

## بررسی چند شکلی ژنتیکی ژن‌های کاندیدا (کالپاستاتین و آنتی‌ژن‌های لنفوسیتی گاوی) در گاوهای نژاد سیستانی ایران با استفاده از روش PCR-RFLP

### Study on the Genetic Polymorphisms of Candidate Genes (Calpastatin and *BoLA*) in Sistani Cattle Using PCR-RFLP

مهدی خسروی<sup>۱</sup>، محسن فخر کاظمی<sup>۱</sup>، امیر محمدی<sup>۲</sup> و محمد رضا نصیری<sup>۳</sup>

#### چکیده

انتخاب حیوان بر اساس نشانگرهای مولکولی یکی از جدیدترین روش‌های اصلاحی است که می‌تواند باعث بهبود صحت پیش-بینی و پاسخ به انتخاب شود. در این آزمایش ژن‌های کاندیدای کالپاستاتین و آنتی‌ژن‌های لنفوسیتی گاوی (*BoLA-DRB3*) در گاوهای نژاد سیستانی با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی شدند. ژن کالپاستاتین در بررسی راندمان رشد و کیفیت گوشت به‌عنوان یکی از ژن‌های کاندیدا شناخته شده است و از ژن *DRB3* به‌عنوان یک ژن کاندیدا در ارتباط با بیماری‌ها و صفات ایمونولوژیکی در گاو استفاده می‌شود. از ۸۹ راس گاو نژاد سیستانی در ایستگاه تحقیقات گاو سیستانی زهک به‌طور تصادفی خون‌گیری به‌عمل آمد. استخراج DNA از خون و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) جهت تکثیر ناحیه چند شکلی ژن‌های کالپاستاتین و *BoLA-DRB3* انجام گرفت. واکنش هضم آنزیمی قطعات تکثیر شده ژن کالپاستاتین به‌وسیله آنزیم محدود الاثر *MspI* و ژن *BoLA-DRB3* به‌وسیله آنزیم-های *Hae III*، *Rsa I* و *BstYI* انجام گرفت. فراوانی‌های آللی M و N ژن کالپاستاتین در این نژاد به‌ترتیب ۰/۷۶۴ و ۰/۲۳۶ برآورد گردید. آزمون  $\chi^2$  تعادل هاردی-واینبرگ را در جمعیت نشان داد. در طی این پژوهش ۱۹ آلل در جایگاه ژنی *BoLA-DRB3* مربوطه در گاو سیستانی شناسایی شد. فراوانی آللی در این نژاد بین ۰/۲۲ تا ۰/۱ بود و دو آلل ۸\* و ۳۴\* فراوان‌ترین آلل‌ها در جمعیت مورد مطالعه بودند. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در این نژاد می‌تواند به برنامه‌های انتخابی آینده مخصوصاً انتخاب به کمک نشانگر (MAS) کمک نماید.

واژه‌های کلیدی: گاو سیستانی، کالپاستاتین، *BoLA-DRB3*، چند شکلی، PCR-RFLP

۱. دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر، کاشمر  
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد  
۳. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

ژن *DRB3* بسیار پلی‌مورفیک بوده و مورد توجه خاص است به‌طوری که فقط در اگزون شماره ۲ این مکان حدود ۸۸ آلل مختلف شناسایی شده‌اند که روی بسیاری از صفات مرتبط با ایمنی در دام‌ها، میزان سلول‌های سوماتیک شیر (SCS)، ورم پستان و صفات تولیدی (نظیر شیر، چربی و پروتئین) اثر دارند (Maillard 2001 & Dietz 1997). اولین بار از روش PCR-RFLP برای تشخیص جهش‌ها و آلل‌های جایگاه ژنی *DRB3* استفاده شده و کارآیی این روش با تشخیص ۳۰ آلل در این مکان ژنی نشان داده شده است (Van Eijk 1992).

هدف از اجرای این پژوهش بهینه کردن روش PCR-RFLP جهت بررسی چندشکلی ژنتیکی و فراوانی آللی در جایگاه‌های ژنی کالپاستاتین و *BoLA* در گاوهای نژاد سیستانی ایران می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه گیری و استخراج DNA

از تعداد ۸۹ راس گاو نژاد سیستانی در ایستگاه تحقیقات گاو سیستانی زهک به‌طور تصادفی خون‌گیری بعمل آمد. برای جلوگیری از انعقاد خون به میزان ۰/۱ حجم نمونه‌ها محلول EDTA (۰/۵ مولار با pH=۸) اضافه شد. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر خون با استفاده از روش گوانیدین سیلیکاژل انجام شد. این روش استخراج مبتنی بر استفاده از ایزوتیوسیانات گوانیدین به‌عنوان یک عامل لیز کننده سلول‌های خونی و جمع‌آوری DNA آزاد شده به کمک ذرات سیلیکا می‌باشد (Boom 1989). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش‌های الکتروفورز مقایسه‌ای استفاده گردید.

