



دانشگاه گیلان

تحقیقات تولیدات دامی

سال هشتم/شماره سوم/پاییز ۱۳۹۸ (۷۳-۸۵)



مقاله پژوهشی

تجزیه و تحلیل مولکولی و بیوانفورماتیکی ناحیه تنظیمی بالادستی ژن‌های لپتین و SIGLEC5 در ارتباط با صفات تولیدی و تولیدمثلی در گاوهای هلشتاین

مریم حسین پور کل محله^۱، ایوب فرهادی^{۲*}، قدرت رحیمی میانجی^۳، محسن قلی زاده^۲

۱- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱۵)

چکیده

هدف از پژوهش حاضر تجزیه و تحلیل مولکولی و بیوانفورماتیکی ناحیه تنظیمی بالادستی ژن‌های لپتین و SIGLEC5 در ارتباط با صفات تولیدی و تولیدمثلی در گاوهای هلشتاین استان مازندران بود. بدین منظور تعداد ۳۰۰ نمونه خون به طور تصادفی تهیه و استخراج DNA انجام شد. سپس دو قطعه ۲۵۲ و ۴۰۶ جفت بازی به ترتیب از ناحیه تنظیمی بالادستی ژن‌های لپتین و SIGLEC5 با PCR تکثیر و تعیین ژنوتیپ‌ها با روش SSCP انجام شد. از هر الگوی بانندی یک نمونه توالی‌یابی شده و بررسی‌های بیوانفورماتیک با نرم افزارهای BioEdit و DNASIS MAX انجام شد. جایگاه SIGLEC5 در این پژوهش تک شکل بود، اما در جایگاه لپتین چهار الگوی بانندی A، B، C و D به ترتیب با فراوانی‌های ۰/۲۵، ۰/۳۶، ۰/۲۲ و ۰/۱۷ مشاهده شدند. بررسی آماری نشان داد که چندشکلی‌های ژن لپتین با صفت چربی شیر و وضعیت زایش ارتباط معنی‌دار دارد ($P < 0/05$)، به طوری که افراد دارای الگوی بانندی A بیشترین چربی شیر و افراد دارای الگوی بانندی D کمترین چربی شیر را نشان دادند. همچنین افراد دارای الگوی بانندی D دارای بهترین وضعیت زایش (طبیعی) بودند ($P < 0/05$). بررسی‌های بیوانفورماتیکی به ترتیب وجود ۱۴ و نه موتیف را در ژن‌های SIGLEC5 و لپتین نشان دادند. لذا، بر اساس نتایج این پژوهش، استفاده از ژن لپتین برای بهبود صفات تولیدی و تولیدمثلی پیشنهاد می‌شود. علاوه بر آن، انجام مطالعات تکمیلی روی سایر نواحی ژن SIGLEC5 در ارتباط با صفات تولیدمثلی و تولیدی در گاو هلشتاین اکیداً توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تولید، تولیدمثل، گاو هلشتاین، لپتین، SIGLEC5

* نویسنده مسئول: ayoub_farhadi@ymail.com

مقدمه

از سال‌ها قبل همبستگی منفی بین تولید شیر و تولیدمثل بهینه در گاوهای شیری مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و اعتقاد بر این است که این دو صفت در تقاضا و مصرف مواد مغذی رقابت فیزیولوژیک دارند (Leblanc, 2013). روش‌های انتخاب کلاسیک برای صفات کمی با وراثت‌پذیری پائین مانند تولیدمثل، در بهبود نهایی ژنتیکی نتیجه‌بخش نیست. حال آنکه شناسایی یک ژن بزرگ اثر می‌تواند در انتخاب صفات پیچیده برای بدست آوردن بهبود ژنتیکی سریع‌تر استفاده شود. بررسی ژنوم گاوها با نشانگرهای ریزماهواره منجر به شناسایی QTL‌های مرتبط با سلامت، باروری و تولید شده است (Elmac *et al.*, 2013). با این حال، با وجود آن که مطالعات پیشین تأکید بر وجود ارتباط بین ناحیه کدکننده یک ژن با صفات مهم اقتصادی دارند، تحقیقات روی انسان و سایر گونه‌ها نشان داده است که چندشکلی‌های نواحی تنظیمی خصوصاً پروموتور ژن‌ها می‌تواند بسیار مهم باشد (Melzner *et al.*, 2002)، زیرا چندشکلی‌های این نواحی عموماً با توالی و عوامل تنظیم‌کننده بیان ژن در ارتباط بوده و ممکن است به طور معنی‌داری فعالیت راه‌انداز ژن را تحت تاثیر قرار دهند (Miller *et al.*, 1996; Mason *et al.*, 1998).

ژن لپتین روی کروموزوم شماره ۴ گاو قرار داشته و محصول آن یک پلی‌پپتید غیر گلیکوزیدی با وزن مولکولی ۱۶ کیلو دالتون و ۱۴۶ آمینو اسید است که در سال ۱۹۹۴ شناسایی شد (Zhang *et al.*, 1994). لپتین که ژن چاقی نیز نامیده می‌شود در گاو دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون بوده و در انواع بافت‌ها بیان می‌شود، ولی محل اصلی بیان آن بافت چربی سفید است (Magni *et al.*, 2000). در مطالعه‌ای تعداد ۵۰۹ تلیسه هلشتاین-فریزین از ۱۹ واحد تولید شیر بریتانیا در زمان تولد تا رسیدن به پایان دوره دوم شیردهی تحت نظر گرفته شد و ارتباط چندشکلی ژن لپتین با برخی صفات رشد و تولیدمثل به وسیله یک مدل مختلط مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی مشخص شد چندشکلی A1457G با ارتفاع جدوگاه مرتبط بوده و حیوانات با ژنوتیپ AA به طور معنی‌داری در سنین ۱، ۶ و ۱۵ ماهگی بلندتر از افراد دارای ژنوتیپ AG بودند. چندشکلی A59V با اندازه کپل

