علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۴ (ص ۳۶۹-۳۶۱)

مطالعهٔ چندشکلی ژن ACACA و ارتباط آن با صفات رشد و تولید شیر در بزهای نژاد مهابادی با روش PCR-SSCP

رضا فرجی[۱]، مصطفی صادقی[۲*] و محمد مرادی شهربابک[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشتهٔ ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشیار و استاد، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۳۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۲۲)

چکیده

این پژوهش با هدف مطالعهٔ چندشکلی ژن ACACA و ارتباط آن با صفات شیر در بزهای نژاد مهابادی انجام گرفت. به این منظور برای ۱۵۰ رأس بز شیری نژاد مهابادی، خون‌گیری و استخراج DNA از خون به روش نمکی بهینه‌یافته صورت گرفت. قطعهٔ اینترون ۴۴ ژن ACACA، به کمک واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد. برای بررسی چندشکلی قطعات تکثیرشده، از روش چندشکلی فضایی تک‌رشته‌ای DNA (SSCP) استفاده شد. در نهایت هفت الگوی متفاوت به دست آمد که با هم‌ردیفی و مقایسهٔ توالی‌ها با یکدیگر و با توالی ژن ACACA بز با شمارهٔ دسترسی NC_022311، در مجموع هفت جهش در جمعیت بز مهابادی در موقعیت‌های ۱۵۴۵۰۳(تغییر باز T به G)، ۱۵۴۵۱۸(تغییر باز G به A)، ۱۵۴۵۷۷(تغییر باز G به A)، ۱۵۴۶۴۰(تغییر باز T به C)، ۱۵۴۷۱۲(تغییر باز C به A)، ۱۵۴۹۲۸(تغییر باز T به C)، ۱۵۴۹۵۶(تغییر باز C به T) مشاهده شد. ارتباط هر SNP با صفات تولید شیر (مقدار تولید، درصد چربی و پروتئین و تعداد سلول‌های بدنی) با نرم‌افزار SAS 9.1 بررسی شد و نتایج حاکی از اثر معنادار SNP دوم (P=۰/۰۵)، سوم (P=۰/۰۵) و پنجم (P<۰/۰۱) بر تولید شیر و SNP اول (P=۰/۰۱۷)، ششم (P=۰/۰۱۷) و هفتم (P<۰/۰۱) بر درصد چربی شیر بود.

واژه‌های کلیدی: بز مهابادی، چندشکلی، صفات تولید شیر، ACACA، PCR-SSCP.

مقدمه

استیل کوآ کربوکسیلازآلفا (ACACA)، آنزیمی کلیدی در تنظیم سنتز اسیدچرب در بافت‌های حیوانی است که به دو روش فسفریلاسیون برگشت‌پذیر و کنترل نتایج آن که کنترل مزمن نامیده می‌شود، در تنظیم سنتز اسیدهای چرب دخیل است (Moioli *et al.*, 2005)؛ همچنین آنزیم محدودکنندهٔ بیوسنتز پالمیتیک اسید و اسیدهای چرب بلند زنجیره در شیر است (García-Fernández *et al.*, 2010). این آنزیم فاکتور مهمی در ساخت اسیدهای چرب، پروکتیدها، فلاوونوئیدها و ترکیبات مهم برای رشد سلول‌هاست. در جانداران عالی، افزایش در فعالیت سلولی استیل‌کوآ کربوکسیلازآلفا، موجب افزایش تولید مالونیل‌کوآ از طریق کربوکسیله‌کردن استیل کوآ و در نتیجه افزایش سنتز اسیدهای‌چرب می‌شود (Volpe *et al.*, 2006). این فعالیت‌ها در هماهنگ‌کردن تقسیم مواد مغذی بین کبد و بافت‌های محیطی نقش محوری دارد. این بخشی از راهبرد انطباقی برای پاسخ به نیازهای

* تلفن: ۰۲۶-۳۲۵۴۱۰۲۲
Email: sadeghimos@ut.ac.ir

فیزیولوژیکی به‌وسیلهٔ نواحی تغذیه‌ای، گرسنگی و تولید شیر است (Travers & Barber, 2001). ژن ACACA به‌طور فراگیر بیان می‌شود، ولی بیان آن در بافت‌های لیپوژنیک[1] (آدیپوز، کبد و غده‌های شیری) بیشتر است. این بافت‌ها مسئول برقراری متابولیسم منطبق با نیازهای فیزیولوژیکی هستند. برای مثال در مدت سنتز اسیدهای‌چرب در شیر، سنتز آن‌ها در بافت چربی محدود می‌شود و در نتیجه اولویت در پیش‌سازهای لیپوژنیک به غده‌های پستانی تعلق می‌گیرد (Travers & Barber, 2001). این ژن در گاو روی کروموزوم ۱۹ قرار دارد و ۲۳۴۶ آمینو اسید را کد می‌کند، در مرغ روی کروموزوم ۱۹ قرار دارد و ۲۳۲۴ آمینواسید را کد می‌کند و در گوسفند روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد و دارای ۵۴ اگزون است و ۲۳۴۶ آمینو اسید را کد می‌کند (García-Fernández *et al*., 2010). در بز نیز روی کروموزوم ۱۹ قرار دارد و ۱۸۳۲ آمینواسید را کد می‌کند (Badaoui *et al*., 2007; Dong *et al*., 2013). امروزه نقش این ژن در کنترل کمی و کیفی چربی شیر و گوشت کاملاً به اثبات رسیده است؛ به‌طوری که یک ژن کاندیدای مؤثر بر صفات شیر و گوشت معرفی می‌شود (Moioli *et al*., 2005; Shin *et al*., 2011; Dong *et al*., 2013).

با توجه به گزارش Badaoui *et al*. (2007) مبنی بر اینکه ارتباط معناداری بین چندشکلی اگزون ۴۴ تا ۴۵ از cDNA این ژن با صفات تولیدی در بزهای اسپانیایی مشاهده کرده‌اند (در حالی که تنها یک SNP خاموش در این نواحی کشف شده است) هدف از این تحقیق تعیین چندشکلی موجود در ناحیهٔ اینترون ۴۴ ژن ACACA و بررسی ارتباط احتمالی آن با صفات رشد و تولید شیر در بزهای نژاد مهابادی مستقر در ایستگاه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه تهران بود.

