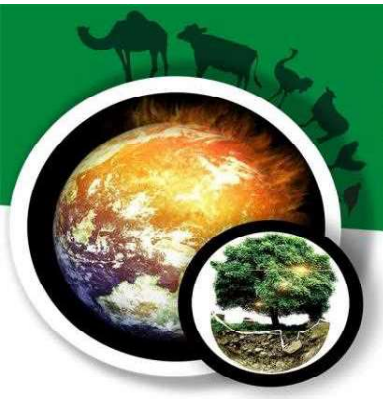


بسم الله الرحمن الرحیم

چهارمین همایش ملی

پژوهش‌های نوین در علوم دامی

با محوریت تنش‌های محیطی

دبیر همایش: دکتر **سیدجواد حسینی واشان**

دبیر علمی همایش: دکتر **محمدرضا اکبری**

دبیر اجرایی همایش: دکتر **حسین نعیمی پور یونسی**

برگزار کننده:

دانشگاه بیرجند

با همکاری:

موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

انجمن علوم دامی ایران

با حمایت:

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

دانشگاه فردوسی مشهد و دانشگاه شهید باهنرکرمان

سازمان جهاد کشاورزی استان خراسان جنوبی،

اداره کل دامپزشکی استان خراسان جنوبی

اداره کل امور عشایر استان خراسان جنوبی

سازمان نظام دامپزشکی استان خراسان جنوبی

کشت و صنعت بیدمشک، مرغ مادر جنوب خراسان، شرکت خوراک دام ستاره کیان، شرکت دان و علوفه شرق، شرکت خوراک دام دان و علوفه خوشینه، زنجیره تولیدی فروزان، شرکت تعاونی مرغداران مودت قائن، شرکت پهن دشت، بانک تجارت، صندوق حمایت از توسعه بخش کشاورزی استان خراسان جنوبی، شرکت پودر کیمیایی زنوک،

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

ارتباط بین ژنوتیپ‌های ژن بتاکازئین و شمار سلول‌های بدنی در شیر گاوهای شیری هلشتاین

غفران اسماعیل یوسف الجبوری و علی جوادمنش*
دانشگاه فردوسی مشهد-دانشکده کشاورزی-گروه علوم دامی
ایمیل نویسنده مسئول: javadmanesh@um.ac.ir

چکیده

مقدمه: هدف از این تحقیق، شناسایی و بررسی آلل A2 ژن بتاکازئین در گاوهای شیری هلشتاین و ارتباط آن با شمار سلول های بدنی شیر بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، از گاوهای هلشتاین به تعداد ۸۹ راس استفاده شد. استخراج DNA از نمونه های خون شیر انجام شد. کمیت و کیفیت DNA¬های استخراج شده با استفاده از طیف سنجی و الکتروفورز بررسی شد. از روش PCR-RFLP جهت بررسی ژنوتیپ بتاکازئین، همچنین از تعیین توالی برای صحت نتایج تعیین ژنوتیپ استفاده شد. با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه ارتباط بین آلل A2 با شمار سلول های بدنی بررسی گردید. همچنین، برای مقایسه میانگین ها، از آزمون توکی با سطح معنی داری ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که از تعداد ۸۹ راس گاو مورد مطالعه، تعداد ۱۴ راس گاو (۱۵/۷درصد) فاقد ژن بتاکازئین A2، ۲۲ راس (۲۴/۷ درصد) به صورت هموزایگوت و تعداد ۵۳ راس (۵۹/۵ درصد) به صورت هتروزایگوت بودند. فراوانی آلل A2 ۰/۳۸۸ بود. ارتباط معنی داری بین آلل A2 و شمار سلول های بدنی وجود نداشت (P> ۰/۰۵).

نتیجه گیری کلی: با توجه به احتمال اثرات مطلوب آلل A2 بر سلامت انسان، و عدم مشاهده ارتباط منفی بین این آلل و صفات مهم شیر، باید با استفاده از برنامه های مطالعاتی، برای افزایش فراوانی این آلل اقدام کرد تا بتوان از ظرفیت ژنتیکی مذکور جهت حفظ سلامت جامعه در گاوهای اصلاح شده، بهره گرفت .

