نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۱، تابستان ۱۳۹۵
ص‌ص: ۸۷~۹۶

بررسی چندشکلی ژن‌های بتالاکتوگلوبولین، پرولاکتین و DGAT1 درگاومیش خوزستان

- **بهاره طاهری دزفولی** (نویسنده مسئول)

عضوهیأت علمی، بخش تحقیقات علوم دامی، مرکزتحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز

- **حمیدرضا سیدآبادی**

عضوهیأت علمی ، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

- **سیما ساور سفلی**

عضو هیأت علمی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۴

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۶۶۱۳۱۹۴۴

Email: bahare.taheri@gmail.com

چکیده

تولید و ترکیبات شیر جزء دسته صفات کمی و چندژنی می‌باشند وتحت تأثیر تعداد زیادی ژن قرار دارند. این تحقیق به منظور تعیین چندشکلی ژن‌های بتالاکتوگلوبولین، پرولاکتین و DGAT1، به عنوان ژن‌های کاندید مؤثر برصفات تولید شیر و ترکیبات آن، با استفاده از تکنیک PCR-RFLP درگاومیش‌های استان خوزستان صورت گرفت. از تعداد ۲۰۰ رأس از گاومیش‌های استان خوزستان نمونه خون تهیه و استخراج DNA از نمونه‌ها به روش بهینه شده و تغییریافته استخراج نمکی صورت گرفت. بعد از انجام مراحل استخراج DNA، ژنوتیپ حیوانات با استفاده از روش PCR-RFLP تعیین گردید. برای تعیین ژنوتیپ حیوانات، قطعه ۲۶۲ جفت باز از ناحیه اگزون و اینترون ٤ ژن بتالاکتوگلوبولین، قطعه ٤١١ جفت باز از اگزون ۸ ژن DGAT1 و قطعه ١٥٦ جفت بازی از ناحیه اگزون ۳ ژن پرولاکتین تکثیر و به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *Hea*III، *Cfr*I و *Rsa*I مورد هضم قرار گرفتند. محصولات هضم شده با استفاده از آنزیم، جهت تعیین ژنوتیپ بر روی آگارز ۲٪ الکتروفورز گردیده و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که در گاومیش‌های مورد مطالعه آلل B در جایگاه بتالاکتوگلوبولین، آلل A در جایگاه پرولاکتین و آلل K در جایگاه DGAT1 تثبیت شده است و برای هیچ یک از جایگاه‌ها چندشکلی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: پرولاکتین، چندشکلی، گاومیش، ژن DGAT1

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 111 pp: 87-96

Investigation of β-Lactoglobulin, Prolactin and DGAT1 genes polymorphism in Khuzestani buffalo

B. Taheri Dezfuli[1*], H.R. Seyedabadi[2], S. Savar Sofla[3]
1:* Bahareh Taheri Dezfuli. Scientific board of Animal Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Recourses Research and Education Center, AREEO, Ahwaz, Iran. 09166131944 – bahare.taheri@gmail.com.
2:HamidReza Seyedabadi. Scientific board of Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3:Sima Savar Sofla. Scientific board of Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: June 2015 **Accepted: September 2015**

Milk production and its components are belong to quantitative and polygenic traits and affected by many genes. This study was conducted to determine the polymorphism in β-lactoglobulin, prolactin and DGAT1 genes of buffaloes in Khuzestan province using PCR-RFLP technique. Therefore, blood samples were collected from 200 buffaloes of Khuzestan province and then DNA samples were extracted using optimal and modified salting-out method. After DNA extraction, the genotype of the animals was determined by PCR-RFLP. For genotyping of animals, the 262 bp fragment of exon and intron 4 of the beta-lactoglobulin, the 411 bp fragment of exon 8 of the DGAT1 and the 156 bp fragment of exon 3 of the prolactin genes were amplified and then digested using restriction enzyme *Hea*III, *Cfr*I and *Rsa*I, respectively. Then restricted PCR products electrophoresed on 2% agaros gel and stained in etedium bromide. Results of this study showed that the allele of B, the allele of A and the allele of K has been fixed in beta-lactoglobulin, prolactin and DGAT1 loci in buffalo population of Khuzestan, respectively and polymorphism was not seen for any of these loci.

Key words: Prolactin, Polymorphism, Buffalo and DGAT1 gene.

مقدمه

استان خوزستان، یکی از استان‌های اصلی پرورش‌دهنده گاومیش در کشور می‌باشد و بالغ بر ۸۵ هزار رأس گاومیش در این استان وجود دارد (بی نام، ۱۳۹۴). اهمیت نسبی تولیدات گاومیش در مناطق مختلف استان یکسان بوده و در تمامی نقاط، گاومیش در درجه اول به منظور تولید شیر پرورش داده می‌شود به طوری‌که، حدود ۴۰ درصد از تولیدات لبنی استان توسط گامیش تولید می‌شود (نشریه ترویجی، ۱۳۸۷). کیفیت و ارزش تولیدات گاومیش و جمعیت قابل توجه آن در استان خوزستان، این دام را به مهم‌ترین دام بومی استان تبدیل کرده و سبب توجه بیش از پیش به امر بهبود تولید گاومیش و توسعه امر گاومیش‌داری گردیده است.

