بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم دامی و شیلات
گروه علوم دامی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد اصلاح نژاد دام

موضوع:

شناسایی چند شکلی های آللی در جایگاه ژنی لپتین و گیرنده لپتین و ارتباط آن با برخی صفات تولیدی در گاوهای نژاد هلشتاین

پژوهش و نگارش:

آرزو قربانی

استاد راهنما:

دکتر سید حسن حافظیان

استاد مشاور:

دکتر قدرت رحیمی میانجی

بهمن ۱۳۹۱

رشته ای بر گردنم افکنده دوست

می کشد هر جا که خاطر خواه اوست

رشته بر گردن نه از بی مهری است

رشته ی عشق است و بر گردن نکوست

سپاس خداوندی را که دوستدار زیبایی هاست و همواره درهای رحمتش را به روی بندگان گشوده است.

او را سپاس میگویم به خاطر حضور دو فرشته مهر آفرین همیشه پدر و مادر عزیزم.

به خاطر زیبایی روح خواهرانم که همواره خستگی هایم را به امید و روشنایی گره زدند.

به خاطر حضور در محضر دوستانی که وجودشان سراسر مهر بود و انسانیت

و او را سپاس میگویم به خاطر دیدن لبخند همه ی آنانی که دوستشان دارم.

برخود لازم میدانم از زحمات اساتید بزرگوارم جناب آقای دکتر حافظیان و جناب آقای دکتر رحیمی به خاطر همه ی کمک ها و دلگرمی هاشان کمال قدردانی را داشته باشم.

همچنین از جناب آقای دکتر انصاری و جناب آقای دکتر دلدار بابت قبول زحمت داوری پایان نامه کمال تشکر را دارم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر رحمانی بابت هدایت جلسه کمال سپاس را دارم.

از جنای آقای مهندس نجفی بابت همه ی شکیبایی و محبت شان کمال تشکر را دارم.

از همه ی دو ستان و همکلاسی هایم و هم اتاقی هایم بابت همه ی همراهی هاشان و خاطره هاشان متشکرم.

از مسئول آزمایشگاه ژنتیک ملکولی جناب آقای مهندس روحی نیز کمال قدردانی را دارم.

این پایان نامه را تقدیم می کنم به اهالی با صفای خانه ی کوچکمان

پدرم، مادرم و خواهرانم

که همواره وجودشان مایه ی آسایش و مهر آفرینی در من است

چکیده

هورمون لپتین، محصول بیان ژن لپتین (ژن چاقی) است و با مصرف خوراک و متابولیسم چربی در ارتباط است. محل اصلی بیان ژن لپتین بافت چربی می باشد و گیرنده های آن در بسیاری از بافتهای بدن از جمله مغز، بافت چربی، معده، غدد تناسلی، عضلات، هیپوتالاموس و هیپوفیز وجود دارند. تحقیق حاضر به منظور بررسی چند شکلی ژن لپتین و گیرنده آن و ارتباط این جایگاه ها با صفات تولیدی در گاو نژاد هلشتاین ایرانی انجام شد. جمعیت مورد مطالعه شامل تعداد ۱۶۰ گاو هلشتاین بود که به طور تصادفی از گله گاو شیری مهدشت انتخاب و استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته انجام شد. تکثیر قطعات ۳۳۱ و ۴۰۰ جفت بازی، به ترتیب از اگزون ۳ ژن لپتین و اگزون ۲۰ ژن گیرنده لپتین توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز و پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. برای تعیین ژنوتیپ نمونه ها از روش PCR-RFLP و از آنزیم های برشی HphI و TaqI به ترتیب برای ژن لپتین و گیرنده لپتین استفاده شد. در جایگاه ژن لپتین دو آلل A و T به ترتیب با فراوانی ۰/۶۱۵۶ و ۰/۳۸۴۴و سه ژنوتیپ AA و AT و TT با فراوانی هر یک به ترتیب برابر با ۲۹/۳۸، ۶۴/۳۸ و ۶/۲۵ درصد برآورد شد. در جایگاه ژن گیرنده لپتین دو آلل C و T به ترتیب با فراوانی ۷۴/۳۸ و ۲۵/۶۳ درصد و دو ژنوتیپ CC و CT به ترتیب با فراوانی۰/۷۲ و ۰/۲۸ شناسایی شد. در جایگاه گیرنده ژن لپتین ژنوتیپ هموزایگوس TT مشاهده نشد. آزمون کای مربع، نشان داد که جمعیت مورد نظر در جایگاه های مورد مطالعه در تعادل هاردی – واینبرگ قرار نداشت. آنالیز آماری اثر هر یک از جایگاه ژن لپتین روی صفات تولیدی شامل تولید شیر، پروتئین معنی دار بوده است اما جایگاه ژن گیرنده لپتین تنها روی تولید شیر اثر معنی دار داشت ($P<0.05$). گاوهای با ژنوتیپ AA در جایگاه ژن لپتین و ژنوتیپ CC در جایگاه ژن گیرنده لپتین به ترتیب بالاترین مقدار تولید شیر داشته اند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و در صورت تکرار این نتایج در پژوهش هایی با نمونه های بیشتر احتمالا می توان از این جایگاه های نشانگری به عنوان ژن های عمده بزرگ اثر در برنامه های انتخاب به کمک نشانگر بهره گرفت.