مواد و روش‌ها

برای این پژوهش از ۸۱ رأس بز مهابادی شیرده و ۶۹ بزغالهٔ موجود در ایستگاه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی با استفاده از ونوجکت‌های ۶ میلی‌لیتری حاوی مادهٔ ضد انعقاد EDTA از سیاهرگ وداج خون‌گیری شد. نمونه‌های خون در محیط سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. از قبل رکوردهای مربوط به صفات شیر شامل تولید شیر، درصد پروتئین، درصد چربی و شمار سلول‌های بدنی[2] اندازه‌گیری شده بود. رکوردبرداری هفتگی با سعی در تکرار و دقت زیاد صورت گرفت و از همهٔ بزهای شیرده رکوردبردای و نمونه‌گیری شد. DNA از خون به روش استخراج نمکی (Iranpur & Esmailizadeh, 2010) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده با روش اسپکتوفتومتری (نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) و روش الکتروفورز روی ژل آگارز (۱ درصد) تعیین شد. جهت تکثیر رشتهٔ مورد نظر، واکنش PCR به‌وسیلهٔ مواد مخصوص PCR شرکت Gennet Bio کرهٔ جنوبی به شرح زیر با غلظت نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت: کلرید منیزیم ($MgCl_2$) ۱/۵ میکرولیتر (۱/۵mM)، بافر (PCR buffer) ۲/۵ میکرولیتر (۱X)، بازهای آزاد دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs) ۲ میکرولیتر (۰/۸ mM)، آغازگر رفت ۱/۲۵ میکرولیتر(۰/۵ mM)، آغازگر برگشت ۱/۲۵ میکرولیتر(۰/۵ mM)، آنزیم DNA پلی‌مراز Taq ۰/۳ میکرولیتر (۱/۵ واحد)، DNA ۲ میکرولیتر و آب دیونیزه ۱۴/۲ میکرولیتر. با استفاده از دو آغازگر اختصاصی ژن ACACA که توسط Badaoui *et al*. (2007) معرفی شدند، قطعهٔ ۸۹۸ جفت بازی از جایگاه اینترون ۴۴ ژن استیل‌کوآ کربوکسیلازآلفا با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر شد. توالی این دو آغازگر در جدول ۱ آمده است.

با استفاده از شیب دمایی اتصال و چندین بار واکنش PCR توسط دستگاه ترموسایکلر شرایط جدول ۲ به عنوان ایده‌آل‌ترین حالت برای واکنش PCR مهیا شد.

1. Lipogenic

2. Somatic cell count

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده‌شده

	توالی آغازگر	دمای ذوب آغازگر (°C)
آغازگر رفت	5´- GCC TAC GAC GAG ATC ATC ACC-3´	۶۳/۱
آغازگر برگشت	5´- TTT TCG ACC TGG ATG GTT CTC T-3´	۶۲/۹

جدول ۲. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های تکثیر

فرایند	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت‌سازی اولیه	۹۵	۴ دقیقه	۱
واسرشت‌سازی	۹۴	۵۰ ثانیه	۳۵
اتصال	۶۱	۶۰ ثانیه	
بسط	۷۲	۷۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۷ دقیقه	۱

تکثیر به‌وسیلهٔ دستگاه ترموسایکلر مدل XP BIOER انجام گرفت. پس از انجام واکنش PCR برای اطمینان از تکثیر و صحت و مقدار DNA تکثیرشده در واکنش، الکتروفورز محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز (۲ درصد) اجرا و بررسی شد. در صورتی که نمونه‌ای به‌طور مناسب تکثیر نشده بود (دارای اسمیر یا باند اضافه یا باند ضعیف بود) دوباره تکثیر می‌شد تا باندهای مطلوب و یکدست برای همه نمونه‌ها حاصل شود. به منظور تشخیص تفاوت الگوهای باندی ناشی از چندشکلی احتمالی در جایگاه مورد نظر از روش الکتروفورز ساختار DNA تک‌رشته‌ای‌شده (SSCP) استفاده شد. برای این منظور ۴ میکرولیتر محصول PCR با ۱۶ میکرولیتر محلول حاوی فرم‌آمید (SSCP Dye) مخلوط شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس به فریزر با دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد تا رشته‌ها از هم جدا شوند و DNA تک‌رشته‌ای باقی بماند. سپس به داخل چاهک‌های ژل پلی اکریل‌آمید (۱۰درصد) که از قبل آماده و داخل تانک حاوی بافر ۱x TBA قرار داده شده بود، منتقل شد. سپس جریان برق ۳۰۰ ولت وصل شد و ۲۴ ساعت در این شرایط الکتروفورز جریان داشت. پس از این مرحله رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره صورت گرفت و پس از مقایسه و تعیین الگوهای متفاوت از هر الگو دو نمونه به‌صورت تصادفی جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست در شرکت Bioneer کرهٔ جنوبی ارسال شد. پس از توالی‌یابی و تعیین ژنوتیپ تک تک دام‌ها و محاسبهٔ فراوانی ژنی و ژنوتیپی برای SNPهای جایگاه مورد بررسی، این اطلاعات به همراه داده‌های مربوط به تولید شیر، پروتئین، چربی و شمارش سلول‌های بدنی وارد نرم‌افزار Excel شد. توزیع صفات به وسیلهٔ تست شاپیرو ویلک از طریق رویهٔ Univariate آزمون شد و در مورد صفاتی که توزیع نرمال نداشتند، رویهٔ Transreg با نرم‌افزار SAS برای نرمال‌سازی استفاده شد. بعد از نرمال‌کردن داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9.1 رویهٔ MIXED برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. در این آزمایش اثر جهش‌های ژن ACACA به عنوان عامل ثابت تأثیرگذار بر صفت تولید شیر، پروتئین، چربی و شمارش سلول‌های بدنی شیر در معادلهٔ مدل قرار گرفت؛ به این صورت که ژنوتیپ‌های مشاهده‌شدهٔ SNPهای ژن ACACA، سال زایش و ماه رکوردگیری به‌عنوان عوامل ثابت و اثر دورهٔ رکوردبرداری در هر حیوان به‌عنوان عامل تصادفی در مدل قرار گرفت. به طور کلی معادلهٔ مدل استفاده‌شده برای آنالیز واریانس به صورت زیر بود:

