تحقیقات تولیدات دامی

سال پنجم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۵ (۷۸-۷۰)

شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن PPP2CA و اثر آن بر صفات لاشه، رشد و ذخیره چربی در گوسفندان لری‌بختیاری و زل

معصومه زارع*[۱]، مصطفی صادقی[۲]، محمد مرادی شهر بابک[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۰)

چکیده

هدف این مطالعه، تعیین چندشکلی‌های ژن PPP2CA در کروموزوم ۵ گوسفند و اثر آن بر صفات لاشه، رشد و ذخیره چربی در گوسفندان لری بختیاری و زل بود. از ۱۴۰ رأس گوسفند زل (اصلاحی یا کشتاری) و ۱۶۵ رأس گوسفند لری‌بختیاری خون‌گیری و استخراج DNA به عمل آمد. سپس قطعه ۲۴۳ جفت بازی از اگزون یک ژن PPP2CA تکثیر و الگوهای مختلف آن توالی‌یابی شد. دو الگوی باندی متفاوت مشاهده شد و نتایج توالی‌یابی وجود دو جهش را نشان داد. در گروه گوسفندان زل اصلاحی و لری‌بختیاری، اثر ژنوتیپ‌های T/T و Del/Del بر صفت وزن از شیرگیری (۳۰/۶۷±۱/۴۶ kg در برابر ۳۰/۶۷ ±۱/۵۲ kg) و کلسترول (۶۰/۷۶±۰/۹۴% در برابر % ۵۴/۲۶ ±۱/۶۵) معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در نژاد لری بختیاری، ژنوتیپ Del/Del به وزن دنبه بیشتری (۵/۲۰±۰/۲۱kg) نسبت به ژنوتیپ T/T (۳/۲۸±۰/۱۲kg) منجر شد (P<۰/۰۵). در زل کشتاری بین اثر ژنوتیپ‌ها بر درصد چربی لاشه و تری‌گلیسرید خون تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که ژنوتیپ T/T درصد چربی لاشه بیشتر (*P*<۰/۰۵) و ژنوتیپ Del/Del تری‌گلیسرید خون بالاتری داشت (*P*<۰/۰۱). بر اساس نتایج این تحقیق، می‌توان انتظار داشت که این ژن در صفات چربی تاثیرگذار بوده و باید در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ژن PPP2CA، گوسفند لری بختیاری، گوسفند زل، صفات رشد، صفات لاشه

* نویسندهٔ مسئول: masumh.zare@alumni.ut.ac.ir

مقدمه

کیفیت لاشه با توزیع گوشت لخم، چربی و استخوان لاشه ارتباط داشته و از طریق انتخاب در جهت دستیابی به لاشه با حداکثر گوشت لخم، حداقل میزان استخوان و سطح مطلوبی از چربی ارتقا می یابد. عوامل متعددی در ذخیره چربی لاشه در گوسفند موثر است که یکی از مهمترین این عوامل نژاد است (Talebi *et al*, 2010). در طی سالیان اخیر تحقیقات مختلفی روی نژادهای دنبه‌دار و بدون دنبه و بررسی چگونگی توارث این صفات انجام شده است (Gokdal *et al*, 2004; Güney *et al*,1990; MacKintosh *et al*, 1990; Moradi *et al*, 2012) با این وجود مناطق ژنومی یا ژن‌های موثر بر این صفت همچنان ناشناخته مانده است. مطالعات اخیر با استفاده از اطلاعات نژادهای زل و لری‌بختیاری و داده‌های پروژه Ovine HapMap و با به‌کارگیری مجموعه‌ای از آماره‌های مختلف، سه منطقه ژنومی مرتبط با ذخیره چربی را گزارش کردند (Moradi *et al*, 2012). بر این اساس یکی از مهمترین مناطق ژنومی در نژادهای دنبه‌دار و بدون دنبه روی کروموزوم ۵ گوسفند گزارش شد و یکی از صفات متمایز کننده این دو نژاد ذخیره چربی در دنبه و اندام احشایی بدن است. بنابراین انتظار می‌رود ژن‌های قرار گرفته در این مناطق با صفت دنبه در ارتباط است. ژن PPP2CA به عنوان یک نشانگر منطقه (chr5: 47149400-47263230) بر روی کروموزوم ۵ گوسفند محسوب می شود که دارای ۷ اگزون و ۶ اینترون و یکی از فسفاتازهای سرین/ترئونین اصلی در سیتوزول سلول‌های یوکاریوتی است. پروتئین فسفاتازهای سرین/ترئونین گروهی از آنزیم‌ها هستند که کاتالیزور حذف گروه‌های فسفات از باقیمانده‌های سرین/ترئونین را از طریق هیدرولیز مونواسترهای اسیدفسفریک انجام می-دهند. ژن PP2A در تکثیر سلولی، توسعه و تنظیم مسیرهای انتقال سیگنال و همچنین در تنظیم مسیرهای متابولیکی، ترجمه، رونویسی و کنترل انتقال از فاز G به تقسیم میتوز در چرخه سلولی نقش دارد. ژن PPP2CA گاو کدکننده زیرواحد کاتالیتکی ایزوفرم آلفای آنزیم فسفاتاز سرین/ ترئونین با ۳۰۹ اسید آمینه است که شامل یک هسته، متشکل از یک زیر واحد کاتالیتیکی ۳۶ kDal همراه با زیر واحد تنظیمی ۶۵ kDal و یک زیر واحد متغیر سوم است (Stone *et al*, MacKintosh *et al*, 1990; 1987). زیر واحد کاتالیتکی حاوی دو ایزوفرم آلفا و بتا هست. ژن PPP2CA ایزوفرم آلفا زیر واحد کاتالیتکی را کد می‌کند و هسته آنزیم PP2A با زیر واحدهای تنظیم کننده متغیر به شکل هولوآنزیم در می‌آید.