برای افزایش تولید دامی، علاوه بر روش‌های نوین مدیریت، بهداشت و تغذیه، استفاده از روش‌های علمی اصلاح‌نژاد به همراه تکنیک‌های مولکولی نیز ضروری می‌باشد. صفات تولید شیر و ترکیبات آن نیز در دام‌های شیری بوسیله تعداد زیادی ژن که اثر برخی از آن‌ها زیاد (ژن عمده) و اثر بسیاری دیگرکم می‌باشد، کنترل می‌شوند (باهاتاچارایا و گاندی، ۱۹۹۷). اگر چه تعداد ژن‌های مؤثر بر یک صفت مانند تولید شیر و ترکیبات آن نامشخص است، اما تعدادی ژن کاندید مؤثر بر روی این صفات شناسائی شده است. بهبود ژنتیکی برای صفت تولیدشیر نیز براساس ارزش‌های اصلاحی تأثیر بسزایی در افزایش عملکرد دام‌ها داشته است. اما به دلیل فاصله نسل زیاد دام‌هایی مانند گاو و گاومیش، این روش بسیار زمانبر می‌باشد به طوری که به منظور انتخاب دام برتر می‌بایست حیوان به مرحله تولید برسد. علاوه براین، صفت تولید شیر از جمله صفات محدود به جنس است، درنتیجه امکان انتخاب دام‌های نر براساس عملکرد خودشان وجود

ندارد. در راستای کم کردن این مشکلات، انتخاب بر اساس نشانگرها می‌تواند نقش بسیار زیادی در بهبود ژنتیکی عملکرد دام‌ها قبل از بیان صفات موردنظر داشته باشد. بنابراین، روش مؤثر برای بهبود این مشکل، انتخاب به کمک نشانگر می‌باشد (باهاتاچارایا و گاندی، ۱۹۹۷). بر اساس تحقیقات انجام شده بر روی گاومیش، از جمله ژن‌های کاندید مؤثر بر صفات تولید شیر و ترکیبات آن ژن‌های بتالاکتوگلوبولین، پرولاکتین و DGAT1 می‌باشند (تانیتا و همکاران، ۲۰۰۶; نایر و همکاران، ۲۰۱۲; ووهرا و همکاران، ۲۰۰۶; یوآن وهمکاران،۲۰۰۷; اوزدیل و ایلهان، ۲۰۱۲; اوتمن و همکاران، ۲۰۱۱; لادانی و همکاران، ۲۰۰۳).

بتالاکتوگلوبولین[1] به عنوان یکی از ژن‌های مهم تأثیرگذار بر صفات مهم اقتصادی شناخته شده است (تیسیاراس وهمکاران، ۲۰۰۵) که بر روی کروموزوم ۱۱ گاومیش قرار دارد (راچاگانی و همکاران، ۲۰۰۶ و هیل و همکاران، ۱۹۹۶).مطالعات نشان داده که آلل‌های A وB بتالاکتوگلوبولین بر ترکیب و خصوصیات شیر مؤثر می‌باشند. تولید شیر توسط گاوهای دارای ژنوتیپ AA بتالاکتوگلوبولین بیشتر بوده ولی کازئین و چربی شیر آن‌ها نسبت به شیر گاوهای با ژنوتیپ BB کمتر است (هیل، ۱۹۹۳). همچنین، پنیر حاصل از شیر گاوها با ژنوتیپ BB نسبت به گاوها با ژنوتیپ AA بیشتر است (وندربرگ وهمکاران،۱۹۹۲). تاهیرا و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبولین درگاومیش‌های نیلی‌راوی، فراوانی آلل A را بالاتر از B اعلام کردند و گزارش کرده‌اند که با وجود فراوانی بیشتر AA و ارتباط با میزان پروتئین شیر، به نظر می‌رسد ژنوتیپ AB نشانگر مناسب این ژن برای بهبود صفات تولید شیر باشد. ووهرا و همکاران (۲۰۰۶) نیز ارتباط ژنوتیپ‌های مربوط به این ژن را با میزان چربی شیر درگاومیش مه‌سانا معنی‌دار گزارش کرده‌اند. با این حال، در مطالعه بر روی ۱۱۰ نمونه DNA از گامیش‌های مورا در جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین چندشکلی مشاهده نشده است (مینانالاکشمی و ماهالینگا، ۲۰۰۹).

DGAT1[2] یکی از دو آنزیم مهمی است که مرحله نهایی بیوسنتز تری‌گلیسرید را در پستاندارن کاتالیز می‌کند و در نتیجه درسوخت و ساز تری‌گلیسرید سلولی که با جذب چربی در روده، تشکیل بافت چربی و شیردهی در ارتباط است، نقش مهمی دارد (کیسز و همکاران، ۱۹۹۸). در مطالعه میشرا و همکاران (۲۰۰۷)، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن کاندیدDGAT1 با درصدچربی شیر در گاومیش‌های هندی[3]گزارش شده است. همچنین، گاومیش‌های آناتولی بومی کشور ترکیه و گاومیش‌های روخانه‌ای برای این ژن مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و گزارش شده است که کلیه گاومیش‌های موردمطالعه برای این ژن دارای آللK بوده که مسئول میزان چربی و درصدچربی بالای شیر آن‌ها می‌باشد (اوزدیل و ایلهان، ۲۰۱۲ و شی و همکاران، ۲۰۱۲).

هورمون پرولاکتین[4] نقش عمده‌ای در ساخت شیر، شیردهی و رشد غددپستانی حیوان دارد. بولکووآ و همکاران (۲۰۱۲)، در بررسی اگزون ۴ ژن پرولاکتین ارتباط آلل G را با میزان تولید شیر مثبت گزارش کرده‌اند. همچنین، درمطالعه ارتباط چندشکلی این ژن با صفات شیر، میترا و همکاران (۱۹۹۵) ولادانی و همکاران (۲۰۰۳)، فراوانی آلل های A و B را به ترتیب در گاومیش های مورا و نیلی راوی و درگاومیش های مه‌سانا ۰/۹۳ و ۰/۰۷، ۰/۸۴ و ۰/۱۶ ، ۰/۵۰ و ۰/۵۰ گزارش کرده‌اند.