$$Y_{ijkln} = \mu + G_i + S_j + M_k + P_l(Animal_m) + e_{ijklmn}$$

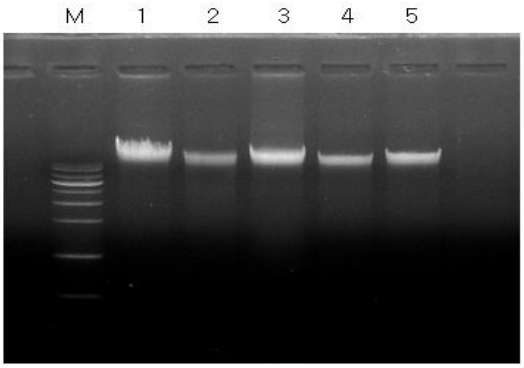
که Y_{ijk}، هر یک از مشاهدات مربوط به مقدار شیر، درصد چربی، درصد پروتئین و مقدار سلول‌های بدنی؛ μ، میانگین صفت در جامعه؛ G_i، اثر i اُمین ژنوتیپ (ACACA)؛ S_j، اثرj اُمین سال زایش؛ M_k، اثر k اُمین ماه رکوردگیری؛ P_l $(Animal_m)$، اثر دورهٔ رکوردبرداری l اُم در حیوان m اُم و e_{ijklmn}، اثر عوامل باقیمانده بود.

برای آنالیز صفات رشد مانند وزن تولد، وزن از شیرگیری، وزن نهایی و افزایش وزن روزانه نیز عوامل ثابت ماه و سال زایش، تک‌قلو یا چندقلو و عوامل همبستهٔ وزن تولد، مقدار خوراک مصرفی و وزن مادر در هنگام زایش در مدل قرار گرفتند.

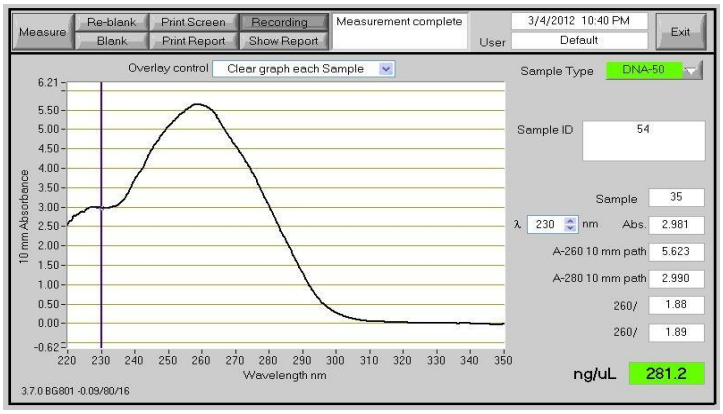
نتایج

کیفیت استخراج DNA

کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده، به‌وسیلهٔ نانودراپ (اسپکتوفتومتری) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد بررسی شد (شکل ۱). نمونه‌هایی که باندهای ضعیف نشان دادند، دوباره استخراج شدند. تعیین خلوص DNA استخراج‌شده با روش اسپکتوفتومتری با دستگاه نانودراپ، نتایج حاصل از ژل آگارز را در استخراج DNA تأیید کرد. نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ در نمونه‌های DNA استخراج‌شده در محدودهٔ ۱/۸ تا ۲/۰ قرار داشت و در نتیجه خلوص DNA در حد بالایی بوده و عاری از آلودگی RNA یا پروتئین بود (شکل ۲).



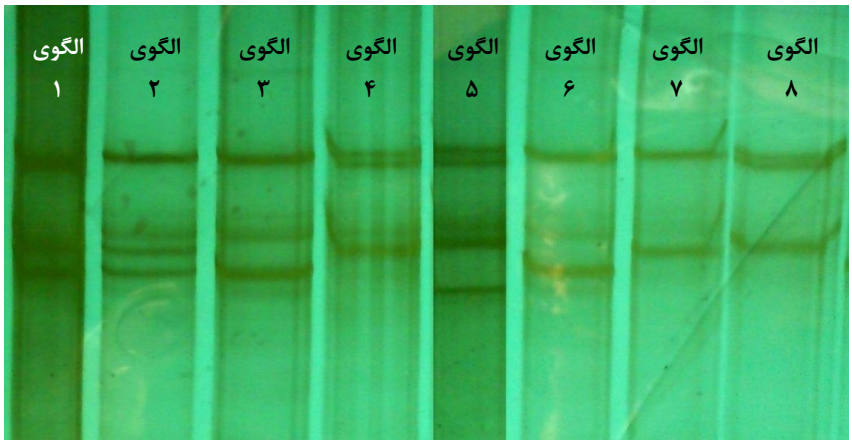
شکل ۱. الکتروفورز DNAهای استخراج‌شده روی ژل آگارز (۱درصد)



شکل ۲. نتیجهٔ نانودراپ DNAهای استخراج‌شده

تکثیر قطعهٔ اینترون ۴۴ ژن ACACA

محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با روش SSCP بررسی شدند. نتایج SSCP بیانگر وجود هشت الگوی باندی متفاوت است (شکل۲) که از ۱ تا ۸ به ترتیب دارای فراوانی ۲۰/۳، ۱۸/۷، ۱۳/۳، ۱۳/۳، ۱۳/۳، ۴/۷، ۸/۶ و ۷/۸ درصد بودند. از هر الگو دو نمونهٔ تصادفی برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کرهٔ جنوبی فرستاده شد که پس از توالی‌یابی مشخص شد دو الگو توالی کاملاً یکسانی داشتند و در یک گروه قرار گرفتند که به این ترتیب هفت الگو و توالی متفاوت به دست آمد. ویرایش و هم‌ردیفی نمونه‌ها توسط نرم‌افزارهای Bio Edit و Vector NT1 صورت گرفت. به دلیل اینکه ژنوم بز قبلاً به‌طور کامل شناسایی نشده بود و همچنین این قطعه از ژن ACACA پیش از این بررسی و توالی‌یابی نشده بود، این توالی‌ها و جهش‌هایشان با یکدیگر و با همان ژن و جایگاه مشابه در گوسفند مقایسه شد.