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

##### تکثیر ژن کالپاستاتین

دو میکرولیتر DNA در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر مخلوط PCR با استفاده از کیفیت GenePak PCR Universal تکثیر شد. هرکیت حاوی غیر فعال کننده آنزیم DNA پلی‌مراز جهت شروع، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۲۰۰ میلی‌مول  $MgCl_2$  و بافر استاندارد می‌باشد. مخلوط PCR شامل ۱۰ میکرولیتر PCR diluent، ۳ میکرولیتر از Mix primer و ۵ میکرولیتر ddH<sub>2</sub>O است. برنامه PCR شامل ۳۵ سیکل تکثیر با دمای واسرشت شدن اولیه ۹۵°C (به مدت ۲ دقیقه)، دمای واسرشت ثانویه ۹۴°C (به مدت ۱ دقیقه)، دمای اتصال ۶۱°C (به مدت ۴۵ ثانیه) می‌-

امروزه توجه به تردی گوشت (Meat tenderness) از مواردی است که همواره شرکت‌های تجاری جهانی را در یافتن راهکارهای مناسب در جهت ارتقاء کیفیت این پارامتر، به رقابت واداشته است (Koochmarei 1994). سیستم کالپاین یک مجموعه پروتئینی پروتئولیتک می‌باشد که وجود آن در همه سلول‌های عضلانی ثابت شده است. این سیستم شامل پروتئازهای طبیعی وابسته به کلسیم، است که نقش اساسی در رشد ماهیچه و تردی گوشت ذبح شده را دارند. به‌طور کلی آنزیم‌های کالپاین از طریق کنترل تجزیه میوفیبریل‌ها در طول حیات حیوان، رشد ماهیچه را تحت کنترل دارند و پس از کشتار، از طریق تجزیه کردن صفحات Z موجود در ماهیچه اسکلتی و هم‌چنین تضعیف پیوندهای موجود بین میوفیبریل‌ها، باعث تردی و بازارپسندی گوشت می‌شوند (Koochmarei 2002). اکثر محققان عقیده دارند که مهم‌ترین پروتئاز مؤثر بر تردی گوشت، کالپاستاتین، مهار کننده اختصاصی کالپین است، زیرا که سطح کالپاستاتین عضله پس از کشتار بر تردی و نرمی گوشت مؤثر است (Koochmarei 1994)، (Chung 2003). ژن کالپاستاتین در گاو روی کروموزوم شماره هفت قرار دارد و شناسایی جهش‌های موجود در روی این ژن با استفاده از تکنیک‌های RFLP و SSCP از جمله دیدگاه‌های جدید برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد این ژن می‌باشد.

مکان ژنی مجموعه‌ی سازگاری بافتی (Major Histocompatibility Complex) کد کننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطح لوکوسیت‌ها می‌باشد که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی نقش دارند. در گاو این مکان ژنی به نام *BoLA* (Bovine Leucocyte Antigen) معروف می‌باشد که در سه گروه ژنی به نام‌های کلاس I، کلاس II و کلاس III روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۳ گاو قرار گرفته‌اند (Lewin 1996 & Kelm 1997). هر یک از این گروه‌های ژنی دارای ژن‌های متعددی است و هر ژن نیز ممکن است تا بیش از چند ده آلل داشته باشد. ویژگی‌های دو گروه I و II این مجموعه تا کنون مورد بررسی قرار گرفته است، اما نقش ژن‌های گروه III هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. گروه II خود به دو زیر گروه تقسیم می‌شود که در یک سوم طول بازوی کوتاه کروموزوم از یکدیگر جدا شده‌اند. گروه IIa شامل مکان‌های ژنی *DRB3*، *DRB2*، *DRB1*، *DRA*، *DQA2*، *DQA*، *DQB1* و *DQB2* می‌باشد و در زیر گروه IIb نیز مکان‌های ژنی *DOA*، *DYA*، *DYB*، *DIB* و *DOB* وجود دارند.

فن آوری زیستی در کشاورزی / جلد نهم / شماره یک / تابستان ۸۹  
 باشد و تکثیر نهایی شامل ۳۵ سیکل در دمای ۷۲°C (به مدت ۱۰ دقیقه) است. محصولات PCR بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش بر اساس پرایمرهای ژن کالپاستاتین گاوی ساخته شدند و یک قطعه ۶۲۲ bp از ژن مربوطه را در واکنش PCR تکثیر شد (Chung 1999).  
 توالی آغازگرها به شرح ذیل بود:

CAST 1C 5'-CTTGTTCATCCGACTTCACCT  
 CAST 1D 3'-TCTTCTTTTCTCTTTGGGTGGA

### تکثیر ژن BoLA-DRB3

تکثیر ناحیه پلی مورفیک اگزون ۲ جایگاه ژنی DRB3 به طول ۲۸۴ جفت باز با روش Hemi-Nested PCR در طی دو مرحله صورت گرفت (Van Eijk 1992).  
 در مرحله اول PCR از دو آغازگر HLO30 و HLO31 استفاده شد.

5'- ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HLO30  
 5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3' HLO31  
 و در مرحله دوم از دو آغازگر HLO30 و HLO32 برای تکثیر استفاده شد.

