علاقة تعدد المظاهر الوراثية لجين عامل النمو شبيه الإنسولين (IGF-1) بأنتاج الحليب ومكوناته الرئيسة لدى النعاج العواسي التركي

مثنى صباح عزاوي

قسم تقنيات الانتاج حيواني–الكلية التقنية المسيب/جامعة الفرات الأوسط التقنية

m.sabah41@yahoo.com

الخلاصة

أجريت الدراسة في محطة أبحاث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة، فضلا عن مختبر الفسلجة/كلية الزراعة/جامعة بغداد ومركز التقانة الاحيائية/جامعة النهرين للمدة من 2013/1/1 ولغاية 2014/6/1، بهدف تحديد التراكيب الوراثية لمنطقة التعبير الأولى (Exon 1) لجين شبيه الانسولين (IGF-1) وعلاقتها في انتاج الحليب وطول موسم الانتاج للعواسي التركي ونسب بعض مكونات الحليب وصفاته.وأستعمل لهذا الغرض تقنية تباين أطوال الحزم المقيدة (RFLP)، بلغت نسب التراكيب الوراثية لجين (IGF-1) في عينة الاغنام 40.00 و 46.67 و13.33 للتراكيب الوراثية AAوAB وBB وبفرق عالي المعنوية بين هذه النسب .واتضح أن تأثير اختلاف التراكيب الوراثية كان معنويا($P\leq0.05$) في انتاج الحليب اليومي والكلي إذ تفوق التركيب الوراثي AB على التراكيب الوراثية الأخرى، فيما لم يكن الأختلاف معنويا بين هذه التراكيب لصفة طول موسم أنتاج الحليب، وكانت الفروقات معنوية ($P\leq0.05$) بين التراكيب الوراثية المذكورة لنسبة البروتين والمواد الصلبة غير الدهنية واللاكتوز والرماد ودرجة الانجماد ، في حين لم تكن الفروقات معنوية بين التراكيب الوراثية الثلاث لصفتي نسبة الدهن والكثافة. وفقا لهذه النتائج من الممكن اعتماد أختلاف التركيب الوراثي لجين شبيه الانسولين (IGF-1) في برامج التحسين الوراثي وذلك بأنتخاب التراكيب الوراثية التي حققت اعلى انتاج حليب وافضل نسب مكونات حليب في سلالة أغنام العواسي.

الكلمات المفتاحية: جين شبيه الانسولين، انتاج الحليب، نسبة الدهن، نسبة البروتين

Abstract

This study was carried out at the Ruminants Researches Station /State Board for Agriculture Researches / Ministry of Agriculture, Reproductive laboratory in college of Agriculture/Univ. of Baghdad & Technical Center of AL-Nahrain Univ. over period from 1/1/2013 until 1/6/2014.

The aim is to determine the genotypic of IGF-1gene (exon1) and the relationships with milk product, lactation period days and some milk components in Turkish awassi sheep by using RFLP (restriction fregmant length polymorphism) . The distribution percentage of genotype in sheep samples was 40.00, 46.67, 13.33 in AA,AB,BB respectively with highly significant defferences ($p<0.01$) . it appears the genotypic polymorphism has significant effect ($p<0.05$) on daily and total milk production Exceeding the AB on the rest of the genotypes، While not significant difference between these genotypes generate a measure the length of the season of milk production, The significant differences ($P\leq0.05$) between genotypes mentioned the proportion of protein , solid ,fat , ash and the degree of freeze, While not significant differences between the genotypes for percentage of fat and density. In accordance with the results of the possible adoption of different genetic (IGF-1) in the programs of the genetic improvement by electing genotypes which achieved the highest milk production and the best rates of breast milk components strain Awassi sheep.