هدف از انجام این تحقیق تعیین چند شکلی موجود در جایگاه اگزون ۱ ژن PPP2CA، بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی آن و ارتباط آنها با صفات لاشه و رشد در گوسفندان زل و لری بختیاری بود.

مواد و روش‌ها

دام های مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۶۵ رأس گوسفند نژاد لری‌بختیاری ایستگاه اصلاح نژاد شولی و ۱۱۳ راس گوسفند زل ایستگاه اصلاح نژاد شیرنگ به همراه ۲۷ رأس گوسفند نژاد زل کشتاری بودند. نمونه‌های خون این دام ها با استفاده از ونوجکت‌های دارای EDTA از سیاهرگ وداج خون‌گیری تهیه شد. صفات مورد بررسی شامل وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه، نسبت کلیبر و فاکتورهای خونی به همراه صفات لاشه (ضخامت چربی پشت، وزن لاشه گرم، درصد چربی و پروتئین لاشه) منحصرا در گروه حیوانات کشتاری نژاد زل و برآورد وزن دنبه از روی اندازه ابعاد آن (Vatankhah *et al*, 2006) منحصرا برای گوسفندان لری بختیاری، بود.

استخراج DNA از ۳۰۰ µl خون به روش بهینه شده نمکی انجام شد و نمونه‌های DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) و نیز روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. جهت مطالعه ژن PPP2CA در گوسفند، توالی نوکلئوتیدی آن ژن در گاو از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد. سپس با استفاده از نرم افزار Primer3Plus و OLIGO Primer Analysis در اگزون ۱ قطعه‌ای با ۲۴۳ جفت‌باز شناسایی و آغازگرهای رفت و برگشت آن به شرح زیر طراحی شد.

F: 5'- CCGCCAGTACCCTCACAAAT-3'

R: 5'- CTCCCCCATCCGAGATGTA-3'

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای جایگاه مزبور در حجم کلی ۲۵ µl مطابق جدول ۱ و برنامه حرارتی و زمانی زیر

انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت ۵ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد و انجام ۳۵ چرخه با مرحله واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگرها طی ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط آغازگر طی ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط انتهایی ۵ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد. بعد از انجام PCR، برای اطمینان از صحت تکثیر و تعیین میزان DNA تکثیر شده، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲% انجام شد .

برای تعیین الگوی باندی نمونه‌ها از روش PCR-SSCP استفاده شد. بدین منظور ۴ µl از محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به همراه ۱۲ µl بافر SSCP شامل (۹۸ % فرمامید، EDTA ۱۰mM، ۰/۲۵ درصد بروموفنل بلو و ۰/۲۵ درصد زایلن سیانول) در دمای ۹۸ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۰ دقیقه واسرشته و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد تا از پیوند دوباره رشته‌های مکمل جلوگیری شود. الکتروفورز عمودی با ژل اکریل آمید ۱۲ درصد در دستگاهی با صفحات شیشه‌ای به ابعاد ۱۸ ×۲۰×۰/۱ سانتی متر (Bio Rad) بعد از بارگذاری مخلوط حاصل از PCR و بافر بارگذاری مخصوص SSCP درون چاهک‌های ژل با ولتاژ ۲۰۰ به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت برای ظهور الگوهای باندی از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره (اسیدی) استفاده شد.