5'- ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' HLO30  
 5'- TCGCCGCTGCACAGTGAACTCTC-3' HLO32  
 در هر دو مرحله، واکنش در حجم نهایی ۲۰

میکرولیتر شامل یک واحد تک پلیمرز، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میکرومول MgCl<sub>2</sub>، ۱۰ تا ۲۰ پیکامول مخلوط پرایمرها، ۰/۸ میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم انجام شد. در مرحله اول تکثیر، واسرشت شدن DNA در ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه شروع شد و طی ۱۰ سیکل با دمای ۹۴°C (به مدت ۲۵ ثانیه)، ۶۰°C (به مدت ۳۰ ثانیه)، ۷۲°C (به مدت ۳۰ ثانیه) و مرحله تکثیر انتهایی ۷۲°C (به مدت ۵ دقیقه) به اتمام رسید. در مرحله دوم از ۳-۴ میکرولیتر از محصولات حاصل از مرحله اول PCR در طی ۲۵ سیکل با دمای ۹۴°C (به مدت ۴۰ ثانیه)، ۶۵°C (به مدت ۳۰ ثانیه) و مرحله تکثیر انتهایی ۷۲°C (به مدت ۵ دقیقه) انجام شد (Kelm 1997). پس از انجام واکنش‌های تکثیر، برای تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد.

### واکنش هضم آنزیمی محصولات PCR به روش RFLP

#### هضم آنزیمی ژن کالپاستاتین

برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از آنزیم محدودالایتر *MspI* به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷°C انجام

گرفت. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر و واکنش‌گرها شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. پس از هضم آنزیمی، محصولات هضم با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مشاهده شدند.

### هضم آنزیمی ژن BoLA-DRB3

جهت انجام هضم آنزیمی از آنزیم *RsaI*، *Hae III* و *BstY I* استفاده گردید. واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم‌های *RsaI* و *Hae III* و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم *BstY I* به مدت ۳ ساعت انجام گشت. واکنش‌گرها شامل ۵ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۵ واحد آنزیم برشی و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر بودند. محصولات هضم شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸ درصد الکتروفورز و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. در انتها داده‌ها با نرم افزار Popgene32 نسخه ۱/۳۲ آنالیز شدند.

### نتایج و بحث

استخراج DNA با روش تیوسیانات گوانیدین سیلیکاژل مقادیر بالایی از DNA ژنومی (حدود ۷۰ng) را حاصل کرد که با اسپکتروفتومتر ارزیابی گردید.

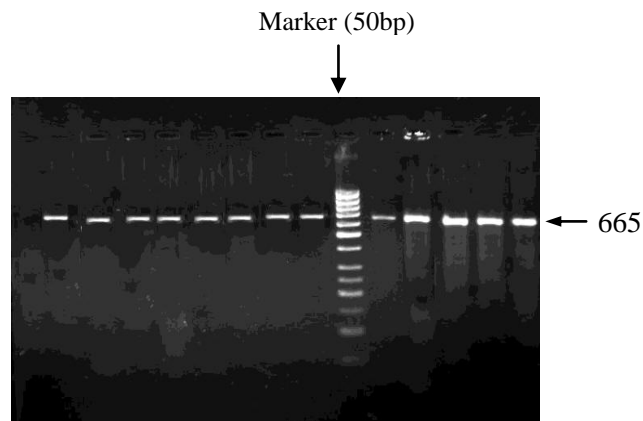
### کالپاستاتین

نتیجه واکنش پلیمرز، تکثیر قطعه ۶۲۲ جفت بازی از ژن *CAST1* را تایید می‌کند (شکل ۱). هضم توسط آنزیم محدودالایتر *MspI* سه ژنوتیپ MM، MN و NN را نشان داد (شکل ۲). ژنوتیپ MM بیشترین تعداد و فراوانی را در گله مورد بررسی نشان داد. فراوانی آللی ۰/۷۶ و ۰/۲۴ به ترتیب برای آلل M و N به دست آمد (جدول ۱). نتایج مشابهی بر روی گاو توسط چانگ (Chung 1999) گزارش گردید. به طوری که فراوانی ۰/۷۱ و ۰/۲۹ را برای M و N گزارش شد. هم‌چنین پالمر نتایج مشابهی را بر روی گوسفند گزارش نمود، به طوری که فراوانی ۰/۷۷ و ۰/۲۳ را برای M و N گزارش نمود (Palmer 1998). تست  $\chi^2$  برقراری تعادل هاردی واینبرگ را در گله نشان داد که گویای این مطلب است که هیچ‌گونه انتخابی در جمعیت در جهت افزایش یا کاهش ژنوتیپ‌های ژن کالپاستاتین صورت نگرفته است. سطح هتروزیگوسیتی یکی از شاخص‌های میزان تنوع ژنتیکی در یک جمعیت به حساب می‌آید. سطح هتروزیگوسیتی پایینی برای ژن

بررسی چند شکلی ژنتیکی ژن‌های کانیدیدا (کالپاستاتین و آنتی‌ژن‌های لنفوسیتی گاوی) ...

و کاهش سطح هتروزیگوسیتی گردیده است (جدول ۲).