Key words: IGF-1, milk production, fat percentage, protein percentage

المقدمة

يتكون الجين المشفر لهرمون النمو الشبيه بالانسولين (Growth factor like hormone insulin-1) من ست مناطق تعبير(Exon) ويبلغ طوله 90 كيلو زوج قاعدي (Steenbergh *et al.*,1991 و Nixon *et al.*,1999) ولهذا الهورمون علاقة بمعدل النمو وانتاج اللحوم (Cobra وجماعته، 2013)، وأشارت دراسات الى أن هذا الجين يؤدي دورا مهما في تطور الغدة اللبنية وتمايز الخلايا

(Mam-Ghali *et al.*, 1991). يشفر هذا الجين لعائلة IGF المكونة من Insulin و IGF1و IGF2 .تلعب هذه الهورمونات دورا هاما في تمايز الخلايا والتطور الجنيني والنمو وتنظيم الأيض (Siadkowska *et al.*, 2006).ويوجد شكلان للترجمة(Transcripts) الأول بوجود منطقة التعبير الأولى وحذف منطقة التعبير الثانية ويكون طوله بحدود 1155 نيوكليوتيده،أما الشكل الأخر فيكون معاكساً للأول ويكون أقصر (750 نيوكليوتدة) (Jansen *et al.*,1991). ونظرا لما للهورمون من أهمية في تمايز الخلايا وتطور الغدة اللبنية ،لذا تهدف هذه الدراسة الى البحث عن تأثيرات التعدد مظهري لهذا الجين على انتاج الحليب ومكوناته وصفاته.

المواد و طرائق العمل

نفذت الدراسة في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية / وزارة الزراعة، للمدة من 2013/1/1 ولغاية 2014/3/1، على عينة مكونة من 45نعجة عواسي تركي هذا فيما يخص الجزء الحقلي، في حين أجريت التحاليل الوراثية في مختبرات كلية الزراعة/جامعة بغداد ومختبرات مركز تقانة جامعة النهرين للمدة من 2013/10/1 لغاية 2014/6/1 بهدف تحديد التراكيب الوراثية (Genotype) لجين شبيه الانسولين IGF-1. جمع 3 مل من الدم من الوريد الوداجي (Jugular vein). استخلص DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid.

تحميل إلـ DNA والترحيل الكهربائي

مزج 10 مايكروليتر من الـ DNA مع 3 مايكروليتر منdye loading(صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue) إذ حملت العينات في الحفر المفردة من الجل. تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها (70 فولت) وبتيار مقداره 40 ملي أمبير ولمدة ساعة، غمر الهلام بمحلول يحوي صبغة الاثيديوم بروماید1% لمدة 20 دقيقة. استخدم جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV light transillminator) لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، ان الحزم الملونة بصبغة بروماید الاثيديوم (Ethidium bromide fluorescence) صورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوعرافي (Photo documentation system) .

أختيرت البوادئ (Primers) وكما موضح في الجدول(1) لغرض أجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري للجينات والطفرات الموجودة للجينIGF-1 (Ge etal.,1997 , Yilmas etal.,2005)

الجدول (1) تسلسل البرايمرات المستخدمة المجهزة من قبل شركة

اسم الجين ومختصره	التسلسل	
IGF-1	Exon 1 5’ flankingregion	**F : 5'**- ATTACAAAGCTGCCTGCCCC-**3'**
		R : 5' - ACATCTGCTAATACACCTTACCCG-**3'**

جُهزت البوادئ من شركة IDT (Integrated DNA Technologies) كمسحوق مجفف (Lyophilized product) وشركة ALFA الالمانية، حضر محلول الخزين(Stock solution) ومحلول العمل (Working solution) بحسب تعليمات شركة IDT (Integrated DNA Technologies) حُضر محلول الخزين وذلك بإضافة الماء المزال الأيون (Deionized water) للحصول على التركيز النهائي للعالق (100picomols/µl). أما محلول العمل فقد حضر بوساطة سحب 10 مايكروليتر من محلول الخزين (100 picomols/ µl) وتخفيفه بـ 90 مايكروليتر من الماء المزال الأيون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو10 Picomols/ µl .

التفاعل المتسلسل لأنزيم البوليميريز للجينات المدروسة

أجري الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البلمره المتسلسل للجين المدروسة وباستخدام العده profitaq PCR PreMix KIT وبحجم 25 مايكروليتر ووضع في جهاز التفاعل المتسلسل لأنزيم البوليميريز وحسب ظروف التفاعل الخاصة بكل قطعة جينية متضاعفة، وبعد انهاء التفاعل تم ترحيل ناتج التفاعل للتأكد من تضاعف القطعة المطلوبة. الجداول (2) يمثل البرامج المستخدمة في الكشف الجزيئي باستخدام تقنيةPCR.

