بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله رب العالمين الرحمن الرحيم مالك يوم الدين
اهدنا الصراط المستقيم
صراط الذين أنعمت عليهم غير المغضوب عليهم
ولا الضالين

دانشکده کشاورزی
گروه علوم علوم دامی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc)
در رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام

ارتباط چند شکلی ژن *CTS K* با صفات لاشه در بره های آمیخته افشاری×برولامرینو

تحقیق و نگارش

لیلا محمدی

استاد راهنما

دکتر طاهر هرکی نژاد

زمستان ۱۳۹۱

تقدیم به پدر مهربانم

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

و تقدیم به

تمام آموزگارانم از او که الفبایم آموخت تا آنان که دریچه ای از علم را به رویم گشودند.

تقدیر و تشکر

چشم بر هم زدنیست انگار آمدن... زیستن... رفتن.

خدای مهربانم را شکر که فرصت بودن و تجربه ی زیستن در کنار آدم هایی را به من ارزانی داشت که همیشه در خاطرم خواهند ماند... انسان هایی جاودانه و ماندگار.

آدم هایی که دغدغه شان انسان بودن است.

فرصتی دست داد تا هر چند کوتاه ولی صمیمانه، از کسانی سپاسگزاری کنم که شایسته ی تقدیرند.

دیروز، امروز و فردایم را مدیون وجود پر مهر و حمایت های همیشگی پدر و مادر فداکارم، بهانه های زندگی ام هستم، کسانی که همیشه دوستشان دارم و خواهم داشت و همچنین خواهران و برادران عزیزم که امیدهای زندگی من اند...

در مسیر زندگی ام کسانی بوده اند که نقشی پر رنگ تر از دیگران در صفحه ی ذهنم به یادگار گذاشته اند... انسان هایی که وجودشان موهبتی است برای من... و همیشه از تجربه و رفتار و فکرشان الهام گرفته ام... چرا که یقیناً رفتار و تفکر یک انسان بیش از هر چیز دیگری برایم اهمیت دارد... در راه پر فراز و نشیب این دو سال استادانی داشتم که رفتار، گفتار، افکار و علمشان سرلوحه ی کار من بود...

بر خود لازم می دانم از پدر بزرگوارم و همچنین از استاد گرامیم **جناب آقای دکتر طاهر حرکی نژاد** که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی خودشان، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ خاضعانه سپاسگزارم.

با سپاس از همکاری صمیمانه مسئول محترم آزمایشگاه سرکار خانم سیامکی از دوستان نازنینم خانم ها: فاطمه سهرابی، نجیبه شهباز نژاد، ژاله امیری، آذر راشدی، مریم زمانی، سمانه الهیاری، صدیقه بهرامی، مهدیه بنخی، خدیجه نوری، مرضیه محرم خانی، مینا موسوی و جناب آقای مهندس فاطمی به خاطر تمام محبت هایشان در طول اجرای این پژوهش نهایت تشکر را دارم و سعادت و توفیق روز افزون این عزیزان را نیز از خداوند خواستارم

چکیده:

