بررسی بیان ژن‌های SCD و FASN در میش‌های بلوچی و نژادهای سنتز شده ایران بلک و آرمان

محمد سلمانی ایزدی*[1] ،عباسعلی ناصریان [2]، محمد رضا نصیری[2] ، رضا مجید زاده هروی [2]، رضا ولی زاده[2]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد

۲- هیئت علمی گروه علوم دامی ،دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

ایمیل نویسنده مسئول : ms_izadi87@yahoo.com

چکیده

موثر ترین ژن بر سرعت بیوسنتز اسیدهای چرب دارای یک پیوند دو گانه (MUFA) ،استریول کوآنزیم آ دسچوراز (SCD) است. این ژن نقش مهمی در سوخت و ساز چربی و نگهداری خاصیت سیالیت غشاء بر اساس اهمیت فیزیولوژیکی بین اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع دارد.از طرفی ژن سنتز کننده اسیدهای چرب (FASN) که سبب سنتز اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر(C4 تاC16) در بافت پستان است میتواند بعنوان پیش سازی در تولیداسید چرب با یک پیوند دوگانه نقش داشته باشد.هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بروز این ژنها (SCD,FASN) در میشهای بلوچی و نژادهای سنتز شده ایران بلک و آرمان موجود در مرکز تحقیقات گوسفند شمال شرق کشور (عباس آباد)می باشد. به این منظور ۲٤ راس میش سه ساله که حاصل زایمان تک قلو بوده و بره های تک قلو نیز داشتند انتخاب گردید و در پایان شیرواری نمونه بافت پستان به روش بیوپسی (Biopsy) تهیه شد. پس از استخراج RNA و ساخت c DNA ، واکنش های rael-time PCR در تمامی نمونه ها و با سه تکرار برای هر نمونه انجام گرفت.از ژن GAPDH برای کنترل داخلی استفاده گردید .میزان بیان، برای ژنهای SCD و FASN به ترتیب مقادیر 2^{5} و 2^{4} فولد(fold) در میش های نژاد بلوچی از نژادهای ایران بلک و آرمان بیشتر می باشد.کاهش بیان این دو ژن در بین نژادهای ایران بلک و آرمان مقایسه گردید و مشخص شد که نژاد آرمان کاهش 2^{2} برابری برای ژن SCD و 2^{4} برابری برای ژن FASN نسبت به نژاد ایران بلک نشان می دهد.که با روش $\Delta\Delta$ CT محاسبه شده است. چون بیان این ژن ها در گوسفندان بلوچی بعنوان یک نژاد بومی و پایه بیشتر بوده پس با آمیخته گری بیان این ژنها در دو جمعیت دیگر کاهش یافته است. و کاهش بیان این ژنها در دو جمعیت دیگرمی تواند به سبب کاهش میزان سهم خونی نژاد بلوچی در دو جمعیت دیگر باشد.با توجه به اینکه این مطالعه تاثیر آمیخته گری را در بیان این ژن ها نشان می دهد ضروری است که در برنامه های اصلاح نژادی پیش بینی های لازم انجام شود.

واژه های کلیدی : آمیخته گری – بیان ژن– SCD – FASN، real-time PCR

مقدمه

یکی از نژادهای مهم گوسفند دراستانهای خراسان ، سیستان و بلوچستان ،کرمان و یزد نژاد بلوچی است.که در شمال شرق ،شرق و جنوب ایران نیز پراکنده ست. گوسفند بلوچی از شاخص‌ترین نژادهای بومی ایران است بگونه‌ای که حدود ۳۰٪ از جمعیت

