التشكل الوراثي للجين المسؤول عن بروتين الهيموكلوبين في دم الماعز المحلي الاسود وعلاقته بقابلية التأقلم

صلاح حسن فرج
كلية العلوم - جامعة ميسان
Salah81ss.sh@gmail.com

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة بأخذ 55 عينة دم من الماعز المحلي الاسود في محافظة ميسان ودرست ظاهرة التشكل الوراثي لجين بروتين الهيموكلوبين باستخدام تقنية Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) بوجود مادة اكريلامايد. استخدم جهاز Hemetology analyser المصنع من قبل شركة Horiba الفرنسية وبواسطة عدة تحليل خاصة لتقدير معايير الدم. اوضحت النتائج وجود تشكل وراثي للجين المسؤول عن الهيموكلوبين, اذ كشف عن ثلاثة تراكيب وراثية AA, AB, BB مسؤول عنهما اليلان A وB اذ يزداد تكرار الاليل A على B (0.92 و 0.08) على التوالي. كذلك وضحت النتائج تأقلماً عالياً للتركيب الوراثي النقي للاليل A اذ بلغ 0.89 بينما كان التركيب الوراثي النقي للاليل B الاقل تأقلماً 0.50.

الكلمات المفتاحية: التشكل الوراثي , الهيموكلوبين , الماعز المحلي الاسود , الترحيل الكهربائي.

Abstract

This study was performed on 55 blood samples of Black local goats at Missan. Study of genetic polymorphism for hemoglobin by using vertical polyacrylamide gel electrophoresis. Hemetology analyser was used to measure blood parameters. The results showed the existence of genetics polymorphism for hemoglobin, was discovered to three genotypes AA,AB, BB responsible for it two alleles A and B, superiority allele A to allele B (0.93 and 0.08) respectively. So the results showed high adaptation of AA genotypes value 0.89 while BB genotypes was low adaptation value 0.50.

Key words: Genetics polymorphism, hemoglobin, Black local goats, electrophoresis.

المقدمـة

يعد الماعز من أوائل الحيوانات الزراعية التي دُجنت من قبل الإنسان ,إذ له القدرة على التأقلم في البيئات المناخية المختلفة وعلى التأقلم تحت نظم الإنتاج المتباينة (Gall, 1981).

توجد اختلافات في جميع حيوانات المزرعة والتي تؤدي الى تقلب في قدرتها الانتاجية وأداء الحيوان داخل وبين السلالات ويمكن تمييز هذا التباين ليكون اساس في تربية وتحسين حيوانات المزرعة, ودراسة تعدد الاشكال الوراثية لبروتينات الدم هي واحده من هذه الطرق التي ترسم الاختلافات الوراثية لدى الحيوانات (Egena and Alao, 2014). يعد الدم ومكوناته من الصفات الحيوية الضرورية التي تساعد في دراسة المحتوى الوراثي للسلالات. ان دراسة معايير الدم تساعد على التشخيص المرضي كما انها تعكس التطور الوراثي الخاص بالسلالة او العشيرة لعلاقة بعض عوامل الدم بكفاءة او قدرة السلالات للعيش ضمن ظروف بيئية معينة (Pieragostini *et al.* 1994 و Ajuwape *et al.* 2000 و Olayemi *et al.* 2007). ويمكن استخدام العناصر الكيموحيوية (البروتينات والانزيمات) على نطاق واسع كواسمات للجينات, وهذه الواسمات لا تتأثر او تعتمد على العوامل البيئية مما يجعلها مناسبة للدراسات الوراثية (Lee *et al.*, 1995). والهيموكلوبين واحد من هذه البروتينات, اذ يعد من معايير الدم ذات الأهمية من الناحية البيولوجية أما تشكلاته