جدول (2): برنامج تضاعف منطقة التعبير الاولى (Exon1) لجين IGF-1(Yilmas etal.,2005).

ت	الخطوات	درجات الحرارة	الوقت	عدد الدورات
1	مرحلة المسخ الاولى	97C°	2 دقيقة	1
2	المسخ	94C°	45 ثانية	31
3	الالتحام	58C°	45 ثانية	
4	الاستطالة	72C°	45 ثانية	
5	مرحلة الاستطالة النهائية	72C°	5 دقائق	1
6	المرحلة النهائية للحضن	4	–	–

تحميل ناتج التفاعل المتسلسل لأنزيم البوليميريز والترحيل الكهربائي

وضع 3µl من الـ DNA ladder مع 5 µl من نواتج PCR في جل الأكاروز وبتركيز 2% (1X TBE Buffer)، أجريت عملية الترحيل بفرق جهد مقداره 70 فولت/سم وبتيار40ملي فولت ولمدة ساعة ونصف ثم غمر الجل بصبغة بروميد ألاثيديوم السائلة وبتركيز 1% وشوهدت الحزم بوساطة UV transiluminater، وصورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي (Photo documentation system).

الكشف عن أليلات منطقة التعبير الأولى لجين IGF-1 بأستعمال تقنية RFLP

كشف عن الاختلاف الأليلي للحزمة الناتجة عن طريق استعمال الإنزيمات القاطعة فقد أستعمل الأنزيم *Hea*IIلهضم حزمة جينIGF-1المستهدفة وفقا لبرنامج هضم محدد (الجدول3)على درجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة ساعة واحده ثم رحلت العينات المهضومة باستعمال جهاز الترحيل الكهربائي وتم الكشف عن الحزم الناتجة بأستعمال جهاز UV transiluminater للكشف عن مواقع القطع واستنادا للحزم الناتجة تم تحديد الأليلات.

جدول (3) : برنامج الهضم الأنزيمي المستخدم لدراسة التعددالمظهري لجين1-IGF للمنطقه المضاعفة

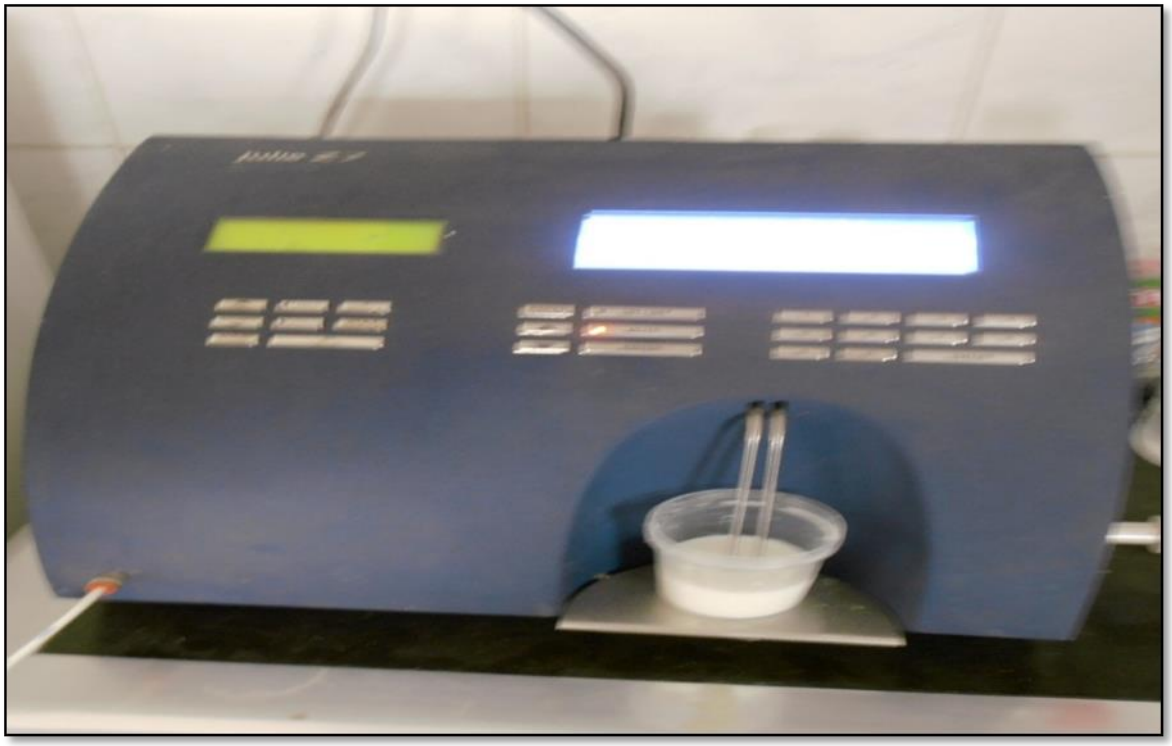
حجم التفاعل 9 مايكرولتر	المكونات
0.3µl	*Hea*II(20000 units/ml)
4 µl	Product PCR
1 µl	1X NEBuffer 4
4.6 µl	DNase Free Water