شکل ۳. الگوهای باندی مشاهده‌شده برای اینترون ۴۴ ژن ACACA

هفت جایگاه چندشکل در جمعیت مورد مطالعه و توالی ثبت‌شده برای بز با شمارهٔ دسترسی NC-022311 وجود داشت. در مجموع هفت جهش در جمعیت بز مهابادی در موقعیت‌های ۱۵۴۵۰۳(تغییر باز T به G)، ۱۵۴۵۱۸(تغییر باز G به A)، ۱۵۴۵۷۷(تغییر باز G به A)، ۱۵۴۶۴۰(تغییر باز T به C)، ۱۵۴۷۱۲(تغییر باز C به A)، ۱۵۴۹۲۸(تغییر باز T به C)، ۱۵۴۹۵۶(تغییر باز C به T) مشاهده شد. برای هر SNP فراوانی ژنوتیپی و ژنی در کل افراد جمعیت محاسبه و در جدول ۲ ارائه شده است. برای SNPهای شمارهٔ ۲، ۳ و ۵ هر سه ژنوتیپ ممکن در جمعیت وجود داشت، اما درمورد SNPهای ۱، ۴ و ۷ ژنوتیپ‌های TT و برای SNP ۶ ژنوتیپ CT در جمعیت مشاهده نشد. فراوانی آللی نیز به همین شکل توسط نرم‌افزار Gene AlEx 6.41 محاسبه و در جدول ۳ و شکل ۱ گزارش شده است.

تجزیهٔ واریانس و بررسی ارتباط SNPها با صفات عملکرد شیر

به علت کوچک‌بودن سایز جمعیت در مقابل تعداد جهش‌های مشاهده‌شده، از آنالیز داده‌ها و بررسی ارتباط SNPها به‌صورت هاپلوتایپیک پرهیز و ارتباط تک‌تک SNPها جداگانه با صفات مورد نظر بررسی شد.

ضریب تغییرات یک صفت، معیار خوبی برای تعیین تنوع آن صفت در جامعه به‌شمار می‌رود. ضرایب تغییرات دیده‌شده در این پژوهش نشان می‌دهد که پراکندگی زیادی برای صفت درصد چربی شیر و تعداد سلول‌های سوماتیک در مقایسه با دیگر صفات وجود دارد. علت ضریب تنوع بالا در صفات مورد مطالعه می‌تواند رکوردگیری در دوره‌های مختلف شیردهی باشد. آماره‌های توصیفی صفات مربوط به رکورد شیر شامل تولید شیر و ترکیبات شیر در جدول ۴ آمده است.

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپی و آللی SNPها در جمعیت مورد مطالعه

SNP	ژنوتیپ	فراوانی (درصد)	آلل	فراوانی (درصد)
۱	GG	۸۶/۷	G	۹۳/۴
	GT	۱۳/۳	T	۶/۶
	TT	-		
۲	AA	۸	A	۲۷/۳
	AG	۳۹	G	۷۲/۷
	GG	۵۳		
۳	AA	۷/۸	A	۲۷/۳
	AG	۳۹	G	۷۲/۷
	GG	۵۳/۲		
۴	CC	۹۵	C	۹۷/۷
	CT	۵	T	۲/۳
	TT	-		
۵	AA	۱۳/۳	A	۳۳/۶
	AC	۴۰/۶	C	۶۶/۴
	CC	۴۶/۱		
۶	CC	۱۳/۳	C	۱۳/۳
	TT	۸۶/۷	T	۸۶/۷
	CT	-		
۷	CC	۸۶/۷	C	۹۳/۴
	CT	۱۳/۳	T	۶/۶
	TT	-		

جدول ۴. آماره‌های توصیفی صفات مربوط به رکورد شیر شامل تولید شیر و ترکیبات شیر در جامعهٔ آماری

صفت	تعداد	بیشترین	کمترین	میانگین	انحراف استاندارد	ضریب تغییرات
تولید شیر (گرم)	۸۴۴	۱۹۴۰	۵۰	۶۰۶/۰۵	۳۳۹/۷۵	۵۶/۰۶
پروتئین شیر (درصد)	۲۲۸	۷/۳۷	۲/۲۹	۴/۱۶	۰/۷	۱۶/۷۹
درصد چربی شیر (درصد)	۲۲۷	۱۲/۵۶	۰/۲۰	۲/۲۶	۱/۹۱	۸۴/۵۳
تعداد سلول‌های سوماتیک (۱۰۰۰ در میلی‌لیتر)	۲۲۴	۱۲۶۸۹	۵/۱۷	۹۲۲/۲۱	۱۸۱۰/۶۹	۱۹۶/۳۴

بررسی آماری ارتباط بین صفات با عوامل موجود در معادلهٔ مدل

ژنوتیپ تک تک دام‌ها و داده‌های هر حیوان در نرم‌افزار Excel ثبت شد. سن حیوان هنگام زایش اثر کاملاً معناداری روی صفات شیر داشت (p<۰/۰۱). همچنین سال زایش (p<۰/۰۱) و ماه رکوردگیری (p<۰/۰۱) اثر معناداری روی صفات شیر داشتند؛ به‌طوری که سال ۹۰ بیشترین تأثیر را روی این صفت داشت که این اثر را می‌توان به مدیریت و تغذیهٔ بهتر در آن سال نسبت داد. رکوردگیری از بزها در ماه‌های اسفند، فروردین، اردیبهشت و خرداد صورت گرفت که اردیبهشت بیشترین تولید شیر و اسفند کمترین تولید شیر را داشت. تولید بیشتر شیر در اردیبهشت را می‌توان به مقدار علوفه و مواد مغذی بهتر در این ماه نسبت داد.