ارتباط داشته و هموزیگوت‌های TT اندازه کپل کوتاه‌تری داشتند. چندشکلی‌های لپتین ارتباط معنی‌داری با صفات باروری نشان دادند به طوری که حیوانات با ژنوتیپ هموزیگوت TT برای چندشکلی UASMS1 باروری بهتر و فاصله زایش کوتاه‌تری نسبت به هتروزیگوت‌های CT داشتند. علاوه بر این، چندشکلی A1457G به طور قابل توجهی با تعداد تلقیح به ازای آبستنی در اولین زایش تلیسه‌ها مرتبط بوده و هموزیگوت‌های GG به میزان ۱۳ درصد به تلقیح کمتر نسبت به حیوانات AG نیاز داشتند (Clempson *et al.*, 2011). با بررسی اثرات چندشکلی ژن لپتین در گاوهای هلشتاین اثر معنی‌دار ژنوتیپ AB-RFLP بر تولید شیر ۳۰۵ روز نشان داده شد و همچنین افراد دارای ژنوتیپ AB در صفات زمان اولین تلقیح تا آبستنی و روزهای باز عملکرد بهتری داشتند (Moussavi *et al.*, 2006).

ژن SIGLEC5 در گاو روی کروموزوم شماره ۱۸ قرار دارد، دارای ۹ اگزون و ۸ اینترون است و در چندین نوع از سلول‌های ایمنی از جمله لنفوسیت B، مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، بازوفیل‌ها و ماست‌ها بیان می‌شود (Angata *et al.*, 2006). خواص ساختاری منحصر به فرد آن‌ها بر اثر وجود یک دنباله single N-terminal V-set متصل‌شونده به سیالیک اسید و تعدادی از دنباله‌های C2-set است که می‌تواند از SIGLEC1 تا SIGLEC16 متغیر باشد (Crocker *et al.*, 2009; Varki *et al.*, 2007). SIGLEC‌ها در سلول‌های متنوعی از سیستم ایمنی بیان شده و در عملکردهای متفاوتی نقش دارند. این ژن به طور بالقوه در تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی موثر است (Avril *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2005). همچنین SIGLEC5 موجب افزایش جذب پاتوژن‌ها به وسیله ماکروفاژها می‌شود (Crocker *et al.*, 2007). با بررسی ۳۸۴۱۶ نشانگر SNP در ۵۲۸۵ گاو نر مشخص شد که نشانگرهای کروموزوم ۱۸ گاو آثار قابل ملاحظه‌ای بر آسان‌زایی، طول عمر و شایستگی کلی گاوها دارند. در این پژوهش مشخص شد که جهش Ss86324977 در جایگاه 57125868 bp کروموزوم ۱۸ گاو بیشترین آثار را بر آسان‌زایی گوساله، عمق بدن و عرض کپل داشته است. تجزیه و تحلیل نتایج این پژوهش نشان داد که SNP واقع بر

پس از انتخاب افراد، خونگیری حیوانات از ورید دمی با استفاده از ونوجکت حاوی EDTA انجام شد. سپس نمونه‌های خون در مخزن حاوی یخ جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA، در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این پژوهش، استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) انجام شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، توالی ناحیه تنظیمی بالا دست مربوط به ژن‌های مورد نظر از بانک ژنی NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) و Ensembl (<http://asia.ensembl.org/index.html>) تهیه و موقعیت ناحیه پروموتور آن‌ها با استفاده از سرور Promoter 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter>) تعیین شد. برای طراحی آغازگرهای ژن SIGLEC5 از نرم افزار Oligo7 استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه مورد نظر از ژن لپتین با توجه به پژوهش (Yoon et al., 2005) انتخاب شدند. در نهایت نیز آغازگرهای طراحی شده در برنامه BLAST primer بررسی شد تا از اختصاصی بودن اتصال پرایمرهای طراحی شده اطمینان حاصل شود. پس از تایید نهایی، آغازگرها جهت تولید به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲ ارائه شده است.

حجم کل واکنش تکثیر ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) و بقیه آب دو بار استریل تزریقی بود. برنامه حرارتی تکثیر نیز شامل واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشته سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۰ (لپتین) و ۵۷/۸ (SIGLEC5) درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. پس از تکثیر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند.

اینترن ژن SIGLEC5 به طور معنی‌داری صفات تولیدمثلی گاو را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Cole et al., 2009). نشان داده شده است که SIGLEC5 و SIGLEC6 به لپتین متصل شده (Patel et al., 1999) و موجب کاهش سطح لپتین خون می‌شوند. اتصال SIGLEC5 به لپتین سبب کمبود لپتین و در نتیجه تاخیر در شروع زایمان در موش شده است (Mounzih et al., 1998). بنابراین حیوانات هموزیگوت برای SNP نادر موجود در ژن SIGLEC5 ممکن است سطح بالایی از ژن SIGLEC5 را بیان کرده و در نتیجه موجب کمبود لپتین و تاخیر در زایمان شوند. با وجود آن که SIGLECها ژن‌های کاملاً شناخته شده‌ای در رابطه با سیستم ایمنی هستند، تاکنون ارتباط چندشکلی‌های نواحی تنظیمی آن‌ها با صفات تولیدی و تولیدمثلی گاو گزارش نشده است. در این راستا و در پژوهش حاضر، تاثیر چندشکلی‌های آللی و موتیف‌های موجود در ناحیه تنظیمی بالادستی دو ژن لپتین و SIGLEC5^۱ بر صفات تولیدی و تولیدمثلی گاو هلشتاین با روش‌های مولکولی و بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون و استخراج DNA تعداد ۳۰۰ نمونه خون از بانک خون آزمایشگاه ژنتیک مولکولی گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شدند. نمونه‌های خون از گاوداری مهدشت ساری و از گاوهایی که در شکم دوم به بعد قرار داشته اند تهیه شده بود. مدیریت گله اشاره شده به صورت صنعتی و زیر نظر هلدینگ بنیاد مستضعفان است. آماره‌های توصیفی گاوهای مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- آماره‌های توصیفی گاوهای مورد مطالعه

Table 1. Descriptive statistics of studied cows

Traits	Means \pm SE*
305-day milk yield (kg)	9727.34 \pm 334.3
Daily milk yield (kg)	26.96 \pm 0.96
Milk protein (%)	3.44 \pm 0.15
Milk fat (%)	3.47 \pm 0.17
Somatic cell count	208.51 \pm 40.13
Pregnancy length (day)	266.47 \pm 4.1

*Standard error

1. Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin

GLM نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده شد و میانگینها بر اساس آزمون توکی مقایسه شدند. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + M_j + e_{ijk}$$

که در این مدل، Y_{ijkl} : ارزش فنوتیپی صفت مشاهده شده، μ : میانگین صفت مورد نظر در گله، G_i : اثر الگوهای باندی، M_j : اثر ماه زایش و e_{ijkl} : اثر خطای تصادفی است. همچنین برای تجزیه و تحلیل ارتباط بین الگوهای باندی مشاهده شده و صفات وضعیت و نحوه زایش از رویه Logistic نرم افزار SAS استفاده شد.