واژگان کلیدی: گاوهای شیری، بتاکازئین A2، PCR-RFLP

مقدّمه

کازئین¬ها ۸۰ درصد پروتئین¬های شیر گاو را تشکیل می¬دهند و به چهار شکل(αS1 (CSN1-S1 ، α -S2(CSN1-S2)، β-(CSN2) و κ-(CSN3) به ترتیب با نسبت¬های تقریبی ۴:۱:۴:۱ می¬باشند. این پروتئین¬ها تأثیر عمده¬ای در تولید شیر، صنعت و سلامت مصرف کننده دارند. بتاکازئین از نظر فراوانی، علاوه بر ارائه آمینواسیدهای فراوان، جایگاه دوم را در بین کازئین¬های شیر گاو دارد (۶). همه انواع کازئین¬ها به دلیل جایگزینی یا حذف برخی از آمینواسیدهای زنجیره پپتیدی، در ساختار خود دچار تغییراتی می¬شوند؛ بنابراین گونه¬های ژنتیکی مختلفی را ایجاد می¬کنند. هنگامی که بیش از یک نوع ساختار توسط یک ژن رمزگذاری شده باشد، می¬توان از آن به عنوان یک پلی مورفیسم یاد کرد. این گونه‌های ژنتیکی که بر ساختارهای پروتئینی موثر هستند، علاوه بر تأثیرگذاری بر تولید شیر و کاربردهای فن‌آوری برای مصارف صنعتی، تغییراتی در ویژگی‌های شیر ایجاد می‌کنند (۳). پلی‌مورفیسم پروتئین شیر به دلیل روابط احتمالی با صفات تولید شیر، ترکیب شیر، ویژگی‌های تکنولوژیکی شیر و حتی متابولیت¬های شیر توجه زیادی را در صنایع لبنی به خود اختصاص داده است. اخیراً، انواع بتا کازئین A1 و A2 مورد توجه محققان و مصرف کنندگان شیر قرار گرفته و روند جدیدی را در بازار شیر

و لبنیات ایجاد کرده که منجر به این شده است که دامپروران در بسیاری از کشورهای جهان به این موضوع اهمیت دهند. ژن کد کننده¬ی بتا کازئین CNS2 است که دارای ۱۳ گونه آللی است (A1، A2، A3، B، C، D، E، F، G، H1، H2، I و J) و فراوان¬ترین آن¬ها در شیر گاوها انواع A1 و A2 هستند (۵). تفاوت بین آلل¬های A1 و A2 به جهش در اسید آمینه موقعیت ۶۷ (پرولین در A2 و هیستیدین در A1) مرتبط است (۲). بنابراین، کدون اصلی سیتوزین-سیتوزین- تیمین (CCT)، که اسید آمینه پرولین را در نوع A2 تشکیل می¬دهد، به سیتوزین-آدنین- تیمین (CAT) تغییر یافته است، که هیستیدین را در موقعیت ۶۷ کد می¬کند. بتاکازومورفین¬ها (β CMs)پپتیدهای شبه اپیوئید (طول زنجیره ۴-۱۱ اسید آمینه) هستند که از بتا کازئین در طی فرآیندهای تکنولوژیکی و یا هضم آنزیمی در روده آزاد می شوند. برش آنزیمی در هیستیدین موقعیت ۶۷ (تنوع آللی A1) منجر به برش ۷ اسید آمینه شده که تولید پپتید زیست فعالی به نام بتا-کازومورفین-۷ (βCM-7) می¬کند (۴). این نوع پپتیدها با عدم تحمل شیر مرتبط است و در ایجاد برخی از بیماری های انسانی مانند بیماری ایسکمیک قلب انسان، دیابت، آترواسکلروز، اسکیزوفرنی، اوتیسم، بیماری عروق کرونر قلب، اوتیسم، اختلال طیفی (ASD) و سندرم مرگ ناگهانی نوزاد (SIDS) نقش دارد. همچنین، ممکن است در طیف دیگری از شرایط خودایمنی دخیل باشد. این پپتید در نوع A2 بتاکازئین تولید نمی¬شود ؛ از این رو محققین به تولید این نوع شیر تمایل پیدا کرده¬اند (۵). با توه به موارد ذکر شده، هدف از مطالعه¬ی حاضر بررسی فراوانی آلل A2 ژن بتاکازئین در گاوهای شیری هلشتاین و ارتباط آن با سلول های بدنی شیر می¬باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه، از گاوهای هلشتاین به تعداد ۸۹ راس استفاده شد. استخراج DNA از نمونه های خون شیر انجام شد. جهت استخراج DNA، از کیت شرکت کاوش ژن سرودشت استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA¬های استخراج شده با استفاده از طیف سنجی و الکتروفورز بررسی شد. پرایمرهای مورد نظر از مطالعه¬ی مایر و همکاران (۸) استخراج شد. واکنش PCR جهت تکثیر قطعه ۱۲۱ جفت بازی ژن بتاکازئین طبق مواد جدول ۱ و برنامه¬ی جدول ۲ با استفاده از دستگاه BioRad مدل T100 ساخت کشور سوئد انجام شد. پس از اتمام واکنش، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