گوسفندان ایرانی را در بر می‌گیرد. ولی نسبت به پراکندگی و تعداد زیاد آن و تولید فراورده های لبنی از شیر این نژاد و مصرف آن در جمعیت های زیادی از مناطق کشور خصوصیت این محصول حایز اهمیت است.از سال ۱۳٥٤ به منظور افزایش تولید در این نژاد برنامه آمیخته گری با نژاد کیوسی یونان انجام شدو منجرب به سنتز نژاد ایران بلک گردید وهمچنین از سال ۱۳٥٥ نیز به منظور تولید بهتر تلاقی گوسفند بلوچی با سه نژاد کیوسی ،سافولک و قزل انجام ومنجرب به سنتز نژاد آرمان در سال ۱۳۷٤گردید.در ایران تاکنون مطالعه ای درباره تغییرات ناشی از آمیخته گری در گوسفند بر بیان ژن انجام نشده است.بیان ژن استریول کو آنزیم آ دسچوراز (SCD) عامل موثر بر بیوسنتز اسیدهای چرب با یک پیوند دو گانه (MUFA) است . که در بوجود آوردن یک پیوند دو گانه سیس (CIS) بین کربن ۹ و ۱۰ در یک طیف وسیعی از اسیدهای چرب (FA) اشباع شده با اولویت اسیداستئاریک C18 و اسید پالمتیک C16 نقش کلیدی دارد .(۳و٥). آنزیم دلتا ۹ دسچوراز نقش مهمی در سوخت و ساز چربی و نگهداری خاصیت سیالیت غشاء، بر اساس اهمیت فیزیولوژیکی نسبت بین اسید های چرب اشباع و غیر اشباع را دارد(۸و۷).تغییرات در این نسبت در انواع بیماریها از جمله بیماریهای قلبی و عروقی ، چاقی ، دیابت ، فشار خون بالا ، بیماریهای عصبی ، اختلالات سیستم ایمنی و سرطان نقش دارد (۲).رونویسی این ژن با بیان بالا در بافت چربی ، کبد و غده پستانی حیوانات شیرده نشخوارکننده انجام می شود. در بافت پستان نشخوارکنندگان ٦۰٪ اولئیک اسید (Cis- 9 -18:1 اسید چرب اصلی شیر) ٥۰ تا ٥٦ ٪ پالمیتولئیک اسید (Cis- 9 - 16:1) ،۹۰٪ مریستولئیک (Cis-9 - 14:1) وبیش از ٦۰٪ ایزومرهای عمده کونژوگه لینولئیک اسید CLA (cis-9 , Trans- 11 - 18:2 یا رومنیک اسید) که نتیجه سنتز پستانی عمل آنزیم SCD در تبدیل استئاریک اسید ۱۸:۰ ،پالمیتیک اسید ۱٦:۰ ،میرستیک اسید ۱٤:۰ و واسینیک اسید (Trans-11-18:1) است (۲). ژن FASN موثر در سرعت سنتز اسیدهای چرب درون بافتی در نشخوارکنندگان است.فعالیت اصلی آن سنتز پالمیتات از استیل کوآنزیم آ و مالونیل کوآنزیم آ ،در حضور نیکوتینامید دی نوکلوتید فسفات به اسیدهای چرب اشباع با زنجیره بلند است(۱و۲و٦) .همچنین پیشنهاد شده است که این ژن تاثیرات گوناگونی بر ذخیره چربی در گونه های مختلف دارد(۲و٤) .

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۲٤ راس میش از سه نژاد بلوچی،ایران بلک و آرمان که از هر نژاد ۸ راس میش سه ساله تک قلو که حاصل زایمانشان نیز تک قلو بود در مرکز تحقیقات گوسفند شمال شرق کشور (عباس آباد) مشهدانتخاب شد. جهت تعیین میزان بیان ژن های SCD وFASN از بافت پستان به روش بیوپسی (Biopsy) نمونه برداری گردید. جهت یکسان سازی شرایط محیطی ، تمامی نمونه ها از مرکز عباس آباد ودر یک فصل (فصل بهار) و از میشهای هم سن وازنظر نوع زایش در شرایط مساوی و همگی از جیره غذایی یکسان مرتعی استفاده نموده و در اواخر شیر دهی بودنداستفاده شد.جهت تعیین میزان بیان ژن های SCD وFASN از بافت پستان به روش بیوپسی (Biopsy)بعد از دوشش صبح غده پستانی تراشیده و تمیز شده سپس برش ۲تا۳ سانتی متری با چاقوی کالبد شکافی در پوست و در قسمت بالایی پستان سمت راست در جهت رسیدن به بافت چربی پستان تحت شرایط استریل انجام شد وبلا فاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و در فریزر ۸۰- درجه نگهداری گردید.نمونه ها در کمترین زمان به آزمایشگاه جهت استخراج RNA منتقل شد.استخراج RNA کل با استفاده از روش Tripure (Roche ,Germany) انجام گرفت و کمیت و کیفیت RNAها بادستگاه الکتروفورز بر روی ژل اگارز ۰/۸ درصد (۱٥ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰) تعیین شدند . با توجه به کمیت و کیفیت RNA ها بدست آمده c DNA تمای نمونه ها با استفاده از کیت Revertaid c DNA synthesis (Termofisher Scientific ,Litvania) و مطابق دستور العمل شرکت سازنده ساخته شد. آغازگرهای مستقیم Forward و معکوس Reverse برای ژنهای هدف SCD (Stearoyl-CoA desaturase) و FASN (fatty acid synthase) و ژن کنترل کننده GAPDH (glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase) بر اساس مطالعه (درویشی و همکاران ۲۰۱۲) انجام گرفت. (جدول ۱) .