کالپاستاتین در گله مورد مطالعه به دست آمد که علت آن را می‌توان بسته بودن این گله دانست که باعث افزایش هم‌خونی



شکل ۱: محصولات PCR ژن کالپاستاتین (قطعه ۶۲۲ جفت بازی) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪. نشانگر ملکولی مورد استفاده M50 می‌باشد

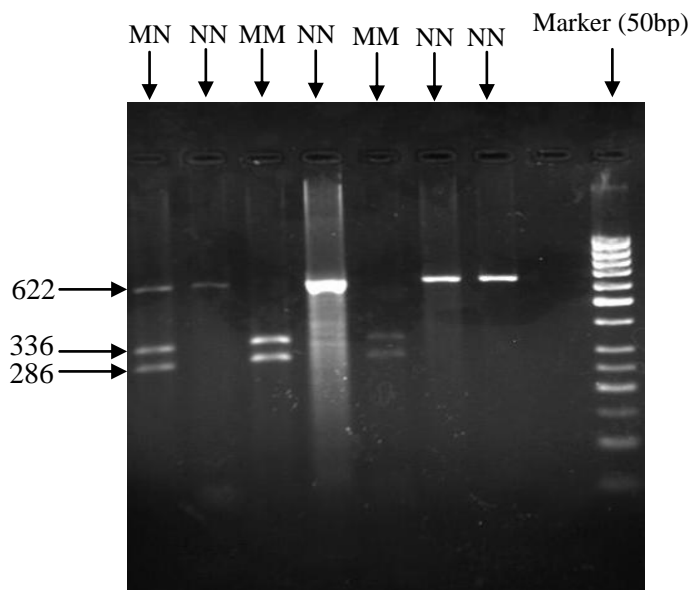
Fig 1: PCR-products of Calpastatin gene with 284 bp size in 1.5% agarose gel. As a molecular marker M50 is used

جدول ۱: فراوانی ژنوتیپی و آلی ژن کالپاستاتین و تست‌های کای مربع

Table 1: Genotypic Frequency and Alleles Frequency of Calpastatin gene and  $\chi^2$  test

$\chi^2$	فراوانی آلی		فراوانی ژنوتیپی	تعداد	ژنوتیپ
	N	M			
			۶۱/۸۰	۵۵	MN
۳/۴۲ <sup>NS</sup>	۰/۲۴	۰/۷۶	۲۹/۲۱	۲۶	MN
			۸/۹۹	۸	NN

NS:  $\chi^2$  غیر معنی‌دار



شکل ۲: محصولات هضمی ژن کالپاستاتین. نشانگر ملکولی مورد استفاده M50 می‌باشد

Fig 2: Restriction analysis of amplification products of Calpastatin gene. As a molecular marker M50 is used

مارکر مرتبط با کیفیت گوشت با ژن کالپاستاتین پیوستگی دارد. آن‌ها در اینترون ژن *CASTI*، جهش‌های نقطه‌ای فراوانی پیدا کردند. در مجموع سه آلل گزارش کردند که آلل a و b در ۶ جهش نقطه‌ای در ناحیه (1C/1D) با هم تفاوت داشــــتند و آلــــل c ســــه (Single nucleotide polymorphism) SNP متفاوت با آلل a و b و جمعاً ۹ جهش نقطه‌ای داشت (Palmer 1996).

جدول ۳: اندازه مؤثر آلی برای جایگاه ژنی کالپاستاتین

Table 3: Effective number of alleles of Calpastatin gene

تعداد نمونه	اندازه مؤثر آلی	جایگاه ژنی
۸۹	۱/۵۶	کالپاستاتین

*BoLA-DRB3*: نتیجه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مورد انتظار بود یک قطعه دارای ۲۸۴ جفت بازی از اگزون ۲ ژن *BoLA-DRB3* تکثیر شده است که برای تشخیص اندازه قطعات از مارکر ۱۰۰ جفت بازی استفاده شده است (شکل ۳).

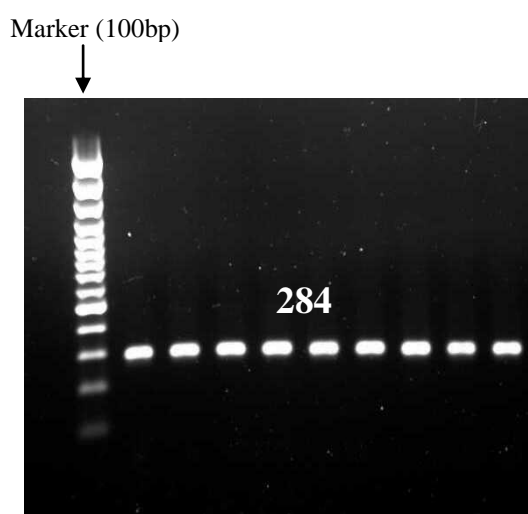
مقایسه باندهای موجود در نمونه‌های هضم شده با سه آنزیم *RsaI*، *HaeIII* و *BstYI* با نشانگر وزنی *pUC19* بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید در شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۲: هتروزایگوسیتی مشاهده شده، هتروزایگوسیتی موردانتظار و متوسط هتروزایگوسیتی جایگاه ژنی کالپاستاتین

