

چندشکلی ژن دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱ (DGAT1) در جمعیت گاو میش های ایران

معصومه ناصرخیل^۱، سید رضا میرابی آشتیانی^{۲*}، مصطفی صادقی^۳، اردشیر نجاتی جوارمی^۴ و دکھوان لی^۵

۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی دکتری، استاد و دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس

کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۵. استاد گروه بیوتکنولوژی حیوانی، دانشگاه هنک یونگ، انسونگ، کره جنوبی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۲۸)

چکیده

دی آسیل گلیسرول آسیل ترانسفراز ۱ (DGAT1) آنزیم کلیدی در ساخت (سنتز) تری گلیسیرید است. ایجاد یک جهش جایگزینی باعث تبدیل گوانین به آدنین و منجر به جایگزینی لیزین با آلانین در آنزیم می شود که در گاو تأثیری بزرگ بر شیر و ترکیب های آن دارد. در این تحقیق، چندشکلی در ناحیه اگزون ۳ تا اگزون ۱۷ ژن DGAT1 در سه توده بومی گاو میش های ایران بررسی شد. استخراج DNA از پیاز مو با استفاده از کیت استخراج DNA از ۲۰۰ رأس گاو میش (خوزستانی، شمالی و آذری) انجام گرفت و قطعه های مورد نظر از روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) افزایش شدند. تعیین ژنوتیپ با روش توالی یابی مستقیم انجام شد و با نرم افزار BioEdit تجزیه و تحلیل صورت گرفت. تجزیه توالی یابی در موقعیت های نوکلئوتیدی g.6097A>G, g.7036C>T, g.7338G>A, g.7710C>T, g.8087C>T, g.8259G>A, g.8275G>A و g.8426C>T چندشکلی های گزارش نشده ای (جدیدی) را در ژن DGAT1 در مقایسه با توالی موجود در بانک ژن (DQ886485) درون جمعیت گاو میش ها نشان داده است. در مقایسه با گاو میش هندی ۳ جهش در ناحیه اگزونی نشان داده شد که یکی از آنها جهش نامترادف بود. یک جهش درج شدگی ۲۲ نوکلئوتیدی در ایترون ۱۰ مشاهده شد. این نتایج گویای تنوع در توالی ژنتیکی قطعه بررسی شده در جمعیت گاو میش های ایران است و از این نوع می توان در بررسی های ژنتیکی و اصلاح نژادی بهره جست.

واژه های کلیدی: تجزیه و تحلیل توالی یابی، ژن DGAT1، چندشکلی، گاو میش ایران.

مقدمه

سبب توسعه فناوری های بسیاری برای بررسی ساختار جمعیت های زیستی با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی شده است. تجزیه و تحلیل چندریختی های ژنتیکی با استفاده از قطعه های DNA سبب معین شدن مقادیر زیادی نشانگر و چندشکلی ژنتیکی شده است. برای تعیین ساختار جمعیت و نشانه های انتخاب درون جمعیت ها شمار زیادی نشانگر مورد نیاز است که برخی از آنها با صفات مهم اقتصادی مرتبط بوده اند

امروزه انتخاب مستقیم نرها برای همردیف (آل) های ژنی خاص محدود شده است، در اصل به این دلیل که روش های آزمون نتاج درازمدت و وقت گیر هستند. اما، اکنون روش های ژنتیک مولکولی در دسترس هستند که اجازه تعیین ژنوتیپ مستقیم ژن های کاندیدا را با استفاده از PCR می دهند (Javanmard et al., 2008) و نیز پیشرفت ژنتیک مولکولی در چند دهه گذشته