پس از الکتروفور به روش SSCP در این جایگاه، دو الگوی باندی متفاوت برای ژن PPP2CA مشاهده شد. از هر الگوی باندی متفاوت، ۵ نمونه از محصول PCR به همراه پرایمرهای رفت و برگشت مطابق با دستوالعمل شرکت بیونیر در کره جنوبی برای انجام توالی‌یابی آماده و ارسال شد. برای جلوگیری از خطای احتمالی عدم خوانش یا خوانش نادرست ابتدایی و انتهایی جایگاه‌های مربوطه توسط دستگاه توالی‌یاب برای همه الگوها از هر دو جهت رفت و برگشت توالی‌یابی انجام شد.

پس از شناسائی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، این اطلاعات به همراه داده‌های مرتبط با صفات کمی لاشه و داده‌های صفات رشد و فاکتورهای خونی با کمک Proc GLM نرم-افزار SAS 9.2 تجزیه و تحلیل شدند. جهت بررسی اثر ژنوتیپ‌ها بر صفات رشد از مدل آماری ۱ و بر وزن دنبه و صفات لاشه از مدل آماری ۲ به صورت زیر استفاده شد:

مدل ۱:

$$\mathbf{Y}_{jklmno} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{year}_i + \mathbf{M}_j + \mathbf{S}_k + \mathbf{J}_l + \mathbf{B}_m + \mathbf{G}_n + \mathbf{b}_1 (\mathbf{D}_{ijklmn} - \mathbf{D}) + \mathbf{b}_2 (\mathbf{BW}_{ijklmn} - \mathbf{BW}) + b_3 (\mathbf{A}_{ijklmn} - \mathbf{A}) + \mathbf{e}_{ijklmnp}$$

مدل ۲:

$$\mathbf{Y}_{ij} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{S}_i + \mathbf{G}_j + \mathbf{b}_1 (\mathbf{BW}_{ij} - \mathbf{BW}) + \mathbf{b}_2 (\mathbf{A}_{ij} - \bar{\mathbf{A}}) + \mathbf{e}_{ijk}$$

در مدل آماری ۱ Y_{jklmno}، هر یک از مشاهدات مربوط به وزن تولد، وزن شیرگیری، افزایش وزن روزانه از تولد تا شیرگیری و شاخص کلیبر، $year_i$، اثر (i) اُمین سال تولد حیوان، M_j، اثر (j) اُمین ماه تولد حیوان، S_k، اثر (k) اُمین تعداد بره متولد شده در هر زایش، J_l، اثر (l) اُمین جنس حیوان، B_m، اثر (m) اُمین نژاد، G_n، اثر (n) اُمین ژنوتیپ، b_1، ضریب رگرسیون مشاهدات به D (سن مادر)، b_2، ضریب رگرسیون مشاهدات به BW (وزن تولد یا وزن از شیرگیری و b_3، ضریب رگرسیون مشاهدات به A (سن حیوان) است. وزن تولد و وزن از شیرگیری، به عنوان متغیر کمکی به ترتیب برای صفات وزن از شیرگیری و سرعت رشد روزانه هستند.

جدول ۱- مواد و مقادیر مورد نیاز برای انجام واکنش PCR

Table1: Materials and required quantities for a PCR reaction

Name	Volume (µl)	Concentration
DNA	2	200 ng
Taq Polymerase	0.2	1.5 Unit
Primer (Forward)	2	0.4 m M
Primer (Reverse)	2	0.4mM
dNTP	0.75	0.2 mM
$MgCl_2$	0.75	1.5 mM
PCR buffer	2.5	1X
dH2O	14.8	-

در مدل آماری ۲ Y_{ij}، مشاهدات مربوط به صفات وزن دنبه و صفات کمی لاشه، **µ**، میانگین صفت در جامعه، A_i، اثر (i) اُمین جنس حیوان، G_j، اثر (j) اُمین ژنوتیپ حیوان، b_1، ضریب رگرسیون مشاهدات به وزن از شیر گیری، b_2، ضریب رگرسیون مشاهدات به A (سن حیوان) و e در هر دو مدل اثر عوامل باقیمانده هستند.

