مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۶، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۶
صفحه ۳۵-۲۵

شناسایی چندشکلی ژن‌های آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین در گاومیش بومی استان آذربایجان شرقی

Detection alpha-lactalbumin and β-Lactoglobulin gene Polymorphism in East Azarbaijan province native buffalo using PCR-SSCP

روناک صالحی[۱]، علی هاشمی*[۲]، مختار غفاری[۳]، قربان الیاسی زرین قبایی[۴]
Ronak Salehi[1], Ali Hashemi[2]*, Mokhtar Ghafari[3], Ghorban Elyasi Zaringhabaie [4],

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ۲- دانشیار ۳- استادیار
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۴- گروه پژوهش علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان آذربایجان شرقی

1. MSc. Student 2. Associate Professor 3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran
4. Department of Animal Science, East Azerbaijan Agriculture and Natural Resources Research Centre, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات: a.hashemi50@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۶ - تاریخ پذیرش:۹۶/۵/۲۸)

چکیده

صفات تولید شیر و ترکیبات آن جزو صفات کمی و چندژنی هست و تحت تأثیر تعداد زیادی ژن قرار دارند. این تحقیق به‌منظور شناسایی چندشکلی ژن‌های آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین در گاومیش بومی استان آذربایجان شرقی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP صورت گرفت. از تعداد ۱۵۰ رأس گاومیش‌های استان آذربایجان شرقی نمونه شیر تهیه و استخراج DNA نمونه‌ها از شیر با روش پروناز صورت گرفت. بعد از انجام مراحل استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) جهت تکثیر یک قطعه ۳۹۲ جفت بازی از اگزون ۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین و قطعه ۴۵۲ جفت بازی از ناحیه اگزون ۲ ژن بتالاکتوگلوبولین انجام شد. برای تعیین چندشکلی نمونه‌ها، الکتروفورز محصولات PCR پس از تک رشته شدن قطعات (روش SSCP) و الکتروفورز روی ژل آکریلامید و رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام شد. در نمونه‌های مورد مطالعه سه الگوی باندی مختلف ۱، ۲ و۳ برای ژن آلفالاکتالبومین به ترتیب با فراوانی ۸۷/۵، ۱۰/۷۱، ۱/۷۸ و پنج الگوی باندی مختلف۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ برای ژن بتالاکتوگلوبولین به ترتیب با فراوانی۹/۸۰، ۵۸/۸۲، ۱۹/۶۰، ۹/۸۰ و ۱/۹۶مشاهده شد. نتایج بیانگر الگوهای متفاوت بود که می‌تواند ناشی از وجود چندشکلی در این جایگاه‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی

**آلفالاکتالبومین،
بتالاکتوگلوبولین،
چند شکلی،
گاومیش،
PCR-SSCP**

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

مقدمه

عموماً نژادهای بومی حیوانات هر کشور به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشوری محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آن‌ها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار است. این موجودات پس از هزاران سال انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و با غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی همچنان به حیات خویش ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته و نسبت به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند (Khosravi nia and Edris, 2001). گاومیش‌های بومی ایران ذخایر ژنتیکی پایه برای برنامه‌های اصلاح نژاد در زیستگاه‌های خویش محسوب می‌شوند، لذا شناسایی این ساختار-های ژنتیکی و ژن‌های مؤثر در صفات اقتصادی معیار مناسبی جهت اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی آینده بوده و موجب پاسخ به انتخاب در زمان کوتاه‌تر می گردند (Khorshidi et al. 2006). گاومیش دام بومی و اصلی آسیاست که به واسطه تولیدات با ارزش خود نقش بسزایی در اقتصاد روستائیان و پرورش‌دهندگان آن ایفا می‌کند. کیفیت و ارزش تولیدات گاومیش این دام را به مهم‌ترین دام بومی تبدیل کرده و سبب توجه بیش از پیش به امر بهبود تولیدات گاومیش و توسعه امر گاومیش‌داری گردیده است (Taheri et al. 2015). با توجه به اینکه شیر و سایر محصولات حاصل از آن از مهمترین اجزای تشکیل دهنده مواد غذایی انسان می‌باشند، بنابراین افزایش تولید و بهبود کیفیت آن همواره به عنوان یکی از اهداف مهم صنعت تولید شیر به شمار می‌آید. با توجه به موارد مذکور، احتمالاً در بخش دام‌های بومی استفاده از پتانسیل ژنتیکی نشانگرهای مولکولی منجر به افزایش تولید و کیفیت محصول خواهد شد. بنابراین لازم است جهت بهبود ژنتیکی جوامع حیوانی از روش‌های انتخاب ژنوتیپ‌های برتر استفاده نمود. روش‌های قدیمی و مرسوم اصلاح نژاد بر پایه استفاده از اطلاعات فنوتیپی و رکوردهای خود فرد یا خویشاوندان استوار بوده که منجر به انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای ایجاد نسل‌های بعد خواهد شد. استفاده از این روش‌ها می‌تواند به اجرای برنامه‌های آمیزشی منتهی گردد که فرزندان حاصل از آن‌ها دارای میانگین ژنتیکی بهتری نسبت به جامعه والدینی هستند (Jalil Piran, 2000). بدیهی است که استفاده از این روش‌ها نیازمند وجود رکوردهای تولیدی و مخصوصاً صرف زمان در دام‌هایی مانند گاومیش است که دارای فاصله نسل طولا نی می-باشند. این امر منجر به طولانی شدن فرآیند بهبود ژنتیکی و ایجاد محدودیت در به‌گزینی دام‌ها خواهد شد. در راستای کاهش مشکلات ذکر شده، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب، باعث بالاتر رفتن دقت انتخاب و کم شدن میزان اریبی در ارزیابی و انتخاب خواهد شد (Kelm et al. 1997). بنابراین به کار بردن نشانگرهای ژنتیکی باعث می‌شود که اعمال انتخاب در جوامع دقیق‌تر و کنترل شده‌تر بوده و برنامه‌های اصلاح نژاد به صورت اصولی پیاده شود (Amigo et al. 2000). استفاده از ژن‌های کاندیدا یکی از جدیدترین محورهای تحقیقاتی برای بهبود خصوصیات شیر تولیدی در دام‌های شیرده می‌باشد که در دهه اخیر زمینه بسیاری از تحقیقات ژنتیک مولکولی در اصلاح نژاد گله‌های شیرده را به خود اختصاص داده است (Jalil Piran, 2000). بر اساس تحقیقات انجام گرفته بر روی گاومیش، از جمله ژن‌های کاندید مؤثر بر صفات تولید شیر و ترکیبات آن ژن‌های بتالاکتوگلوبولین و آلفالاکتالبومین می‌باشند (Tanita et al. 2006). بتالاکتوگلوبولین به عنوان یکی از ژن‌های مهم تأثیرگذار بر صفات مهم اقتصادی شناخته شده است (Tsiaras et al. 2005)، که بر روی کروموزوم ۱۱ گاومیش قرار دارد (Rachagani et al. 2006). این پروتئین، محلول در آب و کروی شکل بوده که حاوی ۱۶۲ اسیدآمینه در زنجیره پپتیدی و با وزن مولکولی۳/۱۸ کیلودالتون است (Mercier et al. 1993). ژن بتالاکتوگلوبولین یک واحد نسخه برداری ۴/۷ کیلو بازی دارد و شامل ۷ اگزون و ۶ اینترون است ژن بتالاکتوگلوبولین در حدود ۵۰٪ از پروتئین‌های سرم و ۱۲٪ از کل پروتئین شیر گاو را تشکیل می‌دهد (Mercier et al. 1993). بتالاکتوگلوبولین یک هیپوکامین است، هیپوکامین‌ها پروتئین‌هایی با وزن مولکولی کم بوده که تمایل ترکیب بالایی با مولکول‌های آب گریز نظیر رتینول دارند. از خواص مهم دیگر این ژن پایداری گرمایی و ژلاتینه‌شدن آن است. گزارش‌هایی نیز در زمینه باند شدن ویتامین‌های محلول در چربی با بتالاکتوگلوبولین وجود دارد (Wang et al. 1997). وجود میل ترکیبی بتالاکتوگلوبولین با رتینول و اسیدهای چرب نشان‌دهنده نقش مهم بتالاکتوگلوبولین در انتقال و متابولیسم این اجزا می-