صفات تولید شیر و ترکیب‌های آن در گاوهای نر هلشتاین معنی‌دار گزارش کردند. نتایج بررسی آنان نشان داد که گاوها به‌طور میانگین در اثر جایگزینی هم‌ردیف (آلل) K در ژن DGAT1 حدود ۰/۱۶۴ درصد چربی، ۰/۰۵ درصد پروتئین و ۷/۴ کیلوگرم چربی بیشتری تولید می‌کنند، درحالی‌که تولید شیر و پروتئین هر گاو به ترتیب ۳۰۶ و ۳/۱ کیلوگرم کاهش می‌یابد. در تحقیق دیگری (Angiolillo *et al.*, 2007) یک قطعه ۱۵۵۲ bp از cDNA مربوط به ژن DGAT1 بز را توالی‌یابی کردند که بیشتر مناطق رمزکننده این ژن از اگزون ۱ تا ۱۷ را پوشش می‌داد. توالی‌یابی چندگانه این ژن نشان‌دهنده وجود یک SNP شامل جایگزینی T با C در اینترون ۱۶ در موقعیت ۷۰۳ بود.

Xu *et al.* (2009) ارتباط بین چندشکلی‌های ژن کاندیدای DGAT1 و کیفیت لاشه را در سه نژاد گوسفند چینی بررسی کردند. نتایج تحقیق آنان نشان‌دهنده وجود یک جهش خاموش^۳ در اگزون شماره ۱۷ در موقعیت بازی ۱۴۶۱ بود که با تغییر GCC (Ala487) به GCT (Ala487) همراه است که در حیوانات جهش‌یافته با ژنوتیپ TT چربی درون ماهیچه‌ای به‌طور معنی‌داری افزایش و میزان چربی پشت کاهش می‌یابد.

در بررسی چندشکلی در اگزون ۸ گاوهای آناتولی ترکیه بررسی شد و ۴ هاپلوتایپ مختلف به دست آمد که هاپلوتیپ شماره ۱ در ۷۳ درصد گاوهای رایج بود. توالی‌یابی هاپلوتیپ‌ها نشان‌دهنده وجود یک نوکلئوتید تثبیت‌شده آلل K (AA) در جایگاه K232A است که می‌تواند مسئول چربی بالای شیر در نژادهای آناتولی ترکیه باشد (Özdil & İlhan, 2012). Venkatachalapathy *et al.* (2013) با بررسی چندشکلی در جایگاه اگزون‌های ۷ تا ۹ به روش PCR-SSCP در گاو و گاوهای هندی وجود یک جهش در چهاردهمین نوکلئوتید از اینترون ۸ این ژن را گزارش کردند. نتایج بررسی آنان نشان داد که فراوانی ژنوتیپ CC و CT به ترتیب ۰/۵۱، ۰/۴۹ در گاوهای هندی و ۰/۷۶ و ۰/۲۴ در گاو بود. Mishra *et al.*

(Thaller *et al.*, 2003). در پروژه‌های نقشه‌یابی، QTL‌هایی^۱ برای درصد چربی و تولید شیر روی کروموزوم ۱۴، به‌ویژه در جمعیت‌های گاو هلشتاین شناسایی شده است (Riquet *et al.*, 1999; Kharrati Koopaei *et al.*, 2011; Kharrati Koopaei *et al.*, 2012). در این نقشه‌یابی‌ها مشخص شده است که ژن دی‌آسیل‌گلیسرول‌آسیل‌ترانسفراز ۱ (DGAT1)، با ۱۷ اگزون و ۱۶ اینترون در انتهای سانترومری کروموزوم ۱۴ قرار دارد و باعث ساخت (سنتر) پروتئینی با ۴۸۹ اسیدآمینو می‌شود، یک ژن کاندیدای بالقوه برای صفات شیر و چربی شیر است (Grisart *et al.*, 2002; Kharrati Koopaei *et al.*, 2011; Kharrati Koopaei *et al.*, 2012).