نتایج

نتایج SSCP دو الگوی باندی متفاوت برای ژن PPP2CA نشان داد که برای هر دو نژاد گوسفند مشابه بود (شکل ۱). توالی‌یابی نیز نشان داد که توالی نوکلئوتیدی این الگوها متفاوت است و هر الگو نشان-دهنده یک ژنوتیپ است. به عبارتی دیگر این مطالعه بر روی یک قطعه ۲۴۳ جفت‌بازی ژن PPP2CA از نوکلئوتید ۲۵۴-۱۲ (مطابق با AC_000164.1) که شامل اگزون‌یک این ژن و قبل (5'UTR) و بعد آن هست، انجام شد. از آنجایی که این ژن هنوز در گوسفند ثبت و گزارش نشده بود، بنابراین توالی‌های موردنظر با توالی موجود از ژنوم گاو در بانک اطلاعاتی NCBI (AC_000164.1) توسط نرم‌افزار BioEdit و Vector NT1 مورد مقایسه قرار گرفتند و نتایج حاصل از همترازی با ژنوم گاو یک جهش با تغییر T/C و جهش حذفی یک نوکلئوتیدی T در الگوی شماره دو را نشان داد. جهش شماره یک بین نمونه‌های بدست آمده از توالی گوسفند تفاوتی نشان نداد، ولی در مقایسه با توالی گاو در نوکلئوتید ۱۹۸ (با شماره دسترسی AC_000164.1)، یک جهش با جایگزینی نوکلئوتید T در گاو با نوکلئوتید C گوسفند وجود داشت و باعث تغییر نوکلئوتید سوم کدون سرین از TCT به TCC (کدون ۲۴ از بانک اطلاعاتی NCBI (NP_851374.1))، شد. به عبارتی تغییر اسیدآمینه‌ای در دو تا توالی مشاهده نشد و در هر دو اسیدآمینه سرین بود. اما جهش حذفی در نوکلئوتید ۲۱۰ رخ داده است و از آنجایی که جهش تغییر چارچوب که با اولین کدون پایان مواجه می‌شوند توالی را تغییر داده و پلی‌پپتید در حال تولید غیر طبیعی کوتاه و یا غیر طبیعی طولانی، و احتمالاً نمی‌تواند عملکردی داشته باشد، از آنجایی که این جهش در اگزون یک ژن PPP2CA در گوسفند رخ داد و دارای ۳۴ کدون اسید آمینه، که پروتئین تولید شده به طور غیر طبیعی کوتاه و احتمالاً قادر به عملکرد نیست. تاکنون هیچ جهشی از ژن PPP2CA در گوسفند، گاو و حیوانات مزرعه‌ای گزارش نشده است و این تحقیق اولین مطالعه چندشکلی این ژن است.

همانطور که در بالا اشاره شد در بررسی نتایج توالی‌یابی با AC_000164.1 در بانک اطلاعاتی NCBI در الگوی شماره دو یک جهش حذفی در نوکلئوتید ۲۱۰ شناسایی شد که بعد از بررسی توالی دو ژنوتیپ T/T و Del / Del در نمونه‌ها مشاهده شد. فراوانی آللی در جمعیت‌های مورد مطالعه در جدول ۲ نشان می‌دهد که آلل T فراوانی بیشتری دارد.

Figure 1: PCR-SSCP genotypes of complete exon 1 of the PPP2CA gene in Lori-Bakhtiari and Zel sheep.

شکل ۱- الگوهای ژنوتیپی PCR-SSCP برای اگزون ۱ ژن PPP2CA در گوسفندان لری بختیاری و زل.

جدول ۲-فراوانی آللی برآورد شده در گوسفندان لری بختیاری و زل

Table 2: Estimated allele frequencies in Lori-Bakhtiari and Zel sheep

Breeds	Del	T
Lori-Bakhtiari	0.268	0.732
Zel	0.412	0.589
Slaughtered Zel	0.280	0.720

T and Del are synonymous and Indels mutations, respectively.

جدول۳- فراوانی ژنوتیپی برآورد شده در گوسفندان لری بختیاری و زل

Table 3: Estimated genotype frequencies in Lori-Bakhtiari and Zel sheep.

Breeds	Del/Del	T/T
Lori-Bakhtiari	0.26	0.74
Zel	0.30	0.70
Slaughtered Zel	0.36	0.64

T and Del are synonymous and Indels mutations, respectively.

