



گیرنده پرولاکتین و ارتباط آن با صفات بیومتری بیضه در گاوهای نر هلشتاین

قربانی ابوالفضل^۱، واعظ ترشیزی رسول^۲، جبارپور بنیادی مرتضی^۳، مهمان نواز یوسف^۴، سلامت دوست نوبر رامین^۱
- گروه علوم دامی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر ۲- گروه علوم دامی - دانشگاه تربیت مدرس ۳- گروه زیست

شناسی - دانشگاه تبریز ۴- گروه علوم دامی دانشگاه آزاد واحد مراغه

پست الکترونیکی: abolfazlgorbani@gmail.com

چکیده

کاربرد تلقیح مصنوعی در صنعت گاو شیری اجازه بهبود انتخاب را بر روی گاوهای نر را برای صفات تولیدی می‌دهد، اما در همان زمان، بر عملکرد تولید مثلی فردی گاو نر فشار وارد می‌کند. این مطالعه تلاش دارد تا اثر مستقیم عملکردی جایگاه کاندیدای گیرنده پرولاکتین را به عنوان نشانگر بر روی صفات بیومتری بیضه شامل میانگین طول بیضه، میانگین عرض بیضه و میانگین محیط بیضه نیز آزمون شدند. از تعداد ۱۸۳ نمونه خون و اسپرم از گاوهای نر موجود در دو مرکز تلقیح مصنوعی که بین سال‌های ۱۳۶۲ تا ۱۳۸۵ متولد شده بودند، برای تعیین SNP ژن‌های گیرنده پرولاکتین (PRLR) با روش PCR-RFLP از آنزیم *TaiI* استفاده شد. برای جایگاه دو ال (برش یافته و برش نیافته) و سه ژنوتیپ مشاهده شد. ال (R) *TaiI*⁺ و ژنوتیپ RR به ترتیب فراوانترین بودند. آنالیز واریانس با مدل مختلط ارتباط معنی دار ژن کاندیدای فوق را با هیچ یک از صفات نشان نداد

مقدمه:

PRLR یک پروتئین منفرد متصل به غشا است که به کلاس ۱ خانواده بزرگ گیرنده های سیتوکینینی تعلق دارد [بازن ۱۹۹۰a و ۱۹۹۰b)، کلی و همکاران (۱۹۹۱) و لای و همکاران (۱۹۹۷)]. با وجود عملکرد مشابه با گیرنده هورمون رشد تنها ۳۰ درصد تشابه توالی بین آنها وجود دارد [گافین و همکاران (۱۹۹۸) و گافین و همکاران (۱۹۹۶)]. با توجه به گستردگی گیرنده‌های پرولاکتین در اکثر اندام‌های بدن از جمله بیضه‌ها (سلول‌های زایا، اسپرماتوزا، سلول‌های لایدی، سلول‌های سرتولی)، اپیدیمیس، وزیکول سمینال و پروستات (بوله فیسوت و همکاران ۱۹۹۸)، نقش زیادی در اثرات مثبت پرولاکتین در بافت‌های تولیدمثلی دام نر دارد. (بوله فیسوت و همکاران ۱۹۹۸) چندشکلی‌ها ژن گیرنده پرولاکتین در دام‌های اهلی و انسان زیاد مطالعه شده و نتایج اکث بررسی‌ها نقش مثبت آن را در فعالیت‌های تولیدمثلی تایید کرده است. کمیک و همکاران (۲۰۰۶) ارتباط بین چندشکلی *AluI* در ژن گیرنده پرولاکتین و صفات حجم انزال، جمعیت اسپرم، درصد اسپرم زنده و تعداد اسپرم زنده در هر انزال در خوک معنی دار گزارش شد. هانق و همکاران (۲۰۰۶) ارتباط چندشکلی ژنهای عامل رشد اپیدرمال، پروستاگلندین اندوپروکسیداز سنتاز ۲ و گیرنده پرولاکتین را با صفات حجم اسپرم، جنبندگی اسپرم، درصد اسپرم‌ها با قطرات سیتوپلاسمی، درصد اسپرم‌های غیر طبیعی، جمعیت اسپرم و تعداد کل جمعیت اسپرم در هر انزال را بررسی و ارتباط این چندشکلی‌های را با تعدادی از صفات فوق