Winter *et al.* (2002) یک جایگزینی دو نوکلئوتیدی AA به‌جای GC را در اگزون ۸ ژن DGAT1 در موقعیت‌های نوکلئوتید ۱۰۴۳۳ و ۱۰۴۳۴ گزارش کردند که باعث تغییر اسیدآمینو آلانین به لیزین در موقعیت ۲۳۲ DGAT1 گاو می‌شد و تأثیری بزرگ روی چربی شیر داشت. تغییر یافته (واریانت) لیزین (K) DGAT1 با چربی بالا مرتبط بود درحالی‌که تغییر یافته آلانین (A) این جایگاه با افزایش تولید شیر و پروتئین همراه بود. بیشتر تحقیقات نشان داده‌اند که تغییر آلانین به لیزین (K232A) در پلی‌پپتید رمز شده توسط اگزون ۸ ژن DGAT1 با کاهش تولید شیر و کاهش پروتئین شیر و افزایش چربی شیر همراه است (Spelman *et al.*, 2002).

در جمعیت گاوهای هلشتاین هلندی ۵۱ درصد تنوع و در جمعیت گاوهای هلشتاین نیوزلند ۳۱ درصد تنوع درصد چربی شیر با جهش در این ژن توجیه می‌شود (Bovenhuis & Schrooten, 2002). افزون بر این، بررسی‌های پویس ژنگانی (ژنومی) نشان‌دهنده این امر است که برخی از SNP‌های کروموزوم ۱۴ که نزدیک این ژن هستند تأثیر بسیار زیادی روی تولید شیر و ترکیب‌های آن دارند (Pimentel *et al.*, 2011). Weller *et al.* (2003) تأثیر جایگاه DGAT1 را بر

1. Quantitative Trait Loci (QTL)

2. Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

3. Silent mutation

(Anonymous, 2012). هدف اول از پرورش گاومیش در ایران، تولید شیر و هدف دوم تأمین گوشت است. میانگین تولید شیر و میانگین طول دوره شیردهی گاومیش‌های ایران، ۱۵۰۰ کیلوگرم در ۲۲۰ تا ۲۴۰ روز بوده است. از ویژگی‌های بارز شیر گاومیش، درصد چربی و پروتئین بالا است، به طوری که نسبت چربی به پروتئین شیر گاومیش حدود ۱/۷-۱/۸ برآورد شده است. مواد جامد کل شیر گاومیش به طور معمول ۴ تا ۶ درصد بیشتر از شیر گاو است، پروتئین آن حدود ۱ درصد بیشتر است، اما از نظر چربی به میزان بیشتری تفاوت دارد (Borghese, 2005). از آنجا که چربی شیر گاومیش از گاو (*Bos indicus* و *Bos taurus*) بیشتر است و تأثیر ژن DGAT1 بر صفت چربی شیر اثبات شده است، نیاز به بررسی ژن DGAT1 در جمعیت گاومیش‌های ایران ضروری به نظر می‌رسد و هدف این پژوهش بررسی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی اگزون ۳ تا اگزون ۱۷ ژن DGAT1 در گاومیش‌های ایران بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۲۰۰ نمونه مو گردآوری شده از جمعیت گاومیش‌های بومی (Rahmaninia, 2015) شامل ۷۰ رأس خوزستانی، ۷۶ رأس آذری و ۵۴ رأس شمالی استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌های مو با استفاده از کیت استخراج Toyobo انجام شد (TOYOBO, Japan). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش‌های طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتری) و الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. آغازگرهای رفت و برگشت برای افزایش با نرم‌افزارهای Oligo analyzer (http://eu.idtdna.com/) و (analyzer/applications/oligoanalyzer) و Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) بنا بر توالی ژن گاومیش هندی در بانک ژن با شماره دسترسی DQ886485 طراحی و اختصاصی بودن آن‌ها توسط نرم‌افزار Primer-Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) بررسی شد (جدول ۱). برای بهینه‌سازی واکنش PCR برنامه‌های گرمایی