کلمات کلیدی: لپتین، گیرنده لپتین، HphI، TaqI، گاو هلشتاین

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۲
۲- بررسی منابع ۶
۲-۱- مروری بر جایگاه ژنی مورد مطالعه ۷
۲-۱-۱- تاریخچه کشف ژن لپتین ۷
۲-۱-۲- لپتین و جایگاه ۸
۲-۱-۳- تنظیم هورمونی تظاهر ژن لپتین و اثرات جانبی آن ۹
۲-۱-۴- مکانیسم عمل لپتین ۱۱
۲-۱-۵- نقش لپتین در تعادل انرژی ۱۳
۲-۱-۶- نقش لپتین در تنظیم تولید مثل ۱۳
۲-۱-۷- نقش لپتین در ایمنی ۱۵
۲-۲- بررسی چند شکلی های مشاهده شده در ژن لپتین و ارتباط آن با صفات تولیدی ۱۷
۲-۳- کشف گیرنده لپتین و نقش آن ۲۲
۲-۴- بررسی چند شکلی های مشاهده شده در ژن گیرنده لپتین ۲۴
۳- مواد و روش ها ۲۶
۳-۱- خون گیری ۲۶
۳-۲- استخراج DNA ۲۶
۳-۲-۱- روش استخراج DNA ۲۶
۳-۳- تعیین ویژگی کمی و کیفی DNA ۲۹
۳-۳-۱- تعیین کمیت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر ۲۹
۳-۳-۲- تعیین کمیت DNA استخراج شده با استفاده به روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۳۰
۳-۴- واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) ۳۱
۳-۵- بهینه سازی شرایط (PCR) ۳۳
۳-۵-۱- اجزاء واکنش PCR برای جایگاه لپتین و گیرنده لپتین ۳۳
۳-۶- چرخه های حرارتی PCR ۳۳
۳-۷- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۳۴
۳-۸- هضم آنزیمی محصولات PCR به کمک آنزیم های برشی ۳۵
۳-۹- تجزیه و تحلیل داده ها ۳۷