هدف از این تحقیق بررسی و تعیین چندشکلی ژن‌های مذکور و فراوانی آللی در گاومیش به عنوان مهم‌ترین دام بومی استان خوزستان بود تا بتوان ضمن بررسی چندشکلی این سه ژن، شناخت و انتخاب حیوانات برای رسیدن به اهداف اصلاح‌نژادی را تسریع نمود.

مواد و روش‌ها

برای مطالعه چندشکلی ژن‌های بتالاکتوگلوبولین، پرولاکتین و DGAT1، تعداد ۲۰۰ رأس گاومیش نر و ماده در گله‌های استان خوزستان با شرایط پرورش یکسان به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌های خون تهیه گردید. از تمام دام‌های موردنظر از ورید

[1]-β-Lactoglobulin
[2]-diacylglycerolacyltransferase
[3]-*Bubalus bubalis*
[4]-prolactin

گردنی، در تیوب‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA نمونه خون گرفته شد و نمونه‌های خون اخذ شده به آزمایشگاه بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور انتقال و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییریافته استخراج نمکی انجام گردید (جوانروح و همکاران، ۲۰۰۶). تیوپ‌های حاوی DNA، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند تا DNA به خوبی حل شود و سپس به دمای ۲۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شدند.

از آنجا که غلظت DNA استخراج شده در نمونه‌های مختلف متفاوت می‌باشد، پس از بررسی تمامی نمونه‌ها، آن‌ها را به ۵ گروه از نظر غلظت تقسیم کرده و رقیق کردن آن‌ها به کمک بافر TE به نحوی انجام شد که DNA رقیق شده در هر میکرولیتر حاوی حدود ۵۰ نانوگرم DNA باشد و غلظت آن توسط نانودراپ مورد تأیید قرار گرفت. کیفیت DNA از روی نسبت جذبی A_{260}/A_{280} برآورد گردید.

به دنبال انتخاب جایگاه‌های مورد مطالعه، توالی آن‌ها از بانک‌های اطلاعاتی استخراج گردید و صحت اتصال آغازگرهای انتخاب شده از منابع در جایگاه‌های مورد مطالعه از طریق نرم افزار اولیگو[5] نسخه ۵، مورد بررسی قرار گرفت (ویس و همکاران، ۱۹۹۹). سپس تمامی آغازگرها از شرکت متابیون[6] آلمان به صورت لیوفلیزه تهیه گردید و طبق دستورالعمل شرکت سازنده جهت بدست آوردن غلظت ۱۰۰pmol/ul از هر آغازگر، با آب دیونیزه رقیق گردید.

پس از آزمایش غلظت‌های مختلف اجزاء PCR، شرایط بهینهٔ PCR به صورت:۱Xبافر PCR، ۲mM $MgCl_2$، ۰/۲۵ µM از هر یک از آغازگرها، ۲۰۰ µM dNTPs، ۰/۶unit/reaction آنزیم تک DNA پلیمراز، ۲۰۰-۱۰۰ ng/reaction DNA الگو و مقدار متغیراز dd H_2O بدست آمدکه در نهایت حجم نهایی واکنش ۱۵ µl در نظرگرفته شد و هر جایگاه ژنی با شرایط دمایی خاص تکثیر گردید.

پس از الکتروفورزبر روی ژل آگارز (با جریان ۱۰۰ ولت، زمان یک ساعت و غلظت ژل ۲ درصد) و برداشتن ژل از داخل تانک، ژل در داخل ظرف حاوی اتیدیوم بروماید محلول به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. برای رنگ‌آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید استفاده گردید. پس از ۱۵ دقیقه ژل برداشته و با آب مقطر شستشو داده شد و برای تهیه عکس بر روی دستگاه یو وی داک[7](شرکت بایو-راد[8]ساخت آمریکا) قرار داده شد.

برای بررسی چندشکلی *Hea*III –RFLP در ژن بتالاکتوگلوبولین، ابتدا یک قطعه ۲۶۲ جفت باز از اگزون و اینترون ۴ (شامل ۹۴ جفت باز از اگزون ۴ و ۱۶۸ جفت باز از اینترون ۴) این ژن با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس زیر که توسط مینانالاکشمی و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شده بود، تکثیر شدند:

Forward: 5′–GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA-3′
Reverse: 5′ – CAGGACACCGGCTCCTGGTATATGA-3′

پس از بررسی دماهای مختلف، برنامه دمایی بهینه برای تکثیر این قطعه ۲۶۲ جفت باز از اگزون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین با مدت زمان هر مرحله در جدول ۱ ذکر گردیده است. مراحل دو تا چهار، ۳۵ بار تکرار گردید.

جدول۱- شرایط دمایی زنجیره واکنش پلیمراز در ترموسایکلر برای ژن بتالاکتوگلوبولین

شماره مرحله	مرحله	درجه حرارت	زمان
۱	واسرشت اولیه	۹۵°C	۳ دقیقه
۲	واسرشت	۹۵°C	۴۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۵۵°C	۵۰ ثانیه
۴	بسط	۷۲°C	۳۰ثانیه
۵	بسط نهایی	۷۲°C	۱۰ دقیقه
۶	نگهداری	۴°C	-

آنزیم *Hea*III جهت برش در جایگاه اگزون ۴ بتالاکتوگلوبولین بکار رفت. برای هر واکنش هضم این آنزیم،۸ واحد آنزیم

[5]-Oligo
[6]- Metabion
[7]- Uvdoc
[8]- Bio-Rad

*Hea*III به همراه ۱۰ میکرولیتر محصول PCR درحجم واکنش ۱۵ میکرولیتر بکار رفت. واکنش هضم آنزیم فوق به طور شبانه (به مدت ۱۵ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از این مدت با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد، محصولات حاصل از برش، الکتروفورز شدند. در مرحله آخر با استفاده از اتیدیوم بروماید، ژل را رنگ کرده و با استفاده از دستگاه یو وی داک از آن عکسبرداری صورت گرفت.