(2007) ژن کاندیدا DGAT1 را در گاومیش هندی بررسی کردند. نتایج به دست آمده بیانگر ارتباط چندشکلی‌های موجود در این ژن و درصد چربی شیر بود. همچنین در مقایسه با توالی ژن DGAT1 گاو، ۱۹ SNP در نژادهای مختلف گاومیش هندی مشاهده شد. توالی ۸۷۱۷ جفت بازی ژن گاومیش هندی در بانک ژن^۱ با شماره دسترسی^۲ DQ886485 ثبت شده است. در مقایسه با گاومیش چینی هشت تغییر در نواحی اگزونی نشان داده شده است که پنج عدد از آن‌ها باعث تغییر در اسیدآمینه‌های ۹۸، ۱۵۴، ۳۶۷، ۳۷۰ و ۴۰۷ بودند. مقایسه توالی ژن DGAT1 گاومیش هندی با *Bos taurus* ده تغییر توالی رمزکننده (بدون تغییر اسیدآمینه^۳) و نه تغییر (با تغییر اسیدآمینه^۴) را نشان می‌دهد (Mao et al., 2012).

بررسی تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی آن‌ها ضروری است (Mohammadi et al., 2009)، اما بیشتر چنین بررسی‌هایی روی گاو انجام شده است (Alinaghizadeh et al., 2007; Ruzina et al., 2010; Kharrati Koopaei et al., 2012) و اطلاعات کمی در مورد تنوع ژنتیکی گاومیش در دسترس است. لذا شناسایی این جایگاه‌ها و تعیین توالی و جهش‌هایی که رخ می‌دهد و ممکن است عملکرد حیوانات را تحت تأثیر قرار دهد می‌تواند در شناسایی وضعیت و بهبود ژنتیکی این گونه ارزشمند تأثیر زیادی داشته باشد (Raut et al., 2012).

گاومیش یکی از دام‌های بومی ایران بوده و پرورش آن از ۲۵۰۰ سال پیش از میلاد در ایران وجود داشته است. گاومیش‌های ایران پایه ژنتیکی با ارزشی دارند (Naderfard & Qanemy, 1997). کل جمعیت گاومیش ایران بر پایه آمارنامه مرکز آمار ایران در سال ۱۳۹۱ در حدود ۱۹۹ هزار رأس گزارش شده است و این جمعیت شامل سه توده آذربایجانی، خوزستانی و شمالی است که به ترتیب ۷۰، ۲۲ و ۸ درصد کل جمعیت گاومیش کشور را به خود اختصاص داده‌اند

1. GenBank
2. Accession number
3. Synonymous
4. Non-synonymous

پیکومول، ۲۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۲۰ میکرولیتر Master Mix (حاوی Taq DNA Polymerase، بافر PCR، $MgCl_2$ ، dNTPs) انجام شد. برای به دست آمدن اطمینان از افزایش قطعه‌های موردنظر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با استفاده از کیت GeneAll (Gene، All، South Korea) خالص‌سازی شدند. در نهایت توالی نمونه‌ها در شرکت GGBio در کشور کره جنوبی انجام و نتایج توالی‌یابی با برنامه BioEdit با توالی موجود در بانک ژن (DQ886485) مقایسه و تجزیه و تحلیل شد. محاسبه فراوانی‌های هم‌ردیف‌های ژنی، ژنوتیپی، میزان ناخالصی (هتروزیگوسیتی)، شاخص شانون و تعادل هاردی-واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Gen Alex6.5 بررسی شد (Nei, 1977).

مختلفی استفاده شد، ولی در نهایت برنامه گرمایی زیر، مطلوب‌ترین شرایط برای افزایش قطعه‌های موردنظر تشخیص داده شد. واسرشت‌سازی اولیه DNA به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس یک چرخه، واسرشت‌سازی DNA در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، همجوشی آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دماهای یادشده در جدول ۱ و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت چهار ثانیه، هر سه مرحله ۳۵ چرخه و بسط نهایی به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس یک چرخه در دستگاه ترموسایکلر بایورد انجام شد (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر و با ترکیب ۳ میکرولیتر DNA ژنگانی با غلظت ۱۰۰ نانوگرم، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰

جدول ۱. توالی و ویژگی‌های جفت آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شده برای افزایش ژن DGAT1