نتایج

تکثیر ناحیه تنظیمی بالادست ژنهای *SIGLEC5* و لپتین: قطعه مورد نظر از ناحیه بالادست ژن *SIGLEC5* با طول ۴۰۶ جفت باز و ژن لپتین با طول ۲۵۲ جفت باز به وسیله جفت آغازگرهای اختصاصی تکثیر شدند. الکتروفورز محصولات PCR این جایگاهها روی ژل آگارز ۱ درصد و همراه با نشانگر وزن مولکولی انجام و صحت تکثیر این قطعه بدون حضور باندهای غیراختصاصی تأیید شد (شکل ۱). شناسایی چند شکلی در جایگاه های ژنی مورد مطالعه: بعد از تکثیر قطعه ۴۰۶ جفت بازی ژن *SIGLEC5*، محصولات واسرشته شده PCR با استفاده از تکنیک SSCP تعیین ژنوتیپ شدند. این ناحیه در نمونههای مورد مطالعه یک شکل بود و هیچ الگوی باندی در آن مشاهده نشد (شکل ۲). جایگاه ژن لپتین در گاو هلشتاین چند شکل بوده و چهار الگوی باندی A، B، C و D در نمونههای مورد مطالعه مشاهده شدند (شکل ۳).

توالی یابی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ناحیه تنظیمی بالادست ژنهای مورد مطالعه: در جایگاه *SIGLEC5* در مطالعه حاضر چندشکلی مشاهده نشد، اما برای بررسی بیشتر توالی تکثیر شده و مقایسه آن با توالی رفرنس بانک ژنی (NC_032667.1) و شناسایی موتیفهای موجود در قطعه مورد نظر، دو نمونه برای توالی یابی دوطرفه به شرکت Bioneer (کره جنوبی) ارسال شد. پس از آن که قطعه تکثیر شده تعیین توالی شد، با استفاده از نرم افزار BioEdit مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تعیین ژنوتیپ نمونهها: برای تعیین ژنوتیپ نمونههای مورد مطالعه از روش SSCP و ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده شد. مواد لازم برای تهیه ۷۰ میلی لیتر ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده شد. ژل آکریل آمید به مدت ۱۹ ساعت با ولتاژ ۳۸۰ و در دمای ۴ درجه سلسیوس الکتروفورز شد. سپس رنگ آمیزی با روش نیترا نقره انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری و بیوانفورماتیکی دادهها: فراوانی الگوهای باندی مورد نظر با شمارش مستقیم باندها از روی ژل پلی آکریل آمید و شمارش تعداد افراد متعلق به هر الگوی باندی در نمونههای مورد مطالعه انجام شد. بعد از مشاهده الگوهای باندی مختلف، از هر الگو یک نمونه برای ارسال جهت توالی یابی انتخاب شد. قبل از ارسال نمونهها برای تعیین توالی، مقدار ۶۰ میکرو لیتر محصول PCR از هر نمونه، برای بازیافت آماده شد. در این پژوهش از کیت High Pure PCR purification (شرکت یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) برای بازیافت نمونهها استفاده شد. مراحل استخراج DNA از روی ژل آگارز با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای بررسی بیشتر توالی تکثیر شده و مقایسه آن با توالی رفرنس بانک ژنی و شناسایی موتیفهای موجود در قطعه مورد نظر، از هر الگوی باندی یک نمونه برای تعیین توالی دو طرفه به شرکت Bioneer (کره جنوبی) ارسال شد. پس از آن که قطعههای تکثیری شامل الگوهای باندی مختلف، تعیین توالی شدند، با استفاده از نرم افزار BioEdit مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در ادامه، هم-ترازی توالیهای بدست آمده و مقایسه آنها با توالی رفرنس از بانک ژنی با ابزار با CLUSTALW Multiple alignment نرم افزار (BioEdit (version 7.0.9.0) صورت گرفت. همچنین شناسایی موتیفها نیز با نرم افزار DNASIS MAX انجام شد. در بررسی ارتباط بین الگوهای باندی جایگاه ژنی لپتین و صفات مورد مطالعه، دادهها با استفاده از نرم افزار Microsoft Office Excel مرتب شدند و اعداد خارج از محدوده زیستی حذف شدند. برای بررسی ارتباط بین الگوهای باندی و صفات تولیدی (تولید شیر ۳۰۵ روز، درصد چربی و پروتئین و سلولهای سوماتیک شیر) و تولیدمثلی (طول آبستنی و نرخ گیرایی) مورد مطالعه از رویه

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table 2. Primers used in the present study

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Region	Annealing temperature ($^{\circ}$ C)
Leptin	F-5' ACGCCCTGATGTTTGTAATTTGCT-3'	252	5'UTR	60
	R-5' TGCATCAGAGACTTCCTAACGGGA-3'		5'UTR	60
SIGLEC5	F-5'-CAAAGAAGCTGCCATATCTC-3'	406	5'UTR	57.8
	R-5'-AAAAGTATGGGGAACAGGTG-3'		5'UTR	57.8

