بررسی ارتباط بین ژنوتیپ‌های ژن PRKAG1 و ارتباط آن با میزان پروتئین و چربی شیر در گاوهای شیری هلشتاین

احمد محمودی[1*]، شاهین اقبال سعید، رضا وجدی حکم آبادی

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه، میانه، ایران

۲- استادیار علوم دامی ، دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد خوراسگان(اصفهان)

۳- گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه، میانه، ایران

نویسنده مسئول: *Email: ahmadmahmoudi66@gmail.com*

چکیده

آدنوزین مونو فسفات پروتئین کیناز (AMPK) یک محور اساسی و مهم برای پاسخ های سلول به استرس و تنش و تخلیه ATP می باشد که منبع عمده ی درون سلول از انرژی است و به محض افزایش نسبت AMP به ATP باعث برقراری تعادل انرژی می شود و کنترل هموستازی انرژی را به عهده می‌گیرد. زیر واحد گاما۳ این ژن در متابولیسم چربی و پروتئین موثر می-باشد. AMPKG1 یکی از زیر واحد های ژن AMPK می‌باشد که در گاو تحت عنوان PRKAG1 شناسایی شده است. در این مطالعه پس از خون‌گیری از ۱۰۰ راس گاو شیری از سه گاو داری معتبر، استخراج DNA به روش فنل کلرو فرم انجام شد، همچنین واکنش PCR با استفاده از پرایمر های مربوطه انجام شد، نمونه های دارای باند ناحیه مورد نظر توالی یابی شدند. نتایج توالی یابی با کمک اطلاعات سایت NCBI و بسته نرم افزار CLC بررسی شد و پس از تعیین ناحیه جهش‌های ایجاد شده، نتایج نشان از وجود جهشی در 3'- UTR و یک جهش نیز در اینترون شماره ٦ ژن PRKAG1 داشت، جهشی که در T C١٤٢٨٠ صورت گرفت، سپس هر صد نمونه SSCP شدند، سه الگو TT، TC و cc مشاهده شد نتایج آنالیز برای این تولید پروتئین و چربی شیر نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ‌های PRKAG1 بر میزان پروتئین و چربی شیر معنی دار است بطوریکه ژنوتیپ TT بیشترین میزان چربی و پروتئین و ژنوتیپ TT کمترین میزان را به خود اختصاص داده است. با توجه به نقش ژن AMPK در متابولیسم تولید انرژی، می توان با شناسایی جهش مشاهده شده در مطالعه حاضر آن را به عنوان یک ژن کاندیدا در کل گاوهای هلشتاین شیری کشور معرفی نمود.

واژه های کلیدی: AMPKG1 - PRKAG1 – تولید شیر- گاو شیری

مقدمه

آدنوزین مونو فسفات پروتئین کیناز (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) یا همان AMPK یک آنزیم هترو ترمیک است که شامل یک واحد کاتالیکی آلفا و دو زیر واحد بتا و گاما است(کوین و همکاران،۲۰۰۷). AMPKG1یکی از زیر واحد های غیر کاتالیکی ژن AMPK می باشد که در گاو تحت عنوان PRKAG1 شناسایی شده است (Protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit) و به عنوان یک سنسور سوخت و ساز بدن عمل کرده و هدایت چندین مسیر متابولیکی را در جهت کمبود مواد مغذی به عهده دارد(بنکل و همکاران، ۲۰۰٤). AMPK نه تنها به صورت مستقیم بر روی آنزیم‌های مختلف در گیر در مسیر متابولیکی عمل می‌کند بلکه در سطح رونویسی

ژن‌ها در فعال شدن متابولیسم گلوکز و لیپید نقش دارد که در این راه AMPK کنترل هموستازی انرژی و خاموش کردن مسیر تخلیه ATP را به عهده میگیرد در حالی که تنوع ژنتیکی در AMPK به نظر نمی‌رسد اما اثر بزرگ بر روی متابولیسم گلوکز و متابولیسم لیپیوپروتئین‌ها در انسان مشخص شده است (بینگ ژونگ و همکاران، ۲۰۰۶). UTR بخشی از DNA است که رونویسی می‌شود ولی ترجمه نمی‌شود. با این وجود بر خلاف عقاید قبلی که گفته می‌شد که این قسمت هیچ تاثیری بر ترجمه ندارد، امروزه تحقیقات زیادی روی این منطقه انجام گرفته و مشخص شده است که جهش در این منطقه باعث اثر برروی کدون ختم، تغییر ساختار ثانویه و سیگنال‌های پلی‌آدنیلاسیون می‌گردد. محققان پی بردند که جهش در ناحیه 3'UTR در ژن KRT5[1] باعث بروز بیماری EBS[2] و FOXP3[3] می‌شود(مولر و همکاران، ۱۹۹۹; جیو و همکاران،۲۰۰۲و ژانگ و ژائو[4]،۲۰۰۷).