Table 1. Sequence and partial characterization of specific primer pairs for the DGAT1 gene

Gene fragment	Region covered	Primer sequences (5'-3')	T _m (°C)	Product length (bp)
Amplicon 1	Partial Intron 2 - Intron 7	F: CAGCGTTATGTCCTCTCTCTC R: GCCTTCTTACCTGCCAAAGC	60.1	1018
Amplicon 2	Exon 8 - Intron 13	F: CGCTTGCTCGTAGCTTTGG R: ACAGGGATGTTCCAGTTCTGC	60.5	956
Amplicon 3	Exon 14 - Exon 17, 3'-UTR	F: AGTTCTACCGGACTGGTGGTG R: GCGAGATCTGCAGGGTTCCAG	62	947

نتایج و بحث

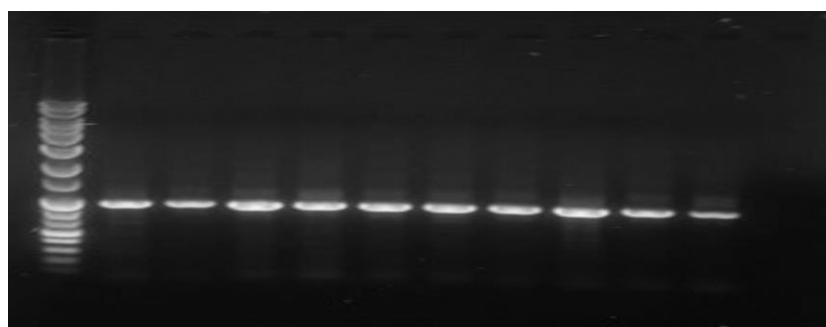
یک جهش در موقعیت نوکلئوتیدی g.6097A>G در اینترون ۳ بود. قطعه ۹۵۶ جفت بازی مربوط به جایگاه اگزون ۸ تا انتهای اینترون ۱۳ است که سه جهش را در موقعیت‌های نوکلئوتیدی C>T g.7036، g.7338، G>A و g.7710C>T به ترتیب در اینترون ۸، اینترون ۱۰ و اگزون ۱۳ در بر داشت. همچنین قطعه ۹۴۷ جفت بازی مربوط به جایگاه اگزون ۱۴ تا بخشی از ناحیه 3'-UTR که پنج جهش را در موقعیت‌های نوکلئوتیدی g.8087C>T (اینترون ۱۵)، g.8259G>A (اینترون ۱۶)، g.8275G>A (اینترون ۱۶)، g.8367C>T (اگزون ۱۷) و g.8426C>T (اگزون ۱۷) برای این ژن در جمعیت گاومیش‌ها نشان داد (شکل ۲). در این پژوهش برخلاف گزارش‌های موجود در جمعیت گاومیش‌های شیر و گوشتی، در جمعیت گاومیش‌های ایران چندشکلی ژنتیکی در موقعیت K232A در اگزون ۸ که با چربی شیر در ارتباط است،

نمونه‌های DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد و نتایج به‌دست‌آمده نشان داد نمونه‌ها کیفیت مناسبی برای انجام PCR دارند. محصولات به‌دست‌آمده از واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند. استاندارد وزن مولکولی استفاده‌شده در کنار محصولات PCR، درست بودن افزایش قطعه‌های موردنظر را تأیید کرد (شکل ۱). نتایج به‌دست‌آمده از تعیین توالی، با توالی موجود در بانک ژن مربوط به گاومیش‌های هندی و چینی مقایسه شدند. بررسی نتایج توالی‌یابی قطعه‌های افزایش‌یافته ژن DGAT1، ۹ چندشکلی را در موقعیت‌های نوکلئوتیدی مختلف در مقایسه با توالی گاومیش هندی (به‌عنوان ژن مرجع) نشان داد. در این تحقیق قطعه ۱۰۱۸ جفت بازی مربوط به جایگاه انتهای اینترون ۲ تا انتهای اینترون ۷ بود که شامل