جدول ۴- اثر ژنوتیپ‌های اگزون یک PPP2CA بر صفات رشد در گوسفندان لری بختیاری و زل

Table 4. Effect of the PPP2CA exon 1 genotypes on growth traits in Lori-Bakhtiari and Zel sheep (Mean ± S.E.)

Traits	T/T	Del/ Del
Birth weight(kg)^{ns}	4.36±0.27	4.49±0.28
Weaning weigh(kg)**	27.79±1.48^{a}	30.67±1.57^{b}
Daily gain (g/d)^{ns}	255.83±9.17	251.67±10.40
Kleiber ratio ^{ns}	19.97±0.59	19.93±0.62
Triglyceride ^{ns}	28.79±0.70	30.69±1.28
Cholesterol**	60.76±0.94^{a}	54.26±1.65^{b}

T and Del are synonymous and Indels mutations, respectively.

$^{a-c}$ Means within the same row indicated by different letters are significantly different.

ns stands for non-significant effects.

*,** are significant effects at the level of 5% and 1%, respectively.

فراوانی‌های ژنوتیپی این جایگاه از ژن PPP2CA به تفکیک برای هر یک از جمعیت‌های زل و لری بختیاری در جدول۳ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود ژنوتیپ T/T دارای فراوانی بیشتر است.

اثر ژنوتیپ‌های جایگاه اگزون یک ژن PPP2CA بر صفات رشد در نژادهای زل اصلاحی و لری بختیاری در جدول ۴ نشان داده شده است. اثر این جایگاه بر صفت وزن از شیرگیری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱) و ژنوتیپ Del/Del به وزن بیشتری نسبت به ژنوتیپ دیگر منجر شد (۳۰/۶۷± ۱/۵۷ kg در برابر ۲۷/۷۹ ±۱/۴۸ kg). اثر ژنوتیپ بر میزان کلسترول خون معنی‌دار بود (P<۰/۰۱) و ژنوتیپ T/T میانگین حداقل مربعات بیشتری نسبت به ژنوتیپ دیگر داشت (۶۰/۷۶±۰/۹۴% در برابر ۵۴/۲۶ ±۱/۶۵ %).

بررسی اثر ژنوتیپ‌های جایگاه اگزون یک ژن PPP2CA بر صفات مختلف در نژاد زل کشتاری (جدول ۵) نشان داد که برای درصد چربی لاشه و تری‌گلیسرید خون بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد، به طوری که ژنوتیپ T/T درصد چربی لاشه بیشتر (P<۰/۰۵) و ژنوتیپ Del/Del تری‌گلیسرید خون بالاتری داشت (P<۰/۰۱).

نتایج ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفت وزن دنبه در نژاد لری بختیاری نشان می‌دهد که جایگاه اگزون یک این ژن اثر معنی‌داری بر وزن دنبه داشته است، به‌طوریکه ژنوتیپ Del/Del وزن دنبه (۵/۲۰±۰/۲۱kg) بیشتری در مقابل ژنوتیپ TT (۳/۲۸±۰/۱۲kg) دارد.

بحث

عوامل متعددی در ذخیره چربی‌های لاشه در گوسفند موثرند که یکی از مهمترین این عوامل نژاد است (Talebi *et al*, 2010). با توجه به این که ژن PPP2CA به عنوان ژن کاندید در ذخیره چربی شناخته شده است (Moradi *et al*, 2012) انتظار می‌رفت که ژنوتیپ‌های مشخص شده و چندشکلی‌های موجود در ناحیه تکثیر شده از این ژن بر روی صفات مورد بررسی خصوصاً صفات لاشه و دنبه تاثیر بسزایی داشته باشد. بررسی جایگاه‌های صفات کمی گزارش شده در مناطق اروتولوگوس در گاوهای شیری، گوشتی و همچنین منطقه کروموزوم ۵ گوسفند با جایگاه‌های صفات کمی گزارش شده برای صفات مرتبط با چربی و کیفیت لاشه همپوشانی دارد.