با توجه به اینکه چندشکلی موجود در ژن پرولاکتین بر روی اگزون ۳ قرار گرفته است، یک قطعه ۱۵۶ جفت بازی از اگزون۳ این ژن با استفاده از یک جفت آغازگر طراحی شده توسط لادانی و همکاران (۲۰۰۳)، تکثیر شد:

Forward 5′ -CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT -3′
Reverse 5′ - GCCTTCCAGAAGTCGTTTGTTTTC -3′

برنامه دمایی بهینه شده با مدت زمان هر مرحله برای PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. مراحل دو تا چهار، ۳۵ بار تکرار گردید.

جدول۲- شرایط دمایی زنجیره واکنش پلیمراز در ترموسایکلر برای ژن پرولاکتین

شماره مرحله	مرحله	درجه حرارت	زمان
۱	واسرشت اولیه	۹۴°C	۶ دقیقه
۲	واسرشت	۹۴°C	۱ دقیقه
۳	اتصال آغازگر	۵۶°C	۱ دقیقه
۴	بسط	۷۲°C	۱ دقیقه
۵	بسط نهایی	۷۲°C	۷ دقیقه
۶	نگهداری	۴°C	–

آنزیم *Rsa*I جهت برش در جایگاه ژن پرولاکتین بکار رفت. برای هر واکنش هضم این آنزیم، ۸ واحد آنزیم *Rsa*I به همراه ۱۰ میکرولیتر محصول PCR در حجم واکنش ۱۵ میکرولیتر بکار رفت. واکنش هضم آنزیم فوق به طور شبانه (به مدت ۱۵ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از این مدت با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد، محصولات حاصل از برش، الکتروفورز شدند. در مرحله آخر با استفاده از اتیدیوم بروماید، ژل را رنگ کرده و با استفاده از دستگاه یو وی داک از آن عکسبرداری صورت گرفت.

از آنجا که چندشکلی موجود در ژن DGAT1 بر روی اگزون ۸ قرار گرفته است، یک قطعه ۴۱۱ جفت بازی از اگزون ۸ این ژن با استفاده از یک جفت آغازگر طراحی شده توسط کوپه و همکاران (۲۰۰۴)، تکثیر گردید:

Forward: 5′- GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3′
Reverse:5′-GGAAGCGCTTTCGGATG-3′

برنامه دمایی بهینه شده، برای PCR در جدول ۳ نشان داده شده است.مراحل دو تا چهار، ۳۵ بار تکرار گردید.

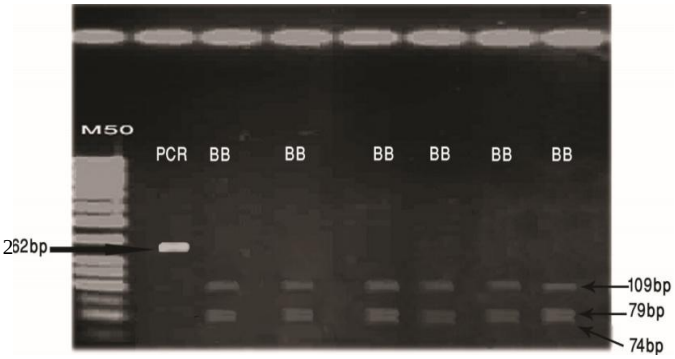
جدول۳- شرایط دمایی زنجیره واکنش پلیمراز در ترموسایکلر برای ژن DGAT1

شماره مرحله	مرحله	درجه حرارت	زمان
۱	واسرشت اولیه	۹۴°C	۶ دقیقه
۲	واسرشت	۹۴°C	۱ دقیقه
۳	اتصال آغازگر	۶۵°C	۱ دقیقه
۴	بسط	۷۲°C	۱ دقیقه
۵	بسط نهایی	۷۲°C	۷ دقیقه
۶	نگهداری	۴°C	–

آنزیم *Cfr*I جهت برش در جایگاه اگزون ۸ ژن DGAT1 بکار رفت. برای هر واکنش هضم این آنزیم، ۸ واحد آنزیم *Cfr*I به همراه ۱۰ میکرولیتر محصول PCR درحجم واکنش ۱۵ میکرولیتر بکار رفت. واکنش هضم آنزیم فوق به طور شبانه (به مدت ۱۵ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. پس از این مدت با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد، محصولات حاصل از برش، الکتروفورز شدند. در مرحله آخر با استفاده از اتیدیوم بروماید، ژل را رنگ کرده و از آن با استفاده از دستگاه یو وی داک عکسبرداری صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از تکثیر قطعه مورد نظر ۲۶۲ جفت بازی از ژن بتالاکتوگلبولین، هضم توسط آنزیم *Hae*III انجام شد. قطعه تکثیر شده دارای دو منطقه شناسایی برای آنزیم می‌باشد. منطقه اول باعث برش قطعه ۲۶۲ جفت بازی تکثیر شده به قطعات ۱۵۳ و ۱۰۹ جفت باز می‌شود. آلل B دارای محل شناسایی دوم آنزیم *Hae*III می‌باشد که در این صورت قطعه ۱۵۳ جفت بازی به دو قطعه ۷۹ و ۷۴ جفت باز تقسیم می‌شود. بنابراین افراد با ژنوتیپ هموزیگوت BB قطعات ۱۰۹، ۷۹ و ۷۴ جفت باز، هتروزیگوت‌های AB قطعات ۱۵۳، ۱۰۹، ۷۹ و ۷۴ جفت باز و هموزیگوت‌های AA قطعات ۱۵۳ و ۱۰۹ جفت بازی دارند که در این مطالعه تنها افراد با ژنوتیپ BB مشاهده شدند(شکل ۱).