الذکر معنی دار گزارش کردند. زنق و همکاران (۲۰۰۸) ارتباط معنی داری بین چندشکلی های موجود در آگزون های ۳، ۴ و ۷ و صفات تولید شیر و درصد چربی گزارش کردند. بیرام و همکاران (۲۰۰۵) وجود دو جهش را در آگزونهای ۳ (GT/AC) و ۷ (T/C) گزارش کردند. این جهش ها به ترتیب باعث جایگزینی اسید آمینه ای به صورت آسپارژین به سرین (S18N) در پپتید سیگنال و جایگزینی گلايسين به پرولين (L186P) در بخش خارج سلولی است. این محققین ارتباط بین S18N و تولید چربی و پروتیین را معنی دار گزارش کردند. خطیب و همکاران (۲۰۰۹) چندشکلی ارتباط ژنهای PRL، GHR، PRLR، UTMP، STAT5A۲، OPN۳ و POU1F1۴ و ارتباط آن را با باروری و نرخ ماندگاری جنین بررسی کردند. این محققین جهشی را در آگزون شماره ۳ گیرنده پرولاکتین گزارش نموده و ارتباط معنی دار ژنوتیپ های حاصله را با صفات مختلف معنی دار گزارش کردند. اما تاکنون بررسی ارتباط بین چندشکلی های پن گیرنده پرولاکتین در گاو و صفات بیومتری بیضه صورت نگرفته است. در این تحقیق چند شکلی موجود در ژن گیرنده پرولاکتین با روش PCR_RFLP مورد بررسی قرار گرفته و سپس ارتباط بین این چندشکلی ها با صفات بیومتری بیضه تحقیق خواهد شد.

مواد و روش

۱۸۳ راس گاو نر مورد استفاده در برنامه تلقیح مصنوعی که در دو مرکز، اصلاح نژاد شمال غرب و تستاژ شرکت جاهد نگه داری می شدند، برای ژن کاندیدای مورد نظر به وسیله روش PCR_RFLP برای روشن شدن ارتباط آنها با صفات عرض بیضه، طول بیضه و قطر بیضه با استفاده از نمونه های خون و اسپرم تعیین ژنوتیپ شدند. واکنش PCR براساس ویتالا و همکاران ۲۰۰۶ و هضم آنزیمی برای تعیین ژنوتیپ ها با استفاده از آنزیم Tail (Mae II) انجام شد. برای شناسایی مواد حاصل از هضم آنزیمی الکتروفورز افقی و عمودی به ترتیب بر روی ژل آگارز ۲ درصد و اکریل آمید ۸ درصد انجام شد. باندها با استفاده از اتیدیوم بروماید نمایان وبه وسیله اشعه UV در دستگاه UV DOC مورد عکسبرداری قرار گرفتند. آزمون تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از آزمون کای مربع برای هر ژن به طور جداگانه با استفاده از رابطه زیر و نرم افزار PopGene.S² انجام گرفت. صفات با استفاده از مدل زیر و نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند

$$y_{ikl} = \mu + a_i + S_k + G_l + \varepsilon_{ikl}$$

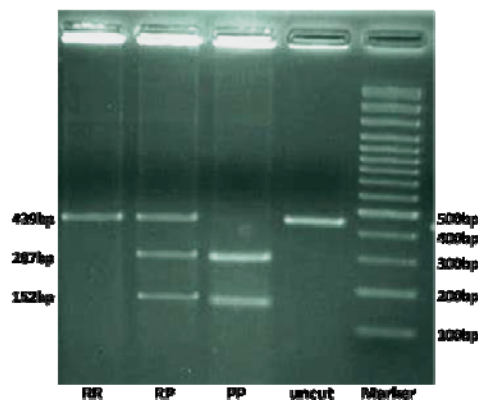
در اینجا:

y_{ijklm} مشاهده هر صفات، μ میانگین کلی صفت، a_i اثر تصادفی i امین حیوان، S_k اثر ثابت k امین ایستگاه (۲-۱)، G_l اثر ثابت l امین ژنوتیپ (۳-۱)، b_m ، ε_{ijklm} اثر تصادفی باقیمانده، η_{ijklm} مشاهده هر صفات و m میانگین کلی صفت می باشد. برآورد متوسط اثر جایگزینی با استفاده از روش فالدکونر و مک کی ۱۹۹۶ انجام شد

- 1 - POU class 1 homeobox 1
- 2 - Signal transducer and activator 5A
- 3 - Osteopontin
- 4 - Uterine milk protein