فتكون واضحة في مختلف الأنواع الحيوانية فهو مصدر مهم للتشكل الوراثي في العشائر ولدراسة التطور الوراثي , ونتيجة العلاقة الكبيرة بين تركيبه وبين وظيفته يبقى الهيموكلوبين البروتين المهم لاسيما من ناحية الوراثة الجزيئية والوراثة بصورة عامة ومعايير التأقلم (Bettati *et al.*, 2009) ويتركب من اربع سلاسل من الكلوبين (اثنان لكل من الفا وبيتا) التي ترتبط مع مجموعة الحديد(Bunn, 1971). والتشكل الوراثي للهيموكلوبين يعود اساساً الى تغير في سلسلة (β) وهو ما تنطبق عليه طريقة مندل في التوارث والذي يعطي ثلاثة تراكيب وراثية BB ,AB, AA. تقع β-globin على الكروموسوم 15 في المجترات بينما تقع α–globin على الكروموسوم 25 (Schibler *et al.*, 1998). ونظرا للعلاقة بين التركيب والوظيفة لايزال هذا البروتين المعقد موضوعاً رائعاً من جميع وجهات النظر ولاسيما الجزيئية والوراثية والتأقلم (Alphonsus *et al.*, 2012). واذا كان الهيموكلوبين لديه اي ارتباط بقابلية التأقلم, فلا ينبغي ان يكون مختلفاً في السلالات والانواع التي تعيش في المنطقة الجغرافية نفسها لاسيما ان الهيموكلوبين من الناحية الفسيولوجية والوظيفية هو نفسهُ في جميع الحيوانات (Tibbo *et al.*, 2005 ; Essien *et al.*, 2011).

المواد وطرائق العمل

الحيوانات المستخدمة

تم الحصول على 55 عينه دم من الماعز المحلي الاسود, اذ سحبت نماذج الدم من الوريد الوداجي (Jugular vein) للحيوانات وبواقع عينتين من كل حيوان وبمقدار 5 مل لكل عينة استعملت محقنة سعة 10مل لكل حيوان بعد أن نظفت منطقة السحب وعقمت بالكحول الاثيلي 70% , وفرغت العينة الأولى في أنبوبة اختبار تحتوي على مانع التخثر(الهيبارين) وذلك للقيام بقياس الصفات الدمية. ووضعت عينة الدم الثانية في أنبوبة اختبار خالية من مانع التخثر (الهيبارين) معده لهذا الغرض وذلك للسماح للدم بالتخثر وتسهيل عملية فصل مصل الدم بعد ترك الأنابيب بصورة مائلة لمدة 24 ساعة في الثلاجة ثم أجراء عملية الفصل باستعمال جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم فرغت كريات الدم الحمر المترسبة (Erythrocytes) في أنابيب بلاستيكية ثم حفظت في المجمدة لحين استعمالها في اختبار الترحيل الكهربائي للهيموكلوبين.

قياس معايير الدم

قدرت معايير الدم باعتماد جهاز Hemetology analyser المصنع من قبل شركة Horiba الفرنسية وبواسطة عدة تحليل خاصة (kit).

دليل نسبة الخلايا العدلة / اللمفاوية

حسبت نسبة الخلايا العدلة / اللمفاوية لكل حيوان واعتمد الحد الادنى لمجال الثقة (99%) كحد فاصل بين الحيوانات المتأقلمة والحساسة وان قيمة الحد الفاصل هي1.37 حيث كانت مجموعة الحيوانات المتأقلمة أقل منها والحساسة اعلى منها, والنسبة الكلية تراوحت بين 1.29 و 1.5 حيث تراوحت قيم الحيوانات المقاومة بين 1.29 و 1.34 وقيم الحيوانات الحساسة بين 1.38 و 1.5 , كما استخدم المجال الاجمالي مقسوماً على الانحراف القياسي في تحديد عدد المواقع الوراثية وفق ما وصفة Al- Murrani وجماعته (2000).

الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الكهربائي الاكريلامايد (PAGE)

أجري الترحيل الكهربائي باستخدام طريقة PAGE كما أوردها Erhardt (1986) مع إجراء بعض التحويرات عليها وباستخدام جهاز الترحيل العمودي Vertical Electrophoresis المجهز من قبل شركة Scie. - Plas البريطانية.

اولآ / تم تحضير أربع محاليل وكما يأتي

تحضير محلول (1) : ذوب 48 غم اكريلامايد و1.2 غم بز اكريلامايد تدريجيا في 100مل من الماء المقطر وخزن في عبوة معتمة في الثلاجة 4 م°.

تحضير محلول (2) : ذوب 2 غم من Citric acid و 9 غم من Tris القاعدي و 260 مايكروليتر من TEMED تدريجيا في 100مل ماء مقطر وخزن في عبوة معتمة في الثلاجة 4°م.

تحضير محلول (3) : ذوب 50 ملغم من APS في 30 مل من الماء المقطر وخزن في عبوة معتمة في الثلاجة 4°م.

تحضير محلول (4) المحلول المنظم: خلط 9 غم من Tris القاعدي و 4 غم من حامض البوريك وأكمل الحجم الى 2500 مل بالماء المقطر.

ثانيا : تحضير محاليل هلام الفصل و هلام التركيز وكما يأتي

تحضير هلام الفصل: أخذ 3.5 مل من محلول رقم (1) و 2.75 مل من كل من محلول رقم (2) و محلول رقم (3) و 2 مل من الماء المقطر اعلاه. ويجب التسلسل في إضافة المحاليل، والتأني في السكب لضمان عدم تكون الفقاعات الهوائية، حيث تتم البلمرة الكاملة لهلام الانفصال بعد مرور 30 – 40 دقيقة بعد السكب ، ومن ثم الاستعداد للهلامة الثانية.

تحضير هلام التركيز: خلط 0.75 مل من كل من محلول رقم (1) و محلول رقم (2) و 4.5 مل من محلول رقم (3). ويجب سكب الخليط بسرعة ووضع المشط الخاص بوضع النماذج أعلى الهلام, وعند التأكد من البلمرة الكاملة لهلام التركيز بعد مرور 20–40 دقيقة رفع المشط وسحبت كمية السوائل الموجودة في الحفر بواسطة محقنة صغيرة.

تحضير محلول الصبغة:

تتكون من 0.04 % من صبغة Coomassie brilliant blue التي تحل في 3.5% من Perchloric acid.

تحضير عينات الهيموكلوبين للترحيل الكهربائي:

1. أخذ 0.5 مل من كريات الدم الحمر (Erythrocytes) و 0.4 مل من كحول الايثانول (40%) و0.2 مل من الكلوروفورم (Chloroform) وخلطت بصوره جيدة ثم وضعت في التبريد لمدة 30 دقيقة وعلى درجة 4°م وبعد انتهاء المده وضع الخليط في جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 دوره/دقيقة ولمدة 15 دقيقة. أخذ الجزء العلوي الذي يدل على الهيموكلوبين ووضع في أنبوبة اختبار لاستعماله في الترحيل الكهربائي (Tucker *et al.*, 1980).
2. أخذ 6 مايكروليتر من الهيموكلوبين وأضيف له 15 مايكروليتر من صبغة البروموفينول الزرقاء كدليل وخلطت بصورة جيدة .

3. وضع في كل حفره 4 مايكروليتر من الخليط أعلاه .
4. أضيف إلى الحفر المحلول المنظم ببطئ شديد ثم وضع الحوض العلوي وملئ بالمحلول المنظم وكذلك الحوض السفلي.
5. وضعت الأقطاب في المكان المخصص لها في الحوض وكذلك في مجهز القدرة حسب طريقة العمل المعتمدة ووصلت بالتيار الكهربائي.
6. ثبتت قوة التيار عند 60 فولت لمدة 30 دقيقة ثم رفعت قوته إلى 200 فولت لغاية وصول الشاهد (الدليل) إلى نهاية الهلام بعد مرور 3 ساعات عندها غلقت الدائرة الكهربائية و فتح الحوض لغرض الوصول إلى الهلام.