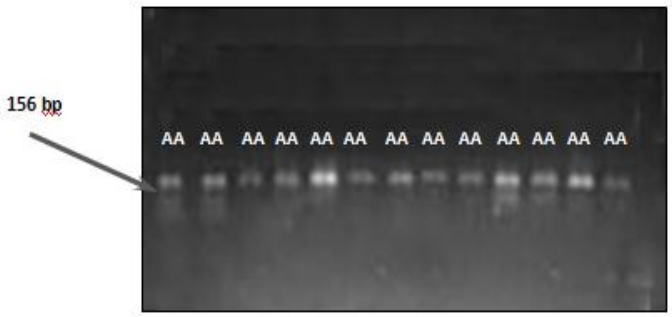


شکل ۱- الگوی باندی جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین

در مطالعه میگنانالاکشمی و ماهالینگا (۲۰۰۹)، نیز با استفاده از تکنیک PCR-RFLP که بر روی بخشی از اینترون و اگزون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین در نژاد گاومیش‌های مورا انجام گرفت، تنها ژنوتیپ BB گزارش شده است و این محققان فراوانی آلل B را ۱ گزارش کرده‌اند که مشابه با تحقیق حاضر می‌باشد. در تحقیق مشابه دیگر، در بررسی منطقه اینترون و اگزون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین در گاومیش‌های بومی مصر، فراوانی آلل B (۰/۹۱۷) بسیار بیشتر از آلل A (۰/۰۵۵) گزارش شده است (گودا و همکاران، ۲۰۱۱). رن و همکاران (۲۰۱۱) نیز، اگزون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین را در ۴۸ رأس گاومیش رودخانه‌ای مورد بررسی قرار دادند که در این تحقیق نیز به طور مشابه، فراوانی ژنوتیپ BB را ۱ گزارش کرده اند.

با این حال، تاهیرا و همکاران (۲۰۱۴) در مطاله ژن بتالاکتوگلوبولین در گاومیش‌های نیلی راوی پاکستان، فراوانی آلل‌های A و B را به ترتیب ۰/۶۹ و ۰/۳۱ گزارش کرده‌اند. این محققان گزارش کرده‌اند از آنجا که گاومیش‌های ایرانی و مصری متمایز از گاومیش نیلی‌راوی می‌باشند لذا در مقایسه با گاومیش نیلی‌راوی، ژنوتیپ BB در این گاومیش‌ها بیشتر مشاهده می‌گردد. همچنین، پاتال و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیق خود بر روی گاومیش‌های رودخانه‌ای، احتمال وجود سه ژنوتیپ AA، AB و BB را برای ژن بتالاکتوگلوبولین در نژادهای مختلف گاومیش گزارش کرده‌اند. در سایر مطالعات که بر روی گاوهای هلشتاین نیز صورت گرفته است فراوانی آلل A، ۰/۴۵ (صبور و همکاران، ۱۹۹۳)، ۰/۴۸ (اگری و همکاران، ۱۹۹۸)، ۰/۴۹۸ (لوندن و همکاران، ۱۹۹۷) و ۰/۵۲(تیسیاراس و همکاران، ۲۰۰۵) گزارش شده است.

برای ژن پرولاکتین نیز پس از تکثیر قطعه مورد نظر ۱۵۶ جفت بازی، هضم توسط آنزیم *Rsa*I انجام شد. قطعه تکثیر شده دارای یک منطقه شناسایی برای آنزیم می‌باشد. این منطقه باعث برش قطعه ۱۵۶ جفت بازی تکثیر شده به قطعات ۸۲ و ۷۴ جفت باز می‌شود. بنابراین افراد با ژنوتیپ هموزیگوت BB قطعات ۸۲ و ۷۴ جفت باز، هتروزیگوت‌های AB قطعات ۱۵۶، ۸۲ و ۷۴ جفت باز و هموزیگوت‌های AA قطعه ۱۵۶ جفت بازی دارند که در این مطالعه تنها افراد با ژنوتیپ AA مشاهده شدند (شکل ۲).