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

باشد، بنابراین ژن بتالاکتوگلوبولین نیز یک کاندید مهم به عنوان نشانگر تولید شیر به خاطر اثرش روی ترکیب شیر است. توالی کامل اسید آمینه این ژن گزارش شده و تنوع ژنتیکی در توالی اسیدهای آمینه آن مشخص شده است (Creamer et al. 1983). ژن بتالاکتوگلوبولین(β-LG) پروتئین اصلی آب پنیر در شیر نشخوارکنندگان بوده که به وسیله سلول‌های پوششی غده پستانی در طی دوره‌های آبستنی و شیردهی سنتز شده و در کیفیت شیر و فرآیند لخته شدن آن نقش دارد. همچنین نقش این پروتئین در محافظت از رتینول شیر، ایمنی نوزادان و تنظیم سوخت و ساز فسفر در غده پستان، شناخته شده است (Wang et al. 1997 ; Vyas et al. 2002). مطالعات نشان داده که آلل‌های A و B بتالاکتوگلوبولین بر ترکیب و خصوصیات شیر مؤثر می‌باشند. تولید شیر توسط گاوهای دارای ژنوتیپ AA بتالاکتوگلوبولین بیشتر بوده ولی کازئین و چربی شیر آنها نسبت به شیر گاوهای با ژنوتیپ BB کمتر است (McLean et al. 1984). پنیر حاصل از شیر گاوهای با ژنوتیپ BB نسبت به گاوهای با ژنوتیپ AA بیشتر است (Van Der Berg et al. 1992). در پژوهشی با بررسی چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبولین نژادهای براون سویس و هلشتاین نشان داده شد که در افراد دارای ژنوتیپ BB، مقدار کل مواد جامد و چربی به طور معنی‌داری بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر بود (Celik, 2003). محققان با بررسی ارتباط بین چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین با صفات تولید شیر در اولین دوره شیردهی گاوهای آیرشایر گزارش کردند که ژنوتیپ AA ژن بتالاکتوگلوبولین بر تولید شیر و پروتئین آن و ژنوتیپ BB نیز بر مقدار چربی شیر اثر مطلوبی داشت (Ikonen, 1999). چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبولین با روش PCR-RFLP در جمعیتی از گاومیش های باتلاقی و (Murrah) مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که نمونه‌های DNA این جمعیت از گاومیش‌ها برای جایگاه-های ژن بتالاکتوگلوبولین مونومورف بودند Nualchuen et al. (2011). ژن آلفالاکتالبومین یک پروتئین آب پنیر شیر می‌باشد؛ که حدود ۳.۵ درصد کل پروتئین شیر و ۱۸ درصد از پروتئین آب پنیر در شیر گاومیش می‌باشد (Kumar et al. 2006). این ژن تشکیل دهنده اساسی آنزیم سنتاز لاکتوز است که مسئول سنتز لاکتوز در شیر است. بنابراین به عنوان یک ژن کاندید برای صفت تولید شیر در نظر گرفته می‌شود. ژن آلفالاکتالبومین بطور مستقیم کیفیت و حجم تولید شیر را از طریق سنتز لاکتوز تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ashwell et al. 1997). آلفا لاکتالبومین نقش مهمی در تنظیم حجم شیر بازی می‌کند، به طور خاص در شبکه آندوپلاسمی زبر از غده پستانی شیرده همراه با پروتئین دیگر شیر به عنوان یک پیش پروتئین با یک توالی پیش برنده آب‌گریز عمل می‌کند (Mercier et al. 1986). آلفالاکتالبومین نقش مهمی در ترشح آب به وزیکول‌های سلول‌های پستانی دارد: این پروتئین یکی از دو جزء کمپلکس آنزیم لاکتوزسنتاز را تشکیل می‌دهد که مرحله نهایی بیوسنتز لاکتوز را کاتالیز می‌کند. جزء دیگر این سیستم گالاکتوزیل ترانسفراز (GT) است که در سلول‌های ترشحی مختلف در انتقال گروه‌های گالاکتوزیل از UDP-galactose به گلیکوپروتئین‌های حاوی N-acetylglucosamin نقش دارد. در غدد مترشحه شیری برهمکنش با آلفالاکتالبومین ویژگی گالاکتوزیل ترانسفراز را تغییر داده و تمایل آن برای گلوکز افزایش می‌یابد (Delavari et al. 2014). اگرچه برخی گزارشات در ژن آلفا لاکتالبومین در گاو، بز، خوک و گوسفند در دسترس هستند، اطلاعات کمی در سطح مولکولی برای گاومیش وجود دارد (Blumberg and Tombs, 1958). چندشکلی جایگاه‌های ژنی آلفالاکتالبومین در گاومیش‌های استان مازندران و ارتباط آنها با کمیت و کیفیت شیر با تکنیک SSCP بررسی شد، در نهایت چهار الگوی باندی شناسایی شد و همچنین اثر چندشکلی جایگاه ژن آلفالاکتالبومین بر صفات (درصد چربی، پروتئین شیر) معنی‌دار نبود (Hasani, 2015). برخی محققان چند شکلی ژنتیکی اگزون۱ و۲ ژن آلفالاکتالبومین را در نژادهای مختلف گاومیش با روش SSCP مورد بررسی قرار دادند. هر دوناحیه از ژن آلفالاکتالبومین در ۴ نژادگاومیش به صورت چند شکلی یافت شد Dayal et al. 2006). با توجه با اینکه تأثیر چندشکلی ژن‌های پروتئین شیر روی صفات مربوط به شیردهی و همچنین در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب دام‌های شیری بسیار بالاست، در نتیجه هدف از این تحقیق بررسی و تعیین چندشکلی ژن‌های آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین در گاومیش بومی استان آذربایجان شرقی با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR-SSCP) بود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