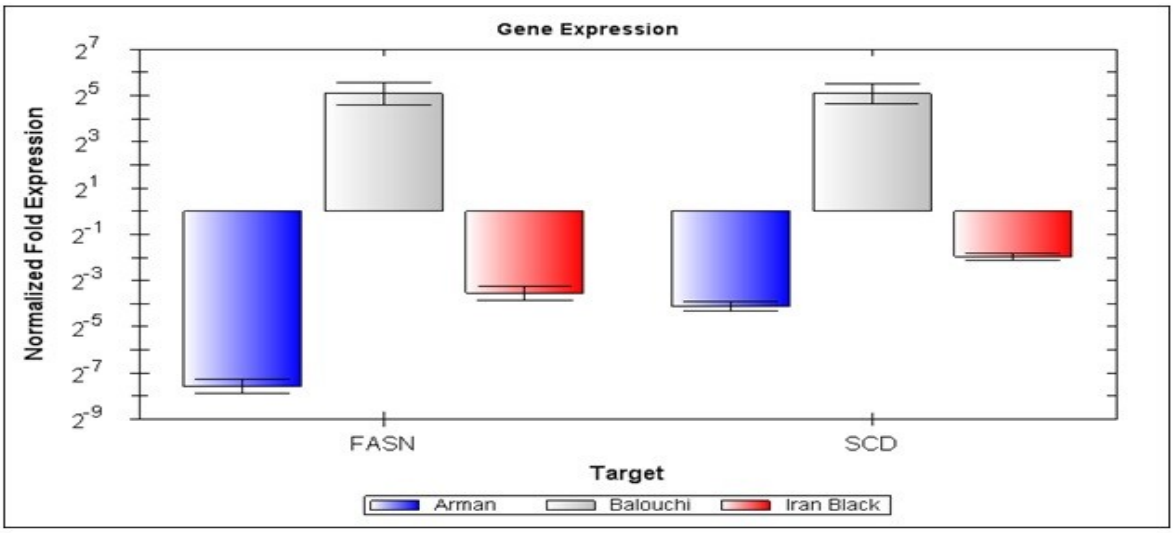
نتایج و بحث

به طور متوسط بیشترین مقدار بیان ژن در نژاد بلوچی و کمترین بیان ژن در نژاد آرمان و حد وسط این دو در نژاد ایران بلک بدست آمد.(نمودار ۱).نتایج بدست آمده نشان دهنده کاهش چهار برابری و دو برابری ژن FASN در نژاد های آرمان و ایران بلک نسبت به بلوچی است. و همچنین کاهش هفت و نیم برابری و سه و نیم برابری ژن SCD در نژادهای آرمان و ایران بلک نسبت به بلوچی است.(جدول۲)مطالعاتی بر روی ژنهای سنتز کننده چربی در نژادهای داخلی توسط بختیاری و همکاران ۲۰۱۳ بر روی نژادهای زل و لری بختیاری در بافت چربی انجام شده است. مقادیر بیان نسبی ۵/۹۲ و ۱۱/٦۷ به ترتیب برای ژن SCD و FASN در نژاد زل و مقادیر ۰/۸٦ و ۱/۵۲ در نژاد لری بختیاری بدست آمده است . ولی تاکنون رکوردی برای ژنهای سنتز چربی در پستان برای نژادهای گوسفند داخلی گزارش نشده است. توسط تورال و همکاران در ۲۰۱۵ روی نژاد Assaf انجام شده است.که بیان ژن SCD را حدود ٦/۲٦ تا ٦/۷۵ نشان داده است.گزارشات توسط تسی پلاکو و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی گوسفند شیری فریزین مقدار بیان ژن را در این دو ژن به ترتیب ۱/۷۵ و ۲/۵ و در بزهای الفین ۰/۷۵ و ۱۵ نشان دادند. ماؤو و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی گوسفندان نژاد هاژیو (Huzhou) مقادیر ۰/۷۵ را نشان دادند. بر روی گوسفند نژاد قزاق همبستگی منفی بین سطح بیان این ژن و چربی بین ماهیچه ای گزارش شده است(۲و٤) .گزارش شده ارتباط معنی داری بین سطح بیان این ژن و درصد چربی عضله سینه و ران در مرغ وجود ندارد(۲و٤).این یافته الگوی بیان افتراقی ژن FASN در بافتها و گونه های مختلف را تایید میکند.همچنین الدا درویشی و همکاران بر روی نژاد راسا اراگونزا (Rasa Aragonesa) اسپانیا در سال ۲۰۱۱ بیان ژنهای مورد مطالعه را زیر گزارش کردند که نزدیک به مطالعه حاضر است . سپس (۲و٤) بر روی نژاد چورا تنسینا (Churra Tensina) اسپانیا مقدار بیان این ژنها را ۳/۵ و ۲/۵ در میش ها براورد کردند. همپنین الساندرا کرسیا در سال ۲۰۱۲ بر روی سه نژاد ایتالیا یی(Altamurana, Gentile di Puglia and Sarda.) مطالعه نموده و اثرات این ژنها را در مقدار چربی شیرنشان داده است. همچنین اقای تارچیلا ازابلا در سال ۲۰۱۵ ارتباط ژنهای FASN, SCD را در مسیر سنتز CLAمطالعه نمودند.