قياسات الحليب

1- قيس إنتاج الحليب لكل نعجة معتمدة في المحطة وذلك باعتماد القياس نصف شهري وتم ذلك بعزل المواليد عن امهاتها قبل عملية الحلب ب12 ساعة ومن ثم تحلب النعجة وتقدر كمية الحليب بضرب الحليب الناتج في 2 وذلك لحساب الانتاج اليومي (ICAR، 1992) ويوزن الحليب المنتج من كل نعجة بميزان خاص و أعتبرت النعجة متوقفة عن الأنتاج عند وصول الانتاج الى 50 غم لكل حلبة.

2- أستخدم جهاز خاص لقياس مكونات الحليب (julie z7) (الشكل 3-3)، أما الصفات التي قيست فشملت نسب كل من البروتين و اللاكتوز والكثافة والدهن و المواد الصلبة غير الدهنية والرماد.

أما الأس الهايدروجيني للحليب (PH) فقد قيس بإستخدام جهازPH-meter (HANNA)



الشكل (3-3) : جهاز قياس مكونات الحليب.

حللت البيانات احصائيا باستعمال البرنامج SAS– Statistical Analysis System (2012) لدراسة تأثير جين عامل النمو شبيه الانسولين (IGF-1) في انتاج الحليب ومكوناته، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام طريقة متوسطات المربعات الصغرى (Least square means).

Y_{ijk}: قيمة المشاهدة k العائدة للتركيب الوراثي i وتسلسل الدورة الانتاجية j.

μ: المتوسط العام للصفة.

G_i: تأثير المظاهرالمتعددة للجين (AA و AB و BB).

P_j: تأثير تسلسل الدورة الانتاجية (من الاولى الى الرابعة).

e_{ijk}: الخطا العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + P_j + T_k + e_{ijkl}$$

إذ ان:

Y_{ijkl}: قيمة المشاهدة l العائدة للتركيب الوراثي i وتسلسل الدورة الانتاجية j ونوع الولادة k.

G_i: تأثير المظاهر المتعددة للجين (AA و AB و BB).

P_j: تأثير تسلسل الدورة الانتاجية (من الاولى الى الرابعة).

T_k: تأثير نوع الولادة (فردية ، توأمية).