مواد و روش ها

مطالعه حاضر روی صد راس گاو از سه گاوداری معتبر انجام گرفت. میانگین تولید شیر در سه گاوداری پرتولید برابر ۱۲۷۸٤، ۱۳۵۹٦ و ۱۲٦۲۱، میانگین چربی شیر ۳۵٦، ۳۸٦ و ۳٦۷ کیلوگرم، و میانگین پروتئین شیر ۳۳٦، ۳٤٦ و ۳۳۰ کیلوگرم در یک دوره ۳۰۵ روزه بود. سپس خون گیری از صد راس گاو انجام شد، در ادامه از همه نمونه‌ها استخراج DNA به روش فنل کلرو فرم انجام شد. کیفیت وکمیت DNA های استخراج شده توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر و ژل الکتروفورز اندازه گیری شد. سپس پرایمرها بر اساس اطلاعات سایت NCBI و نرم افزار OLIGO طراحی شد . سپس واکنش زنجیره ایی پلیمراز Polymerase Chain Reaction)PCR) طبق شرایط استاندارد و فقط با درنظر گرفتن دمای اتصال متفاوت برای آنها انجام شد. توالی های مربوط به ۱۰ نمونه محصول PCR با کیفیت بالا انتخاب و برای توالی یابی به شرکت BIOBASEIC کانادا ارسال شد. نتایج با توجه به اطلاعات سایت NCBI و بسته نرم افزارCLC Main Workbench 6 تجزیه و تحلیل تحلیل شد.در نهایت از روش SSCP برای شناسای و تایید جهش شناسایی شده در توالی یابی استفاده شد و عملیات SSCP همه نمونه ها توسط ژل اکریل آمید و الکتروفورز عمودی انجام گرفت. در این تحقیق پس از تعیین ژنوتیپ تک تک دام ها برای جایگاه مورد بررسی این اطلاعات به همراه داده های مربوط به تولید شیر، چربی شیر، پروتئین شیر، شکم زایش و اطلاعات گله وارد برنامه Excel شده و پس از ویرایش با استفاده از برنامه SAS 9.1 ، توسط رویه GLM تجزیه شدند.

نتایج و بحث

مقایسه توالی های بدست آمده برای ژن PRKAG1 با توالی NC_007303.5 موجود در NCBI انجام گرفت. نتایج حاکی از وجود جهش در ناحیه UTR۳ در باز ۱٤۲۸۰ بود که تبدیل باز تیمین را به سیتوزین به همراه داشت. نتایج SSCP سه الگوی ژنوتیپی هموزیگوت جهش یافته، هتروزیگوت، هموزیگوت وحشی را که در توالی یابی مشاهده شده بود تایید کرد.

1- Keratin
2-epidermolysis bullosa simplex
3-forkhead box P3
4-Zhang and Zhou

الگو۱: هموزیگوت جهش یافته، الگوی۲: هتروزیگوت، الگوی۳: هموزیگوت وحشی

نتایج آنالیز تأثیر چند شکلی ژن PRKAG1 بر چربی و پروتئین شیر نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ‌های PRKAG1 روی چربی و پروتئین شیر معنی دار است ($P < 0.05$)، بطوریکه ژنوتیپ CC بیشترین میزان چربی و پروتئین و ژنوتیپ TT کمترین میزان را به خود اختصاص داده است . روکس و همکاران جهش‌هایی را در زیر واحد گاما۳ این ژن مشاهده کردند که منجر به تغییر اسید آمینه و در نهایت افزایش صفات تولیدی را در گاو به دنبال داشت (روکس[5] و همکاران، ۲۰۰۵). نقش مهم و کلیدی زیر واحد گاما در تنظیم و بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم گلوکز مشخص شده است. PRkAG یکی از زیر واحدهای AMPK است که نقش مهمی در تنظیم هموستازی انرژی دارد. با توجه به تحقیقات انجام شده روی این ژن مشخص شده که جهش‌هایی در این زیرواحد بر متابولیسم چربی و پروتئین موثر بوده است(داسیلوا و همکاران، ۲۰۰۰). نقش مهم و کلیدی زیر واحد گاما در تنظیم و بیان ژن‌های درگیر در متابولیسم گلوکز مشخص شده است. ژن PRkAG3 که زیرواحد PRkAG است نیز نقش مهمی در تنظیم هموستازی انرژی و متابولیسم چربی و پروتئین دارد(داسیلوا و همکاران، ۲۰۰۰).

منابع

Bernhard Benkel, Sonja Kollers, Ruedi Fries, Alexei Sazanov, Erin Yoshida, Edith Valle, Jon Davoren, Donal Hickey. 2004. Characterization of the bovine ampkg1 gene. Mamm Genome Volume 16, 194–200.

Bingzhong Xue and Barbara B. Kahn. 2006. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. Journal compilation C The Physiological Society.

Roux, M., Nizou, A., Forestier, L., et al., Characterization of the Bovine PRKAG3 Gene: Structure, Polymorphism, and Alternative Transcripts, Mamm. Genome,2006, vol. 17, pp. 83_92.

Muller, F.B., Anton-Lamprech, I., Kuster, W. and Korge, B.P. (1999) A premature stop codon mutation in the 2B helix termination peptideof keratin 5 in a German epidermolysis bullosa simplex Dowling-Meara case. J. Invest. Dermatol. 112, 988–990.

Kevin W. Williams, Roberto Coppari, and Joel K. Elmquist. 2007. AMPing up" our understanding of the hypothalamic control of energy balanceThe . Journal of Clinical Investigation

Zhang N, Gao Q. Z. Li,1 X. J, YanH. B. .2011, Potential role of adenosine monophosphate-activated protein kinase in regulation of energy metabolism in dairy goat mammary epithelial cells. Journal of Dairy Science 94:218–222.

X. Yang l M. J. Zhu, K. R. Underwood, B. W. Hess, S. P. Ford and M. Du,2007, The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth

5-Roux