نتایج و بحث

در این بررسی قطعه ۴۳۹ کیلو بازی از ناحیه از آگزون سوم ژن گیرنده پرولاکتین با استفاده از برنامه پیشنهادی ویتالا و همکاران (۲۰۰۶) تکثیر شده و بعد از هضم، قطعات حاصل از هضم بر روی ژل اکریل امید ۸ درصد بارگذاری گردید. نتایج دو ال که موجب ایجاد سه ژنوتیپ PP، RP و RR مشاهده شد (شکل ۱). مقایسه نتایج با منابع نشان داد که این دو نوع ال بر اثر یک جهش به صورت تبدیل جایگزینی نوکلئوتیدهای GT با AC ایجاد شده بودند. فراوانی الی و ژنوتیپی (جدول ۱) در جایگاه Tail ژن گیرنده پرولاکتین نشان داد که ال R نسبت به ال P فراوانتر است (۰/۸۴۴۳ در مقابل ۰/۱۵۵۷) و همچنین ۷۱/۲۹ درصد از گاوهای نر جمعیت مورد بررسی دارای ژنوتیپ RR بودند.



شکل ۱ ژنوتیپ‌های ژن PRLR در جایگاه Tail بر روی ژل اکریل امید ۸ درصد

چند شکلی فوق در آگزون سوم ژن گیرنده پرولاکتین برای اولین بار توسط ویتالا و همکاران (۲۰۰۶) در گاوهای آیرشایر فنلاندی مطالعه شده است. فراوانی آلل P و R در این مطالعه، به ترتیب برابر ۰/۸۶ و ۰/۱۴ بود که با نتایج مطالعه حاضر در نژاد هلشتاین مغایرت دارد که می‌تواند به دلیل بعضی از تفاوت‌های عملکردی این دو نژاد از قبیل صفات تولید شیر و ترکیبات آن باشد. زنگ و همکاران (۲۰۰۸) فراوانی آلل P و R را به ترتیب در ۳۸۵ گاو هلشتاین چینی ۰/۱۵۰ و ۰/۸۵۰ گزارش کردند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. تفاوت اندک فراوانیهای مشاهده شده و مورد انتظار ژنوتیپ‌های RR (۱۳۲ در مقابل ۱۳۰)، RP (۴۵ در مقابل ۴۸) و PP (۵ در مقابل ۶) در این جایگاه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). و جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ قرار دارد. این نتایج ممکن است دلیل کوچک بودن جمعیت مورد بررسی یا موثر نبودن عوامل مداخله‌گر بر روی فراوانی‌های الی و ژنوتیپی بوده است.



بررسی نتایج تجزیه واریانس نشان می دهد که اثر جایگاه Tai-PRLR ژن گیرنده استروژن بر روی طول بیضه، عرض بیضه و قطر بیضه ($p > 0/05$) غیر معنی دار بود. میانگین ژنوتیپ ها جایگاه PRLR_Tai در جدول یک آمده است. مقایسه میانگین ها اختلاف چندانی نشان نمیدهد

جدول ۳-۱۵ برآورد میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ های مختلف در جایگاه PRLR_Tai و ارزش P برای صفات مورد بررسی در گاوهای نر هلشتاین ایران

ارزش P	ژنوتیپ های گیرنده پرولاکتین			صفات مورد بررسی
	RR	RP	PP	
۰/۸۲۷۷	۱۷/۷۲ ± ۰/۳۲	۱۷/۵۴ ± ۰/۳۵	۱۷/۴۱ ± ۰/۷۳	عرض بیضه (سانتی متر)
۰/۵۳۷۳	۱۳/۶۱ ± ۰/۸۰	۱۳/۶۱ ± ۰/۸۰	۱۴/۳۲ ± ۰/۴۵	طول بیضه (سانتی متر)
۰/۹۹۰۳	۳۹/۱۴ ± ۰/۶۴	۳۹/۲۰ ± ۰/۷۰	۳۹/۰۱ ± ۱/۴۸	قطر بیضه (سانتی متر)