تصبيغ الهلام

بعد رفع الجزء الداخلي الحاوي على الهلام فتحت القطع الزجاجية بحذر شديد ونزع الهلام ووضعه في حوض زجاجي يحتوي على صبغة Coomassie brilliant blue لمدة ساعة واحده.

إزالة الصبغة

أزيلت الصبغة من الهلام بغمره بمحلول مزيل الصبغة المكون من 7 % من حامض الخليك وغسل عدة مرات بمحلول مزيل الصبغة لحين ظهور الحزم، وترك إلى اليوم الثاني لغرض الفحص.

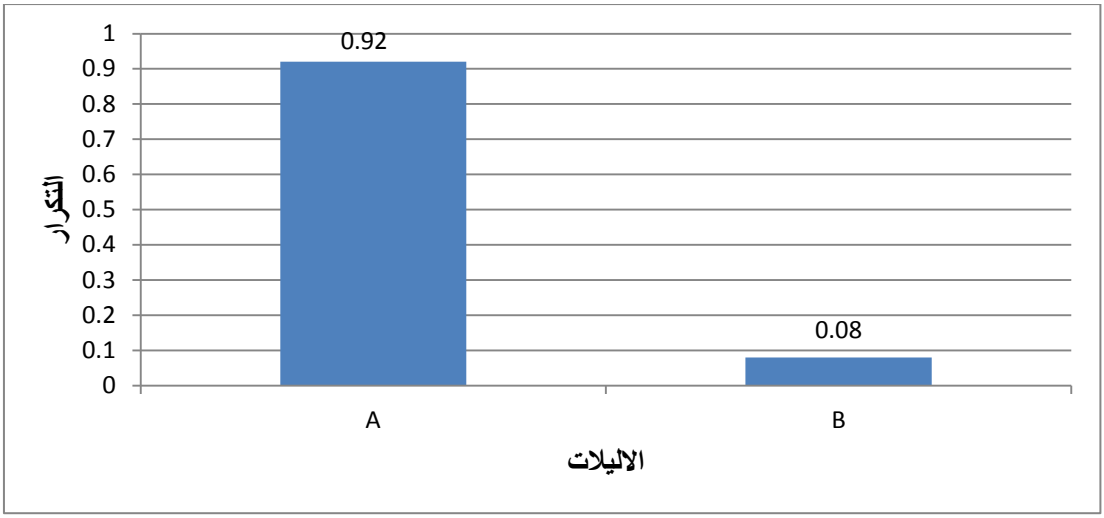
التحليل الإحصائي

استخدم البرنامج الإحصائي الخاص بوراثة العشائر Popgene (Yeh *et al.*, 1999) لتقدير تكرار الجينات والتراكيب الوراثية لبروتين الهيموكلوبين.