گوسفندان نژاد افشاری چربی اعماء، احشا و دنبه درصد مهمی از وزن دام زنده و نیز لاشه را به خود اختصاص می دهد. از جمله ژنهای مهم مرتبط با صفات چربی می توان به ژنCTS K (Cathepsin K) اشاره نمود که عضو خانواده پروتئاز سیستئین لیزوزوم است. این ژن در چند دهه اخیر به عنوان نشانگر چاقی در انسان و خوک شناخته شده است. در تحقیق حاضر چند شکلی ژنCTS K درگوسفندان آمیخته افشاری × برولامرینو مورد بررسی قرار گرفت. هدف مطالعه حاضر بررسی رابطه ناحیه اگزون ٦ این ژن با صفات چربی لاشه بود. بدین منظور ۹۷ رأس بره نرآمیخته افشاری × برولامرینو با سن تقریباً یکسان گله تحقیقاتی- آموزشی دانشگاه زنجان مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه‌گیری‌های سونوگرافی برای ضخامت چربی، ضخامت و سطح مقطع عضله راسته بر روی دام زنده در ناحیه پشت بین دنده ۱۲ و ۱۳ انجام گردید و اندازه های واقعی بر روی لاشه پس از کشتار ارزیابی گردید. لاشه‌ها پس از طی ٢٤ ساعت نگهداری در سرد خانه به دو نیمه راست و چپ تقسیم گردیدند. نیمه لاشه راست به قطعات گردن، ران، سردست، قلوه گاه، راسته، دنبه وضایعات(چربی های اضافی) تفکیک و اندازه گیری شد. از تمام دام ها نمونه خون جهت استخراج DNA و اندازه گیری فراسنجه های خون مانند کلسترول، HDL، LDL، VLDL و تری گلیسیرید گرفته شد. پرایمر های لازم برای ناحیه مورد نظر به طول bp٤۹۸ طراحی گردید. جهت بررسی چند شکلی ابتدا نواحی مورد نظر توسط PCR تکثیر و سپس محصولات به دست آمده پس از واسررشته سازی با استفاده از تکنیک SSCP و بار گذاری روی ژل اکریل آمید ۹ درصد و تکنیک توالی یابی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با بررسی نمونه ها بر روی ژل اکریل آمید، تمامی نمونه ها در دو گروه ژنوتیپی GA و GG به ترتیب با فراوانی ٢٦ و ۷۳ درصد قرار گرفتند. نتایج حاصل از SSCP و تعیین توالی حاکی از وجود چند شکلی تک نوکلئوتیدی در باز ۱۵۰ از قطعه تکثیر شده بود. بررسی ارتباط چند شکلی مشاهده شده با صفات لاشه و نیز فاکتور های خونی نشان داد که چند شکلی در این ناحیه در صفات لاشه با درصد وزن دنبه، در پارامترهای خونی با کلسترول و VLDL در ارتباط است. نتایج این پژوهش نشان می دهد که این ژن می تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی برای بهبود کیفیت لاشه مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: پلی مورفیسم، ژن CTSK، چربی لاشه گوسفند افشاری

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول:مقدمه

۱-۱- مقدمه.....۲

۱-۲- ژن‌ها و متابولیسم چربی.....۳

۱-۳- اهداف تحقیق.....٦

فصل دوم:بررسی منابع علمی

۲-۱-کلیات.....۸

۲-۲- لیپیدها ۹

۲-۳- منشأ چربی.....۹

۲-٤- بیوسنتز اسید چرب.....۹

۲-۵- سنتزتری گلیسیریدها و اکسیداسیون چربی ۱۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-٦- لیپولیز اسیدهای چرب..... ۱۱

-۷- نقش هورمون ها در لیپولیز..... ۱۲

۲-۸- بافت آدیپوز..... ۱۳

۲-۹- آناتومی بافت آدیپوز..... ۱٤

۲-۱۰- بافت ذخیره کننده چربی..... ۱٤

۲-۱۰-۱- محل‌های ذخیره چربی در بدن..... ۱۵

۲-۱۱- آدیپوژنز..... ۱۵

۲-۱۱-۱- تنظیم خارج سلولی آدیپوژنزیز..... ۱٦

۲-۱۲- منشأ کاتپسین‌ها ۱۷

۲-۱۲-۱- خصوصیات و جایگاه ژن CTS K..... ۱۷

۲-۱۲-۲- ساختار پروتئین CTS K..... ۲۰

۲-۱۳- تنظیم فعالیت CTS K..... ۲۱

۲-۱۳-۱- PH ۲۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۱۳-۲- فعالیت زیموژنی.....۲۲

۲-۱٤- تنظیم بیان ژن CTS K.....۲۳

-۱۵- ارتباط ژن CTSK در بافت چربی.....۲٤

۲-۱٦- پلی مورفیسم ژن CTS K و رابطه آن با صفات لاشه.....۲٦

۲-۱۷- نشانگرهای مولکولی.....۲۸

۲-۱۸- تفاوت تک نوکلئوتیدی(SNP).....۲۹

۲-۱۹- تفاوت فرم فضایی تک رشته(SSCP).....۲۹

فصل سوم:مواد و روش‌ها

۳-۱- تغذیه گوسفندان.....۳٦

۳-۲- مدیریت پرورش.....۳۷

۳-۳ - رکوردهای ثبت شده.....۳۷

۳-٤- تهیه رکوردهای سونوگرافی.....۳۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۵- تهیه نمونه خون و پلاسما..... ۳۹