۳-۹-۲- بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد مطالعه ۳۷
۳-۹-۲-۱- برآورد میزان فراوانی ژنی و ژنوتیپی ۳۷
۳-۹-۲-۲- مدل آماری مورد استفاده در آنالیز ۳۸
۴- نتایج ۴۰
۴-۱- کمیت و کیفیت DNA ۴۰
۴-۲- تکثیر محصولات PCR ۴۰
۴-۳- نتیجه هضم آنزیمی و RFLP ۴۴
۴-۳-۱- تیمار آنزیمی HphI برای جایگاه ژنی لپتین ۴۴
۴-۳-۲- تیمار آنزیمی TaqI برای جایگاه ژنی گیرنده لپتین ۴۵
۴-۴- برآورد پارمترهای ژنتیکی ۴۵
۴-۴-۱- تعیین فراوانی ژنی و ژنوتیپی ۴۵
۴-۴-۱-۱- فراوانی ژنی و ژنوتیپی محصولات هضم آنزیم HphI برای جایگاه ژنی لپتین ۴۵
۴-۴-۱-۲- فراوانی ژنی و ژنوتیپی محصولات هضم آنزیم TaqI برای جایگاه ژنی لپتین ۴۶
۴-۵- بررسی اثر ژنوتیپ ها روی صفات مورد مطالعه ۴۷
۴-۵-۱- صفات مورد پژوهش ۴۷
۴-۵-۱-۱- مقایسه میانگین برای صفت تولید شیر بین ژنوتیپ های مختلف جایگاه ژنی لپتین ۴۸
۴-۵-۱-۲- مقایسه میانگین برای صفت پروتئین شیر بین ژنوتیپ های مخلف جایگاه ژنی لپتین ۴۹
۴-۵-۱-۳- مقایسه میانگین برای صفت تولید شیر بین ژنوتیپ های مخلف جایگاه ژنی گیرنده لپتین ۴۹
۴-۶- بحث ۵۰
۴-۶-۱- لپتین ۵۰
۴-۶-۲- گیرنده لپتین ۵۴
۴-۶-۳- نتیجه گیری ۵۶
۴-۶-۴- پیشنهاد ها ۵۷
منابع ۵۸

فهرست شکل ها

۱. شکل (۲-۱) ۹
۲. شکل (۲-۲) ۱۱
۳. شکل (۲-۳) ۱۲
۴. شکل (۲-۴) ۱۵
۵. شکل (۲-۵) ۲۴
۶. شکل (۳-۵) ۳۴
۷. شکل (۴-۱) ۴۰
۸. شکل (۴-۲) ۴۰
۹. شکل (۴-۳) ۴۴
۱۰. شکل (۴-۴) ۴۴
۱۱. شکل (۴-۵) ۴۵

فهرست جدول ها

۱. جدول (۳-۱) ۳۲
۲. جدول (۳-۲) ۳۳
۳. جدول (۳-۳) ۳۵
۴. جدول (۳-۴) ۳۶
۵. جدول (۳-۵) ۳۸
۶. جدول (۴-۱) ۴۶
۷. جدول (۴-۲) ۴۶
۸. جدول (۴-۳) ۴۷
۹. جدول (۴-۴) ۴۸
۱۰. جدول (۴-۵) ۴۸

فهرست نمودار ها

۱. نمودار (۴-۱) ۴۸
۲. نمودار (۴-۲) ۴۹
۳. نمودار (۴-۳) ۵۰

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

با وجود پیشرفت بشر در عرصه‌های مختلف علم و تکنولوژی، غذا نه تنها همچنان به عنوان نیاز اولیه بشر نقش خود را حفظ بلکه با افزایش آگاهی انسان از نقش مواد مغذی در سلامتی، اهمیت غذا روز به روز افزایش می‌یابد. افزایش رشد جمعیت، باعث تغییر و تنوع سیستم تولید و افزایش نیاز به فرآورده های حیوانی شده است. در این راستا حفظ تنوع ژنتیکی حیوانات امری لازم است. چرا که توفیق برنامه های اصلاح نژادی بستگی به تنوع ژنتیکی جمعیت ها دارد. مدل های استفاده شده در ژنتیک کمی عمدتا اثر تجمعی ژن هایی را که عهده دار ایجاد تنوع در صفات می باشند مورد توجه قرار می دهند و فرض اصلی در این مدل ها، تفکیک همزمان بسیاری از ژن های کوچک اثر می باشد. این موضوع مورد تردید است که همه ژنهای مؤثر بر صفات کمی اثرات جزئی داشته باشند و ممکن است برخی از این ژن ها سهم عمده ای در تنوع صفات به خود اختصاص دهند. متخصصین ژنتیک مولکولی قادر به تعیین ژنوتیپ موجودات با استفاده از تکنیک های مولکولی بوده و قادرند به طور مستقیم نشان دهند که چگونه تنوع فنوتیپی از تنوع ژنتیکی موجود در ژنوم موجود ناشی می شود. امروزه تکنیک های مولکولی و ژنتیک کمی به صورت مکمل یکدیگر استفاده می شوند. دو دیدگاه عمده برای تعیین ژنوتیپ وجود دارد که یکی استفاده از نشانگرهای غیر مستقیم می باشد که در این روش تعیین ژنوتیپ با استفاده از نشانگرهایی که روی قطعه کروموزومی خاصی قرار دارند صورت می گیرد و دیدگاه دیگر ژن های عمده[۱] است که در این روش با توجه به اطلاعات موجود، خود ژن کنترل کننده صفت که پروتئین خاصی را کد می کند مورد