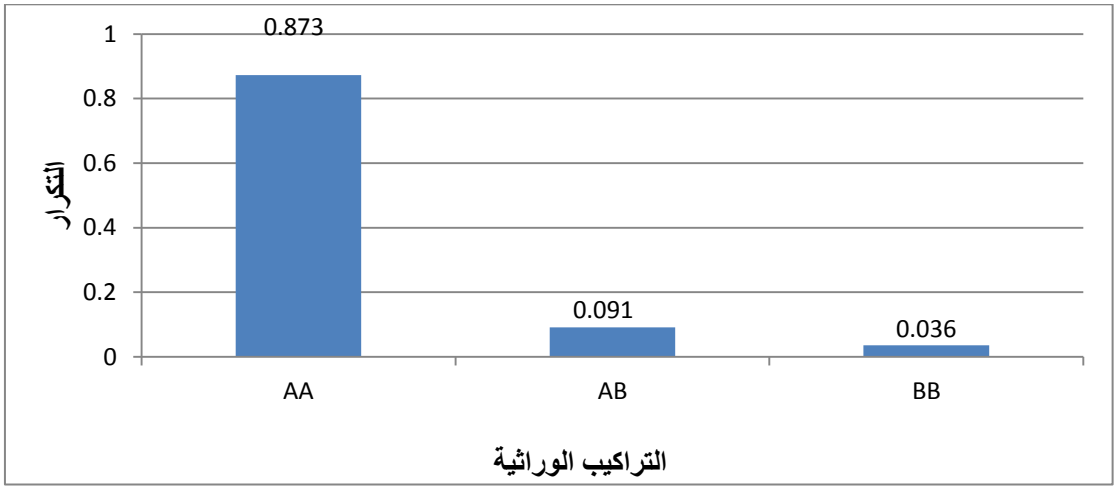
النتائج والمناقشة

ظهر من فحوصات الترحيل الكهربائي وجود حزم واضحة من هذا البروتين في دم الماعز المحلي الاسود وهذا يدل على تشكل البروتين وراثياً إلى أكثر من تركيب وراثي واحد حيث كان هناك ثلاثة تراكيب وراثية (AA، BB، AB) مسؤول عنها اليلين (A و B) تتوارث حسب قانون مندل الأول وهذا يتفق مع ما ذكره Tounon *et al.*, 1989) و يوسف وخير الدين ,1990). والشكل رقم (1) يوضح تكرار الاليلات حيث كان تكرار الاليل A هو الاعلى (0.92) بينما تكرار الاليل B كان (0.08).

ولقد استخدمنا طريقة عمل محورة وبالتالي تمكنا من الحصول على هذه النتائج، حيث أن هذه النتائج تؤكد حالة التنوع الوراثي في الماعز المحلي الاسود لاسيما في محافظة ميسان، إذ وجدنا ثلاثة أشكال وراثية لهذا البروتين وكما هو واضح في الشكل رقم (2 و3) وهذا الجين يعد من الجينات المهمة في تشخيص وتوصيف الماعز المحلي.



شكل (1) يوضح تكرار الاليلات للهيموكلوبين في دم الماعز المحلي الاسود



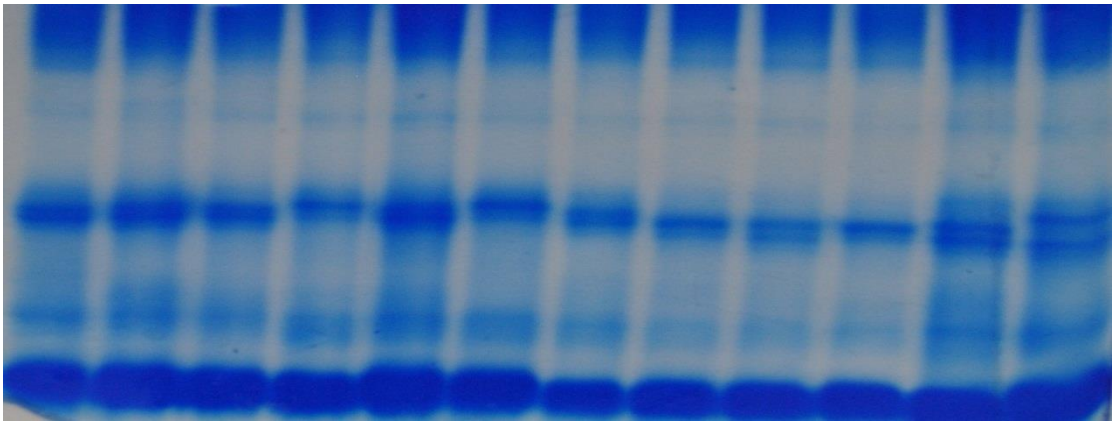
شكل (2) يوضح تكرار التراكيب الوراثية للهيموكلوبين في دم الماعز المحلي الاسود