برای مطالعه چندشکلی ژن‌های بتالاکتوگلوبولین و آلفالاکتالبومین، تعداد ۱۵۰ رأس گاومیش در گله‌های استان آذربایجان شرقی به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌های شیر تهیه گردید. نمونه‌های شیر تا زمان استخراج DNA در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از نمونه‌های شیر از روش پروناز استفاده شد (Bailes et al. 2007). جهت تعیین کیفیت DNA نمونه‌های استخراج شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

توالی آغازگرها با استفاده از سایت NCBI طراحی گردید و صحت اتصال آغازگرها انتخاب شده از طریق نرم افزار Oligo Version5 مورد بررسی قرار گرفت (Weiss et al. 1999). تمامی آغازگرها از شرکت سیناژن به صورت لیوفیوزه تهیه گردید. واکنش نهایی PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر (بافر PCR 1X، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱ واحد *Taq* DNA Polymerase، ۷۵ نانوگرم DNA استخراج شده) در نظر گرفته شد و هر جایگاه ژنی با شرایط دمایی خاص تکثیر گردید. صحت طول قطعه به دست آمده از PCR برای ژن بتالاکتوگلوبولین با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد و برای ژن آلفالاکتالبومین با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد با رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید صورت گرفت. بدین منظور پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز (با ولتاژ ۱۳۰ ولت، زمان یک ساعت و غلظت ژل ۱/۵ درصد) ژل در داخل ظرف حاوی اتیدیوم برماید قرار داده شد و پس از ۲۰ دقیقه ژل با آب مقطر شستشو داده شده و از آن عکس گرفته شد. از آنجا که چندشکلی موجود در ژن بتالاکتوگلوبولین بر روی اگزون ۲ قرار گرفته است، یک قطعه ۴۵۲ جفت بازی از اگزون ۲ ژن بتالاکتوگلوبولین و یک قطعه ۳۹۲ جفت بازی از اگزون ۱و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط سایت NCBI که ترتیب توالی آن در جدول ۱ آمده است تکثیر گردید.

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی ژن بتالاکتوگلوبولین و ژن آلفاکتوگلوبولین برای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز.

Table 1. Beta-lactoglobulin gene and Alpha-lactalbumin gene specific primers for polymerase chian reaction

ژن بتالاکتوگلوبولین	نام آغازگر
Forward primer	TTGGGTTCAGTGTGAGTCTGG
Reverse primer	AAAAGCCCTGGGTGGGCAAC
آلفالاکتالبومین	نام آغازگر
Forward primer	TTGGGTTCAGTGTGAGTCTGG
Reverse primer	AAAAGCCCTGGGTGGGCAAC

جدول ۲- شرایط دمایی واکنش زنجیره ای پلی مراز.

Table 2. Polymerase chain reaction temperature conditions

ردیف	مرحله	درجه حرارت	زمان
۱	واسرشت سازی اولیه	۹۵درجه سانتی‌گراد	۳ دقیقه
۲	واسرشت سازی	۹۵درجه سانتی‌گراد	۴۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۶۵ درجه ژن بتا	۳۰ ثانیه
۳		۶۱ درجه ژن آلفا	
۴	توسعه	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۴۰ ثانیه
۵	توسعه نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه

واکنش PCR با برنامه حرارتی زیر برای ژن بتالاکتوگلوبولین وآلفالاکتالبومین در جدول ۲ نشان داده شده است. مراحل دو تا چهار ۳۵ بار برای ژن بتالاکتوگلوبولین و ۳۶ بار برای ژن آلفالاکتالبومین تکرار گردید.