۳-٦- اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید و کلسترول..... ٤۰

۳-۷- مراحل شناسایی پلی‌مورفیسم ژن..... ٤۰

۳-۷-۱- استخراج DNA..... ٤۱

۳-۷-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی..... ٤۳

۳-۷-۳- ژل آگارز..... ٤۳

۳-۷-٤- طرز تهیه محلول TBE 10X..... ٤٤

۳-۸- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ٤٤

۳-۸-۱- مواد لازم برای انجام واکنش PCR ٤٤

۳-۸-۲- طراحی پرایمرها..... ٤۵

۳-۸-۳- حجم مواد استفاده شده برای PCR..... ٤۵

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۸-٤- چرخه‌های حرارتی PCR.....٤٦

۳-۹- روش SSCP.....٤٦

۳-۹-۱- ژل پلی‌اکریل‌آمید ٤٦

۳-۹-۲- طرز تهیه محلول اکریل‌آمید ٤۰٪.....٤۷

۳-۹-۳- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine).....٤۷

۳-۹-٤- طرز تهیه ۳۰ میلی‌لیتر ژل اکریل‌آمید۹٪.....٤۷

۳-۹-۵- طرز تهیه ۲۰ میلی لیتر بافر بارگیری.....٤۸

۳-۱۰- نشانگر DNA.....٤۸

۳-۱۱- ریختن ژل ونصب الکتروفورز.....٤۸

۳-۱۲- رنگ‌آمیزی.....٤۹

۳-۱۳- مراحل تعیین توالی.....۵۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱٤- استخراج باند اختصاصی از ژل آگارز.....۵۱

۳-۱۵- آنالیز داده‌های مولکولی.....۵۲

۳-۱٦- روش‌های آماری مورد استفاده در تجزیه و تحلیل داده‌ها.....۵۲

فصل چهارم:بحث و نتایج

٤-۱- نتایج بررسی صفات مختلف بر بره‌های افشاری× برولامرینو.....۵۵

-۱-۱- صفات بیومتری بره ها ی افشاری × برولامرینو.....۵۵

٤-۱-۲- نتایج مربوط به سونوگرافی.....۵٦

٤-۲- نتایج مربوط به صفات لاشه.....۵۷

٤-۲-۱- اندازه گیری انجام شده در کشتارگاه.....۵۷

٤-۲-۲- تفکیک لاشه.....۵۷

٤-۳- نتایج آزمایشات سرولوژی بره های آمیخته ها.....۵۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-٤- نتایج حاصل از PCR اگزون٦(به همراه بخشی از اینترون ٥).....٥٩

٤-٥- بررسی چندشکلی مربوط به نواحی اگزون ٦(و بخشی از اینترون ٥) بر اساس روش SSCP.....٦٠