مطالعه ای در خصوص ارتباط این چندشکلی و صفات بیومتری بیضه انجام نشده است. اکثر مطالعات در راستای یافتن ارتباط با صفات کیفی اسپرم بوده اند ولی نتایج این مطالعات متناقض بوده است. کمیک و همکاران (۲۰۰۶) ارتباط بین چندشکلی PRLR-AluI و صفات کیفی اسپرم را مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند که بین چندشکلی در این جایگاه و تغییرات در صفات حجم انزال، جمعیت اسپرم، درصد اسپرم زنده و تعداد اسپرم زنده در هر انزال در خوک ارتباط معنی دار وجود دارد. همچنین نتایج این محققین نشان داد که میانگین افراد هتروزیگوت نسبت به دو هموزیگوت بالاتر است که در توافق با نتایج تحقیق حاضر است. هانق و همکاران (۲۰۰۶) ارتباط چندشکلی گیرنده پرولاکتین به همراه چندشکلی ژنهای عامل رشد اپیدرمال، پروستاگلندین اندوپروکسیداز سنتاز ۲ را با صفات کیفی اسپرم بررسی کرده و نشان دادند که ارتباط بین چندشکلی در ژن گیرنده پرولاکتین و صفات درصد اسپرم ها با قطرات سیتوپلاسمی و درصد اسپرم طبیعی معنی دار و با صفات حجم اسپرم، جنبندگی اسپرم، درصد اسپرم های غیر طبیعی، جمعیت اسپرم و تعداد کل جمعیت اسپرم در هر انزال غیر معنی دار است. همچنین لین و همکاران (۲۰۰۶) با بررسی ارتباط بین ژن کاندیدای گیرنده پرولاکتین با صفات کیفی اسپرم در خوک های نر به این نتیجه رسیدند که ارتباط بین چندشکلی در ژن گیرنده پرولاکتین با صفات زنده ماندن اسپرم، قطرات سیتوپلاسمی و درصد اسپرم های غیر طبیعی معنی دار و با بقیه صفات از جمله حجم انزال، جمعیت انزال و غیره، معنی دار نیست. که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت داشت. دلیل مغایرت به دلیل متفاوت بودن گونه (خوک و گاو) و متفاوت بودن جایگاه های مورد بررسی در ژن گیرنده پرولاکتین است.

تشکر و قدردانی:

محققین از زحمات جناب آقای مهندس کوشا و کارکنان مرکز تستاژ شرکت جاهد، کارکنان مرکز اصلاح نژاد شمالغرب و آقای اسماعیلی تشکر می نمایند...



منابع

1. Bazan, JF. 1990a. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today.*, 11: 350-354.
2. Kelly, PA, J. Djiane, MC.Postel-Vinay and M. Edery. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endo. Rev.*, 12: 235-251.
3. Lai, HL, TH. Yang, RO. Messing, YH. Ching, SC. Lin and YJ. Chern. 1997. Protein kinase C inhibits adenylyl cyclase type VI activity during desensitization of the A2a-adenosine receptor-mediated cAMP response. *J. Biol. Chem.*, 272: 4970-4977.
4. Goffin, V and PA. Kelly. 1996. Prolactin and growth hormone receptors. *Clin. Endo.*, 45: 247-255.
5. Goffin, V., Kelly PA, V. Goffin and F. Ferrag. 1998. Molecular aspects of prolactin and growth hormone receptors. In: *Adva. in Mole. Cell. Endo.*, edited by LeRoith D. London: JAI, 1-33.
6. Bole-Feyssot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binar and PA. Kelly. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endo. Rev.* 19: 225-268.
7. Zhang, JL., LS. Zan, LS. Fang, P. Zhang, F. Shen, GL Tian. 2008. Genetic variation of PRLR gene and association with milk performance traits in dairy cattle. *Canad. J. Anim. Sci.*, 88(no.1)
8. Kmiec M, A. Terman. 2006. Associations between the prolactin receptor gene polymorphism and reproductive traits of boars. *J Appl Genet.* 47: 139-41.
9. Khatib H, W. Huang, X. Wang, AH. Tran, AB. Bindrim, V. Schutzkus, RL. Monson and BS. Yandell. 2009. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. *J Dairy Sci.*, 92: 2238-2247.
10. Brym, P., S. Kamiński and W. Elzbieta. 2005. Polymorphism within the bovine prolactin receptor gene (PRLR). *Anim. Sci. Pap. Repo.*, 23: 61-66.
11. Lin, CL, Ponsuksili S., Tholen E., Jennen DG., Schellander K. and Wimmers k. (2006). Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Anim. Reprod. Sci.*, 92: 349-363.



Prolactin Receptor Polymorphism and its association with testis biometry trait in Iranian Holstein bulls

Abstract:

Fertility is one of the most important economical traits in cattle production. Implementation of artificial insemination (AI) in cattle production allowed improving selection on the bulls for production traits, but at the same time, it stresses the meaning of the individual bull reproductive performance. This study aims to elucidate the effect of direct functional candidate gene loci as markers testis biometry trait, i.e, average testis length (ATL), average testis width (ATW) and scrotum circumference (SC). Candidate gene loci *PRLR* were chosen for investigation based on their biological correlation and/or physiological functions in male reproduction. The semen and blood sample of 183 Holstein bulls from two AI station, born between 1993 and 2008 were genotyped with PCR-RFLP method *TaiI* restriction enzyme. Two allele and three genotype were observed. Frequency of alleles and genotypes were $TaiI^+$ (R) alleles and RR genotypes. Analyses of variance with mixed model revealed no significant association with mentioned traits.