در مطالعات مختلف یک جایگاه صفات کمی مرتبط با ضخامت چربی پشت، روی کروموزوم ۷ در فاصله ۵۵CM (Casas *et al*, 2003) و در گاو آنگوس در فاصله CM ۱۰۱/۱ و ۸۵/۳۲CM کروموزوم ۷ گاو (McClure *et al*, 2010) و همچنین یک جایگاه صفات کمی در فاصله ۴/۲CM کروموزم ۷ گاوی مرتبط با صفات رشد و لاشه در نژاد آنگوس و براهما (Imumorin *et al*, 2011) گزارش شد. محققین همچنین وجود یک جایگاه صفات کمی در فاصله ۱۲CM کروموزم ۵ با نماد FA-C16:1 را در گوسفند سرسیاه اسکاتلندی شناسایی کردند (Karamichou *et al*, 2006) و این بررسی اولین گزارش از تشخیص جایگاه‌های صفات کمی اصلی موثر بر ترکیب اسید چرب لاشه گوسفند بود.

از مکانیسم‌های تایید کننده این موضوع، که ژن PPP2CA به عنوان یک ژن کاندیدا در جهت ذخیره چربی است، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد. با توجه به

اینکه یکی از مهترین فسفاتازها که در سلول‌های هدف انسولینی وجود دارد پروتئین فسفاتاز 2A (PPP2CA) است،

افزایش اسید چرب پلاسما باعث افزایش بیان پروتئین فسفاتاز 2A می‌شود (Reaven *et al*, 1988). افزایش بیان آن منجر به افزایش دفسفریلاسیون تیروزین گیرنده انسولین و سوبسترای گیرنده انسولین شده که در نتیجه پیام‌رسانی فرودست انسولین کاهش می‌یابد. کاهش پیام رسانی انسولین در نهایت منجر به کاهش فعال سازی PKB (یا AKT) شده که نقش مهمی در برداشت گلوکز ایفا می‌نماید. از طرفی دیگر دو عامل نسخه‌برداری بنام پروتئین FoxA2 و FoxO1 در مسیر گلوکونئوژنز نقش دارند. این دو پروتئین توسط آنزیم کیناز Akt/ PKB که خود توسط انسولین تحریک می‌شود، تنظیم منفی می-شوند. همچنین آنزیم گلیکوژن سنتتاز توسط Akt/ PKB مهار می‌شود، در نهایت همه این عوامل باعث افزایش گلوکز می‌شود. از طرفی دیگر آنزیم aPKC که توسط انسولین تحریک می‌شود باعث افزایش serbp1c و آن هم به نوبه خود موجب افزایش لیپوژنز می‌شود (*et al*, 2001 Hakan ؛ Rosanna). از انجایی که وجود آنزیم کیناز Akt/PKB برای تجمع چربی در کبد ضروری است (Barbara *et al*, 2009). محققین این سیستم را به عنوان کلید تعیین کننده‌ی مقدار تری‌گلسیرید کبدی معرفی کردند که در حقیقت نمایانگر افزایش چربی است. علاوه بر این، پیام رسانی انسولین برای افزایش متابولیسم چربی ضروری است. مهمترین اسید چرب آزاد موجود در پلاسما پالمیتات است. مطالعات حیوانی و آزمایشگاهی نشان داده‌اند که پالمیتات در بافت‌های هدف انسولین منجر به مقاومت به انسولین در عضله اسکلتی می‌شود.

از نگاهی دیگر به این مکانیسم‌های مرتبط با ذخیره چربی می‌توان گفت که پروتئین کیناز وابسته به cAMP باعث فسفریله شدن اسیدآمینه سرین در جایگاه تنظیمی لیپاز حساس به هورمون می‌شود (Strilfors *et al*, 1984) که با افزایش همزمان در فعالیت لیپاز همراه است. جایگاه فسفوریلاسیون تنظیمی لیپاز حساس به هورمون توسط پروتئین فسفاتاز-1، A2 و C2 دفسفریله می‌شود، که پروتئین فسفاتاز A2، فسفاتاز غالب لیپاز در بافت چربی خواهد بود.

جدول۵- ارتباط بین ژنوتیپ‌های اگزون یک PPP2CA بر صفات کمی لاشه در گوسفندان زل کشتار شده

Table 5. Association of the PPP2CA genotypes with carcass traits in Zel Slaughter sheep (Mean ± S.E.).

Traits	T/T	Del/ Del
Eye muscle cross-sectional area (cm) ^{ns}	14.96 ± 0.75	14.47 ±0.76
Live weight (kg) ns	36.24 ±0.78	35.82 ± 1.17
Hot carcass weight (kg) ^{ns}	15.49 ± 0.45	15.42 ± 0.67
Carcass (%)^{ns}	42.97 ±0.27	43.12 ±0.39
Back fat thickness (mm) ^{ns}	2.59 ±0.21	3.15 ±0.32
Fat carcass (%) *	3.76±0.30^{a}	2.44 ± 0.41^{b}
Protein carcass (%) ^{ns}	20.28 ±0.24	20.22 ±0.33
Cholesterol (%) ns	92.83 ±3.49	63.99± 4.39
Triglyceride (%) **	29.65 ± 2.76^{a}	43.97 ± 3.68^{b}
LDL (%)^{ns}	31.30 ± 2.93	26.25 ± 2.68
HDL (%)^{ns}	27.09 ± 1.96	31.72 ± 2.48

T and Del are synonymous and Indels mutations, respectively.