۱. Candidat gene

بررسی قرار می گیرد که در واقع این ژن ها به عنوان مارکرهای مستقیم صفات بیولوژیکی و فیزیولوژیک به کار گرفته می شوند.

استفاده از نشانگرهای DNA در اصلاح دام به علت تاثیر نپذیرفتن آن از شرایط محیطی، زمینه مناسبی برای بررسی صفات مهم در دام ها و شناسایی سریع و دقیق ژن های کنترل کننده صفات تولیدی فراهم کرده است. امروزه با توجه به محدودیت منابع طبیعی و ملاحظات اقتصادی امکان افزایش افقی تولید که در حقیقت به معنی افزایش تعداد رأس دام است وجود ندارد و تنها راه افزایش تولید و پاسخگویی به نیازهای روز افزون بشر، افزایش عمودی تولید و به عبارتی افزایش تولید، به ازای هر رأس دام می‌باشد. برای افزایش عمودی باید در گامه نخست پتانسیل ژنتیکی دام‌ها و سپس شرایط محیطی را بهبود بخشید و در اینجاست که اهمیت اصلاح نژاد دام مشخص می‌شود (کاظمی، ۱۳۷۷).

حدود ۱۳۶ سال از زمان کشف قوانین توارث توسط گرگور مندل[۱] کشیش اتریشی می‌گذرد و در این مدت متخصصین ژنتیک توانسته‌اند با بهنژادی دام‌ها تحول عظیمی را در تولید محصولات دامی ایجاد کنند. متعاقباً در سال ۱۹۵۳ واتسون و کریک[۲] ساختمان مارپیچ دو رشته‌ای را برای DNA پیشنهاد کردند که اگر چه در آن زمان ارزش کار آنها معادل کار دانشمندانی که ساختمانهای مختلف پروتئین راکشف کرده بودند در نظر گرفته شد ولی به تدریج و با تحقیقات بعدی، ارزش این کشف مشخص شد و دانشمندان توانستند با مطالعه در این ساختمان نسبتاً ساده، سیستم های مختلف ژنتیکی را بررسی نموده و مکانیسم‌های مختلف همانندسازی و رو نویسی DNA و مکانیسم‌های عمل آن را دریافته و ترجمه آن به پروتئین‌ها و تمایز آنها در نقاط مختلف

۱ . Gregor Mendel
۲. Watson & Crick

بدن را روشن نمایند. البته دانشمندان به همین جا بسنده نکرده بلکه سعی کردند از این اطلاعات به اشکال مختلف استفاده نمایند. یکی از اهداف آنها این بود که DNA را از یک موجود گرفته و در موجود دیگر وارد کنند تا اثرات آن ژن در موجود ثانویه بروز نماید. این کار گرچه بیان ساده ای داشت ولی عملاً ساده نبود و هنوز هم چندان ساده نیست. از این علم نوین که به تدریج جای خود را بین علوم دیگر پیدا کرد با عناوینی چون زیست مولکولی، مهندسی ژنتیک و نهایتاً DNA نوترکیب نام برده و پیشرفت آن به توسعه علوم دیگر از قبیل پزشکی، پیراپزشکی، میکروبیولوژی، بیوتکنولوژی، کشاورزی و دامپروری کمک شایانی کرده و می کند (کاظمی، ۱۳۷۷).