٤-٦- تعیین توالی فرآورده PCR.....٦٠

٤-٧- مقایسه نتایج تعیین توالی با روش SSCP.....٦١

٤-٨- خواندن آلل‌ها ٦٣

٤-٩- اثر ژنوتیپ های CTS K بر صفات مختلف بره های آمیخته.....٦٤

٤ -٩-١- وزن تولد و وزن زنده.....٦٤

-٩-٢- صفات بیومتری بره‌های آمیخته.....٦٥

٤-٩-٣- پارامترهای خونی بره‌های آمیخته.....٦٧

٤-٩-٤- نتایج سونوگرافی بره‌های آمیخته.....٦٨

٤-١٠- اثر ژنوتیپ‌های CTS K بر صفات مختلف لاشه.....٧٢

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

٤-١٠-١- اندازه گیری‌های انجام شده در کشتار گاه.....٧٢

٤-١٠-٢- نتایج تفکیک لاشه ٧٣

٤-١١- آنالیز صفات اندازه گیری شده با رویه Mixe Model ٧٧

٤-١٢- مقایسه توالی CTS K حاصل از این پژوهش با توالی NCBI.....٧٩

٤-١٣- نتایج توالی یابی.....٨٠

٤-١٤- نتیجه گیری کلی.....٨١

٤-١٥- پیشنهادات.....٨٢

جدول ٣-١- نحوه اندازه‌گیری صفات بیومتری بر روی دام زنده.....٣٨

جدول ٣-٢- پرایمرهای طراحی‌شده ژن CTS K.....٤٥

جدول٤-١- آماره‌های بدست آمده از صفات بیومتری بره‌های افشاری×برولامرینو.....٥٥

جدول٤-٢- آماره بدست آمده از سونوگرافی بره‌های آمیخته.....٥٧

جدول٤-٣- آماره‌های مربوط به اندازه گیری‌های کشتارگاه.....٥٧

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

جدول٤-٤- آماره‌های به دست آمده از صفات لاشه بره‌های آمیخته.....٥٨

جدول٤-٥- آماره‌های به دست آمده از آزمایشات سرولوژی بره‌های آمیخته‌ها.....٥٨

جدول٤-٦- فراوانی ژنوتیپی و آللی در بره‌های آمیخته.....٦٣

جدول ٤-٧- فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار در بره‌های آمیخته.....٦٣

جدول ٤-٨- تجزیه واریانس صفات وزن تولد و وزن زنده در بره‌های آمیخته.....٦٥

جدول ٤-٩- تجزیه واریانس صفات بیومتری.....٦٦

جدول٤-١٠- تجزیه واریانس پارامترهای خونی.....٦٧

جدول٤-١١- تجزیه واریانس صفات مربوط به سونوگرافی در بره‌های آمیخته ٧٠

جدول٤-١٢- میانگین و S.E صفات قبل از کشتار بره‌های آمیخته به تفکیک گروه ژنوتیپی.....٧١

جدول ٤-١٣- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده در کشتار گاه برای بره‌های آمیخته.....٧٢

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

جدول ٤-١٤- نتایج تجزیه واریانس تفکیک لاشه ٧٤

جدول ٤-١٥- میانگین و S.E صفات بعد از کشتار به تفکیک گروه ژنوتیپی.....٧٦

جدول٤-١٦- میانگین و S.E صفات قبل از کشتار بره‌های آمیخته به تفکیک گروه‌های ژنوتیپی به رویه Mixe Model.....٧٧

جدول ٤-١٧- میانگین و S.E صفات بعد از کشتار به تفکیک گروه ژنوتیپی رویه Mixe Model.....٧٧

جدول ٤-١٨- تطابق قطعه‌ی توالی یابی شده.....٧٧

شکل ٢-١- ساختار ثانویه کاتپسین.....٢١

شکل ٢-٢- سطح الکتروستاتیک کاتپسین‌های K و L ٢٣

شکل ٢-٣- تنظیم بیان ژن CTS K استخوان ٢٤

شکل٣-١- اندازه‌گیری ضخامت چربی و عضله بین دنده ١٢ و ١٣ بر روی لاشه.....٣٩

شکل٣-٢- اندازه‌گیری ضخامت چربی و عضله بین دنده ١٢ و ١٣ توسط دستگاه

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

سونوگرافی.....۳۹

شکل۳-۳- تعیین کیفیت DNA استخراجی از الکتروفورز با ژل آگارز ۲٪.....۴۳

شکل٤-۱- باندهای مربوط به تکثیر ژن CTS K با اتفاده از پرایمر CTS K.....۵۹

شکل ٤-۲- نتایج حاصل از انجام SSCP با استفاده از روی فر آورده‌های PCR.....٦۱

شکل ٤-۳ - مشاهده باند اختصاصی با وضوح بالا و بدون باند اضافه بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد.....٦۱