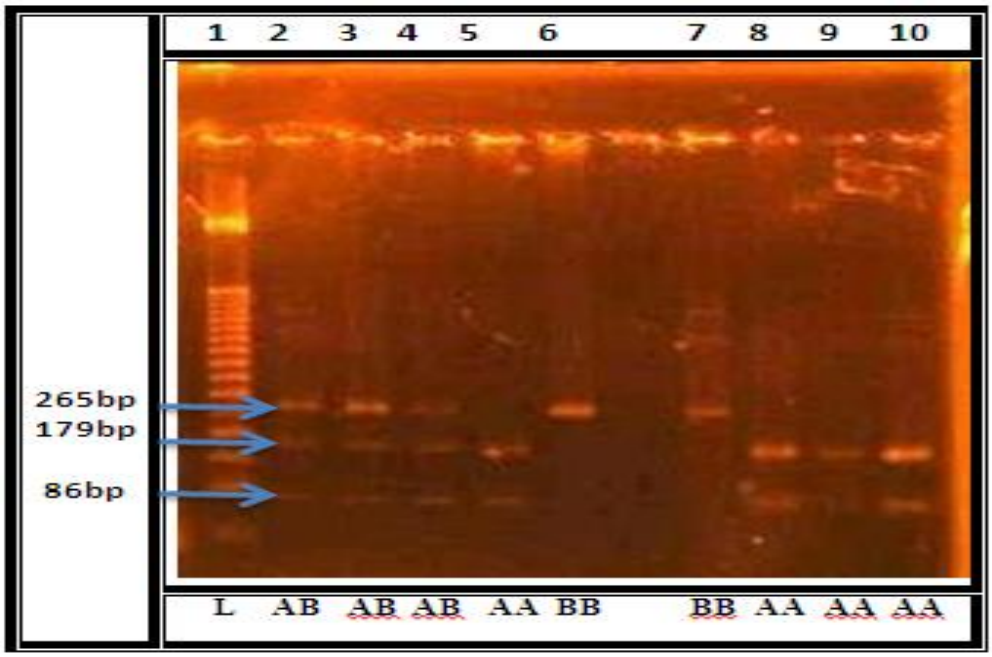
e_{ijk}: الخطا العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$

استعمل اختبار مربع كاي (χ^2 -Chi-square) للمقارنة بين النسب المئوية لتواجد كل جين في عينة الاغنام المدروسة.

النتائج والمناقشة

1-الحزم الناتجة

تم الحصول على الحزمة 265 زوجاً قاعدياً بأستخدام التفاعل المتسلسل لأنزيم البوليميريز (PCR) وهي تمثل منطقة التعبيرالاولى (Exon1) لجين IGF-1 وتم الحصول على التراكيب الوراثية وفقا للحزم الناتجه عن الهضم الأنزيمي للحزمة المذكورة، أذ مثلت الحزم 179 و86 زوجاً قاعدياً التركيب الوراثي AA ، بينما كان التركيب الوراثي AB متمثلا بالحزم الوراثية 265 و179 و 87 زوجاً قاعدياً، أما التركيب الوراثي BB فقد تمثل بالحزمة 265 زوجاً قاعدياً غير القابلة للهضم أنزيميا(الشكل1) ، وأن هذا الأختلاف الأليلي كان نتيجة لحدوث طفرة وراثية في منطقة 5'flanking region وهي A الى C وGالى C في الموقع 179 و181 على التوالي من طول المنطقة المدروسة (تمثل A و G الأليل A بينما يمثل C وC الأليل B) . وان هذه النتيجة جاءت موافقة لما توصل اليه الباحثون (Ge *et al.*,1997 , Yilmas *et al.*,2005).



الشكل1: التراكيب الوراثية لمنطقة التعبير الاولى للجين IGF-1: 1 الدليل الحجمي، 2 و3و4 التركيب الوراثيAB،5و8و9و10 التركيب الوراثي AA ، 6 و7 التركيب الوراثي BB

2- توزيع النسب الوراثية

يتبين من الجدول(1) العدد والنسبة المئوية لجين شبيه الأنسولين(IGF-1) في العينة التي تمت دراستها، أذ كان التركيب الوراثي AB هو الأكثر شيوعا ثم تلاه التركيب الوراثي AA واخيرا التركيب الوراثيBB وهذه النتيجة جاءت متفقة مع ماتوصل اليه Mojtaba (2009) إذ تغلب التركيب الوراثي الهجينAB (0.48) على التركيبين الوراثيين AA (0.45) وBB (0.9) ،وفي دراسةSeyed(2011)على اغنام Zel في أيران تساوت النسب الوراثيه للتركيبين الوراثيينAA و AB (0.47) وكانت نسبة التركيب الوراثي BB الاقل(0.6) ،والملاحظ في دراستنا الحالية و الدراسات السابقة ان نسب التركيبين الوراثيين AA و AB كانتا الاعلى ومتقاربتان وكان التركيب الوراثي BB الأقل وبفارق كبير عن التركيبين الاخرين ، وقد يعود ذلك الى ان

التركيبين الوراثيين AA وAB أكثر تأقلما للظروف البيئية مقارنة بالتركيب الوراثيBB و قد يكون لأختلاف السلالات وأختلاف حجم العينة الأثر الكبير في ذلك(عزاوي،2015).