در دامپروری و اصلاح نژاد، آن مطلبی که همیشه اهمیت داشته است و مورد بررسی قرار گرفته مساله انتخاب حیوانات و تصمیم‌گیری در مورد نگهداری یا حذف دام در کمترین زمان ممکن می-باشد. تعیین پلی مورفیسم ژن‌ها به کمک نشانگر مولکولی این امکان را فراهم نموده که جهش موجود در سطح ژنوم شناسایی شوند. جهش در حقیقت فرآیندی است که بدون توجه به تغییرات در ماده ژنتیکی، برای بیان تغییرات فنوتیپی در جانوران و گیاهان عمل می‌کند (کاظمی ۱۳۷۷). در دهه‌های اخیر شناخت جهش‌های موجود در سطح ژنوم و همچنین ساختمان و شیوه عمل ژن‌ها در علم ژنتیک مولکولی ممکن شده شناسایی چند شکلی های DNA به استراتژی انتخاب، تست والدین، تشخیص گونه‌ها و مطعالعات ژنتیک جمعیت کمک می‌کند و می‌تواند به عنوان معیار غیرمستقیم انتخاب نیز استفاده شود (Montaldo و همکاران، ۱۹۹۸). به طور معمول در برنامه های اصلاح نژادی، عمدتاً از روش‌های ژنتیک کمی و پارامترهای مربوط به فنوتیپ حیوان و یا خویشاوندان آن استفاده می‌شود اما چون فنوتیپ نتیجه برآیند عامل ژنتیکی و محیطی است لذا اگر انتخاب صرفاً بر اساس فنوتیپ صورت گیرد مقدار اشتباه آن زیاد و سودمندی انتخاب کاهش

می‌یابد. علاوه بر این، برنامه‌های اصلاح نژادی که در قالب ژنتیک کمی صورت می‌گیرد وقت زیادی را که حداقل آن یک نسل است می‌گیرد. امروزه، به کمک علم ژنتیک مولکولی بسیاری از این قبیل مشکلات حل شده است. همان گونه که می‌دانیم توارث و بروز صفات والدین در فرزندان نتیجه انتقال ماده ژنتیکی از والدین به نتاج است. این ماده بیوشیمیایی که در موجودات عالی عمدتاً در کروموزوم‌ها قرار گرفته از طریق فرآیند میوز، تشکیل گامت و باروری گامت‌های نر و ماده به نتاج منتقل می‌شود. به کمک علم ژنتیک مولکولی ژنوم تعداد زیادی از حیوانات شناسایی و یا لااقل جایگاه ژن‌های مهم مؤثر در بروز صفات تولیدی و مکانیسم عمل آنها شناخته شده و امروزه می‌توان با کمک نشانگرها و روش‌های مولکولی که در این تحقیق نیز مورد استفاده واقع شده به ژنوتیپ و همچنین پلی مورفیسم ژن عامل پی برد. (شهریاری، ۱۳۸۳).

ژن لپتین را می توان یک QTL تصور کرد که صفات تولیدی متعددی مثل صفات پرواری و صفات تولید مثلی، را تحت تاثیر قرار می دهد. ژن لپتین در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است و مطالعات اولیه آن در ارتباط با صفات رشد و پروار بوده است.. مناسب ترین مدل های ژنتیکی که اساس ارزیابی های مولکولی ژن لپتین قرار می گیرد به دلیل وجود نقش گیرنده لپتین می باشد که فعالیت و سطح لپتین را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه اتصال لپتین به گیرنده آن جزء مهمی از فعالیت بیولوژیک لپتین را تشکیل می دهند.

مطالعه حاضر به منظور شناسایی چندشکلی های آللی در جایگاه ژنی لپتین و گیرنده لپتین و ارتباط آن با صفات تولیدی انجام گرفت تا هر چه بهتر بتوان ژن های با اثرات عمده که می توانند برای اهداف اصلاح نژادی مورد استفاده قرار گیرد، مورد ارزیابی قرار داد.

فصل دوم

بررسی منابع