Table 2: Observed heterozygosity and expected heterozygosity of Calpastatin gene

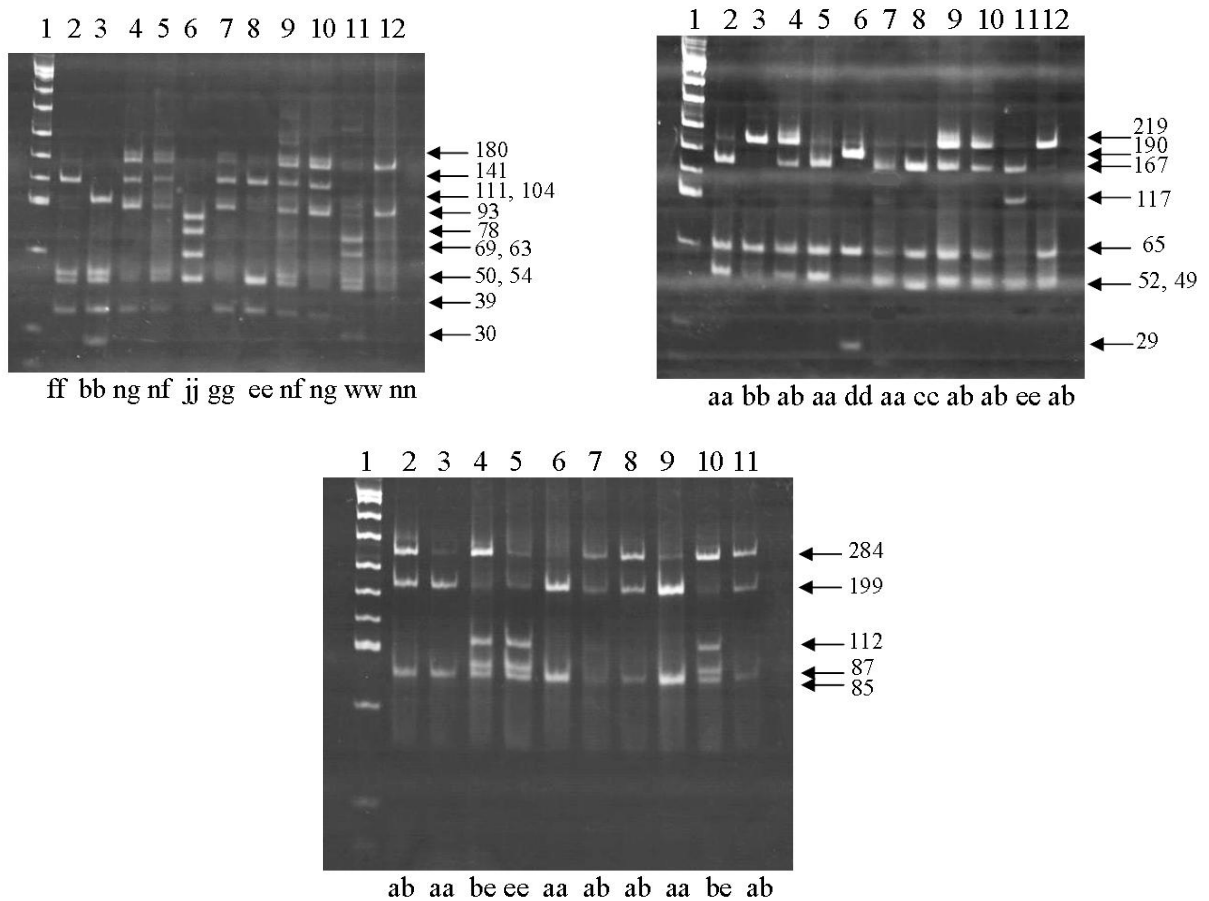
جایگاه ژنی	هتروزایگوتی موردانتظار	هتروزایگوتی مشاهده شده
کالپاستاتین	۰/۳۶	۰/۲۹

تعداد آلل موثر، تعداد آلل‌هایی است که هتروزایگوسیتی یکسان ایجاد می‌نماید. این پارامتر در جدول ۳ آورده شده است. تعداد آلل موثر برای ژن کالپاستاتین در گاوهای نژاد سیستانی ۱/۵۶ به دست آمد. با توجه به این که کالپاستاتین به‌عنوان مهم‌ترین تنظیم کننده فعالیت کالپین محسوب می‌گردد و آنزیم کالپین بر کیفیت گوشت بسیار موثر می‌باشد، بنابراین لزوم بررسی ژنتیکی ژن کالپاستاتین احساس می‌شود. طی یک پژوهش چند شکلی ژن کالپاستاتین با روش PCR-RFLP و با آنزیم‌های *EcoRI*، *BamHI*، *BglIII* و *PstI* در خوک مورد بررسی گرفت، در این بررسی هیچ‌گونه چند شکلی در رابطه با آنزیم‌های *PstI*، *BglIII* و *DraI* پیدا نشد (Lonergan 1995). در پژوهشی دیگر چند شکلی آلی ژن *CASTI* (1C/1D) مورد بررسی قرار گرفت و سه آلل a، b و c در این ناحیه شناسایی و فراوانی این آلل‌ها را به ترتیب ۰/۱۸/۶۹ و ۰/۱۳ گزارش شد (Roberts 1996). پالمر و همکاران گزارش کردند که



شکل ۳: تصویر تکثیر قطعه ۲۸۴ جفت بازی از ژن *BoLA-DRB3* جایگاه ژنی ۲

Fig 3: PCR-products of BoLA-DRB3.2 with 284 bp size



شکل ۴: الگوهای باندهای حاصل از هضم آنزیمی بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید  
Fig 4: Restriction analysis of amplification products in polyacrylamide gel.