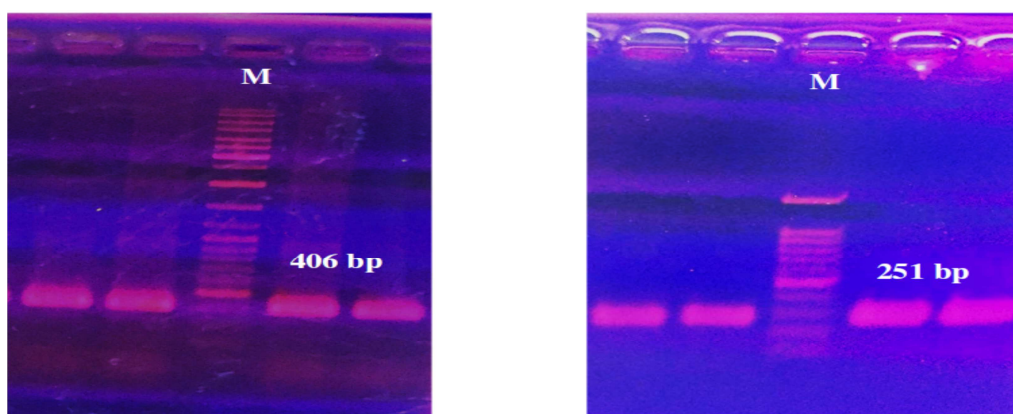


Fig. 1. Bands related to the PCR products of SIGLEC5 (left) and leptin (right) genes upstream in the present study.
M: 100 bp molecular weight marker (Fermentas)

شکل ۱- باندهای مربوط به محصول PCR ناحیه بالادست ژنهای SIGLEC5 (چپ) و لپتین (راست) در پژوهش حاضر. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (فرمنتاز)

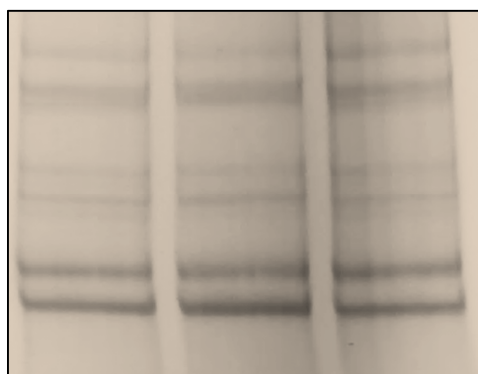


Fig. 2. Observed banding pattern in upstream region of SIGLEC5 gene in Holstein cattle
شکل ۲- الگوهای باندهای مشاهده شده در ناحیه بالادست ژن SIGLEC5 در گاو هلشتاین

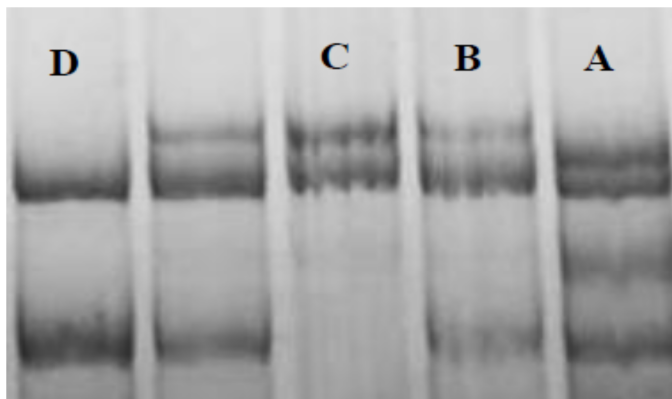


Fig. 3. Observed banding pattern in upstream region of leptin gene in Holstein cattle
شکل ۳- الگوهای بانندی مشاهده شده در ناحیه بالادست لپتین در گاو هلشتاین

شناسایی موتیف‌های درگیر در تنظیم بیان ژن‌های مورد مطالعه در گاو هلشتاین: برای شناسایی موتیف‌های موجود در توالی‌های مورد نظر از نرم افزار DNASIS MAX استفاده شد. لیست تمامی موتیف‌ها و موقعیت آن‌ها در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است. به ترتیب تعداد ۱۴ و ۹ موتیف در ژن‌های SIGLEC5 و لپتین مشاهده شد. بیشترین موتیف شناسایی شده در هر دو ژن مربوط به TCF_1 است. موتیف‌ها توالی‌های کوتاه و تکرارپذیر در نواحی بالادست ژن‌ها هستند که دارای نقش‌های فیزیولوژیکی مختلفی هستند. موتیف‌های TCF یا عامل رونویسی در میزان بیان سطوح mRNA نقش دارند.

تجزیه و تحلیل آماری: بیشترین فراوانی بانندی مشاهده شده برای الگوی B و کمترین فراوانی متعلق به الگوی بانندی D بود. بررسی ارتباط آماری بین الگوهای بانندی مشاهده شده در جایگاه بالادست ژن لپتین با صفات تولیدی (شیر تولیدی روزانه و ۳۰۵ روز، درصد چربی و پروتئین و سلول‌های سوماتیک شیر) در گاو هلشتاین نشان داد که چندشکلی-های این جایگاه با صفت چربی شیر ارتباط معنی‌دار دارد ($P < 0.05$), به طوری که افراد دارای الگوی بانندی A و افراد دارای الگوی بانندی D کمترین چربی شیر را نشان دادند (جدول ۵). همچنین بررسی ارتباط آماری بین الگوهای بانندی مشاهده شده در جایگاه بالادست ژن لپتین با صفات تولیدمثلی (طول آبستنی، نرخ گیرایی، وضعیت و نحوه زایش) در گاو هلشتاین نشان داد که چندشکلی‌های این جایگاه با وضعیت زایش (طبیعی، سقط یا مرده زایی) ارتباط

در ادامه، هم ترازوی توالی بدست آمده و مقایسه آن‌ها با توالی رفرنس از بانک ژنی با ابزار با Multiple alignment صورت گرفت. نتایج هم‌ترازی این توالی در شکل ۴ آورده شده است. همانگونه که در شکل ۴ نشان داده شده است قطعه تکثیر شده از ناحیه بالادست ژن SIGLEC5 در گاوهای هلشتاین در ایران در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۱۵۸، ۱۶۳، ۲۳۸ و ۲۵۷ جفت بازی با توالی رفرنس متفاوت است.

جایگاه مورد نظر در ژن لپتین در گاو هلشتاین چند شکل بوده و چهار الگوی بانندی A، B، C و D در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شدند. همچنین جهت بررسی بیشتر و تایید چند شکلی در جایگاه لپتین، از هر الگوی بانندی یک نمونه برای تعیین توالی دو طرفه ارسال شد.