لقد درس هذا البروتين بشكل مفصل في كثير من البحوث وعلى حيوانات اخرى اذ عمل فرج (2013) على الاغنام و Pal and Mummed (2014) على الابقار اما فيما يتعلق بالماعز فقد عمل كل من Bindu and Raghavan, 2010) و Osaiyuwu *et al.* 2013 و Agaviezor *et al.,* 2013 و Yakubu *et al.,* 2014) وهذه النتائج تتفق معهم من حيث المبدأ اذ اكدوا وجود ظاهرة التشكل الوراثي للهيموكلوبين وبالتالي كان هناك اتفاق بين دراستنا والدراسات السابقة, واتفقت هذه الدراسة مع الدراسات السابقة حيث وجدوا نفس التراكيب الوراثية التي حصلنا عليها وسيادة الاليل (A) على الاليل (B) وقد يعود السبب الى هجرة الماعز من مناطق نشأتها الى المناطق الاخرى هي احدى الاسباب التي ادت الى سيادة التركيب الوراثي AA في الماعز وبالتالي أدت الى ظهور تركيب وراثي جديد وتغير في التركيب الوراثي السائد للمنطقة (Agar *et al.,* 1972).

بينما يبين الجدول رقم (1) ان التركيب الوراثي AA قد اظهر تأقلم عالي اذ بلغ 0.89 بينما انخفضت قابلية التأقلم في التراكيب الوراثية النقي للاليل B. اذ بين Deza وجماعته (2000) ان السبب في تفوق الاليل A على الاليل B يعود الى ان A يكون اكثر مقاومة للأمراض والظروف البيئية. وكذلك هذا يدل على ان هذه الحيوانات لم تتعرض الى العوامل المؤثر بتغيير تكرار الجين (الانتخاب والهجرة والطفرة والصدفة) بشكل كبير يعمل على تغيير تكرار الجين , ماعدا وجود بعض أثر للطفرات ففي تكوين بعض التراكيب الوراثية منخفضة التكرار.

التركيب الوراثي	متأقلم	حساس
AA	0.89	0.11
AB	0.60	0.40
BB	0.50	0.50

جدول (1) علاقة التراكيب الوراثية للهيموكلوبين بقابلية التأقلم



الشكل (3) يوضح التراكيب الوراثية لبروتين الهيموكلوبين على هلام الاكريلآمايد بتقنية الهجرة الكهربائية في دم الماعز المحلي الاسود

المصادر

فرج , صلاح حسن. 2013. التشكل الوراثي لبعض المعايير الكيموحيوية في دم الأغنام العرابية وعلاقتها بقابلية التأقلم. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة, العراق.

يوسف, وليد حميد وخير الدين, محي الدين. 1990. علم الفسلجة – جامعة الموصل.

Agar, N. S. ; Evans, J. V. and Robert, J. 1972. Red blood cell potassium and haemoglobin polymorphism in sheep (A review) Anim. Breed. Abstr. 40: 407-436.

Agaviezor, B. O.; Ajayi, F. O. and Benneth, H. N. 2013. Haemoglobin polymorphism in Nigerian indigenous goats in the Niger delta region, Nigeria. I. J. S. N., VOL. 4(3): 415-419.

Ajuwape, A. T. P. and Antia, R. E. 2000. Breed differences in haematologicalchanges associated with trypanosome antigenaemia in Nigeria cattle. Trop. Vet., 18: 67-72.

Al-Murrani, W. K. ; Al-Dairi, A. H. M. and Al-Rawi, A. A. 2000. The Neurtophil / Lymphocyte ratio (N/ L) as an indicator to Winter and Summer seasonal stress

and a criterion for selection for stress resistance in sheep. Iraq J. Agric. (Special Issue), 5(4) : 134-143.