تکنیک چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد SSCP

جهت انجام تکنیک SSCP ابتدا محصولات PCR، تک رشته‌ای شدند. برای این منظور مقدار ۵ میکرولیتر از هر یک از محصولات PCR با ۱۰ میکرولیتر از بافر بارگذاری SSCP به نسبت ۱ به ۲ به مدت زمان ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه تک رشته‌ای شدند که بلافاصله پس از این مرحله به داخل یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید (Pipalia et al. 2004). در آزمایشگاه از دستگاه الکتروفورز با ابعاد ۰/۱× ۱۸ ×۲۰ استفاده شد. ژل مورد استفاده پلی آکریلامید ۱۰ درصد و غیرواسرشت ساز بود. نمونه‌ها در ژل پلی آکریل

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

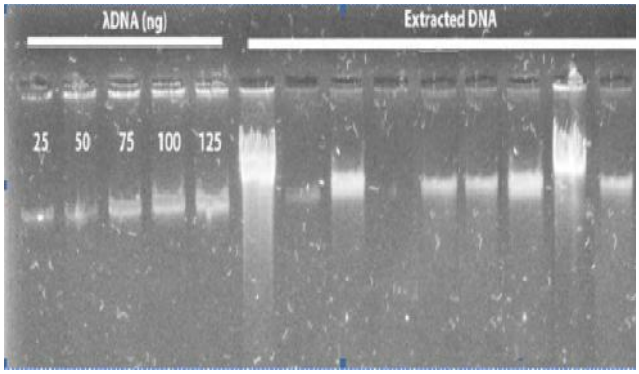
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

آمید با ولتاژ ۱۳۰ ولت و مدت زمان ۱۸ ساعت و با بافر TBE(0.5X) الکتروفورز شدند. جهت مشاهده الگوهای باندی از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید (Benbouza 2006 et al.).

نتایج و بحث

استخراج DNA با روش پروناز کیفیت مناسب و قابل قبولی برای DNA جهت ادامه مراحل پژوهش را نشان می‌دهد (شکل۱). تکثیر قطعه ۴۵۲ جفت بازی ژن بتالاکتوگلوبولین و ۳۹۲ جفت بازی ژن آلفالاکتالبومین به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت و صحت طول قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد و ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد به ترتیب برای ژن آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین تأیید شد (شکل ۱ و ۲).

پس از تکثیر قطعه مورد نظر ۴۵۲ جفت بازی از ژن بتالاکتوگلوبولین و ۳۹۲ جفت بازی آلفالاکتالبومین، جهت تعیین چندشکلی این دو جایگاه از تکنیک چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR-SSCP) استفاده گردید. ۵ الگوی مختلف چند شکلی برای ژن بتالاکتوگلوبولین و ۳ الگوی مختلف چند شکلی برای ژن آلفالاکتالبومین شناسایی شد (شکل ۳).



شکل ۱- **نمونه‌های DNA استخراج شده از شیر گاو میش و تعیین کیفیت شده بر روی ژل آگارز۱/۵درصد**

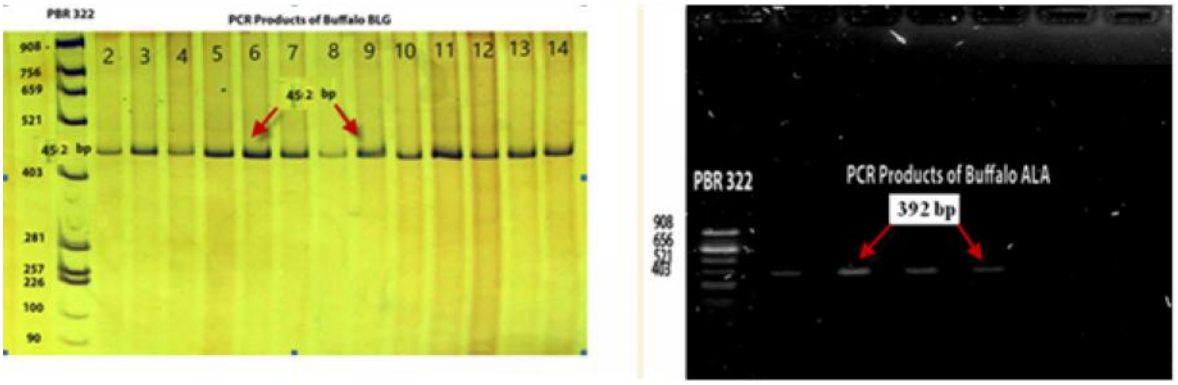
Figure 1. DNA samples extracted from buffalo milk and were determined quality on the 1.5 percent agarose gel.

محققان با استفاده از روش PCR-RFLP، چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین را در گاومیش رودخانه‌ای و گاوهای هلشتاین و جرزی شناسایی نمودند (Xiren et al. 2011). برخی محققان دیگر با بررسی چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین در جمعیتی از گاوهای هلشتاین و گاوهای بومی ایران نشان دادند که این جایگاه ژنی دارای چندشکلی می‌باشد. (Doosti et al. 2011) با بررسی چندشکلی ژن بتالاکتوگلوبولین در جمعیتی از گاومیش‌های باتلاقی نشان داده شد که این جایگاه ژنی در گاومیش‌ها تک شکل بود، دلایل عدم مشاهده چند شکلی در نمونه‌های مورد بررسی بدین شرح توضیح داده شد که ممکن است ژن مورد بررسی، ژن مناسبی برای مطالعه جمعیت گاومیش نبوده، توالی مورد استفاده دچار هیچ گونه جهشی نگردیده است و چه بسا انتخاب ژن‌های دیگر، نتایج متفاوتی نشان دهند (Nualchuen et al. 2011). در حالی که در پژوهش حاضر در این جایگاه ژنی ۵ شکل مختلف ژنوتیپی شناسایی شد و عدم تطابق ممکن به دلیل وجود جهش‌های متفاوت در دو جمعیت، انتخاب طبیعی، محل متفاوت پرورش جغرافیایی و پراکندگی ژنتیکی این نژادها باشد. برخی محققان با استفاده از تکنیک PCR-RFLP قطعه‌ای به اندازه ۲۶۲ جفت باز در اگزون و اینترون ۴ ژن بتالاکتوگلوبولین در جمعیتی از گاومیش‌های (Murrah) را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که نمونه‌های DNA این جمعیت از گاومیش‌ها برای جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین مونومورف بودند (Meignanalakshmi et al. 2009). این یافته‌ها با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت. دلیل عدم تطابق احتمالاً می‌تواند ناحیه مورد بررسی و نوع روش استفاده شده باشد چون در پژوهش حاضر روش استفاده شده PCR-SSCP و ناحیه مورد بررسی قسمتی از اگزون ۲ این ژن بود.