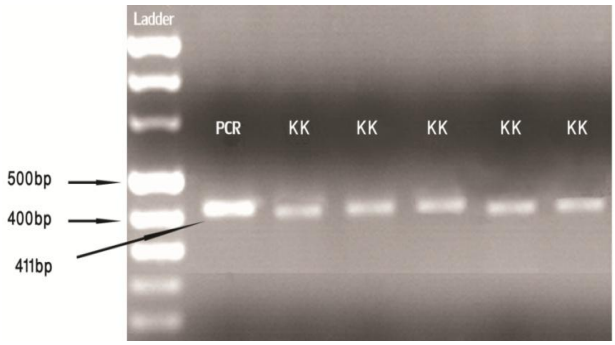
شکل ۲- الگوی باندی جایگاه ژن پرولاکتین

کاپلان و بوزتپ (۲۰۱۰) نیز درمطالعه چندشکلی ژن پرولاکتین در گاومیش‌های رودخانه‌ای آناتولی، با استفاده از تکنیک PCR-

RFLP، گاومیش‌ها را برای اگزون ۳ این ژن تک شکل گزارش کرده‌اند. همچنین، در مطالعه بیرادار و همکاران (۲۰۱۴) در گاومیش‌های مورا فقط آلل A با فراوانی ۱ مشاهده شد. همچنین، میترا و همکاران (۱۹۹۵) با بررسی اگزون ۳ جایگاه ژن پرولاکتین در گاومیش‌های مورا و نیلی‌راوی، فراوانی آلل A را برای این دو نژاد به ترتیب ۰/۹۳ و ۰/۸۴ و کمتر از ۱ گزارش کرده‌اند و نتیجه‌گیری کرده‌اند که ممکن است تشخیص جهش ژنی در اگزون ۳ جایگاه پرولاکتین بین نژادهای مختلف گاومیش متفاوت باشد.

برای نژادهای مختلف گاو نیز کوماری و همکاران (۲۰۰۸) بااستفاده از تکنیک PCR-RFLP چندشکلی اگزون ۳ جایگاه ژن پرولاکتین را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که ژنوتیپ AA بالاترین فراوانی را (۰/۵۵) نشان داده است. همچنین، در مطالعه گاوهای براون سوئیس امریکایی فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۰/۸۷ و ۰/۱۲ گزارش شده است (آلفونسو و همکاران، ۱۲۰۱۲) و این محققان فراوانی A را بیشتر گزارش کرده‌اند. عالی پناه و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه ارتباط چندشکلی ژن پرولاکتین با صفات شیر گاوهای روسی نتیجه‌گیری کرده‌اند که ژنوتیپ AA این ژن با مقدار شیر، چربی و پروتئین بیشتر مرتبط می‌باشد.

برای ژن DGAT1، پس از تکثیر قطعه مورد نظر ۴۱۱ جفت بازی، هضم توسط آنزیم *Cfr*I انجام شد. بر اساس نحوه برش آنزیم انتظار می‌رود، سه نوع ژنوتیپ KK، KA و AA قابل مشاهده باشند. افراد KK بدون جهش، افراد KA دارای یک آلل جهش یافته و افراد AA در هر دو آلل آن‌ها جهش صورت می‌گیرد. افرادی که تنها در ناحیه ۴۱۱ جفت بازی دارای باند هستند جهش در آن‌ها رخ نداده و به شکل وحشی باقی مانده‌اند، افرادی که در ناحیه ۴۱۱،۲۰۸ و ۲۰۳ جفت بازی دارای باند هستند هتروزیگوت و تنها در یک آلل آن‌ها جهش رخ داده است و در نهایت افرادی که دارای دو باند ۲۰۸ و ۲۰۳ جفت بازی هستند هموزیگوت جهش‌یافته می‌باشند به این معنی که در هر دو آلل آن‌ها جهش روی داده است. در این تحقیق همه افراد دارای ژنوتیپ KK بودند و هیچ جهشی در این ژن مورد شناسایی قرار نگرفت (شکل ۳).



شکل ۳-الگوی باندی جایگاه ژنDGAT1

در مطالعه ای بر روی اگزون ۸ ژن DGAT1در نژاد گاومیش‌های رودخانه‌ای با استفاده از تکنیک PCR-RFLP نیز تنها ژنوتیپ KK گزارش شده است (شی و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین، اوزدیل وایلهان (۲۰۱۲)، با استفاده از تکنیک مشابه، منطقه اگزون ۸ ژن DGAT1 را در گاومیش‌های بومی آناتولی تکثیر نمودند و تنها ژنوتیپ KK را گزارش نمودند. این محققان در هر دو مطالعه آلل K را در جمعیت گاومیش‌های رودخانه‌ای و آناتولی، ۱ بدست آورده‌اند. در تحقیقی دیگر که بر روی گاومیش‌های رودخانه‌ای هندوستان انجام شده است، برای ژن DGAT1، تنها آلل K گزارش شده است (مادهو و همکاران، ۲۰۰۶). کلیه نتایج بدست آمده در مطالعات مذکور، با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد. تانیتا و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعه اگزون ۸ این ژن در گاومیش‌های مورا، جعفرآبادی، سورتی، مه سانا و بهاداواری[9] هندوستان ژنوتیپ تک شکل KK را گزارش کرده اند و تثبیت آلل K را برای ژن DGAT1 مربوط به مقدار چربی و درصد چربی بالای شیر گاومیش مرتبط دانسته‌اند.

برخلاف تحقیقات صورت گرفته بر روی گاومیش که ژن DGAT1 را تک‌شکل گزارش کرده‌اند، تحقیقات صورت گرفته در گاو بیانگر وجود چندشکلی در اگزون شماره ۸ ژن DGAT1 می‌باشد. پژوهشگران فراوانی آللK را در گاوهای هلشتاین آلمانی به ترتیب ۰/۳۴ و ۰/۳۵ گزارش نمودند. بوونهیوس

[9]- Bhadawari

و اسکروتن(۲۰۰۲) و گاوتایر و همکاران (۲۰۰۷)، در دو پژوهش جداگانه بر روی گاوهای هلشتاین فرانسه، فراوانی آلل K را به ترتیب ۰/۳ و ۰/۳۷ گزارش کردند. پایین‌ترین فراوانی آلل K توسط ولر و همکاران (۲۰۰۳) در گاوهای هلشتاین گزارش شده است (به ترتیب ۰/۰۸۹ و ۰/۱۵۵). اسپلمن و همکاران (۲۰۰۲) نیز، فراوانی ۰/۲۴ تا ۰/۷۱ را در نژاد هلشتاین- فریزین نیوزلند برآورد کردند و گزارش نمودند که فراوانی آللK به شدت تحت تأثیر ژن‌های نژادهای خارجی (گاوهای نر آمریکا، کانادا و هلند) قرار می‌گیرد به طوری که در کشور نیوزلند به دلیل تأکید بیشتر برای افزایش چربی شیر، فراوانی این آلل افزایش یافته است.