$^{a-c}$ Means within the same row indicated by different letters are significantly different.

^{ns} stands for non-significant effects.

*,** are significant effects at the level of 5% and 1%, respectively.

انسولین با فعال ساختن پروتئین فسفاتاز *A2*، آن هم به نوبه خود موجب دفسفریله کردن جایگاه فسفوریلاسیون تنظیمی لیپاز حساس به هورمون از فعالیت آنزیم لیپاز جلوگیری می‌کند و در نهایت باعث افزایش ذخیره چربی می‌شود (Gokdal *et al*, 2004). بنابراین می‌توان نقش این ژن را در لیپوژنز و مرتبط با ذخیره چربی گزارش کرد.

نتیجه‌گیری کلی

این مقاله نخستین گزارش از چندشکلی ژن PPP2CA در نژادهای بومی گوسفندان ایران بود. بررسی اثر ژنوتیپ-های ناحیه تکثیر شده از این ژن بر صفات رشد و لاشه در نژادهای مورد بررسی نشان داد که بر وزن از شیرگیری و کلسترول خون اثر معنی‌داری دارند. به علاوه اثر این جایگاه بر صفت وزن دنبه در نژاد لری‌بختیاری نیز معنی-دار بود. بررسی اثر دو ژنوتیپ جایگاه مورد بررسی در ژن PPP2CA با صفات مختلف در نژاد زل نشان داد ژنوتیپ T/T و Del/Del به‌ترتیب در افزایش درصد چربی لاشه و تری‌گلیسرید خون نقش دارند. بر اساس نتایج این تحقیق، می‌توان انتظار داشت که این ژن در صفات چربی تاثیرگذار بوده و باید در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقایان اصغر بزار پریخانی، حمیدرضا امینی، مهدی ایمانی و امیرحسین سبحانی در گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران تشکر می نمایند

فهرست منابع

Barbara R. 2009. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. The Journal of Clinical Investigation. 119:1745–1754.

Barford D. 1996. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. Trends in Biochemical Sciences. 21(11): 407-412.

Casas E., Shackelford S.D., Keele J.W., Koohmaraie M., Smith T.P. and Stone R.T. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. U.S. Animal Research, USDA, 81(12):2976-83.

Galbo T., Olsen G.S., Quistorff B. and Nishimura E. 2011. Free fatty acid-induced PP2A hyperactivity selectively impairs hepatic insulin action on glucose metabolism. PLoS ONE 6(11): e27424. doi:10.1371/ journal. pone.0027424.

Gokdal O., Ulker H., Karakus F., Cengiz F., Temur C. and Handil H. 2004. Growth, feedlot performance and carcass characteristise of Karakas and crossbreed lambs (F1) (Ile de France x Akkaraman (G1) x Karakas) under rural farm conditions in Turkey. South African Journal of Animal Science. 34(4):223-232.

Güney O. 1990. Commercial crossbreeding between Ile-de-France, Rambouillet, Chios and local fat-tail Awassi for market lamb production. Small Ruminant Research. 3(6):449–456.

Hakan O., and Per B. 1987. The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-l, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. European Journal of Biochemistry, 168:399-405.

Imumorin I.G., Kim E.H., Lee Y.M., De Koning D.J., van Arendonk J.A., De Donato M., Taylor J.F. and Kim J.J. 2011. Genome scan for parent-of-origin qtl effects on bovine growth and carcass traits. Frontiers in Genetics. 2:44.

Karamichou E., Richardson R.I., Nute G.R., Gibson K.P. and Bishop S.C. 2006. Genetic analyses and quantitative trait loci detection, using a partial genome scan, for intramuscular fatty acid composition in Scottish Blackface sheep. Journal of Animal Science. 84(12):3228-38.

Khaldari M., Kashan N.E., Afzalzadeh A. and Salehi A. 2007. Growth and carcass characteristics of crossbred progeny from lean-tailed and fat-tailed sheep breeds. Journal of Animal Science. 37(1) :51-56.