شکل٤-٤- نتیجه تعیین توالی اگزون ٦ و بخشی از اینترون۵ ژنCTS K ٦۱

شکل ٤-۵-گراف‌های حاصل از تعیین توالی.....٦۲

شکل٤-٦- میانگین صفات بیومتری ژنوتیپ‌های مختلف.....٦۹

شکل ٤-۷- میانگین پارامترهای خونی ژنوتیپ‌های مختلف.....۷۰

شکل ٤-۸- میانگین ULMD، ULMA و UBF ژنوتیپ‌های مختلف.....۷۰

شکل ٤-۹- میانگین صفات تفکیک لاشه ژنوتیپ‌های مختلف.....۷۵

شکل٤-۱۰- تطابق قطعه حاصل از توالی یابی با قطعه مشابه در گاو، خوک، انسان ۷۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

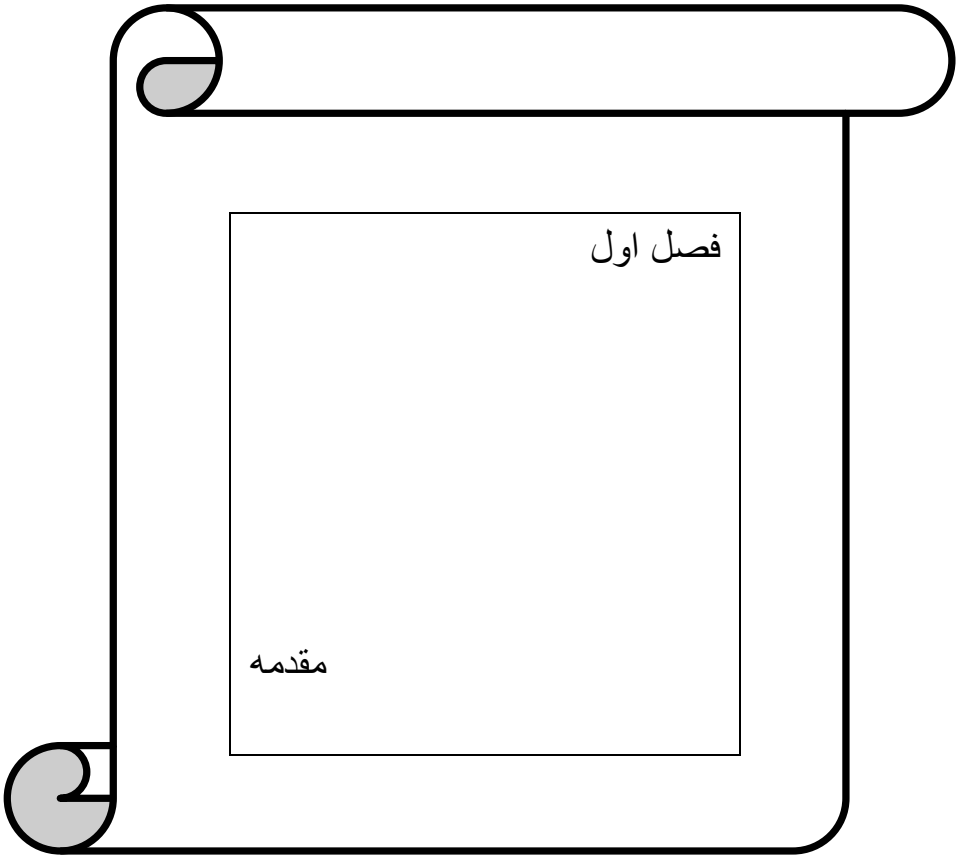
شکل ٤-١١- گراف‌های حاصل از تعیین توالی گوسفندان افشاری..... ٨٠

٣-١- معادله محاسبه VLDL..... ٤٠

٣-٢-معادله محاسبهLDL..... ٤٠

٣-٣-مدل آماری برای پارامترهای خونی..... ٥٣

٣-٤- مدل آماری برای سایر صفات..... ٥٣


فصل اول
مقدمه

۱-۱- ۱ مقدمه

کشور ایران مهد اولیه پرورش گوسفند در جهان بوده و به لحاظ جمعیت بالای گوسفند و تنوع نژادی (۲۷نژاد مختلف) بخش وسیعی از ذخایر ژنتیکی گوسفندان جهان را دارا می باشد(توکلیان، ۱۳۸۷)، به طوری که ۳۳ درصد از سهم کل گوشت مصرفی کشور را گوشت گوسفند تشکیل می دهد (سفلایی شهر و همکاران، ۱۳۸۵). تاکنون ۸۵۰ نژاد گوسفند در بانک اطلاعات جهانی ذخایر ژنتیک دام به ثبت رسیده است که از این میان اطلاعات مربوط به اندازه جمعیت ٦٥٦ نژاد در دسترس می باشد و با استفاده از این اطلاعات، ۱۱۹ نژاد گوسفند در معرض خطر انقراض می باشند(مولائی و همکاران، ۱۳۸۹).