به طور کلی، نتایج بدست آمده هیچ گونه چندشکلی برای سه جایگاه مورد بررسی در گاومیش‌های استان خوزستان نشان نداد و تمامی گاومیش‌های مورد مطالعه برای ژن‌های بتالاکتوگلوبولین، پرولاکتین و DGAT1 تک‌شکل بودند. تثبیت آلل B برای ژن بتالاکتوگلوبولین، آلل A برای ژن پرولاکتین و آلل K برای ژن DGAT1 در گاومیش‌های موردمطالعه، ممکن است به دلیل انتخاب طبیعی باشد.

منابع

بی‌نام (۱۳۹۴). آمار معاونت بهبودتولیدات دامی، سازمان جهاد کشاورزی استان خوزستان.

نشریه ترویجی (۱۳۸۷). پرورش گاومیش درخوزستان. کمیته انتشارات ترویج و توسعه کشاورزی خوزستان. ص ص: ۲۰-۲۳.

Aggrey, S.E., Sabour, M.P., Lin, C.Y., Zadworny, D. and Kuhnlein, U. (1998). Analysis of the β-lactoglobulin locus using the granddaughter design in the Canadian Holstein population. *Canadian Journal of Animal Science*.76: 245-248.

Alfonso, E., Roja, R., Herrera, J.G., Ortega, M.E., Lemus, C., Cortez, C., et al. (2012). Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle. *African Journal of Biotechnology*. 11(29):7338-7343.

Alipanah, M., Kalashnikova, L. and Rodionov, G. (2007). Association of prolactin gene variants with milk production traits in Russian Red Pied cattle. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5(3): 158-161.

Bhattacaharya, T.K. and Gandhi, R.S. (1997). Marker assisted selection (MAS) and its application in dairy cattle. *Indian Dairyman*.49:39-45.

Biradar, S.M., Unaune, K.P., Dodamani, S., Mhatre, P.S., Londhe, S.P., Pawar, V.D. et al. (2014). Study of prolactin gene polymorphism in *Murrah* buffalo. *Journal of Cell and Tissue Research*. In: http://www.readperiodicals.com/201404/3257703391.html#ixzz3T7ZFxgkE.

Boleckova, J., Matejickova, J., Stipkova, M., Kyselova, J. and Barton, L. (2012). The association of five polymorphisms with milk production traits in *CzechFleckvieh* cattle. *Czech Journal of Animal Science*. 57(2): 45–53.

Bovenhuis, H. and Schrooten, C. (2002).Quantitative trait loci for milk production traits in dairy cattle. In: Proceedings of 7th World Congress of *Genetics Applied* to *Livestock Production*. France, Montpellier, pp: 7-9.

Cases, S., Smith, S.J., Zheng, Y.W., Myers, H.M., Lear, S.R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C.B., Lusis, A.J., Erickson, S.K. and Farese, R.V. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerolacyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. In: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 95, pp: 13018–13023.

Gautier, M., Capitan, A., Fritz, S., Eggen, A., Biochard, D. and Druet, T. (2007). Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *Journal of Dairy Science*.90: 2980-2988.

Gouda, E.M., Galal, M.K. and Wasfy, M.A. (2011). Phenotypes, Genotypes and Allele Frequencies of β-lactoglobulin in Egyptian Cattle and Buffalo. *Journal of Agricultural Science*. 3(4).203-210.

Hill, J.P. (1993). The relationship between β-lactoglobulin phenotype and milk composition in New Zealand dairy cattle. *Journal of Dairy Science*.76: 281-286.

Hill, J.P., Boland, M.J., Creamer, L.K., Anema, S.G., Otter, D.E., Paterson, G.R., Lowe, R., Motion, R.L. and Thresher, W.C. (1996). Effect of the bovine β-lactoglobulin phenotype on the properties of β-lactoglobulin, milk composition, and dairy products. In: *Macromolecular Interactions in Food Technology* (Eds Parris N, Kato A, Creamer LK, Pearce J). ACS symposium series, 650: 281–294. In: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1996-0650.ch022.

Javanrouh, A., Banabazi, M.H., Esmaeilkhanian, S., Amirinia, C., Seyedabadi, H.R. and Emrani, H. (2006). Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. In: Proceedings of 57thAnnual Meeting of the European Association for Animal Production. Turkey, Antalya.

Kaplan, S. and Boztepe, S. (2010).*The determination of prolactin gene polymorphism using PCR-RFLP method within Indigenous Anatolian water buffalo and Brown Swiss.* In: Proceedings of 2nd International Symposium on Sustainable Development, Sarajevo.

Kaupe, B., Winter, A., Fries, R. and Erhardt, G. (2004). DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Research*. 71:182-187.

Kumari, A.R., Singh, K.M., Soni, K.J., Patel, R.K., Chauhan, J.B. and Sambasiva Rao, K.R.S. (2008).Genotyping of the polymorphism within exon 3 of prolactin gene in various dairy breeds by PCR RFLP. *Archives Animal Breeding*. 51(3): 298-299.