الجدول1:عدد ونسب التراكيب الوراثية لجين شبيه الانسولين (IGF-1) في الاغنام العواسي التركي .

التركيب الوراثي(Genotype)	العدد	النسبة المئوية(%)
AA	18	40.00
AB	21	46.67
BB	6	13.33
المجموع	45	% 100
قيمة مربع كاي (χ^2)	---	** 8.40
** ($P\leq0.01$).		

3- أنتاج الحليب وطول موسم انتاجه

أشارت النتائج الى تفوق التركيب الوراثي AB في أنتاج الحليب اليومي والكلي وطول موسم الانتاج على التركيبين الوراثيBB في حين لم تكن الفروقات معنوية بين هذا التركيب والتركيب AA كما لم تكن الفروقات معنوية بين التراكيب الثلاثة لصفة طول موسم الأنتاج (الجدول 2) ، ولم يتسنا الحصول على دراسات تتناول علاقة هذا الجين بأنتاج الحليب في الاغنام بأستخدام تقنية تباين أطوال الحزم المقيدة(RFLP) ألا أن عدد من الباحثين درسوا تاثيره في الابقار فقد أشار EulaliaSiadkowska وجماعته(2006)الى تفوق التركيب الوراثي ABعلى التركيبين AA و AB في انتاج الحليب وقد علل ذلك بتفوق هذا التركيب الوراثي في كفاءة التحويل الغذائي كما ان سيادة تاثير التركيب الوراثي الهجين على التركيبين النقيين يشير الى عدم وجود تاثير منفرد أصيل للأليلين A وB على أداء الحيوان,وأشارSmaraqdov وجماعته(2006) الى وجود علاقة قوية بين مواقع الصفات الكمية (QTL) وأنتاج الحليب.ألا أن Hines وجماعته (1998) لم يجدو علاقة بين جين IGF-1 (RFLP SnaBI) وأنتاج الحليب في أبقار الحليب.

الجدول 2 . علاقة المظاهر المتعددة لجين شبيه الانسولين (IGF-1) في انتاج الحليب وطول موسم الانتاج في أغنام العواسي التركي.

التركيب الوراثي (Genotype)	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي		
		انتاج الحليب اليومي (كغم)	انتاج الحليب الكلي (كغم)	طول موسم انتاج الحليب (يوم)
AA	18	a0.10 ± 1.09	ab12.74 ± 113.89	a7.23 ± 106.44
AB	21	a0.13 ± 1.10	a17.72 ± 134.89	a5.98 ± 119.90
BB	6	b0.16 ± 0.472	b25.09 ± 59.96	a6.61 ± 112.83
مستوى المعنوية	---	*	*	NS

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

* ($P\leq0.05$)، NS: غير معنوي.

4- مكونات الحليب

يتبين من الجدول (3) تفوق التركيب الوراثي BB معنويا ($P\leq0.05$)على التركيبين الوراثيين AAوAB في الصفات نسبة البروتين ونسبة المواد الصلبة غير الدهنية والرماد، وفي نسبة اللاكتوز تفوق أيضا على التركيب الوراثيAA الا انه لم يتفوق معنويا على التركيب الوراثيAB ،كما لم يكن هناك اي فروقات معنوية بين التراكيب الوراثية الثلاث للصفات نسبة الدهن والأس الهيدروجيني والكثافة . أن هذا الاختلاف في النتائج قد يشير الى ضعف التأثير المنفرد لهذا الجين في هذه الصفات بمعزل عن جينات أخرى , فقد ذكر EulaliaSiadkowska وجماعته(2006) أن الصفات الكمية كانتاج الحليب والنمو تخضع لتاثير عدد كبير من الجينات وكل واحد من هذه الجينات له تاثير صغير وأن كل جين من هذه الجينات يشارك بنسة معينة في احداث التباين الوراثي. إن لحجم العينة تاثيراً في ذلك فأذا نظرنا وجدنا 6 افراد فقط حاملة للتركيب الوراثي BB من مجموع 45 وبالتالي قد لاتكون هذه الحيوانات معبرة عن الواقع الفعلي لهذا التركيب الوراثي وذلك لقلة أعداد الافراد الحاملة لهذا التركيب الوراثي.