پس از آن که قطعه‌های تکثیری شامل الگوهای بانندی مختلف، تعیین توالی شدند، هم‌ترازی توالی‌های مربوط به الگوهای بانندی با توالی رفرنس از بانک ژنی انجام شد (شکل ۵). همانگونه که در شکل ۵ نشان داده شده است قطعه تکثیر شده از ناحیه بالادست ژن لپتین در گاوهای هلشتاین در ایران چندشکل بوده و مقایسه الگوهای بانندی مشاهده شده با توالی رفرنس نشان می‌دهد الگوی بانندی A در موقعیت ۹۰ و ۱۸۷ جفت بازی متفاوت است. الگوی بانندی B در موقعیت‌های ۹۰ و ۱۸۷ با توالی رفرنس دارای تفاوت است. همچنین الگوی بانندی C در موقعیت‌های ۹۰، ۱۸۷ و ۱۹۲ و الگوی بانندی D در موقعیت ۹۰ با توالی رفرنس تفاوت دارند.

زایش نیز بر صفات مورد نظر معنی‌دار نبود، اما ماه زایش میزان شیر تولیدی روزانه را به طور معنی‌داری تحت تاثیر قرار داد ($P<0.05$)، به طوری که میزان تولید شیر در ماه فروردین بیشترین و در تیر ماه کمترین بود (جدول ۶).

معنی‌دار دارد ($P<0.05$)، به طوری که افراد دارای الگوی بانوی D دارای نحوه زایش آسان بودند، در حالی که در سایر الگوهای بانوی، در مواردی سقط جنین یا مرده زایی هم مشاهده شده بود. همچنین در پژوهش حاضر، اثر فصل

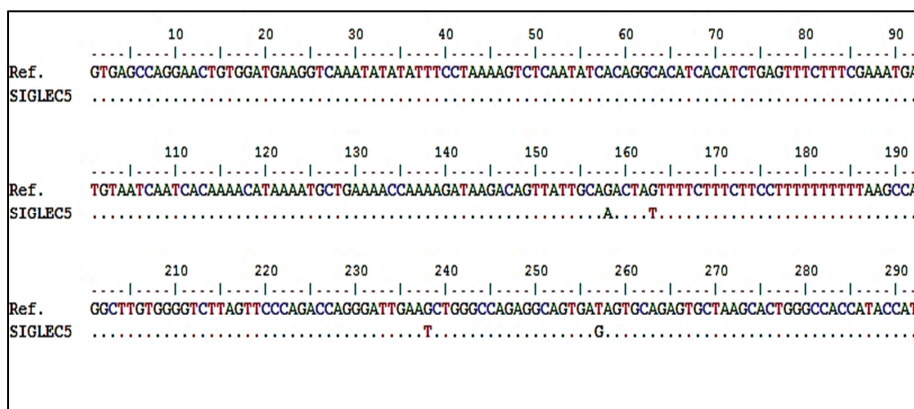


Fig. 4. Alignment of sequence of amplified fragment from upstream region of SIGLEC5 gene with reference sequence. Ref: sequence of interested fragment from gene bank (NC_032667.1)

شکل ۴- هم‌ترازی توالی قطعه تکثیر شده از ناحیه بالادست ژن SIGLEC5 با توالی رفرنس. Ref: توالی قطعه مورد نظر برگرفته از بانک ژنی (NC_032667.1)

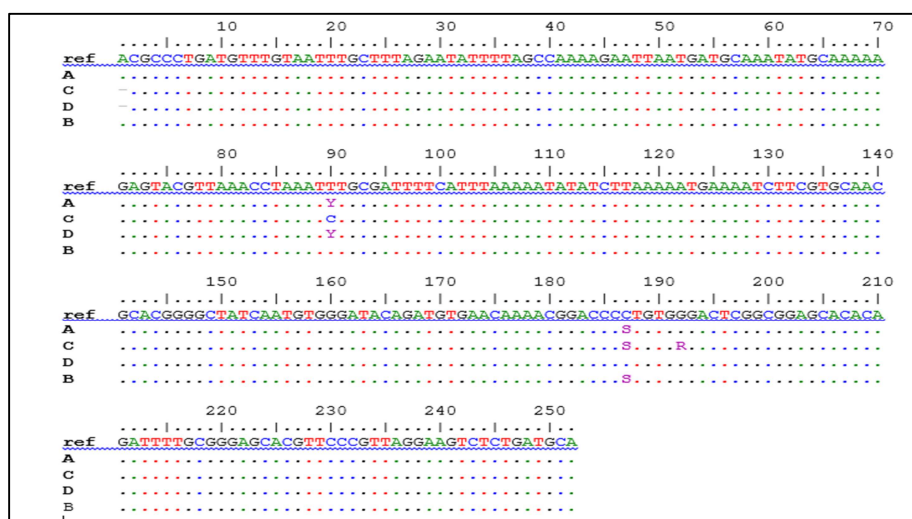


Fig. 5. Alignment of sequence of amplified fragment from upstream region of leptin gene with reference sequence. Ref: sequence of interested fragment from gene bank (AC_000161.1). R: nucleotides A and G, S: nucleotide C and G, Y: C and T

شکل ۵- هم‌ترازی توالی قطعه تکثیر شده از ناحیه بالادست ژن لپتین با توالی رفرنس. Ref: توالی قطعه مورد نظر برگرفته از بانک ژنی (AC_000161.1). R: نوکلئوتیدهای A و G، S: نوکلئوتیدهای C و G، Y: نوکلئوتیدهای C و T

جدول ۳- موتیف‌های شناسایی شده در توالی بالادست ژن SIGLEC5 در گاوهای هلشتاین

Table 3. motifs identified in upstream sequence of SIGLEC5 gene in Holstein cattle

