بررسی ارتباط بین ژن *PRKAG1* و *BHBA* با صفات مختلف گاوهای شیری هلشتاین در استان اصفهان

امیر زرگران*، شاهین اقبال سعید[۲] ، اسد اسدی[۳]

۱ـ کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان

*(*نویسنده مسئول: Zargaranamir@yahoo.com)*

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

۲ ـ استادیار علوم دامی،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد میانه

چکیده

ژن آدنوزین مونوفسفات پروتئین کیناز (AMPK) یک محور اساسی و مهم برای پاسخ‌های سلول به استرس، تنش و تخلیه ATP می‌باشد که منبع عمده‌ی درون سلول از انرژی است و به محض افزایش نسبت AMP به ATP باعث برقراری تعادل انرژی می‌شود. یکی از زیر واحدهای ژن AMPK در گاو تحت عنوان PRKAG1 شناسایی شده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین ژن PRKAG1 با صفات مختلف گاوهای شیری هلشتاین در استان اصفهان می‌باشد. در این مطالعه پس از خون‌گیری از ۱۰۰ راس گاو شیری از سه گاوداری معتبر، استخراج DNA به روش فنل کلروفرم انجام شد، همچنین واکنش PCRبا استفاده از پرایمرهای مربوطه انجام شد، نمونه‌های دارای باند ناحیه مورد نظر توالی‌یابی شد. توالی‌یابی با کمک اطلاعات سایت NCBI و بسته نرم‌افزار CLC بررسی شد و پس از تعیین ناحیه جهش‌های ایجاد شده، نتایج نشان از وجود جهشی در 3' -UTRو یک جهش نیز در اینترون شماره ٦ ژن PRKAG1 داشت، سپس هر صد نمونه SSCP شدند، سه الگو TT، TC و cc مشاهده شد. نتایج آنالیز تأثیر چند شکلی ژنPRKAG1 بر وضعیت بدن نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ‌هایPRKAG1 بر روی وضعیت بدن معنی‌دار می‌باشد بطوریکه ژنوتیپ TT بیشترین نمره اسکور و ژنوتیپ cc کمترین میزان را به خود اختصاص داده است.

