شده اند را تایید میکند.
نتایج بدست آمده از هضم آنزیمی و تعیین چند شکلی در ژن بتا-دیفنسین۱۲ تا کنون در جایی گزارش نشده است و تنها مقاله ارایه شده در این زمینه همان تحقیق Ryniewicz وهمکاران بوده که نتایج بدست آمده درآن بدلیل در نظر گرفتن ژنوتیپ ترکیبی دیفنسینها قابل انطباق و مقایسه با نتایج بدست آمده در این تحقیق نیست.

منابع:

- Goldammer, T., Zerbe. H., Molennar, A., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Kata,S. R., Seyfert, H. M., 2004. Mastitis increases mammary mRNA abundance of β-defencin 5, toll-like-reseptor 2 (TLR2), and TLR4 but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laratory Immunology. p. 174-185.*
- Kaiser, V., Diamond, G., 2000. Expression of mammalian defensin genes. *Journal of Leukocyte Biology. Vol. 68, p. 779.*
- Liefers, S. C., Te Pas, M. F. W., Veerkamp,R. F., & Van der Lende, T., 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. J. Dairy Sci. 85, 1633-1638.
- Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., te Pas, M. F. W., Delavaud, C., Chilliard, Y., & van der Lende, T., 2004. A missense mutation in the bovine leptin reseptor is associated with leptin concentrations during late pregnancy. International Society for Animal Genetics. 35, 138-141.
- Ryan, L. K., Rhodes, I., Bhat, M., Diamond, G., 1998. Expression of β-defensin genes in bovine alveolar macrophages. *Infection and Immunity. p.878-881*
- Ryniewicz, Z., Zwierzchowski, L., Bagnicka, E., Krzyzewski, J., Strzalkowska, N., 2002. Preliminary investigations on the polymorphysm of defensin Genes in cattle. *Animl Science Papers and Reports. Vol. 20, No. 2, 125-131.*



شکل۱: محصولات حاصل از هضم ژن لپتین



شکل۲: محصولات حاصل از هضم ژن بتا-دیفنسین

لینک های مفید

سرویس های ویژه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

فیلم های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی STRS

کارگاه های آموزشی

عضویت درخبرنامه