Ladani, D.D., Pipalia, D.L., Brahmkshtri, B.P., Rank, D.N., Joshi, C.G., Vataliya, P.H. and Solanki, J.V. (2003). PCR-RFLP polymorphism at prolactin locus in buffaloes. *Buffalo Journal*. 2: 237-242.

Lunden, A., Nilsson, M. and Janson, L. (1997). Marked effect of beta-Lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. *Journal of Dairy Science*. 80: 2996-3005.

Madhu, T., Ramesh, V. and Bishnu, M. (2006). DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bosindicus*) and buffalo (*Bubalusbubalis*) breeds. *BioMed Central Veterinary Research*. 2:32.1-6.

Meignanalakshmi, A., Mahalinga, N.A. and Nachimuthu, K. (2001). Identification of genetic polymorphism of beta- lactoglobulin gene locus in Red Sindhi cows by PCR-RFLP Analysis. *International Journal of Animal Science*. 16:223-226.

Meignanalakshmi, S. and Mahalinga Nainar, A. (2009). PCR-RFLP analysis of beta-lactoglobulin gene in *Murrah* buffaloes. *Tamilnadu Journal of Veterinary & Animal Sciences*. 5(5): 194-197.

Mishra, B., Tantia, M.S., Bharani, S., Kumar, T. and Vijh, R.K. (2007).Characterization of the DGAT1 gene in the Indian buffalo (*Bubalusbubalis*). *Journal of Genetics* and *Molecular Biology*. 30(4): 1097-1100.

Mitra, A., Schleec, P., Balakrishnanf, R. and Pirchner. (1995). Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. *Journal of Animal Breeding and Genetics*.112:71-74.

Nair, A.K., Sirothia, A.R., Patel, R.K., Soni, K.J., Singh, K.M., Sirothia, K.A. and Gawande, T.R. (2011). Characterization of κ-casein and β-lactoglobulin gene in *Nagpuri* buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Wayamba Journal of Animal Science*. 153-157.

Othman, O.E., Zayed, F.A., El-Gawead A.A. and M.R.A. El-Rahman. (2011). Genetic polymorphism of three genes associated with milk trait in Egyptian buffalo. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 9(2): 97–102.

Ozdil, F. and Ilhan, F. (2012). DGAT1-exon8 polymorphism in Anatolian buffalo. *Livestock Science*. 149(1): 83-87.

Patel, R.K., Chauhan, J.B., Singh, K.M. and Soni K.J. (2007). Genotype and Allele frequencies of κ-casein and β-lactoglobulin in Indian River buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). *The Buffalo Bulletin*. 26(3): 63-66.

Rachagani, S., Gupta, I.D., Gupta, N. and Gupta, S.C. (2006). Genotyping of beta-lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. *BioMed Central Genetic*.7: 31-34.

Ren, D.X., Miao, S.Y., Chen, Y.L., Zou, C.X., Liang, X.W. and Liu, J.X. (2011). Genotyping of the κ -casein and β-lactoglobulin genes in Chinese *Holstein*, jersey and water buffalo by PCR-RFLP. *Journal of Genetic Science.* 90(1): e1-e5.

Sabour, M.P., Lin, C.Y. and Keough, A. (1993). Effects of selection practiced on the frequencies of κ -casein and β -Lactoglobolin genotypes in Canadian artificial in insemination bulls. *Journal of Dairy Science*. 76:174-180.

Shi, D.S., Wang, J., Yang, Y., Lu, F.H., Li, X.P. and Liu, Q.Y. (2012). DGAT1, GH, GHR, PRL and PRLR polymorphism in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reproduction Domestic Animals*. 47(2):328-334.

Spelman, R.J., Ford, C.A., McElhinney, P., Gregory, G.C. and Snell, R.G. (2002). Characterization of the DGATl gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*.85:3514-3517.

Tahira, I., Mahmood, A., Saqlain, M., Hanif, N.Q. and Kaukab Raja, G. (2014). Study of β-Lactoglobulin milk protein variants in buffalo. *Pakistan Journal of Zoology*. 46(2):549-552.

Tantia, M.S., Vijh, R.K., Mishra, B.P., Mishra, B., Kumar, S.T.B. and Sodhi, M. (2006). DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *BioMed Central Veterinary Research*. 2:32.

Tsiaras, A.M., Bargouli, G.G., Banos, G. and Boscos, C.M. (2005). Effect of kappa Casein and beta Lactoglobulin loci on milk production traits and reproductive performance. *Journal of Dairy Science*.88:327-334.

Van der Berg, G., Escher, J.T.M., Konning, P.J. and Bovenhuis, H. (1992). Genetic polymorphism of κ -casein and β -lactoglobulin in relation to milk composition and processing. *Netherlands Milk and Dairy Journal*.46: 145-168.

Vohra, V., Bhattacharya, T.K., Dayal, S., Kumar, P. and Sharma, A. (2006). Genetic variants of beta-lactoglobulin gene and its association with milk composition traits in riverine buffalo. *Journal of Dairy Research*. 73(4):499-503.

Weiss, B., Davidkova, G. and Zhou, L.W. (1999). Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cellular* and *Molecular Life Sciences*.55: 334-358.

Weller, J.I., Golik, M., Seroussi, E., Ezra,E. and Ron, M. (2003). Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*.86: 2219-2227.

Yuan, J., Zhou, J., Deng, X., Hu, X. and Li, N. (2007). Molecular cloning and single nucleotide polymorphism detection of buffalo DGAT1 gene. *Biochemical Genetics*. 45(7-8):611-621.