نشندند (Da Mota 2002) در جمعیت هلشتاین کانادا فراوانی آلل‌های ۸\* و ۱۱\* به ترتیب ۲۰/۱ و ۱۴/۹ درصد (Roberts 1996) و در گاوهای جرسی فراوانی آلل ۸\* معادل ۱۱/۳ درصد (Kelm 1997) گزارش شده است. در صورتی که در گاوهای نژاد سیستانی فراوانی آلل ۸\*، ۲۲/۴۵ و فراوانی آلل ۱۱\*، ۵/۱ بود. در هلشتاین ایرانی برای این مکان ژنی ۲۷ آلل شناسایی شده که بیشترین فراوانی مربوط به آلل ۸\* می‌باشد (Nassiry 2004). در تحقیقاتی که بر روی گاوهای گلپایگانی ایران انجام گرفته است، برای این مکان ژنی ۱۹ آلل گزارش شده است (Nassiry 2008).

هم‌چنین ۱۷ آلل در نژاد Russian Mongolian و ۲۱ آلل در نژاد Russian Black برای مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* گزارش شده است که بیشترین فراوانی به ترتیب برای آلل‌های ۷\* و ۲۲\* می‌باشد (Mohammadabadi 2003). در یک پژوهش بر روی چهار نژاد گاو ژاپنی بیشترین تعداد آلل در نژاد Japanese Black (۲۳ آلل) و کمترین تعداد آلل در نژاد Jersey (۱۴ آلل) گزارش شده است (Takeshima 2001).

در این پژوهش تعداد ۱۹ آلل در مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* توسط روش PCR-RFLP شناسایی شد و بین آلل‌های شناسایی شده احتمال جدید بودن یکی از این آلل‌ها (آلل X) مطرح شد. جهت تایید وجود این آلل جدید نیاز به انجام آزمایشات تعیین توالی می‌باشد که در این پژوهش انجام نشده است. فراوانی‌های آللی در جمعیت سیستانی بین ۱ تا ۲۲ در صد به دست آمد. ۵ آلل ۸\*، ۳۴\*، ۱۵\*، X\* و ۴۴\* *BoLA-DRB3.2* به ترتیب با فراوانی ۲۲/۴۵، ۲۱/۴۳، ۸/۱۶، ۸/۱۶ و ۶/۱۲ در صد از بیشترین فراوانی در این جمعیت برخوردار بودند. آلل‌های ۳\*، ۲۹\*، ۳۷\* و ۵۱\* *BoLA-DRB3.2* کمترین فراوانی را در نژاد مورد بررسی داشتند (جدول ۴). فراوانی ژنوتیپی به دست آمده نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ‌های ۸/۸ و ۳۴/۳۴ به ترتیب با فراوانی ۲۰/۴ و ۱۴/۲۸ می‌باشد (جدول ۵).

در گاو نژاد Gir که بومی کشور برزیل است تعداد ۱۷ آلل در این مکان ژنی شناسایی شد. که دو آلل ۲۰\* و ۶\* دارای بیشترین فراوانی می‌باشند ولی آلل‌های ۸\* و ۱۱\* مشاهده

جدول ۴: فراوانی‌های آللی جایگاه ژنی

*BoLA-DRB3.2* در نژاد سیستانیTable 4: Frequencies of *BoLA-DRB3.2* alleles in Sistani cattle

آلل	فراوانی (%)
*۸	۲۲/۴۵
*۳۴	۲۱/۴۳
*۱۵	۸/۱۶
*x	۸/۱۶
*۴۴	۶/۱۲
*۱۱	۵/۱
*۱۰	۴/۰۸
*۷	۴/۰۸
*۴۷	۳/۰۶
*۱۳	۳/۰۶
*۴۵	۲/۰۴
*۳۶	۲/۰۴
*۲۴	۲/۰۴
*۲۱	۲/۰۴
*۴	۲/۰۴
*۵۱	۱/۰۲
*۳۷	۱/۰۲
*۲۹	۱/۰۲
*۳	۱/۰۲

تعیین می‌شود. در پژوهش حاضر هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۲۰۴۱ و ۰/۸۸۵۳ بود که پایین بودن هتروزیگوسیتی این مکان ژنی در نژاد سیستانی را نشان می‌دهد، همان‌طور که در مورد جایگاه کالپاستاین اشاره شد علت پایین بودن هتروزیگوسیتی را می‌توان بسته بودن این گله نسبت داد (جدول ۶). هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در نژاد هلشتاین به ترتیب ۹۲/۱ و ۹۰/۱ درصد، در نژاد شورت هورن ژاپنی ۹۲ و ۹۱/۲ درصد، در نژاد جرسی ۹۱/۳ و ۸۸/۷ درصد و در نژاد سیاه ژاپنی ۹۰/۵ و ۹۱/۴ درصد گزارش شده است (Takeshima 2001). تعداد آلل موثر در تنوع این مکان ژنی در گاوسیستانی معادل ۸/۰۸۴ بود. به‌طور کلی این پارامتر نشان می‌دهد که تعداد آلل‌های موثر در تنوع ژنتیکی این مکان زیاد بوده است. تعداد آلل موثر فقط در مواردی با تعداد آلل واقعی برابر است ولی در بیشتر موارد تعداد آلل موثر کمتر از تعداد آلل واقعی است (Dietz 1997).

مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در ایجاد پاسخ ایمنی نقش اساسی دارد لذا این مکان ژنی برای مطالعات پایه‌ای ژنتیکی در مورد بررسی مقاومت به بیماری‌ها دارای اهمیت زیادی است. بررسی‌ها نشان می‌دهند گاوهایی که دارای آلل‌های \*۱۱، \*۲۲ و \*۲۸ هستند نسبت به بیماری لکوز مقاوم می‌باشند (Sulimova 1995 & Udina 1998) وجود آلل \*۱۱ در نژاد سیستانی می‌تواند نشانه‌ای برای مقاومت این نژاد به بیماری لکوز باشد.

پژوهش حاضر وجود چندشکلی ژنتیکی برای ژن‌های کالپاستاین و *BoLA-DRB3.2* را به‌خوبی در گاوهای نژاد سیستانی ایران نشان داد. از وجود این چند شکلی‌ها، جهت بررسی ارتباط بین چند شکلی ژنتیکی با صفات تولیدی و ایمنولوژیکی از قبیل تولید و کیفیت گوشت و ارتباط با بیماری‌ها به‌عنوان مارکر ژنتیکی می‌توان استفاده نمود.

تمام این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که در مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* چندشکلی بسیاری وجود دارد که تعداد و فراوانی آلل‌ها از نژادی به نژاد دیگر تفاوت دارد (Maillard 2001., Da Mota 2002.& Mossafer 2005). میزان تغییرات ژنتیکی در داخل یک جمعیت با اندازه‌گیری هتروزیگوسیتی و تعداد آلل موثر مکان ژنی مورد مطالعه

بررسی چند شکلی ژنتیکی ژن‌های کانیدیا (کالپاستاتین و آنتی‌ژن‌های لنفوسیتی گاوی) ...

جدول ۵: فراوانی های ژنوتیپی جایگاه ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد سیستانی

Table 5: Genotypic Frequency of *BoLA-DRB3* in Sistani cattle

ژنوتیپ	تعداد	RsaI Patterns	HeaIII Patterns	BstYI Patterns	فراوانی (%)
۷/۷	۱	EE	CC	CC	۲/۰۴
۳۴/۳۴	۷	LL	BB	AA	۱۴/۲۸
X/X	۴	LE	BC	AA	۸/۱۶
۸/۱۱	۱	FG	AA	AE	۲/۰۴
۱۵/۱۵	۳	II	AA	BB	۶/۱۲
۱۳/۱۳	۱	HH	AA	BB	۲/۰۴
۸/۸	۱۰	FF	AA	AA	۲۰/۴
۴۷/۳۴	۱	LW	BA	AA	۲/۰۴
۴۳/۱۳	۱	LH	AB	AB	۲/۰۴
۴۴/۴۴	۳	KK	II	BB	۶/۱۲
۴۵/۴۵	۱	SS	BB	DD	۲/۰۴
۴۷/۴۷	۱	WW	AA	AA	۲/۰۴
۱۵/۳۷	۱	IO	AA	BB	۲/۰۴
۲۴/۲۴	۱	NN	BB	BB	۲/۰۴
۳۴/۳۴	۱	LL	BB	AA	۲/۰۴
۲۱/۷	۱	LE	CE	BC	۲/۰۴
۱۱/۱۱	۲	GG	AA	EE	۴/۰۸
۱۰/۱۰	۲	FF	AA	BB	۴/۰۸
۲۱/۳۴	۱	LL	BE	BA	۲/۰۴
۲۹/۵۱	۱	PG	AC	CB	۲/۰۴
۴/۴	۱	CC	AA	BB	۲/۰۴
۸/۳۴	۱	LF	AB	AA	۲/۰۴
۳۶/۳۶	۱	LL	AA	BB	۲/۰۴
۱۵/۳۴	۱	LI	AB	BA	۲/۰۴
۷/۳	۱	BE	BC	CB	۲/۰۴

جدول ۶: هتروزایگوسیتی مشاهده شده، مورد انتظار و تعداد آلل موثر در مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد سیستانی

Table 6: Observed heterozygosity, expected heterozygosity and effective number of alleles of *BoLA-DRB3.2* gene in Sistani cattle

تعداد آلل موثر Effective number of alleles	هتروزایگوسیتی مورد انتظار expected heterozygosity	هتروزایگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity
۸/۰۸۴۲	۰/۸۸۵۳	۰/۲۰۴۱

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۵۹-۶۰ متن انگلیسی مراجعه شود.



## Study on the Genetic Polymorphisms of Candidate Genes (Calpastatin and *BoLA*) in Sistani Cattle Using PCR-RFLP

Khosravi<sup>1</sup>. M., Fakhar Kazemi<sup>1</sup>. M., Mohammadi<sup>2</sup>, A. and Nassiry<sup>3</sup>. M. R.

### Abstract

Selection based on molecular markers is one of the new methods that may improve progress and accuracy of selection in animal breeding programs. Candidate genes of Calpastatin and (*BoLA* Bovine Leucocyte Antigen *DRB3*) were studied. Calpastatin gene is the candidate gene investigating growth rate and meat tenderness and *DRB3* is extensively evaluated as a candidate marker for associations with various bovine diseases and immunological traits. Blood samples were taken from 89 Sistani cows in Zehak Research Institute. Genomic Extraction and PCR reaction were done for detect genomic variation of Bovine Leucocyte Antigen and Calpastatin. Amplicons were digested with restriction enzymes *MspI* for Calpastatin and *RsaI*, *HaeIII* and *BstYI* for *BoLA DRB3* genes, respectively. Allelic frequencies for Calpastatin were M=0.764 and N=0.236, respectively.  $\chi^2$  test showed That population is in Hardy-Weinberg equilibrium. In this studies 19 alleles were identified in the studied Sistani herd. Allelic frequencies ranged from 0.1 to 0.22 in the Sistani population. The most frequent alleles were \*8 and \*34. These data provide evidence that Sistani breed have a variability, which opens interesting prospects for future selection programs, especially marker-assisted selection.