ارتباط بین صفات موردنظر با SNPهای مشخص‌شده و مقایسهٔ میانگین صفات در ژنوتیپ‌های مختلف پس از نرمال‌سازی داده‌ها در جدول ۵ به‌طور کامل گزارش شده است.

جدول ۵. مقایسهٔ میانگین حداقل مربعات و انحراف استاندارد تبدیل‌یافتهٔ[1] صفات مربوط به شیر برای هر SNP

SNP	ژنوتیپ	تولید شیر	چربی شیر	پروتئین	سلول‌های بدنی
	میانگین تبدیل‌یافتهٔ جمعیت	۲۸/۶۶±۷/۳۶	۰/۵۹±۰/۸۴	۰/۸۰±۰/۰۴	۸۶±۴/۲۵
۱	GG	۲۶/۹۱±۰/۹۱	۰/۲۲±۰/۱۸[a]	۱/۲۸±۰/۰۳	۳/۸۸±۰/۱۸
	GT	۲۷/۹۱±۰/۸۸	۰/۶۸±۰/۲۱[b]	۱/۳۲±۰/۰۳	۳/۹۵±۰/۲۲
		(n.s)	(P=۰/۰۱۷)	(n.s)	(n.s)
۲	AA	۲۲/۹۰±۲/۵۴[a]	۰/۳۲±۰/۳۵	۱/۲۷±۰/۰۶	۳/۷۱±۰/۲۳
	AG	۲۸/۱۹±۰/۴۵[b]	۰/۴۸±۰/۱۸	۱/۳۳±۰/۰۳	۳/۹۰±۰/۱۸
	GG	۲۸/۲۶±۰/۳۹[b]	۰/۴۴±۰/۱۷	۱/۲۸±۰/۰۳	۳/۹۹±۰/۱۸
		(P=۰/۰۵)	(n.s)	(n.s)	(n.s)
۳	AA	۲۲/۹۰±۲/۵۴[a]	۰/۳۲±۰/۳۵	۱/۲۷±۰/۰۶	۳/۷۱±۰/۲۳
	AG	۲۸/۱۹±۰/۴۵[b]	۰/۴۸±۰/۱۸	۱/۳۳±۰/۰۳	۳/۹۰±۰/۱۸
	GG	۲۸/۲۶±۰/۳۹[b]	۰/۴۴±۰/۱۷	۱/۲۸±۰/۰۳	۳/۹۹±۰/۱۸
		(P=۰/۰۵)	(n.s)	(n.s)	(n.s)
۴	CC	۲۶/۹۳±۰/۹۲	۰/۴۱±۰/۱۹	۰/۷۹±۰/۰۱	۴/۰۰±۰/۱۸
	CT	۲۷/۴۷±۰/۶۹	۰/۴۷±۰/۳۹	۰/۷۹±۰/۰۲	۳/۲۰±۰/۳۹
		(n.s)	(n.s)	(n.s)	(n.s)
۵	AA	۲۵/۸۹±۱/۲۱[b]	۰/۴۹±۰/۱۸	۰/۷۹±۰/۰۱	۴/۰۰±۰/۱۷
	AC	۲۷/۰۰±۰/۷۲[b]	۰/۱۹±۰/۲۳	۰/۷۹±۰/۰۱	۳/۷۵±۰/۲۴
	CC	۲۹/۶۴±۰/۴۰[a]	۰/۲۳±۰/۱۸	۰/۷۸±۰/۰۱	۳/۷۳±۰/۱۸
		(P<۰/۰۱)	(n.s)	(n.s)	(n.s)
۶	CC	۲۹/۹۶±۱/۹۷	۰/۳۸±۰/۲۰[a]	۰/۷۷±۰/۰۱	۳/۸۰±۰/۲۲
	TT	۲۷/۹۲±۰/۳۳	۰/۳۲±۰/۱۶[b]	۷۹±۰/۰۱	۳/۹۰±۰/۱۷
		(n.s)	(P=۰/۰۱۷)	(n.s)	(n.s)
۷	CC	۲۷/۰۸±۰/۹۲	۰/۲۲±۰/۱۸[b]	۱/۲۸±۰/۰۳	۳/۸۸±۰/۱۸
	CT	۲۷/۷۵±۰/۸۷	۰/۶۸±۰/۲۱[a]	۱/۳۲±۰/۰۳	۳/۹۵±۰/۲۲
		(n.s)	(P<۰/۰۱)	(n.s)	(n.s)

۱. میانگین مربعات و انحراف استاندارد صفات پس از نرمال‌سازی داده‌ها

تجزیهٔ واریانس، آنالیز داده‌ها و بررسی ارتباط SNPها با صفات عملکرد رشد

داده‌های مربوط به وزن تولد، وزن از شیرگیری، افزایش وزن روزانه، مقدار خوراک مصرفی برای ۸۰ روز توسط نرم‌افزار SAS مورد آزمون نرمال‌بودن قرار گرفتند و مشخص شد که از لحاظ باقیمانده‌های صفات مربوط به رشد نرمال هستند.

آماره‌های توصیفی صفات مربوط به رشد

همان‌طور که قبلاً گفته شد ضریب تغییرات یک صفت، معیار خوبی برای تعیین تنوع آن صفت در جامعه به شمار می‌رود. ضرایب تغییرات دیده‌شده برای صفات مربوط به رشد در این پژوهش در جدول ۶ آمده است.