چند شکلی ژن بتالاکتوگلوبولین در اگزون و اینترون ۴ در جمعیت گاومیش‌های خوزستان بررسی شد نتایج نشان داد که در گاومیش‌های مورد مطالعه آلل B در جایگاه بتالاکتوگلوبولین تثبیت شده است و برای این جایگاه چندشکلی مشاهده نشد و عدم تطابق ممکن است به دلیل محل متفاوت پرورش جغرافیایی و نوع نژاد مورد بررسی باشد (Taheri et al. 2015). چندشکلی

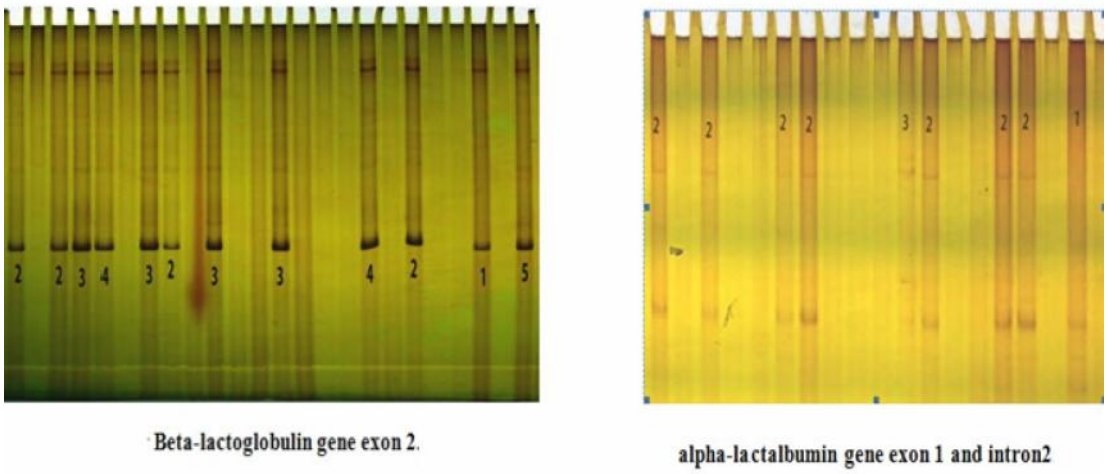
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

ژن بتالاکتوگلوبولین در ناحیه اگزون و اینترون ۴ درجمعیتی از گاوهای نژاد سیاه و سفید لهستانی بررسی شد نتایج نشان داد که نمونه های DNA این جمعیت از گاوها برای جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین چندشکلی بودند (Strazalkowska et al. 2002). در یک بررسی جهت تعیین ایزوفرم‌های پروتئین بتالاکتوگلوبولین در شیر گاومیش‌های رودخانه‌ای (نیلی راوی) شیر، سه ایزوفرم پروتئین بتالاکتوگلوبولین AA، BB و AB و ارتباط معنی‌داری این سه ایزوفرم با اجزای تشکیل دهنده اصلی شیر را گزارش شد (Tahira et al. 2014). محققان فراوانی آللی و ژنوتیپی، ناحیه اگزون و اینترون ژن بتالاکتوگلوبولین را در جمعیتی از گاومیش‌های مصری با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی نموده و این نتایج چند شکلی در جمعیت گاومیش‌های مصری حاکی از وجود سه نوع الگوی ژنتیکی متفاوت بود (Gouda et al. 2011).



شکل ۲- نمونه‌ای از محصولات PCR لود شده بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد و ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد ژن آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین

Figure 2. PCR products were loaded on 1.5 percent agarose gel and 8 percent poly acrylamid, β-lactoglobulin gene and alpha-lactalbumin gene.



شکل۳- **الگوهای** SSCP **مشاهده شده برای ژن آلفالاکتالبومین و ژن بتالاکتوگلوبولین.**

Figure 3. SSCP patterns observed for alpha-lactalbumin gene and Beta-lactoglobulin gene.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

ارزیابی ژنتیکی قطعه ۶۵۰ جفت بازی در قسمتی از ژن آلفالاکتالبومین در گاومیش‌های منطقه آذربایجان با استفاده از روش SSCP انجام شده و نتایج چندشکلی آن با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت (Hossienzadeh et al. 2014). در پژوهشی دیگر چند شکلی ژن آلفالاکتالبومین در گاو نژاد (Creole Colombian) با استفاده از روش PCR-SSCP بررسی شده و چند شکلی این ژن تأیید شد و با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (Rosero et al. 2011). محققین در گاوهای نژاد (Sahiwal, Hariana, Tharparkar) چندشکلی را در جایگاه ژن آلفالاکتالبومین بررسی نموده، نتایج بررسی این ژن چندشکلی نشان داد و ارتباط معنی داری ژنوتیب BB را با تولید شیر مشاهده شد (Sashikanth and Yadev 2011). چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین در گاوهای هلشتاین و ارتباط آن با صفات تولید شیر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج چندشکلی و ارتباط معنی داری را با تولید شیر نشان داد (Voelker et al. 1999).