**Keywords :** Sistani Cows, Calpastatin, *BoLA DRB3*, polymorphism, PCR-RFLP

### References

- Boom, R., SOL, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M. E. and Van Der Moorde, J. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3): 495-503.
- Chung, H.Y., Davis, M.S. and Hines, H.C. 1999. A DNA polymorphism of the bovine calpastatin gene detected by SSCP analysis. *Animal Genetics*., 30:80.
- Chung, H. Y., Davis, M. E. and Hines, H. C. 2003. Relationship of a PCR-SSCP at the bovine calpastatin locus with calpastatin activity and meat tenderness. *Research and reviews: Beef and Sheep*. 266-268.
- Da Mota, A. F., Gabriel, J. E., Martinez, M. L. and Coutinho, L. L. 2002. Distribution of bovine lymphocyte antigen (*BoLA-DRB3*) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *European Journal of Immunogenetics* 29: 223–227.
- Dietz, A. B., Detilleux, J. C., Freeman, A. E., Kelley, D. H., Stabel, J. R. and Kehrli, M. E. 1997. Genetic association bovine lymphocyte antigen *DRB3* alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 400-405.
- Kelm, S. C., Detilleux, J. C., Freeman, A. E., Kehrli, M. E., Dietz, A. B., Fox, L. K., Butler, Kascovics, J. E., I. and Kelley, D. H. 1997. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 1767-1775.
- Koohmarei, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*. 36:93-104.
- Koohmaraie, M., Matthew, P. K., Shackelford, S.D., Tommy, E. V. and Weeler, L. 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship. *Meat Sci.* 62: 345-352.
- Lewin, H. A. 1996. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. Pages 65–98 in *The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species*. L. B. Schook and S. J. Lamont, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lonergan, S. M., Ernest, C.W., Bioshop, M. D., Calkins, C.R., and Koohmaraie, M. 1995. Relation of restriction length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *Journal of Animal Science*. 73:3608-3612.
- Nassiry, M. R., Eftekhari Shahroodi, F., Mosafer, J., Norouzy, A., and Javadmanesh, A. 2004. Distribution of bovine lymphocyte antigen (*BoLA-DRB3*) alleles in Iranian Holstein Cattle. *Proc. 11th AAAP Congress 2004 Vol.3, Malaysia*.
- Nassiry, M. R., Eftekhari Shahroodi, F., Tahmoorespoure, M., and Javadmanesh, A. 2008. The Diversity of *BoLA-DRB3* Gene in Iranian Native Cattle. *Asian-australasian Journal of Animal sciences*. 21: 465 - 470
- Maillard, J. C., Chantal, L., and Berthier, D. 2001. Sequencing of four new *BoLA-DRB3* and six new *BoLA-DQB* alleles. *Animal Genetics*. 32: 40-53.

1. M.Sc. Graduated of Animal Science, Yong Researchers Club Azad University of Kashmar, Kashmar

2. M.Sc. Graduated of Animal Science of Ferdowsi University of Mashhad

3. Assistant Professor of Ferdowsi University of Mashhad

- Mohammadabadi, M. R., Sulimova, G. E. 2003. Polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP in Mongolian and Black Pied cattle. Proceeding of the 3rd national congress of biotechnology. I. R. Iran. Vol. 4: 497-499.
- Palmer, B. R., Hickford, J. G. H. and Bickerstaffe, R. 1997. A candidate gene approach to animal quality traits. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production 57:294-296.
- Palmer, B.R., Su.,H.Y., Roberts, N., Hickford, J.G.H. and Bicketstaffe, R. 2000. Single nucleotide polymorphism in an intron of the ovine calpastatin gene. Animal Biotechnology. 11(1), 63-67.
- Roberts, N. Palmer, B., Hickford, J.G.H., Bickerstaffe. 1996. PCR-SSCP in the ovine calpastatin gene . Animal Genetics. 27.211-222.
- Sulimova, G. E., Udina, I. G., Shaikhaev, G. O. and Zakharov, I. A. 1995. DNA Polymorphism at the BoLA-DRB3 gene of Cattle in relation to resistance and susceptibility to Leukemia. Russian Journal of Genetics. Vol. 31, No. 9: 1294-1299.
- Takeshima, S. N., Ikegami, M., Morita, M., Nakai, Y. and Aida, Y. 2001. Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. Immunogenetics. 53: 74-81.
- Udina, I. G., Karamysheva, E. E., Sulimova, G. E., Pavlenko, S. P., Turkova, S. O., Orlova, A. R. and Ernst, L. K. 1998. Comparative analysis of Ayrshire and Black Peid Cattle breeds by histocompatibility markers. Russian Journal of Genetics. Vol. 34, No. 12:1668-1674.
- Van Eijk, M. J. T., Stewart-Hayaes, A. and Lewin, A. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. Animal Genetics. 23:483-496.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 35-42= ۳۵-۴۲).