MacKintosh R.W., Haycox G., Hardie D.G. and Cohen P.T. 1990. Identification by molecular cloning of two cDNA sequences from the plant Brassica napus which are very similar to mammalian protein phosphatases-1 and -2A. FEBS Lett. 276(1-2):156-160.

McClure M.C., Morsci N.S., Schnabel R.D., Kim J.W., Yao P., Rolf M.M., McKay S.D., Gregg S.J., Chapple R.H., Northcutt S.L. and Taylor J.F. 2010 .A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. Animal Sciences. 41(6):597-607.

Moradi M.H., Nejati-Javaremi A., Moradi–Shahrbabak M., Dodds K.G. and Mc Ewan J.C. 2012. Genomic scan of selective sweeps in thin and fat tail sheep dreeds for identifying of candidate regions associated with fat deposition. BMC Genet. 13:10.

Reaven G.M., Hollenbeck C., Jeng C.Y., Wu M.S. and Chen Y.D. 1988. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. Diabetes. 37: 1020–1024.

Rosanna C., Lee C., Trevor J.B., Carsten P. 2001. A role for protein phosphatase 2A–like activity, but not atypical protein kinase C, in the inhibition of protein kinase B/Akt and Glycogen synthesis by palmitate, doi: 10.2337/diabetes.50.10.2210.

Sabite P.C., Schaffner S.F., Fry B., Lohmueller J., Varilly P., Shamovsky O., Palma A., Mikkelsen T.S., Altshuler D. and Lande E.S. 2006. Positive natural selection in the human lhneage. Science. 3129(5780): 1614-1620.

Stone S.R., Hofsteenge J., Hemmings B.A. 1987. Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. Biochemistry. 26(23):7215-20.

Strilfors P., Bjorgell P. and Belfrage P. 1984. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 81(11):3317-21.

Talebi M., Karami M. and Movassasgh H. 2010. Effects of docking and fattening period on performance and carcass physical composition of Lori-Bakhtiri male lambs. Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi). 85: 31-39.

Vatankhah, M., Moradi Shahrbabak, M., Nejati-Javaremi, A., Miraei-Ashtiani, S.R. and Vaez-Torshizi, R. 2006. A study of external fat-tail dimensions and their relationships whit fat-tail weight in Lori-Bakhtiri breed of Sheep. Journal of Science and technology of agriculture and Natural Resources. 445-456.

Animal Production Research

Vol. 5, No. 4, 2017 (70-78)

University of Guilan

Identification of single nucleotide polymorphisms of PPP2CA gene and its effect on carcass, growth and fat storage traits in Lori Bakhtiari and Zel sheep

M. Zare[1*], M. Sadeghi[2], M. Moradi-Shahrbabak[3]

1. M.Sc. gratuated of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran .
2. Associate professor of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Professor of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

(Received: 8-20-2016 – Accepted: 3-10-2017)

Abstract

The purpose of this study was to determine the polymorphism of PPP2CA gene in chromosome 5 of sheep and its effect on carcass, growth and fat storage traits in Lori-Bakhtiari and Zel sheep. Blood samples were collected from 140 Zel sheep (breeding or slaughtering), and 165 Lori-Bakhtiari sheep, and their DNA was extracted. Then, the fragment of 243 bp of exon 1 of PPP2CA gene was amplified of and its various patterns were sequenced. Two different banding patterns were observed and the results of sequencing showed existence of two mutations. Within the group of breeding Zel and Lori-Bakhtiari, the effect of T/T and Del/Del genotypes on weaning weight (27.79±1.46 vs 30.67 ± 1.57) and cholesterol (60.76±0.94 vs 54.26±1.65) was significant (P<0.05). In Lori-Bakhtiari, Del/Del genotype resulted in heavier fat tail (5.20±0.21kg) than T/T genotype (5.20±0.21kg vs 3.28±0.12kg) (P<0.05). In slaughtering Zel, the effect of genotypes on carcass fat percentage and triglyceride was significant, so that the T/T genotype had more carcass fat percentage (P<0.05) and Del/Del genotype had higher triglyceride (P<0.01). On the basis of the results, it is expected that this gene is affective on fat traits and should be considered in breeding programs.

Keywords: PPP2CA gene, Lori-Bakhtiari sheep, Zel sheep, Growth traits, Carcass traits.

*Corresponding author: masumh.zare@alumni.ut.ac.ir