تاثیر تغییر در بیان ژنها در نتیجه آمیخته گری بر روی نژادهای مختلف گاو شیری انجام شده است که مطالعات پاپی و همکاران در سال۲۰۰۰ بر روی جمعیت های آمیخته در گاوهای شیری نشان دهنده کاهش بیان ژنها نسبت به نژادهای بومی بوده است.همچنین (۲و٤) بر روی سه نژاد گاوشیری نشان دادن که آمیخته گری می توتند بیان بعضی از ژنها را کاهش دهد. این مطالعات با نتایج حاصل از تحقیق حاضر که نشان دهنده کاهش بیان این دو ژن در نژادهای آمیخته ایران بلک و آرمان نسبت به نژاد بومی بلوچی است را تایید می نماید.در این مطالعه کاهش بیان ژن در نژادهای سنتز شده ایران بلک و آرمان را نسبت به بلوچی می توان به برنامه آمیخته گری سنتز این نژادها مرتبط دانست و با کاهش بیشتر سهم ژنتیکی گوسفندان بومی در نژاد آرمان ، بیان این ژن نسبت به نژاد بلوچی و ایران بلک کاهش یافته است . همچنین کاهش بیشتر بیان ژن در تژاد آرمان نسبت به ایران بلک به دلیل کاهش بیشتر سهم خونی نژاد بلوچی با توجه به تلاقی حاصل از چهار نژادی سنتزگوسفندان آرمان می باشد. بنابراین با توجه به اهمیت این ژنها در تولید شیرهای با ترکیبات مفید در تغذیه انسان باید به عنوان الگویی در طراحی برنامه های آمیخته گری مد نظر قرار گیرد.

جدول ۱ : مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی 5′ →3′	[1]اندازه قطعه تولید شده bp	[2]کد ژن بانک	[3]دمای اتصال (oC)
SCD F	atgttgaccacatccccatt	۱۱۵	AJ001048	۵۷
SCD R	cccagctgtcagagaaaagg		AJ001048	
FASN F	gtgtggtacagcccctcaag	۱۱۰	GQ150557	۵۷
FASN R	gtgtggtacagcccctcaag		GQ150557	
GAPDH F	atgcctcctgcaccacca	۷۶	HM043737	۵۷
GAPDH R	agtccctccacgatgccaa		HM043737	

F :Forward , R :Revers ;1- Amplicon (bp) ;2- GenBank accession numbers :3- Annealing temperature