5- الأستنتاج

نستنتج من دراستنا الحالية أمكانية أستخدام الاختلاف الوراثي لجين IGF-1 في التحسين الوراثي لصفات الحليب من خلال انتخاب التراكيب الوراثية الأفضل تأثيرا في الأداء الأنتاجي،وأن تقنيات البايوتاكنلوجي سهلت دراسة التأثير الجيني بشكل مباشر من خلال التعرف على التركيب الوراثي بعد ان كانت الدراسة تقتصر على مظهر الصفه فقط، أن أستعمال هذه التقنيات في برامج التحسين الوراثي سوف يساهم كثيرا في تقدم قطاع الأنتاج الحيواني وذلك بوضع برنامج متكامل لدراسة تأثير عدة جينات لعدد من الصفات الأقتصادية بأستعمال أكبر عدد ممكن من الحيوانات من أجل الخروج بنتائج أكثر ثقة وواقعية وممثلة للمجتمع.

المصادر (Reference):

عزاوي، مثنى صباح. 2015.التحليل الوراثي الجزيئي لجيني Cyp19 وprl وأختبار المذنب وعلاقتها ببعض مظاهر الأداء للأغنام العواسية المحلية والتركية. رسالة دكتوراة. كلية الزراعة. جامعة بغداد.ص52.

Cobro M., Giti, E. and Abbas, H. 2013. Polymorphism of IGF-1 gene in Makoei sheep using PCR-SSCP. EU.jor .of exp.Bio.71-78.

Ge, W., Davis, M.E.and Hines, H.C. 1997. Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. Anim. Genet., 28: 155-156.

EulaliaSiadkowska, Lech Zwierzchowski, JolantaOprządek, NinaStrzałkowska, Emilia Bagnicka, JózefKrzyżewski. 2006. Effect of polymorphism in IGF- 1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Animal Science Papers and Reports vol. 24 (2006) no. 3, 225-237.

Hines H.C., Ge, W., Zhao, Q.and Davis, M.E., 1998 . Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins. Animal Genetics .69 ,(1)29

Jansen, E., Steenbergh , P.H., Leroith, D., Roberts, Jr. and Sussenbach, J.S. 1991. Identification of multiple transcription start sites in the human insulin-like growth factor I gene. Molecular and Cellular Endocrinal. 78: 115-125.

Mam-Ghali, M.I., Saidi-Mehtar, N., Guerin, G. 1991. Sheep gene mapping: additional DNA markers included .*Animal Genetics*, 22: 165.

Nixon, A.J., Brower-Toland, B.D. and Sandell, L.J. 1999. Primary nucleotide structure of predominant and alternate splice forms of equine insulin-like growth factor I and their gene expression patterns in tissues .American J. Veterinary Res., 60(10): 1234-1241.

Smaragdov, M.G., Prinzenberg, E.M., Zwierzchowski, L., 2006 . QTL mapping in cattle: theoretical and empirical approach. Animal Science Papers and Reports 24 (2) 69-110.

Siadkowska, E., Zwierzchowski L., Oprzadek, J. and Strzalkowska, N .2006. Effect of polymorphism in *IGF-1* gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 3: 225-237.

Steenbergh,P.H., Koonen-Reemast, A.M.C.B., Cleutjens, C.B.J.M. and Sussenbach, J.S. 1991.Complete nucleotide sequence of the high molecular weight human IGF-1 mRNA .Biochmical and Biophysical Research Communication, 175:507-514.

Yilmaz, A., M.E. Davis, H.C. Hines and H. Chung.2005. Detection of two nucleotide substitutions and putative promoters in the 5' flanking region of the ovine IGF-I gene. J. Appl. Genet, 46: 307-309.