بررسی آماری ارتباط بین صفات با عوامل موجود در معادلهٔ مدل

در مورد صفات مربوط به رشد عامل وزن مادر هنگام زایش تأثیر معناداری روی صفت وزن تولد داشت (p<۰/۰۵). همچنین عوامل ماه زایش، سال زایش، وزن از شیرگیری، وزن تولد و مقدار خوراک مصرفی تأثیر معناداری روی صفت افزایش وزن روزانه داشتند (p<۰/۰۵). در مورد صفت وزن از شیرگیری هیچ‌یک از عوامل تأثیر معناداری روی صفت نداشتند. درمورد صفت وزن نهایی هم تنها عامل وزن از شیرگیری تأثیر معناداری روی صفت نشان می‌داد (p<۰/۰۱).

مقایسهٔ میانگین حداقل مربعات بین ژنوتیپ‌های مختلف در هر جایگاه نشان داد که تفاوت معناداری بین ژنوتیپ‌ها در صفات رشد وجود ندارد (جدول ۷).

جدول ۶. آماره‌های توصیفی صفات مربوط به رشد

صفت	تعداد	بیشترین	کمترین	میانگین	انحراف استاندارد	ضریب تغییرات
وزن تولد (کیلوگرم)	۵۱	۵/۰۰	۲/۱۸	۳/۳۲	۰/۵۳	۳۷/۰۵
وزن از شیرگیری (کیلوگرم)	۴۹	۳۰/۵۰	۹/۲۰	۱۹/۴۴	۵/۱۸	۲۶/۶۶
افزایش وزن روزانه (کیلوگرم)	۴۹	۰/۳۲	۰/۰۶	۰/۱۴	۰/۰۵	۳۷/۰۵
وزن نهایی (کیلوگرم)	۴۹	۳۸/۳۲	۲۰/۶۴	۲۹/۲۲	۵/۸۹	۲۰/۱۶

جدول ۷. مقایسهٔ میانگین حداقل مربعات و انحراف استاندارد تبدیل‌یافتهٔ[1] صفات مربوط به رشد برای هر SNP

SNP	ژنوتیپ	وزن تولد (کیلوگرم)	وزن از شیرگیری (کیلوگرم)	افزایش وزن روزانه (کیلوگرم)	وزن نهایی (کیلوگرم)
	میانگین در جمعیت	۳/۳۲±۰/۶۳	۱۹/۴۴±۵/۱۸	۰/۱۴۴±۰/۰۵	۲۹/۲۲±۵/۸۹
۱	GG	۳/۱۳±۰/۲۶	۱۹/۹۴±۱/۷۹	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۹/۷۹±۱/۴۰
	GT	۲/۹۱±۰/۴۲	۲۳/۲۴±۲/۹۴	۰/۱۵±۰/۰۰۶	۲۹/۴۳±۲/۳۶
۲	AA	۳/۱۸±۰/۴۵	۲۰/۹۰±۳/۲۴	۰/۱۷±۰/۰۰۹	۲۹/۲۰±۲/۵۴
	AG	۳/۳۴±۰/۳۲	۱۸/۶۷±۲/۳۱	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۹/۵۲±۱/۵۳
	GG	۳/۰۵±۰/۲۷	۲۰/۴۶±۱/۹۶	۰/۱۶±۰/۰۰۴	۲۹/۹۳±۱/۵۱
۳	AA	۳/۱۸±۰/۴۵	۲۰/۹۰±۳/۲۴	۰/۱۷±۰/۰۰۹	۲۹/۲۰±۲/۵۴
	AG	۳/۳۴±۰/۳۲	۱۸/۶۷±۲/۳۱	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۹/۵۲±۱/۵۳
	GG	۳/۰۵±۰/۲۷	۲۰/۴۶±۱/۹۶	۰/۱۶±۰/۰۰۴	۲۹/۹۳±۱/۵۱
۴	CC	۳/۱۲±۰/۲۶	۱۹/۹۸±۱/۸۵	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۹/۷۸±۱/۴۰
	CT	۲/۸۶±۰/۵۲	۲۲/۰۳±۳/۷۳	۰/۱۵±۰/۰۰۸	۲۹/۳۹±۲/۸۶
۵	AA	۲/۶۸±۰/۳۹	۲۰/۷۹±۳/۰۸	۰/۱۶±۰/۰۰۸	۳۲/۶۵±۱/۸۶
	AC	۳/۳۴±۰/۳۷	۱۹/۰۲±۲/۶۸	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۸/۰۲±۱/۷۱
	CC	۳/۳۲±۰/۲۹	۱۹/۷۷±۲/۱۴	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۸/۸۵±۱/۴۰
۶	CC	۳/۰۸±۰/۳۸	۱۹/۵۲±۲/۹۶	۰/۱۵±۰/۰۰۸	۳۰/۰۷±۲/۲۶
	TT	۳/۱۴±۰/۳۰	۲۰/۲۳±۲/۱۸	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۹/۶۴±۱/۶۳
۷	CC	۳/۱۳±۰/۲۶	۱۹/۹۴±۱/۷۹	۰/۱۶±۰/۰۰۵	۲۹/۷۹±۱/۴۰
	CT	۲/۹۰±۰/۴۲	۲۳/۲۴±۲/۹۴	۰/۱۵±۰/۰۰۶	۲۹/۴۳±۲/۳۶