واژه‌های کلیدی: *PRKAG1 AMPKG1، بتاهیدروکسی بوتیریک اسید، کتوز، گاو شیری*

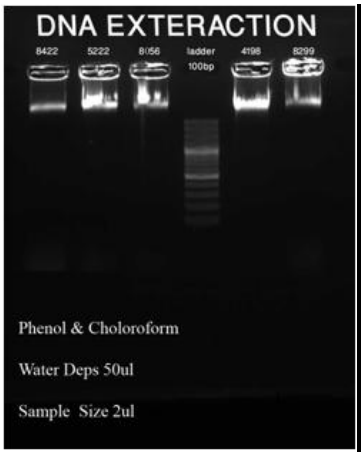
مقدمه

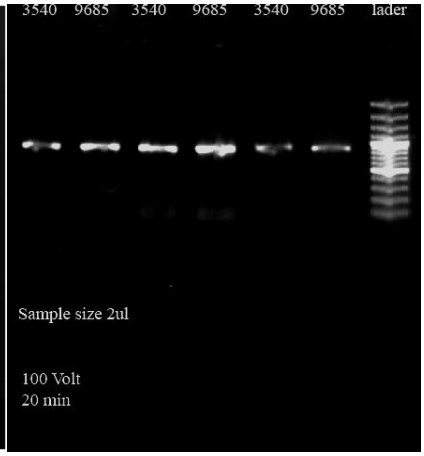
ژن آدنوزین مونو فسفات پروتئین کیناز (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) یا همان AMPK یک آنزیم هتروترمیک است که شامل یک واحد کاتالیکی آلفا و دو زیر واحد بتا و گاما است. AMPKG1 یکی از زیرواحدهای غیر کاتالیکی ژن AMPK می‌باشد که در گاو تحت عنوانPRKAG1 شناسایی شده است.AMPKG1 به عنوان یک سنسور سوخت و ساز بدن عمل کرده و هدایت چندین مسیر متابولیکی را در جهت کمبود مواد مغذی به عهده دارد. در انسان نیز۳ زیر واحد (G۳، G۲، G۱) شناسایی شده است. در هنگام تنش و استرس AMPK گروه فسفات انتهایی ATP را انتقال می‌دهد و به AMP تبدیل می‌شود (هاردیه، ۱۹۹٤). اثر فعال‌سازی AMPK که منجر به خاموش کردن مسیرهای مصرف انرژی و روشن کردن مسیرهای تولید انرژی است. مکانیسم‌های متعدد فعالیت AMPK روی متابولیسم لیپیدها و کربوهیدرات‌ها به دفعات ارائه شده است (فری و همکاران، ۲۰۰۳). مطالعاتی انجام شده که وجود جهش در زیر واحد گاما۳ باعث افزایش محتوای گلیکوژن در خوک شده است (میلان، ۲۰۰۰؛ کیوبانوو همکاران،۲۰۰۱). آدنوزین‌آنالوگ-5-آمینوایمیدازول-4-کربوکسامید-D-Bریبوفورانوزید (AICAR) می‌تواند باعث فعال‌سازی AMPK شود (سولیوان و همکاران، ۱۹۹٤؛ کااوشیک و

همکاران، ۲۰۰۱).اثر فعال‌سازی AMPK منجر به خاموش کردن مسیرهای مصرف انرژی و روشن کردن مسیرهای تولید انرژی است. مکانیسم‌های متعدد فعالیت AMPK روی متابولیسم لیپیدها و کربوهیدرات‌ها به دفعات ارائه شده است (فری و همکاران، ۲۰۰۳).

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از صد راس گاوشیری از سه گاوداری معتبر خون‌گیری انجام گرفت. میانگین تولید شیر در سه گاوداری پرتولید برابر ۱۲۷۸٤، ۱۳۵۹٦ و ۱۲٦۲۱، میانگین چربی شیر ۳٥٦، ۳۸٦ و ۳٦۷ کیلوگرم، و میانگین پروتئین شیر ۳۳٦، ۳٤٦ و ۳۳۰ کیلوگرم در یک دوره ۳۰۵ روزه بود. از همه نمونه‌ها استخراج DNA به روش فنل کلروفرم انجام شد. کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر و ژل الکتروفورز اندازه گیری شد (شکل۱). واکنش زنجیره ایی پلیمراز Polymerase Chain (Reaction) طبق شرایط استاندارد و فقط با درنظر گرفتن دمای اتصال متفاوت برای آنها انجام شد (شکل۲). 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 شد (شکل۳).در نهایت از روش SSCP برای شناسایی و تایید جهش شناسایی شده در توالی‌یابی استفاده شد و عملیات SSCP همه نمونه‌ها توسط ژل اکریل آمید و الکتروفرز عمودی انجام گرفت (شکل٤). در این تحقیق پس از تعیین ژنوتیپ همه‌ی دام‌ها (جدول۱) برای جایگاه مورد بررسی این اطلاعات به همراه داده های مربوط به شکم زایش، فصل زایش، اسکور بدن و اطلاعات گله وارد برنامه Excel شده و پس از ویرایش با استفاده از برنامه SAS 9.1 ، توسط رویه GLM تجزیه شدند.





شکل۱- استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم شکل۲- الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل اگارز

نتایج و بحث

نتایج آنالیز نشان می‌دهد که ژن PRKAG1 روی صفات اسکور بدن معنی‌دار است، بطوریکه ژنوتیپ TT بیشترین نمره اسکور و ژنوتیپ cc کمترین میزان را به خود اختصاص داده است(جدول ۲). جهش در باز ۱٤۲۸۰ DNA ژنومی و در ناحیه 3'UTR ژن PRKAG1 دیده شد که تا کنون این جهش در گاو گزارش نشده است. نتایج آنالیز اثر فصل زایش بر وضعیت بدن و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید نشان می‌دهد که اثر فصل زایش بر روی وضعیت بدن معنی دار و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید نمی باشد. نتایج آنالیز اثر شکم زایش بر وضعیت بدن و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید نشان می‌دهد که اثر شکم زایش بر روی وضعیت