ایران از نظر تولید گوشت گوسفند مقام پنجم تولید در جهان را با ۳۳۲/٦ هزار تن یا٤/۲ درصد دارا می باشد، گوشت گوسفند در ایران هنوز یکی از مهمترین منابع تأمین کننده گوشت قرمز است، اما تا کنون تولید آن نتوانسته نیاز مصرف کنندگان داخلی را تأمین کند. به طوری که گوسفندان کشور ۵/۱ درصد تعداد گوسفند دنیا بوده، ولی مقدار تولید گوشت گوسفند در کشور ٤/۲ درصد مقدار تولید جهانی آن است که علت آن پایین بودن وزن کشتار است. نظر به رشد روز افزون تقاضا و تمایل مصرف کنندگان به گوشت گوسفندی با کیفیت برتر، پژوهش‌های بنیادی در زمینه‌هایی نظیر چگونگی افزایش کمیت و کیفیت منابع پروتئینی حیوانی مورد نیاز است(کرمی و همکاران، ۱۳۸۵). استان زنجان با داشتن گوسفند نژاد افشاری که نژادی سنگین وزن است از پتانسیل مناسبی برای تولید گوشت برخوردار است و نقش مهمی را درتأمین گوشت قرمز منطقه می‌تواند ایفا کند. این نژاد یکی از منابع مهم ژنتیکی کشور بوده و از نظر سرعت رشد و دوره پروار یکی از بهترین گوسفندان به شمار می رود و این گوسفندان به زیستن در شرایط آب وهوایی سردسیری استان زنجان سازگار

هستند.با این وجود نژاد مورد بحث علیرغم همه‌ی محاسن خود همانند اغلب نژادهای سنگین وزن ایران دارای دنبه‌ای نسبتاً بزرگ بوده، که با کاهش تقاضای مصرف کنندگان روبرو شده و همچنین دنبه‌ی بزرگ ضریب تبدیل مواد غذایی در لاشه را پایین آورده که باعث کاهش درآمد و صرفه اقتصادی می‌شود. به طوری که در منطقه تمایل به خرید گوسفندان نژادهای دیگر به علت کوچکی دنبه رو به افزایش گذاشته است. بنابراین لازم است برای کاهش وزن دنبه در این گوسفندان اقدامات اصلاح نژادی انجام گیرد(حبیبی و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۲- ژن‌ها و متابولیسم چربی

در گوسفند چربی به دو صورت ذخیره می‌شود، یکی اینکه در داخل عضله قرار گرفته وموجب تردی و طعم خوب گوشت می‌شود دیگر اینکه در دنبه، اعما و احشا ذخیره می‌شود. سال های اخیر ژن‌های کاندید بسیاری از جمله لپتین و آسیل کوآ دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز۱ (DGAT1)[1] به عنوان کاندید برای کنترل چربی در حیوانات مزرعه ای مورد بررسی قرار گرفته اند(Van Harmelen et al., 2000; Chiellini et al., 2003). یکی ازکاندیدهای جدید چربی در بافت‌های آدیپوز، رشد توده چربی و تمایز بافت‌های چرب در موش، انسان و خوک ژن CTS K است.

ژن CTS K عضوی از خانواده پروتئاز سیستئین لیزوزوم است که در نیمه اول قرن بیستم به عنوان کاتپسین شناسایی شدند(Turk et al., 2001)، که ابتدا به فرم پروآنزیم غیر فعال با وزن ۳۷ کیلو دالتون در شبکه آندوپلاسمی زبر سنتز شده و از طریق گیرنده مانوز-٦- فسفات به محفظه لیزوزوم

[1] - Diacylglycerol Acyltransferase1