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که در فصل نتایج مشاهده می‌شود در قطعهٔ تکثیرشدهٔ اینترون ۴۴ ژن ACACA، چندشکلی وجود داشت. با مطالعهٔ توالی الگوهای مختلف هفت SNP جدید در قطعهٔ تکثیرشده وجود داشت که همگی در ناحیهٔ اینترون ۴۴ ژن ACACA قرار داشتند. در مطالعات گذشته هم تعداد شایان‌توجهی SNP در این ژن توسط محققان مختلف کشف و گزارش شده است (Moioli et al., 2005; Zhang et al., 2009; Garcia-Fernandez *et al*., 2010; Shin *et al*., 2011). با توجه به نتایج آنالیز ارتباط بین SNPها و تغییرات صفات که در جدول۴ ارائه شده است، درمورد صفت تولید شیر، SNP شمارهٔ دو و سه (تغییر باز G به A)، در سطح (P=۰/۰۵) و SNP شمارهٔ پنج (تغییر باز C به A) در سطح (*P*<۰/۰۱) اثر معناداری روی این صفت نشان دادند که دام‌های با ژنوتیپ GG برای SNPهای دو و سه و ژنوتیپ CC برای SNP پنج بیشترین تولید شیر را داشتند. درمورد صفت درصد چربی شیر، SNP یک (P=۰/۰۱۷)، SNP شش (P=۰/۰۱۷) و SNP هفت اثر معناداری بر این صفت نشان دادند (P<۰/۰۱) که در مورد SNP شمارهٔ یک (تغییر باز T به G) فقط ژنوتیپ‌های GG و GT در جمعیت مشاهده شدند و ژنوتیپ هتروزیگوت درصد چربی بیشتری داشت. در مورد SNP شمارهٔ شش (تغییر باز T به C) نیز ژنوتیپ‌های هموزیگوت CC و TT در جمعیت مشاهده شدند که ژنوتیپ CC واجد درصد چربی بیشتری در شیر بود. در مورد SNP شمارهٔ هفت (تغییر باز C به T) هم ژنوتیپ TT در جمعیت مشاهده نشد و ژنوتیپ هتروزیگوت درصد چربی شیر بیشتری داشتند. در مطالعهٔ Badaoui *et al.* (2007) نیز ارتباط معناداری بین صفات شیر و یک جهش خاموش در ناحیهٔ اگزون ۴۴ به ۴۵ ژن ACACA در بز گزارش شده است. Garcia-Fernandez et al. (2010) نیز گزارش کرده‌اند ارتباط معناداری بین چندشکلی ژن ACACA با درصد چربی و ترکیبات اسیدهای چرب در گوسفند وجود دارد. Moioli *et al.* (2005) و Federica *et al.* (2009) نیز بین چندین چندشکلی در ناحیهٔ پروموتر ۳ ژن ACACA در گوسفند و صفات شیر ارتباط معناداری گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۵ نیز ارتباط معناداری بین صفات شیر و سه SNP در ژن ACACA در گوسفند شناسایی و گزارش شد (Moioli *et al*., 2004). Matsumoto *et al.* (2012) نیز ارتباط معناداری میان چندشکلی ژن ACACA و صفات شیر به‌ویژه درصد چربی شیر گزارش کرده‌اند. در مورد صفات درصد پروتئین شیر و همچنین تعداد سلول‌های بدنی در شیر هیچ‌یک از SNPها تأثیر معناداری روی این صفات نداشتند، این در حالی است که در برخی از مطالعات نظیر Garcia-Fernandez *et al.* (2010) و Ibeagha-Awemu (2008)، ارتباط معناداری بین چندشکلی در ACACA و درصد پروتئین شیر و تعداد سلول‌های سوماتیک گزارش شده است. در مطالعه‌ای، سه SNP در نواحی اگزون ۱۴، ۴۵ و ۴۶ همین ژن در بزهای آلپاین مشاهده شد که SNP ناحیهٔ اگزون ۴۶ ارتباط کاملاً معناداری با صفات شیر نشان داده است (Dong *et al*., 2013). در مورد صفات رشد اعم از وزن تولد، وزن ازشیرگیری، افزایش وزن روزانه و وزن نهایی هیچ ارتباط معناداری بین این صفات با SNPهای مورد مطالعه مشاهده نشد که به دلیل اندازهٔ جمعیت و عدم اطمینان از صحت و دقت رکوردبرداری، از قضاوت دربارهٔ ارتباط احتمالی این صفات با جهش‌های کشف‌شده می‌پرهیزیم. در حالی که Shin *et al.* (2011) در مطالعه‌ای روی گاوهای هانوو کره‌ای T دو SNP در ناحیهٔ اینترون ۱ این ژن شناسایی و گزارش کردند که جهش g.2344T>C ارتباط معناداری با صفات وزن زنده (P<۰/۰۰۹) و وزن لاشه داشت (P=۰/۰۱۷). حیوانات با ژنوتیپ CC وزن بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر داشتند. همچنین جهش g.2447C>A ارتباط معناداری با رنگ گوشت لاشه نشان داد (P=۰/۰۱۹). همچنین Zhang *et al.* (2009) در مطالعه روی چندشکلی پروموتر ۱ این ژن در گاو، هشت SNP جدید کشف کردند که ارتباط آن‌ها با صفات ضخامت چربی پشت و ترکیبات اسیدهای چرب و تری آسیل گلیسرول معنادار گزارش شد. Gallardo *et al.* (2011) نیز ارتباط معناداری بین چندشکلی ژن ACACA با صفات لاشه و متابولیت‌های چربی در خوک گزارش کرده‌اند.