جدول۱. مواد مورد نیاز جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

مواد مورد نیاز	مقدار
Master mix PCR 2X	۵ µl
Primer F	۰/۲۵ µl
Primer R	۰/۲۵ µl
H2O	۱/۵ µl
DNA	۳ µl
حجم نهایی	۱۰ µl

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

جدول۲. برنامه‌ی دستگاه ترموسایکلر جهت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با پرایمرهای A2

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه
Pre-Denaturation	۹۴	۴ دقیقه	
Denaturation	۹۴	۲۵ ثانیه	
Annealing	۶۰	۴۰ ثانیه	۳۵
Extending	۷۲	۲۰ ثانیه	
Final Extending	۷۲	۵ دقیقه	

پس از انجام PCR، برای نمونه ها آزمون PCR-RFLP یا هضم آنزیمی گذاشته شد. محصولات PCR با استفاده از آنزیم Dde I به مدت ۲ ساعت در دمای 37^0C قرار داده شدند. پس از هضم آنزیمی محصولات PCR، الکتروفورز نمونه¬ها با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد انجام شد (۲). جهت بررسی رابطه بین ژنوتیپ¬ها و صفات تولیدی، داده های مربوط به تولید شیر استاندارد شده بر اساس ۳۰۵ روز و ۳ درصد چربی شیر، تعداد سلول¬های بدنی، درصدهای چربی و پروتئین شیر گاوهای مورد آزمایش جمع آوری شدند. تفاوت معنی¬داری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده از برنامه JMP نسخه ۱۷ بر اساس مدل آماری زیر تعیین شد و مقایسه میانگین¬ها به روش آزمون توکی در سطح ۵ ٪ انجام شد:

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

Y_{ij}: مشاهده

μ: میانگین کلی

G_i: اثر ژنوتیپ

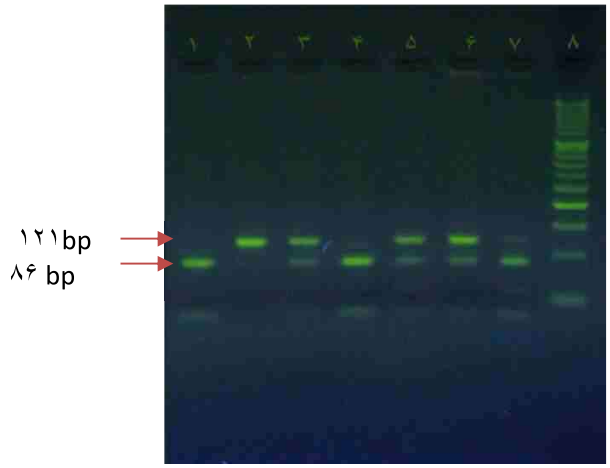
P_i: اثر شکم زایش

e_{ijk}: خطای آزمایشی

نتایج و بحث

استخراج DNA و واکنش PCR با موفقیت انجام شد و باند ۱۲۱ جفت بازی تکثیر گردید. هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *Dde*I با موفقیت انجام شد. نتایج محصول ایجاد شده حاصل از برش آنزیمی بر روی ژل آگارز ۳ درصد ران شد. در تصویر ۱ ژنوتیپ A2 به صورت هموزایگوت و هتروزایگوت قابل مشاهده است. همانطور که مشهود است؛ نمونه¬های مربوبه چاهک¬های شماره ۱، ۴و ۷ دارای ژنوتیپ A2A2، چاهک ۲ فاقد ژنوتیپ A2A2 و چاهک¬های شماره¬های ۳، ۵ و ۶ ژنوتیپ هتروزایگوت (-A2) را نشان می دهند.

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir



شکل ۱. الکتروفورز آگارز هضم آنزیمی محصولات PCR نمونه¬های شماره ۱، ۴و ۷ دارای ژنوتیپ A2A2 نمونه¬ی ۲ فاقد ژنوتیپ A2A2، شماره¬های ۳، ۵ و ۶ ژنوتیپ هتروزایگوت (–A2) و شماره ۸ لدر می¬باشد).