بدن معنی دار و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید نمی باشد. (جدول ۳). نتایج آنالیز اثر گله بر وضعیت بدن و بتاهیدروکسی بوتیریک اسید نشان می‌دهد که اثر گله بر روی وضعیت بدن معنی دار نیست ولی بر روی بتاهیدروکسی بوتیریک اسیدمعنی‌دار است به طوریکه میزان BHBA در گله یک بالاترین مقدار را به خود اختصاص داده است و بعد از آن گله دو بیشترین میزان BHBA را دارد(جدول ٤). نتایج آنالیز تأثیر چند شکلی ژن PRKAG1 نشان می‌دهد که اثر ژنوتیپ‌های PRKAG1 بر روی اسکور بدن معنی دار است(جدول ۱). به‌طوریکه ژنوتیپ TT بیشترین نمره اسکور و ژنوتیپ cc کمترین میزان را به خود اختصاص داده است. فعال شدن AMPK در هیپوتالاموس در پاسخ به کاهش انرژی باعث تحریک نورون‌های NPY و بیان ژن‌های مرتبط با AgRP شده و افزایش مصرف خوراک و کاهش مصرف انرژی را به دنبال دارد که نهایتا باعث افزایش سطح انرژی بدن می‌شود. AMPK باعث اثر برروی نورون‌های NPY و AgRP می‌گردد که نورون‌های تحریک کننده‌ی اشتها می-باشند که تاثیر منفی روی α-MSH و در نهایت نورون POMC می‌شود که این امر باعث کاهش مصرف خوراک و افزایش مصرف انرژی است. بنابراین در زمان عدم بالانس انرژی AMPK با اثر بر روی نورون‌های تحریک کننده‌ی اشتها باعث افزایش مصرف خوراک و کاهش سطح انرژی و از طرف دیگر با تاثیر منفی بر روی POMC که مهار کننده اشتها است باعث قطع کاهش مصرف خوراک می‌شود. بنابراین این ژن نقش مهم و موثری در کاهش مصرف انرژی دارد که همچنین با توجه به این که چاقی باعث عدم بالانس انرژی می‌شود گاوهایی که دارای نمره بدن بیشتر می‌باشند بیشتر در معرض کتوز بوده و فعالیت AMPK در آن نیز کمتر است. در پایان پیشنهاد می‌گردد این آزمایش را برای صفات دیگری انجام داد و روی نژادهای دیگری این آزمایش انجام شود، همچنین از تعداد نمونه‌های مورد بررسی بیشتری استفاده کرد.

منابع

Ciobanu D, Bastiaansen J, Malek M, Helm J, Woollard J et al. (2001) Evidence fornewalleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated c3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. Genetics 159, 1151–1162.

Ferre P, Azzout-Marniche D, Foufelle F (2003) AMPactivated protein kinase and hepatic genes involved in glucose metabolism. Biochem Soc Trans 31: 220_223.

Gu, L.-H., Kim, S-C., Ichiki, Y., Park, J., Nagai, M. and Kitajima, Y. (2003) A usual frameshift and delayed termination codon mutation in keratin 5 causes a novel type of epidermolysis bullosa simplex with migratory circinate erythema. J. Invest. Dermatol. 121, 482–485.

Hardie DG, Carling D, Halford N (1994) Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress.Cell Biol 5, 409–416.

Kaushik, V. K., M. E. Young, D. J. Dean, T. G. Kurowski, A. K. Saha, and N. B. Ruderman. 2001. Regulation of fatty acid oxidation and glucose metabolism in rat soleus muscle: Effects of AICAR. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 281:E335–E340.

Milan D, Jeon J-T, Looft C, Amarger V, Robic A et al.(2000) A mutation in PRKAG3 associated with excessglycogen content in pig skeletal muscle. Science 288,1248–1251.

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

Sullivan, J. E., K. J. Brocklehurst, A. E. Marley, F. Carey, D. Carling, and R. K. Beri. 1994. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. FEBS Lett. 353:33–36.