REFERENCES

1. Badaoui, B., Serradilla, J., Tomas, A., Urrutia, B., Ares, J., Carrizosa, J., Sanchez, A., Jordana, J. & Amills, M. (2007). Goat acetyl-coenzyme A carboxylase α: molecular characterization, polymorphism, and association with milk traits. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 1039-1043.
2. Barber, M., Pooley, L. & Travers, M. (2001). Developmental regulation of alternatively spliced acetyl-CoA carboxylase-alpha mRNAs encoding isozymes with or without an eight amino acid domain upstream of the Ser-1200 phosphorylation motif in the mammary gland. *Journal of Molecular Endocrinology*, 27(3), 349-356.
3. Barber, M.C. & Travers, M.T. (1998). Elucidation of a promoter activity that directs the expression of acetyl-CoA carboxylase alpha with an alternative N-terminus in a tissue-restricted fashion. *Biochemical Journal*, 333(Pt 1), 17.
4. Crepaldi, B., Nicoloso, L., Coizet, B., Milanesi, E., Pagnacco, G., Fresi, P. & Dimauro, C. (2013). Associations of acetyl-coenzyme A carboxylase α, stearoyl-coenzyme A desaturase, and lipoprotein lipase genes with dairy traits in Alpine goats. *Journal of Dairy Science*, 96, 1856-1864.
5. Dong, Y., Xie, M., Jiang, Y., Xiao, N., Du, X., Zhang, W., Tosser-Klopp, G., Wang, J., Yang, S., Liang, J., Chen, W., Chen, J., Zeng, P., Hou, Y., Bian, C., Pan, S., Li, Y., Liu, X., Wang, W., Servin, B., Sayre, B., Zhu, B., Sweeney, D., Moore, R., Nie, W., Shen, Y., Zhao, R., Zhang, G., Li, J., Faraut, T., Womack, J., Zhang, Y., Kijas, J., Cockett, N., Xu, X., Zhao, S., Wang, J. & Wang, W. (2013). Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nature Biotechnology*, 31(2), 135-41.
6. Federica, S., Francesco, N., Giovanna, D M., Carmela, SM., Gennaro C., Carmela, T. & Bianca, M. (2009). Identification of novel single nucleotide polymorphisms in promoter III of the acetyl-CoA carboxylase-{alpha} gene in goats affecting milk production traits. *Journal of Hered*, 100(3), 386-9.
7. Gallardo, D., Quintanilla, R., Varona, L., Díaz, I., Ramirez, O., Pena, R. & Amills, M. (2009). Polymorphism of the pig acetyl-coenzyme A carboxylase α gene is associated with fatty acid composition in a Duroc commercial line. *Animal Genetics*, 40(4), 410-417.
8. García-Fernández, M., Gutiérrez-Gil, B., Garcia-Gámez, E. & Arranz, J.J. (2010). Identification of single nucleotide polymorphisms in the ovine acetyl-CoA carboxylase-alpha gene. *Small Ruminant Research*, 90(1), 34-40.
9. Ibeagha-Awemu, E.M., Kgwatalala, P. & Zhao, X. (2008). A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*, 19(9), 591-617.
10. Iranpur M.V. & Esmailizadeh, A.K . (2010). Rapid extraction of high quality DNA from whole blood stored at 4ºC for long period. Available from: http://www.protocol-online.org/prot/Protocols.
11. Matsumoto, H., Sasaki, K., Bessho, T., Kobayashi, E., Abe, T., Sasazaki, S., Oyama, K. & Mannen, H. (2012). The SNPs in the ACACA gene are effective on fatty acid composition in holstein milk. Molecular Biology Reports: 1-8.
12. Moioli, B., D'Andrea, M. & Pilla, F. (2007). Candidate genes affecting sheep and goat milk quality. *Small Ruminant Research*, 68(1), 179-192.
13. Moioli, B., Napolitano, F., Orrù, L. & Catillo, G. (2005). Single nucleotide polymorphism detection in promoter I of the acetyl-CoA carboxylase-α gene in sheep. *Small Ruminant Research*, 59(1), 49-53.
14. Moioli, B., Napolitano, F., Orru, L. & Catillo, G. (2005). Single nucleotide polymorphism detection in promoter III of the acetyl-CoA carboxylase-α gene in sheep. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122(6), 418-420.
15. Shin, S.C., Heo, J. & Chung, E.R. (2011). Effect of Single Nucleotide Polymorphisms of Acetyl-CoA Carboxylase α (ACACA) Gene on Carcass Traits in Hanwoo (Korean Cattle).
16. Tong, L. (2005). Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(16), 1784-1803.
17. Travers, M. & Barber, M. (2001). Acetyl-CoA carboxylase-α: gene structure-function relationships. *Journal of Animal Science*, 79(Suppl E), E136-E143.
18. Volpe, J. & Marasa, J. (2006). Regulation of palmitic acid synthesis in cultured glial cells: Effects of lipid on Fatty acid synthetase, acetyl-CoA carboxylase, fatty acid and sterol synthesis1. *Journal of Neurochemistry*, 25(3), 333-340.
19. Zhang, S., Knight, T., Reecy, J., Wheeler, T., Shackelford, S., Cundiff, L. & Beitz, D. (2009). Associations of polymorphisms in the promoter I of bovine acetyl-CoA carboxylase-α gene with beef fatty acid composition. *Animal Genetics*, 41(4), 417-420.
20. Zhang, S., Knight, T.J., Reecy, J.M., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Cundiff, L.V. & Beitz, D.C. (2008). Association of polymorphism in the promoter I of bovine Acetyl-CoA Carboxylase- alpha gene with beef lipid content. *Genetcs*, 3, 123-132.

Iranian Journal of Animal Science, Vol. 46, No. 4, Winter 2016

Study of polymorphism in ACACA gene and its association with milk and growth traits in Mahabadi goats using the PCR-SSCP technique

Reza Faraji[1], Mostafa Sadeghi[2*] and Mohammad Moradi Shahrbabak[3]
1, 2, 3. Former M. Sc. Student, Associate Professor and Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Aug. 22, 2013 - Accepted: Nov. 13, 2015)

ABSTRACT

This research was conducted to study polymorphism of intron 44 of ACACA gene and its association with milk traits in Mahabadi goats. Blood samples were taken from 81 Mahabadi goats. DNA was extracted from blood using salting out method. 897 base pair fragment of intron 44 ACACA gene was amplified using polymerase chain reaction. SSCP method was used to investigate the amplified DNA fragment polymorphism. Amplified products were sequenced in both directions. Finally, seven different patterns were obtained and sequences compared with each other also with *Capra hircus* ACACA gene sequence on NCBI (NC_022311). Seven novel SNPs were identified which were NC_022311: nucleotide 154503(T/G), 154518(A/G), 154577(A/G), 154640(C/T), 154712(A/C), 154928(C/T), 154956(C/T). Then a mixed animal model was used by SAS9.1 analysis system to evaluate the association of these SNPs with milk traits. In this model, variables of age of dam, genotypes and mount of recording were considered as fixed effects. There were significant association of SNP2 (P=0.05), SNP3 (P=0.05) and SNP5 (P<0.01) with milk yield. SNPs 1 (P=0.017), 6 (P=0.017) and 7 (P<0.01) had also significant effect on milk fat-percentage.

Keywords: ACACA gene, Mahabadi goats, milk traits, PCR-SSCP, polymorphism.

* Corresponding author E-mail: sadeghimos@ut.ac.ir Tel: +98 26 32541022