چندشکلی جایگاه‌های ژنی آلفالاکتالبومین در گاومیش-های استان مازندران و ارتباط آنها با کمیت و کیفیت شیر با تکنیک SSCP بررسی شد. نتایج با استفاده از روش SSCP، چهار الگوی باندی را نشان داد و اثر جایگاه ژن آلفالاکتالبومین نیز بر صفات مورد مطالعه (درصد چربی، پروتئین) معنی‌دار نبود که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت (Hasani et al. 2015). اثر چندشکلی ژن آلفالاکتالبومین بر صفت تولید شیر در گاومیش‌های رودخانه‌ای (Bhadawari و Murrah) با تکنیک SSCP در اگزون ۱ مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان داد که در گاومیش (Murrah) ۵ ژنوتیپ (CC, BC, BB, AB و CD) و ۴ آلل(A, B, C, و D) یافت شد. در گاومیش (Bhadawari) دو ژنوتیپ و سه آلل یافت شد. ژنوتیپ‌ها ارتباط معناداری با تولید شیر در گاومیش‌های Bhadawari نشان دادند ($p\leq0.05$) ولی در گاومیش‌های Murrah ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (Dayal et al. 2006) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت نداشت و از دلایل عدم تطابق می‌تواند به نوع نژاد مورد بررسی و کوچک بودن اندازه نمونه اشاره نمود. محققان با کمک روش PCR-SSCP چندشکلی اگزون ۱، ۲، ۳ و۴ ژن آلفا لاکتالبومین در دو نژاد گاومیش رودخانه‌ای (Murrah و South Kanara) مورد آزمون قرار دادند. در اگزون ۱ چند شکلی مشاهده شد ولی در۲ ،۳ و ۴ مشاهده نشد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (Ramesha et al. 2008). دلیل این تطابق احتمالاً می‌تواند مربوط به نوع ناحیه و اندازه قطعه تکثیر شونده باشد. پژوهشگران با بررسی ژن آلفا لاکتالبومین در نژاد گاو خال سیاه رومانیایی با روش PCR-RFLP تک شکلی را در این ژن شناسایی نمودند که با نتایج تحقیق ما مطابقت نداشت (Balcan et al. 2008). عدم تطابق به نظر می‌رسد که مربوط به تعداد نمونه‌های اخذ شده از گاو رومانیایی باشد که در این نمونه‌ها جهش ژنی لازم به منظور چندشکلی انجام نگرفته باشد که این جهش در نمونه ۱۵۰ تایی تحقیق حاضر مشاهده شده است. چندشکلی تک نوکلئوتیدی ژن آلفا لاکتالبومین در اگزون ۳ در بعضی نژادهای بز(Hair, Saanen, Kilis, Honamli) در ترکیه با کمک روش PCR-RFLP بررسی و یافته‌های این مطالعه حضور چندشکلی ژنتیکی در ژن آلفا لاکتالبومین در نژاد-های (Kilis و Honamli) را نشان داد (Agaoglu et al 2014). چندشکلی ژن آلفا لاکتالبومین در اگزون ۱ در بزهای شیری هندوستان با تکنیک PCR-SSCP بررسی شده و نتایج چند شکلی را در نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد و این موضوع بیانگر این است که بزهای شیری هندوستان تنوع ژنتیکی نسبتاً بالا در جایگاه، اگزون ژن آلفا لاکتالبومین داشته و روش PCR-SSCP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بز بطور مناسب عمل نموده است (Kumar et al. 2006).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه بررسی چندشکلی این دو ژن کاندید، نتایج متناقضی داشت بعضی مطالعات نشان دادند که این ژن‌ها دارای چندشکلی بوده، در حالیکه مطالعات دیگر نشان دادند که این ژن-ها تک شکل هستند. با توجه به نتایج به دست آمده و تکثیر قطعه مورد نظر ۴۵۲ جفت بازی ژن بتالاکتوگلوبولین و۳۹۲ جفت بازی ژن آلفالاکتالبومین می‌توان نتیجه گرفت که در مطالعات بعدی می‌توان برای ناحیه اگزون ۲ ژن بتالاکتوگلوبولین و اگزون۱ و اینترون ۲ ژن آلفالاکتالبومین از همین آغازگرها استفاده نمود. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که این ژن‌ها دارای چندشکلی نسبتاً بالایی می‌باشند و می‌تواند به عنوان یک نشانگر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

ژنتیکی در بررسی‌ها و مطالعات آینده از آن بهره گرفت بر اساس نتایجی که از این تحقیق به دست آمد می‌توان گفت که روش PCR-SSCP یک ابزار قوی، آسان و با هزینه پایین جهت بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی الگوهای ژنوتیپی مختلف می‌باشد. به هرحال، بررسی بیشتر این ژن‌ها به وسیله نشانگرهای مولکولی دیگر، به همراه استفاده تعداد بیشتری از دام و رکوردهای عملکردی بیشتر، می‌تواند اطلاعات بیشتر و دقیق‌تری را حاصل نماید که در امر اصلاح نژاد دام مفید واقع شود. از طرفی حفظ ذخائر ژنتیکی کشور و مطالعه و بررسی صفات مهم اقتصادی در نژادهای بومی کشور که از ظرفیت ژنتیکی بالای برخوردارند، نیازمند انجام اینگونه تحقیقات می‌باشد.

منابع

Agaoglu K, Saatci M, Elmaz Ö, Çolak M. 2014. Mva I PCR-RFLP identifies single nucleotide polymorphism of the alpha-lactalbumin gene in some goat breeds reared in Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 38: 225-229.

Amigo L, Isidra R, Mercedes R. 2000. Genetic polymorphism of ovine milk protein:its influence on technological properties of milk. International Dairy Journal 10:135-149.