Motif name	Motif sequence	Start site	Stop site
alpha_INF.2	AARKGA	87	92
bHLH_CS	CANNTG	70	75
c_Myb_CS	CMGTTR	147	152
CK_8_mer	AANCCAAA	131	138
gamma_IRE_CS	CWKKANNY	7	14
gamma_IRE_CS	CWKKANNY	191	198
GATA_1_CS	WGATAR	139	144
GMCSF_CS	CATTW	290	294
LBP_1_RS	WCTRG	238	242
LBP_1_RS	WCTRG	275	279
malT_CS	GGAKGA	17	22
NF_E1_CS2	GATAAG	140	145
NF_IL6_CS	TKNNGNAAK	82	90
TATA_box_CS	TATAWAW	31	37
TCF_1_CS	MAMAG	43	47
TCF_1_CS	MAMAG	57	61
TCF_1_CS	MAMAG	136	140
W_element_CS	WGNAMCYK	8	15
W_element_CS	WGNAMCYK	92	99
ZESTE_CS	YGAGYC	2	7

جدول ۴- موتیف‌های موجود در توالی بالادست ژن لپتین در گاوهای هلشتاین

Table 4. motifs identified in upstream sequence of leptin gene in Holstein cattle

Motif name	Motif sequence	Start site	Stop site
alpha_INF.2	AARKGA	119	124
bHLH_CS	CANNTG	164	169
c_Myb_CS	CMGTTR	230	235
E2A_CS	RCAGNTG	163	169
GMCSF_CS	CATTW	99	103
HNF_5_CS	TRTTTGY	9	15
Oct_R_CS	ATGCAAAY	53	60
PEA3_CS	AGGAAR	235	240
TCF_1_CS	MAMAG	40	44
TCF_1_CS	MAMAG	66	70
TCF_1_CS	MAMAG	206	210

جدول ۵- مقایسه میانگین الگوهای باندی جایگاه بالادست ژن لپتین برای صفت چربی شیر در گاو هلشتاین

Table 5. Means comparison of banding patterns of upstream regions of milk fat percentage in Holstein cattle

Banding pattern	Milk lipid (%)
A	4.31 ^{a*}
C	3.51 ^{ab}
B	3.05 ^b
D	2.81 ^b
P-value	0.016
SEM	0.17

*Means with same letter don't have significant difference.

جدول ۶- مقایسه میانگین تولید شیر روزانه گاوهای هلشتاین در ماه‌های مختلف

Table 6. Means comparison of daily milk yield of Holstein cows in different months

Month	Milk (kg)	Month	Milk (kg)
January	26.75 ^{abcd*}	July	13.6 ^d
February	27.66 ^{abc}	August	28.72 ^{abc}
March	23.66 ^{bcd}	September	28.9 ^{abc}
April	38.9 ^a	October	31.6 ^{ab}
May	21.18 ^{bcd}	November	16.8 ^{cd}
June	32 ^{ab}	December	28.48 ^{abc}
SEM		0.96	
P-value		0.001	

*Means with the same letters in each column don't have significant differences.

بحث

در این جایگاه با توالی رفرنس موجود در بانک ژن وجود چهار جهش تک نوکلئوتیدی (SNP) را در توالی بالادست ژن SIGLRC5 در گاوهای هلشتاین مازندران نشان داد که در توالی ژن رفرنس وجود نداشت. این تفاوت می تواند به دلیل تفاوت نژادی یا تفاوت در اقلیم پرورش این نژاد باشد. نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های پیشین در تضاد بود. در پژوهشی مشخص شد که جهش Ss86324977 در جایگاه 57125868 bp کروموزوم ۱۸ گاو بیشترین آثار را بر آسان-زایی گوساله، عمق بدن و عرض کپل داشته است. تجزیه و تحلیل نتایج این پژوهش نشان داد که SNP واقع بر اینترون ژن SIGLEC5 به طور معنی‌داری صفات تولیدمثلی گاو را تحت تاثیر قرار می دهد (Cole *et al.*, 2009). در قطعه تکثیر شده از ناحیه بالادست ژن SIGLEC5 در گاوهای هلشتاین مازندران تعداد ۱۵ موتیف مختلف شناسایی شد که بیشترین فراوانی مربوط به موتیف TCF_1_CS بود. ناحیه تنظیمی بالادست در گونه‌های یوکاریوتی حاوی موتیف‌های تنظیمی متعددی هستند که برای کنترل رونویسی ژن‌ها ضروری هستند. شواهد زیادی نشان می‌دهند که تغییر در این موتیف می‌تواند به طور بحرانی فعالیت‌های تنظیمی بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد. موتیف‌های DNA اهمیت زیادی در تجزیه و تحلیل تنظیم بیان ژن دارند. این موتیف‌ها توالی‌های کوتاهی از DNA با الگوی تکرار شونده هستند که دارای عملکرد زیستی هستند. اغلب این موتیف-ها، جایگاه‌های اتصال اختصاصی پروتئین‌هایی از قبیل نوکلئازها و عوامل رونویسی هستند. برخی از آن‌ها نیز در فرآیندهای مهم در سطح RNA از جمله اتصال به ریبوزوم، فرآیند mRNA (اسپلیسینگ، ویرایش، پلی آدنیلاسیون) و

در پژوهش حاضر دو قطعه با طول‌های ۲۲۵ و ۴۰۶ جفت بازی از ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های لپتین و SIGLEC5 با موفقیت به وسیله PCR در گاوهای هلشتاین مازندران تکثیر شد. جایگاه SIGLEC5 به عنوان یک ژن کاندید در ارتباط با صفات مهم اقتصادی در گاو هلشتاین برای اولین بار در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. ژن SIGLEC5 روی کروموزوم ۱۸ گاو قرار گرفته است. این کروموزوم از دیدگاه اصلاح نژادگران گاو شیری، کروموزوم مهمی به شمار می‌رود چرا که نشان داده شده است که ژن‌های قرار گرفته روی کروموزوم ۱۸ گاو نقش مهمی در کنترل صفات تولیدمثلی در گاو هلشتاین ایفا می‌کنند (Cole *et al.*, 2009; Lawlor *et al.*, 2014). تجزیه و تحلیل گستره کامل ژنومی برای ردیابی QTL‌های موثر بر صفات تولیدمثلی در گاو هلشتاین نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین ده صفت مهم تولیدمثلی و جهش‌های موجود در کروموزوم ۱۸ گاو هلشتاین وجود دارد (Muller *et al.*, 2017). در طول دهه گذشته کاهش شگفت‌انگیزی در عملکرد تولیدمثلی گاو هلشتاین رخ داده و مشکلات باروری این نژاد دلیل اصلی حذف گاوها از گله‌ها بوده است، به طوری که حذف حیوانات دارای ارزش اصلاحی بالا اما دارای مشکلات تولیدمثلی زیان اقتصادی هنگفتی را به این صنعت وارد نموده است. بنابراین مطالعات مولکولی در ارتباط با نقش صفات کاندیدا در عملکرد تولیدمثلی و تولیدی گاو هلشتاین از اهمیت بسزایی برخوردار است. در پژوهش حاضر، در نمونه‌های مورد مطالعه چندشکلی برای ناحیه بالادست ژن SIGLEC5 در گاوهای هلشتاین مازندران مشاهده نشد، اما مقایسه تولی تکثیر شده