شکل ۱: میزان بیان ژنها در سه نژاد بلوچی ، ایران بلک و آرمان

جدول ۲ : سطوح بیان نسبی ژنهای هدف در نژادهای بلوچی ، ایران بلک و آرمان

	بلوچی	ایران بلک	آرمان
SCD	۵.۰۸±۱۲.۳۸	-۳.۵۳±۰.۰۲۹	-۷.۵۸±۰.۰۰۱
FASN	۵.۰۸±۱۴.۲۹	-۱.۹۵±۰.۰۲۱	-۴.۱۱±۰.۰۰۸

منابع

1- Akpa, M.M., Point, F., Sawadogo, S., Radenne, A., Mounier, C., 2010. Inhibition of insulin and T3-induced fatty acid synthase by hexanoate. Lipids 45, 997–1009.
2-Bernard L, Montazer Torbati MB, Graulet B, Leroux C, Chilliard Y (2012) Long-chain fatty acids differentially alter lipogenesis in bovine and caprine mammary slices. J Dairy Res 80(89–95
3-Bichi E, Toral PG, Hervás G, Frutos P, Gómez-Cortés P, Juárez M, de la Fuente MA (2012)

Inhibition of Δ9-desaturase activity with sterculic acid: effect on the endogenous synthesis of
4-Dervishi, E., Serrano, C., Joy, M., Serrano, M., Rodellar, C., Calvo, J.H., 2011. The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. Meat Sci. 89, 91–97.
5-García-Fernández M, Gutiérrez-Gil B, García-Gámez E, Sánchez JP, Arranz JJ. Detection of quantitative trait loci affecting the milk fatty acid profile on sheep chromosome 22: role of the stearoyl-CoA desaturase gene in Spanish Churra sheep. J Dairy Sci. 2010; 93(1):348-57.
6-Joseph, S.J., Robbins, K.R., Pavan, E., Pratt, S.L., Duckett, S.K., Rekaya, R., 2010. Effect of diet supplementation on the expression of bovine genes associated with fatty acid synthesis and metabolism. Bioinf. Biol. Insights 4, 19–31.
7-Han LQ, Pang K, Li HJ, Zhu SB, Wang LF, Wang YB. et al. Conjugated linoleic acid-induced milk fat reduction associated with depressed expression of lipogenic genes in lactating Holstein mammary glands. Genet. Mol. Res. 2012; 11 (4): 4754-4764.
8-Huang ZG, Xiong L, Liu ZS, Qiao Y, Liu SR, Ren HX, Xie Z, Liu GQ, Li XB:The developmental changes and effect on IMF content of H-FABP and PPARgamma mRNA expression in sheep muscle. Yi Chuan Xue Bao 2006,33:507–514.

Evaluation of SCD and FASN gene expression in three sheep breeds: Baluchi, Iran-Black and Arman

The most effective rate of fatty acid biosynthesis gene has a double bond (MUFA) stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD). This gene plays an important role in fat metabolism and membrane fluidity of property based on the physiological significance of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids. On the other hand, gene synthesis (FASN) that causes short and medium chain fatty acid synthesis (C4 to C16) in mamary tissue could be involved in a double bond in the fatty acids. the aim of this study was to evaluate the incidence of this gene (SCD, FASN) synthesized in Baluchi , Iran Black and Arman ewes in the center sheep Research North East of the country (Abbas bad) . For this purpose, 24 ewes and lambs three-year delivery singleton was also chosen at the end of lactation and mamary tissue biopsy samples (Biopsy) was prepared. After RNA extraction and production of c DNA, rael-time PCR reactions in all cases with three replications for each sample. GAPDH gene was used for internal control rate of speech, for SCD and FASN genes, levels of 2^5 and 2^4 fold respectively . The maximum expression of SCD and FASN genes was in Baluchi local sheep and the minimum expression was in crossbred Arman Sheep breed.With consideration of highest gene expression in local Baluchi sheep and decreasing in gene expression of synthetic Iran-Black and Arman Sheep breeds, respect to decreasing in blood contribution of Baluchi sheep in these synthetic sheep, it is necessary to consider the consequences of crossbreeding on local sheep breeding program and fatty acid composition of dairy products.

Keywords: Gene expression, SCD, FASN, Real-time PCR