Ashwell M, Rexroad J, Miller C, Van Raden R, Da Y PM. 2009. Detection of loci affecting milk production and health traits in an elite US Holstein population using microsatellite markers. Animal Genetics 28:216-222.

Bailes S, Devers M, Kirby JD, Rhoads DD. 2007. An inexpensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. Poultry Sciences 86: 102-106.

Balcan RA, Georgescu SE, Manea MA, Dinischiotu A, Tesio CD, Costache M. 2008. Alpha-lactalbumin genotypes identification in romanian black spotted cattle breed. Lucrări stiinŃifice Zootehnie si Biotehnologii 41:169-173.

Benbouza H, Jacquemin M, Bauduin J, Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable , fast,cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. Biotechnology, Agronomi, society and Environment. 2:77-81.

Blumberg BS, Tombs MP. 1958. Possible polymorphism of bovine a-lactalbumin. Nature 181:683–684.

Celik S. 2003. β-lactoglobulin genetics variant in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. International Dairy Journal 13: 727-731.

Creamer L, Parry D, Malcolm G. 1983. Secondary structure of β-lactoglobulin B. Archives of Biochemistry and Biophysics 227: 98-105.

Dayal S, Bhattacharya TK, Vohra V, Kumar P, Sharma A. 2005. Effect of Alpha-lactalbumin gene Polymorphism on milk production traits in Water Buffalo. Animal Genetics 12:305-308.

Delavari b, Geliai b, Atri M. 1393. Study alfa lactoalbumin structure and its interaction with oleic acid and anti cancer complexes. Department of Biology. University of Mazandaran. (In Farsi with English abstract).

Dokso A, Kelava N, Brka M, Ivanković A. 2011. The effect of LGB genes on quantitative and qualitative characteristics of milk holestein breed in croatia. Proceedings of the 22nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina13:25-28.

Doosti A, Arshi A, Yaraghi M, Dayani-Nia M. 2011. Comparative study of β-lactoglobulin gene polymorphism in Holstein and Iranian native cattle. Journal of Cell and Animal Biology. 5(3): 53-55.

Edris M, Khosravi nia H. 2001. Introduction on animal breeding. Isfahan University Publishing Centre. 1-9. (In Farsi with English abstract).

Elyasi G, Ghiyas S, Nasiri M, Tahmasbi A, Pirahari A. 2005. Investigation sheep β-lactoglobulin gene by PCR-RFLP. Journal Water and Soil. Science. 2: 129-133. (In Farsi with English abstract).

Gharedaghi L, Sadeghi M, Moradi-Shahrebabak H, Ganjkhanlou M. 2015. Study of polymorphism of β-Lactoglobulin gene in exon 7 and its association with milk production traits in mahabadi Goats using PCR-SSCP. Research Animal Production 11: 120-125. (In Farsi with English abstract).

Gouda EM, Galal M, Ahmed Wasfy M, Ahmed Abdelaziz S. 2011. Phenotypes, Genotypes and Allele Frequencies of B-lactoglobulin in Egyptian Cattle and Buffalo. Journal of Agricultural Science. Journal Agricultry Science 2: 11-19.

Hasani S. 2015. Polymorphism loci buffalo DGAT1 and Alpha-lactalbumin and Ghrelin in Mazandaran province and their relation to the quantity and quality of milk. Master thesis. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (In Farsi with English abstract).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

HosseinZadeh P, Hashemi A, Elyasi gh, Chaharbashi S. 2014. Genetic evaluation of α-Lactalbumin Gene in Azerbaijan buffaloes, using PCR-SSCP technique, Animal Science Sixth Congress of Tabriz. . (In Farsi with English abstract).

Ikonen T, Ojala M, Ruottinen O. 1999. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in finish Ayrshire cows. Journal of Dairy Science 82: 1026-1033.

Jalil Piran L. 2000. Effect of Beta-Lactoglobulin gene polymorphism on production traits of Holstein cows. Master thesis. Academic Technology. College of Agriculture (In Farsi with English abstract).

Karimi K, Taghi Beigi Nassiri M, Mirzadeh KH, Ashayerizadeh A, Roushanfekr HL, Fayyazi J. 2009. Polymorphism of the β-lactoglobulin gene and its association with milk production traits in Iranian Najdi cattle. Iranian Journal Biotechnology 7:82-85.

Kelm SC, Dettilleu x, Freeman AE, Kelly DH. 1997. Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastits in peri parturient Holstein cutrle. Journal of Dairy Science 80:1767-1775.

Khorshidi K, Bahri M, Soltani J. 2006. Feeding cattle and buffalo. Banafsheh Publication. P:180. (In Farsi with English abstract).

Kishore A, Mukesh M, Sobti RC, Keviletsu KH, Mishra BP, Sodhi M. 2014. Single nucleotide polymorphism in exon 4 and promoter regions of β-Lactoglobulin gene in native cattle (Bos indicus) breeds of India. Advansed Dairy Research 2:2-7.

Kumar D, Gupta N, Ahlawat S, Satyanarayana R, Sunder SH, Gupta SC. 2006. Single strand confirmation polymorphism (SSCP) detection in exon I of the α-lactalbumin gene of Indian Jamunapari milk goats (Capra hircus). Genetics and Molecular Biology 2: 287-289.

McLean DM, Graham ER, Ponzoni RW. 1984. Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition. Dairy Research 51:531-546.

Meignanalakshmi S, Mahalinga Nainar A. 2009. PCR-RFLP Analysis of beta-lactoglobulin gene in murrah buffaloes. Tamilnadu Journal Veterinary & Animal Sciences 5:194-197.

Mercier JC, Vilotte JL. 1993. Structure and function of milk protein genes. Journal Dairy Science 76:3079.