خاتمه رونویسی درگیر هستند. امروزه تعداد موتیف‌های شناسایی شده در ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌ها بیش از تعداد پروتئین‌های تنظیمی شناخته شده است. بنابراین نقش دقیق بسیاری از این موتیف‌ها و پروتئین‌های متصل-شونده به آن‌ها هنوز شناخته شده نیستند (D'haeseleer, 2006). بنابراین با توجه با یافته‌های اخیر در ارتباط با اهمیت و نقش SIGLECها در تولیدمثل گاو و با توجه با اینکه این پژوهش برای اولین بار انجام شد، مطالعات بعدی روی سایر نواحی این ژن از جمله اگزون و اینترون‌ها در ارتباط با صفات تولیدمثلی و تولیدی در گاو پیشنهاد می-شود.

در پژوهش حاضر ناحیه تنظیمی بالادست ژن لپتین در گاوهای هلشتاین مازندران چندشکلی نشان داد به طوری که چهار الگوی باندی A، B، C و D مشاهده شد که بیشترین فراوانی باندی مشاهده شده برای الگوی B (۰/۳۶) و کمترین فراوانی متعلق به الگوی باندی D (۰/۱۷) بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین الگوهای باندی ناحیه بالادست ژن لپتین و صفت چربی شیر ارتباط وجود دارد، به طوری که الگوی باندی A بیشترین چربی شیر و الگوی باندی D کمترین چربی شیر را دارا بودند. لپتین که ژن چاقی نیز نامیده می‌شود در انواع بافت‌ها بیان می‌شود ولی محل اصلی بیان آن، بافت چربی سفید است. در یک مطالعه، ارتباط سه SNP 1127T، C1180T و C3100T با صفات کیفیت گوشت و لاشه در گوساله پرواری نژاد کره-ای مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که حیوانات با ژنوتیپ CC چربی پشت بیشتری نسبت به ژنوتیپ TT و درجه ماربلینگ بیشتری نسبت به دو ژنوتیپ CT و TT داشته اند (Shin et al., 2007). همچنین ارتباط معنی‌دار چندشکلی‌های ژن لپتین با تولید شیر ۳۰۵ روزه گزارش شده است (Moussavi et al., 2006). در پژوهش دیگری نیز ارتباط بین چندشکلی G-2548A ناحیه پرموتر لپتین را با چاقی در انسان و شاخص توده بدنی گزارش کرده‌اند (Hinuy et al., 2008).

در پژوهش حاضر همچنین بین الگوهای باندی ناحیه بالادست ژن لپتین و صفت وضعیت زایش ارتباط معنی‌دار

مشاهده شد، به طوری که الگوی باندی D دارای بهترین وضعیت زایش بود (طبیعی)، در حالی که سایر الگوهای باندی در مواردی دارای سقط جنین یا مرده‌زایی بودند. تاکنون در توافق با یافته‌های پژوهش حاضر در مورد تاثیر چندشکلی‌های ژن لپتین بر صفات تولیدمثلی در گاو هلشتاین گزارش‌هایی وجود داشته است. نشان داده شده است که چندشکلی‌های RFLP ژن لپتین با صفات تولیدمثلی در ارتباط است، به طوری که افراد دارای ژنوتیپ RFLP- AB در صفات زمان اولین تلقیح تا آبستنی و روزهای باز عملکرد بهتری داشته‌اند (Moussavi et al., 2006). همچنین با مطالعه تعداد ۵۰۹ راس تلیسه هلشتاین فریزین از ۱۹ واحد تولید شیر بریتانیا نشان داده شد که چندشکلی‌های لپتین ارتباط معنی‌داری با صفات باروری دارند، به طوری که حیوانات با ژنوتیپ هموزیگوت TT برای چندشکلی UASMS1 باروری بهتر و فاصله زایش کوتاه‌تری نسبت به هتروزیگوت‌های CT داشتند. علاوه بر این، چندشکلی A1457G به طور قابل توجهی با تعداد تلقیح به ازای آبستنی در اولین زایش تلیسه‌ها مرتبط بوده و هموزیگوت‌های GG به میزان ۱۳ درصد به تلقیح کمتر نسبت به حیوانات AG نیاز داشتند (Clempton et al., 2011).

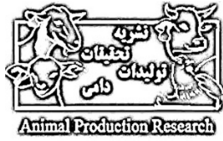
نتیجه‌گیری کلی

در پژوهش حاضر ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های لپتین و SIGLEC5 در ارتباط با صفات تولیدی و تولیدمثلی در گاو هلشتاین مورد بررسی قرار گرفتند. جایگاه ژنی SIGLEC5 در این پژوهش یک شکل بود، اما چهار الگوی باندی A، B، C و D در جایگاه بالادست لپتین مشاهده شد که بیشترین فراوانی باندی مشاهده شده برای الگوی B (۰/۳۶) و کمترین فراوانی متعلق به الگوی باندی D (۰/۱۷) بود. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین الگوهای باندی ناحیه بالادست ژن لپتین و صفات چربی شیر و وضعیت زایش وجود دارد، به طوری که الگوی باندی A بیشترین چربی شیر و الگوی باندی D کمترین چربی شیر و بهترین وضعیت زایش را دارا بودند.