Alphonsus, C., Akpa, G.N., Usman, N., Barje, P.P. and Byanet, O. (2012) Haemoglobin Polymorphism and its Distribution in Smallholder Goat Herds of Abuja Nigeria. Global. J. Mol. Sci., 7(1): 11-14.

Bettati, S. ; Viappiani, C. and Mozzarelli, A. 2009. Hemoglobin, an "evergreen" red protein. Biochim. Biophys. Acta. 1794:1317-1324

Bindu, K. A. and Raghavan, K. C. 2010. Haemoglobin Polymorphism in Malabari Goats.Veterinary World., 3(2): 74-75.

Bunn, H.F. 1971. Differences in the interaction of 2,3- diphosphoglycerate with certain mammalian haemoglobins. Science 172: 1049-1052.

Deza, C.; Petrez, G. T. ; Gardenal, C. N.; Varela, L.; Villar, M. ; Rubiales, S. and Barrioglio, C. 2000. Protein polymorphism in native goats from central Argentina. Small Rum. Res. 35(3):195-201.

Egena S.S.A. and Alao R.O. 2014.Haemoglobin polymorphism in selected farm animals-a review. Biotechnology in Animal Husbandry 30 (3), 377-390.

Erhardt, G. (1986). Transferrin variants in sheep: separation and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. Anim. Genet. 17: 343-352.

Essien, I. C.; Akpa, G. N. ; Barje, P. P. and Alphonsus, C. 2011. Haemoglobin types in Bunaji cattle and their Friesian crosses in Shika, Zaria-Nigeria. African J Anim Biochem, 6(1): 112 - 116.

Gall,C.1981. Goat production .Fletcher and sons ltd ,London.

Lee S. L. ; Mukherjee T K.; Agamuthu P. and Panandam J.M. 1995. Biochemical polymorphism studies of wool-sheep, hair-sheep and their hybrids in Malaysia. Asian Journal of Animal Science, 4: 357-364.

Olayemi, F. O. ; Nwandu C. N. and Aiyed, J. O. 2007. Haematology of Sokoto Gudali Cattle as Influenced by Sex and Breed. J. Anim. Vet., 6: 816-818.

Osaiyuwum, O. H. ; Akinyemi, M. O.; Omoike, O. A. and Salako, A. E.2013. Haemoglobin Polymorphism in Red Sokoto Goats of Nigeria.J. Anim. Prod. Adv., 3(9): 278-282.

Pal, S. K. and Mummed, Y. Y. 2014. Investigation of haemoglobin polymorphism in Ogaden cattle,Veterinary World., 7(4): 229-233.

Pieragostini, E. ; Dario, C. and Bufano, G. 1994. Haemoglobin phenotypes and hematological factors in Leccese sheep. Small Rum. Res., 13: 177-185

Schibler, L. ; Vaiman, D.; Oustry, A. ; Giraud-Delville, C.; Cribiu, E. P. 1998. Comparative gene mapping: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. Genome Res., 8: 901-915.

Tibbo, M. ; Aragaw, K. ; Abunna, F. ; Woldemeskel, M. ; Deressa, A. ; Lemma Dechassa, M. and Rege, J. E. O. 2005. Factors affecting haematological profiles in three indigenous Ethiopian sheep breeds. Comp. Clin. Pathol., 13: 119-127.

Tunon, M J.; Gonzalez, P. and Vallejo, M. 1989. Genetic relationships among 14 Spanish breeds of goats. Anim. Gen., 20: 205-212.

Yakubu, A.; Haruna K. A.; Ibrahim S. M.; Rowland E. B. and Abdulrazak O. R. 2014. Preliminary investigation of haemoglobin polymorphism and association with morphometric traits in West African Dwarf goats in north central Nigeria. Mljekarstvo 64 (1), 57-63 (2014).

Yeh, F. C. ; Yang, R. C. and Boyle T. 1999. Popgene Version 1.31 Microsoft Window-based Freeware for-Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Technology Center, University of Alberta, Canada.