از تعداد ۸۹ راس گاو مورد مطالعه، تعداد ۱۴ راس گاو (۱۵/۷) فاقد ژن بتاکازئین A2، ۲۲ راس (۲۴/۷ درصد) به صورت هموزایگوت و تعداد ۵۳ راس (۵۹/۵ درصد) به صورت هتروزایگوت بودند. فراوانی آلل A2 نیز ۰/۳۸۸ محاسبه شد. قابل توجه است در این مطالعه بعلت وجود آلل های متعدد ژن بتاکازیین و اهمیت بررسی آلل A2 به بررسی فراوانی آللی سایر الل ها پرداخته نشد. به همین دلیل محاسبه تعادل هاردی-واینبرگ و سایر پارامترهای ژنتیک جمعیت نیز انجام نگرفت.

در مطالعه¬ای¬ی جدید نشان داده شد که فراوانی گاوهای A2/A2 در جمعیت گاوهای شیری در استرالیا از سال ۲۰۰۰ به سرعت از ۳۲٪ به ۵۲٪ افزایش یافته است. این فراوانی شبیه به زیرجمعیت گاوهای هلشتاین ایتالیایی است که در آن¬ها فراوانی ۶۰/۷ درصد برای آلل A2 و ۳۰/۴ درصد برای آلل A1 یافتند (۱۱). در پژوهش دیگری محققین نشان دادند که بسیاری از کشاورزان ممکن است به طور فعال A2 را انتخاب کنند که این موضوع توسط نظرسنجی ملی اسپرم که افزایش نسبت اسپرم A2/A2 را در استرالیا مشاهده کرده است، پشتیبانی می¬شود (۱۰). در کشور ایران، میزان فراوانی ژنوتیپی A2 نسبت به سایر کشورها کمتر است چرا که انتخاب برای استفاده از شیر A2 کمتر مورد توجه قرار گرفته است و در سال¬های اخیر شاهد استفاده از اسپرم¬های A2 در گله¬ها هستیم. انتظار می¬رود در سال¬های آتی شاهد افزایش ژنوتیپ A2 در گله¬ها باشیم. مطالعات مشابهی در گذشته برای یافتن فراوانی ژنوتیپ¬های مختلف بتاکازئین موجود در نژادهای گاو مختلف در کشورهای مختلف انجام شده است. مطالعه¬ای بر روی هلشتاین فریزین لهستانی نشان داد که ۱۲/۸ درصد گاوهای هموزیگوت A1، ۴۴/۱ درصد از گاوها هتروزیگوت (A1/A2) و ۴۸/۱ درصد در حالت هموزیگوت A2 هستند (۹).

نتایج مربوط به ارتباط بین ژن بتاکازئین و تعداد سلول های بدنی نشان داد که هیچ گونه ارتباط معنی¬داری بین ژنوتیپ¬ها و صفت مورد نظر وجود ندارد (P>۰/۰۵). همراستا با مطالعه¬ی حاضر، آرنس و همکاران (۱) نشان دادند که فراوانی آلل A2 (۶۸ درصد) بیشتر از آلل A1 و ژنوتیپ A2/A2 (۴۶ درصد) برای جمعیت گاوهای هلشتاین گزارش شد. علاوه بر این، نشان داده شد که میزان تولید شیر، پروتئین و چربی شیر، سلول¬های سوماتیک شیر و باروی (روزهای باز) ارتباطی با ژنوتیپ بتاکازئین در گاوهای شیری هلشتاین طی ۳۰۵ روز ندارد. مطالعات بر روی گاوهای شیری و ارتباط بین ژن بتاکازئین و تولید شیر متناقض است. لو و همکاران (۷) گزارش کردند هیچ ارتباطی بین تولید شیر و ژنوتیپ بتاکازئین برای گاوهای هلشتاین، جرسی و هلشتاین × جرسی پیدا نکردند.

آدرس: بیرجند- دانشگاه بیرجند- پردیس امیرآباد- دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی
تلفن ۰۵۶۳۱۰۲۷۶۳۹؛ دورنگار : ۰۵۶۳۲۲۰۴۰۵۰؛ وبسایت: www.conf.birjand.ac.ir/ncaras4 ایمیل: ncaras@birjand.ac.ir

نتیجه‌گیری کلی

اعتقاد بر این است که مصرف شیر A2 دارای طیف وسیعی از مزایای سلامتی است، با این حال داده¬های بالینی در مورد اثرات بر التهاب روده، علائم و عملکرد دستگاه گوارش، چربی خون، ترکیب بدن، متابولیسم گلوکز و فشار خون متناقض یا محدود هستند. لذا؛ شناسایی گاوهای گله که حاوی ژن A2 هستند و ارتباط آن با صفات تولید شیر و بررسی های بیشتر در این نوع شیر در زمینه های مختلف حائز اهمیت می¬باشد.

قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است .

منابع

1. Arens, S. C., Sharpe, K. T., Schutz, M. M., Hardie, L. C., Dechow, C. C., & Heins, B. J. (2023). Relationships of beta-casein genetics with production, fertility, and survival of purebred organic Holstein dairy cows. JDS communications, 4(6), 458-463.
2. Javadmanesh, A & Rashidian Z. (2023). Detecting A2 allele of beta-casein in dairy cows. Proceedings of 10th National and 2nd International Animal Science Congress of Iran. Tehran. 30-31 July.
3. Jianqin, S., Leiming, X., Lu, X., Yelland, G. W., Ni, J., & Clarke, A. J. (2015). Effects of milk containing only A2 beta casein versus milk containing both A1 and A2 beta casein proteins on gastrointestinal physiology, symptoms of discomfort, and cognitive behavior of people with self-reported intolerance to traditional cows' milk. Nutrition journal, 15, 1-16.
4. Jinsmaa, Y., & Yoshikawa, M. (1999). Enzymatic release of neocasomorphin and β-casomorphin from bovine β-casein. Peptides, 20(8), 957-962.
5. Kay, S. I. S., Delgado, S., Mittal, J., Eshraghi, R. S., Mittal, R., & Eshraghi, A. A. (2021). Beneficial effects of milk having A2 β-casein protein: Myth or reality? The Journal of nutrition, 151(5), 1061-1072.
6. Kumar, A., Kumar, S., Singh, R. V., Chauhan, A., Kumar, A., Sonwane, A., ... & Singh, R. (2022). Investigation of genetic polymorphism at β-casein A1/A2 loci and association analysis with production & reproduction traits in Vrindavani crossbred cows. Animal Biotechnology, 33(7), 1562-1570.
7. Lu, Y., Hickson, R., Gedye, K., Correa-Luna, M., Donaghy, D., & Lopez-Villalobos, N. (2020). Milk composition and productive and reproductive performance of cows from A1 and A2 β-casein variants, milked once or twice a day.
8. Mayer, H. K., Lenz, K., & Halbauer, E. M. (2021). "A2 milk" authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. Food Research International, 147, 110523.
9. Olenski, K., Kamiński, S., Szyda, J., & Cieslinska, A. (2010). Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein–Friesian bulls. Livestock Science, 131(1), 137-140.
10. Scott, B. A., Haile-Mariam, M., MacLeod, I. M., Xiang, R., & Pryce, J. E. (2023). Evaluating the potential impact of selection for the A2 milk allele on inbreeding and performance in Australian Holstein cattle. Frontiers in Animal Science, 4, 1142673.
11. Sebastiani, C., Arcangeli, C., Ciullo, M., Torricelli, M., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2020). Frequencies evaluation of β-casein gene polymorphisms in dairy cows reared in Central Italy. Animals, 10(2), 252.

Correlation between betacasein gene genotypes and somatic cells in milk of Holstein cows

Ghufran Ismael Yousif Algburi and Ali Javadmanesh*
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
*Corresponding author's email: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract
Introduction: The purpose of the present study is to identify and investigate the A2 allele of the betacasein gene in Holstein dairy cows and its relationship with milk somatic cells.
Materials and Methods: In this study, 89 Holstein cows were used. DNA extraction was done from milk blood samples. The quantity and quality of the extracted DNAs were checked using spectrometry and electrophoresis. PCR-RFLP method was used to check the genotype of beta-casein, as well as sequencing was used for the accuracy of the genotyping results. Finally, one-way analysis of variance was performed to investigate the relationship between the A2 allele and the number of body cells using JMP software version 0.17. Tukey's test with a significance level of 5% was used to compare the means.
Results and discussion: The results showed that out of the 89 cows, 14 cows (15.7%) lacked betacasein A2 gene, 22 cows (24.7%) were homozygous and 53 cows (59.5%) were heterozygous. The frequency of A2 allele was calculated as 0.388. Statistical analysis also did not show a significant relationship between the A2 allele and the number of body cells ($P<0.05$).
Conclusion: Considering the possibility of favorable effects of A2 allele on human health, and the absence of a negative relationship between this allele and important traits of milk, it is necessary to use study programs to increase the genetic and genotypic frequency of this allele so that the mentioned genetic potential can be used to maintain health. Society is interested in improved cows.

Keywords: Dairy cows, beta-casein A2, PCR-RFLP