فهرست منابع

- Angata T., Margulies E. H., Green E. D. and Varki A. 2004. Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36): 13251-13256.
- Avril T., Freeman S. D., Attrill H., Clarke R. G. and Crocker P. R. 2005. Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20): 19843-19851.
- Clempson A. M., Pollott G. E., Brickell J. S., Bourne N. E., Munce N. and Wathes D. C. 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 94(7): 3618-3628.
- Cole J. B., VanRaden P. M., O'Connell J. R., Van Tassell C. P., Sonstegard T. S., Schnabel R. D. and Wiggans G. R. 2009. Distribution and location of genetic effects for dairy traits. *Journal of Dairy Science*, 92(6): 2931-2946.
- Connolly N. P., Jones M. and Watt S. M. 2002. Human Siglec-5: tissue distribution, novel isoforms and domain specificities for sialic acid-dependent ligand interactions. *British Journal of Hematology*, 119(1): 221-238.
- Crocker P. R., Paulson J. C. and Varki A. 2007. Siglecs and their roles in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 7(4): 255-266.
- D'haeseleer P. 2006. What are DNA sequence motifs? *Nature Biotechnology*, 24:423-425.
- Elmac C., Sahin S. and Oner Y. 2013. Distribution of different alleles of aromatase cytochrome P450 (CYP19) and melatonin receptor 1A (MTRN1A) genes among native Turkish sheep breeds. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 19: 929-933.
- Hinuy H. M., Hirata M. H., Forti N., Diament J., Sampaio M. F., Armaganijan D. and Hirata R. D. 2008. Leptin G-2548A promoter polymorphism is associated with increased plasma leptin and BMI in Brazilian women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia*, 52(4): 611-616.
- Lawlor T. J., VanRaden P.M., Null D., Levissee J. and Dorhorst B. 2014. Using haplotypes to unravel the inheritance of Holstein coat color. *Proceeding of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*.
- Leblanc S. J. 2013. Is a high level of milk production compatible with good reproductive performance in dairy cows? *Animal Frontiers*, 3 (4): 84-91.
- Magni P., Motta M. and Martini L. 2000. Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regulatory Peptides*, 92(1): 51-56.
- Mason M. M., He Y., Chen H., Quon M. J. and Reitman M. 1998. Regulation of Leptin Promoter Function by Sp1, C/EBP, and a Novel Factor 1. *Endocrinology*, 139(3): 1013-1022.
- Melzner I., Scott V., Dorsch K., Fischer P., Wabitsch M., Brüderlein S. and Möller P. 2002. Leptin gene expression in human preadipocytes is switched on by maturation-induced demethylation of distinct CpGs in its proximal promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47): 45420-45427.
- Miller S. G., De Vos P., Guerre-Millo M., Wong K., Hermann T., Staels B. and Auwerx J. 1996. The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11): 5507-5511.
- Mounzih K., Qiu J., Ewart-Toland A. and Chehab F. F. 1998. Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology*, 139(12): 5259-5262.
- Moussavi A. H., Ahouei M., Nassiry M. R. and Javadmanesh A. 2006. Association of leptin polymorphism with production, reproduction and plasma glucose level in Iranian Holstein Cows. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(5): 627-631.
- Muller M. P., Rothammer S., Seichter D., Russ I., Hinrichs D., Tetens J., Thaller G. and Medugorac I. 2017. Genome-wide mapping of 10 calving and fertility traits in Holstein dairy cattle with special regard to chromosome 18. *Journal of Dairy Science*, 100(3): 1987-2006.
- Patel N., Brinkman-Van der Linden E. C., Altmann S. W., Gish K., Balasubramanian S., Timans J. C. and Kastelein R. A. 1999. OB-BP1/Siglec-6 a leptin-and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32): 22729-22738.
- Shin S. C. and Chung E. R. 2007. Association of SNP marker in the leptin gene with carcass and meat quality traits in Korean cattle. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(1): 1-6.

- Varki A. 2009. Natural ligands for CD33-related Siglecs? *Glycobiology*, 19(8): 810-812.
- Yoon D. H., Cho B. H., Park B. L., Choi Y. H., Cheong H. S. and Lee H. K. 2005. Highly Polymorphic Bovine Leptin Gene. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(11): 1548-1551.
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L. and Friedman J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505): 425-432.



Research paper

Molecular and bioinformatics analysis of regulatory upstream region of leptin and SIGLEC5 genes in association with production and reproduction traits in Holstein cattle

M. Hoseinpour Kol-Mahaleh¹, A. Farhadi^{2*}, Gh. Rahimi Mianji³, M. Gholizadeh²

1. MSc. Graduated in Animal Breeding and Genetics, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3. Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: 26-05-2018 – Accepted: 04-02-2019)

Abstract

The aim of this study was the molecular and bioinformatics analysis of regulatory upstream region of leptin and SIGLEC5 genes in association with production and reproduction traits in Holstein cattle. For this purpose, 300 blood samples were collected randomly and DNA was extracted. Two fragments of 251 and 406 bp from regulatory upstream regions of leptin and SIGLEC5 genes were amplified by PCR and genotyping was done by SSCP method. One sample from each banding pattern was sequenced and bioinformatics analysis were done by BioEdit and DNASIS MAX softwares. The SIGLEC5 locus was monomorphic, whereas, four banding patterns of A, B, C and D with frequencies of 0.25, 0.36, 0.22 and 0.17 were observed in leptin locus, respectively. Statistical analysis showed that leptin gene polymorphism was significantly ($P<0.05$) associated with milk lipid and status of parturition, so that cows with banding pattern A had the highest milk fat and cows with banding pattern D showed lowest milk fat. Also, cows with banding pattern D had the best status of parturition (easy birth) ($P<0.05$). The bioinformatics analysis showed 14 and nine motifs in SIGLEC5 and leptin genes, respectively. Therefore, according to the results of this study, leptin gene can be suggested to improve production and reproduction traits. In addition, complementary studies on other regions of SIGLEC5 gene to find relations between production and reproduction traits in Holstein cattle are highly recommended.

Keywords: Production, Reproduction, Holstein cattle, Leptin, SIGLEC5

*Corresponding author: ayoub_farhadi@ymail.com