Nualchuen W, Srisakwattana K, Chethasing E, Tasripoo K, Usawang S, Hengtrakulsin R, Kamonpatana M. 2011. RFLP Analysis of beta-Lactoglobulin gene in Swamp and Murrah Buffaloes using a single restriction enzyme. Iraniyan Journal of Animal Science 2:301-303.

Pipalia DL, Joshi CG, Brahmkshtry BP, sonlanki JV. 2004. PCR-SSCP typing of MHC in cattle and buffaloes. Indian Journal of Animal ScienceVol,74:637-639.

Pirani N. 2004. Text book Workshop on Application of Biotechnology in Animal Science, Faculty of Agriculture. Tabriz University.

Rachagani S, Dayal Gupta I, Gupta N, Gupta C. 2006. Genotyping of β-Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal and Tharparkar cattle breeds. BMC Genetics 7:1-4.

Ramesha KP, Khosravinia H, Gowda Sh, Rao MRS. 2008. Alpha-lactalbumin gene polymorphism: A preliminary study on two breeds of the river Buffalo (Bubalus bubalis). Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 16:47-52.

Rosero A, Jaime A. 2011. Genetic polymorphism of beta-lactoglobulin and alpha-lactoalbumin in Colombian Creole cattle by PCR-SSCP. ACTA AGRONÓMICA. 4: 334-341.

Sashikanth M, Yadev B. 2011. Alpha lactalbumin polymorphism in three breeds of Indian zebu cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics. 115: 403-405.

Slami neghad A, Nasiri M, Eftekhar Shahrodi F, valizadeh R, Javadmanesh A, Noruzi A. 2011. Study of genetic polymorphisms in candidate genes karakul. Third Congress of Animal Science. University of Gorgan (In Farsi with English abstract).

Strazalkowska N, Kuzewski J, Ryniewicz Z. 2002. Effect of kappa-casein and betalactoglobulin polymorphism cows age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and White cattle. Animal Science . 20: 21-35.

Strazalkowska N, Kuzewski J, Ryniewicz Z. 2002. Effect of kappa-casein and betalactoglobulin polymorphism cows age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black and White cattle. Journal of Animal Science 20:21-35.

Taheri B, Seyedabadi H, Savar Sofla S. 2015. Investigation of β-lactoglobulin, prolactin and DGAT1 genes polymorphism in Khuzestani buffalo. Journal of Animal Science Pajohesh and Sazandegi 111:87-96. (In Farsi with English abstract).

Tahira I, Mahmood A, Saqlain M, Qudsia Hanif N, Kaukab Raja Gh. 2014. Study of β-lactoglobulin milk protein variants in Buffalo. Pakistan Journal of Zoology 46: 549-552.

Tsiaras A, Bargouli G, Banos G, Boscos C. 2005. Effect of kappa casein and beta-lactoglobulin loci in milk production traits and reproductive performance. Journal of Dairy science 88: 327-334.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

Van Der Berg G, Escher JT, De Koning PJ ,Bovenhuis H. 1992. Genetic polymorphism of K-casein and P-lactoglobulin in relation to milk composition and processing. Nether land Milk Dairy J46:145-168.

Voelker G, Bleck G, Wheeler B. 1997. Single-base polymorphisms within the 5` flanking region of the bovine α-lactalbumin gene. Journal of Dairy Science. 80:194-197.

Vohra V, Dayal SH, Bhattacharya T. 2012. SSCP typing of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin gene and its association with milk production and constituent traits in Indian riverine buffalo. Indian Journal Animal Science 82:884-888.

Vyas H, Izco M, Jimenez-Flores R. 2002. Scale-up of native β-lactoglobulin affinity separation process. Journal of Dairy Science 85:1639-1645.

Wang Q, Allen J, Swaisgood H. 1997. Binding of vitamin D and cholesterol to β-lactoglobulin. Journal of Dairy Science 80:1054-1059.

Weiss B, Davidkova G, Zhou LW. 1999. Antisense RNA gene therapy for studing and modulating biological processes. Journal of Cell Molecular life science 55:334-358.

Xiren D, Yingmiao S, Liang chen Y, Xia zou C, Wel liang X, Xin liu J. 2011. Genotyping of the k-casein and β-lactoglobulin genes in Chinese Holstein, Jersey and water buffalo by PCR-RFLP. Journal of Genetics. 90:1-5.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]

Detection alpha-lactalbumin and β-Lactoglobulin gene Polymorphism in East Azarbaijan province native buffalo using PCR-SSCP

Ronak Salehi[1], Ali Hashemi[2]*, Mokhtar Ghafari[3], Ghorban Elyasi Zaringhabaie [4]

1. MSc. Student 2. Associate Professor 3. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran
4. Department of Animal Science, East Azerbaijan Agriculture and Natural Resources Research Centre, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: a.hashemi50@gmail.com

Abstract

Milk production traits and its components are quantitative and polygenic traits affected by many genes. This study was conducted to determine the polymorphism in alpha-lactalbumin and β-lactoglobulin genes using PCR-SSCP method in East Azarbaijan native buffalo. Milk samples were collected from 150 buffaloes of East Azarbaijan native province and then DNA samples were extracted using the pronase method. After DNA extraction specific primers were used for amplification of a 392 bp fragment of exon 1 and intron 2 of the alpha-lactalbumin gene and a 452 bp fragment of exon 2 of the β-lactoglobulin gene. To identify polymorphisms, the PCR products were electrophoresed on polyacrylamide gel (SSCP method) and stained with silver nitrate. Three different banding patterns were observed in samples 1, 2 and 3 for the alpha-lactalbumin gene (with 87.5%, 10.71% and 1.78% frequency) and five different band patterns were observed for the for the β-lactoglobulin gene, with 9.80%, 58.82%, 19.60, 9.80% and 1.96% frequency. The results indicate that the different patterns may be due to polymorphism in these fragments.

Key Words: Alpha-Lactalbumin, Beta-lactoglobulin, Buffalo, Polymorphism, PCR-SSCP

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-06-01]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1396.6.1.2.4]