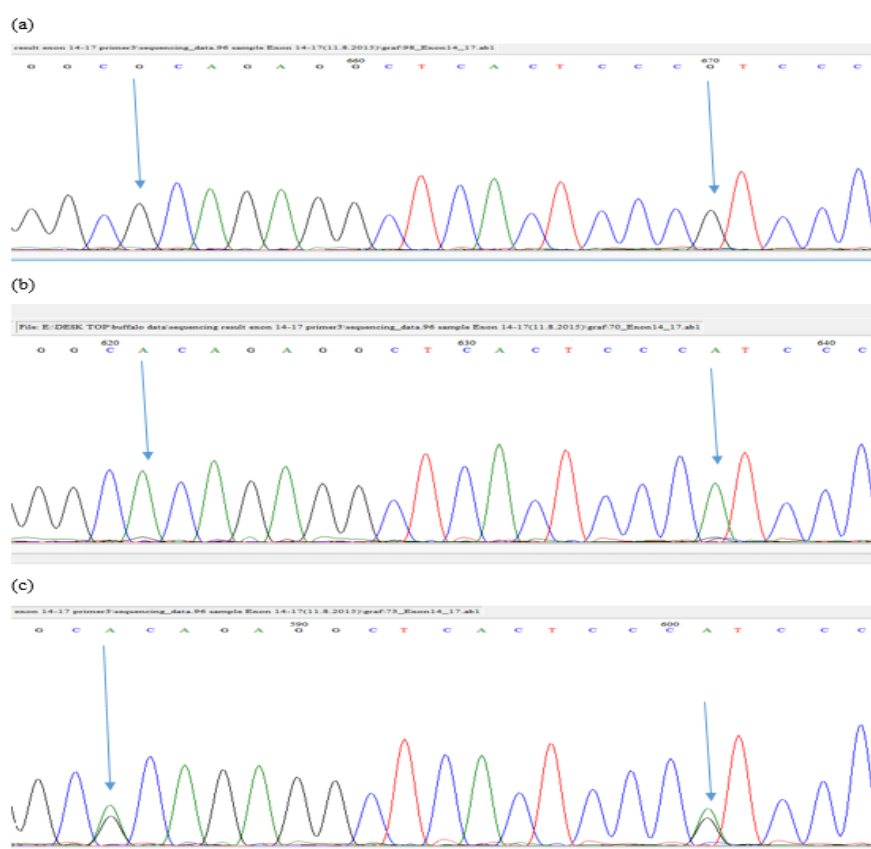
مورد انتظار و آمارهٔ آزمون کای مربع (χ^2) برای بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جدول‌های ۲، ۳ و ۴ بر پایهٔ قطعه‌های ژنی موردبررسی ارائه شده است. در این بررسی موقعیت نوکلئوتیدی $g.8367C>T$ (اگزون ۱۷) با توالی گاومیش هندی مقایسه شد و جهش جایگزینی هم‌جنس C/T در جمعیت گاومیش ایرانی نشان داده شد. در این بررسی، بیشترین فراوانی‌های ژنوتیپی در ناحیهٔ نوکلئوتیدی $g.8087 C>T$ واقع در اینترون ۱۵ از قطعهٔ ۹۴۷ جفت بازی، برای ژنوتیپ CC برابر با ۰/۹۷ و ژنوتیپ GG با فراوانی ۰/۹۵ در اینترون ۱۰ در موقعیت نوکلئوتیدی $g.7338 G>A$ به دست آمد. کمترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به ژنوتیپ AA برابر با ۰/۰۱ در اینترون ۱۰ در موقعیت نوکلئوتیدی $g.7338 G>A$ در قطعهٔ افزایش‌یافتهٔ ۹۵۶ جفت بازی مشاهده شد. ژنوتیپ‌های GG و TT در موقعیت‌های نوکلئوتیدی $g.6097A>G$ و $g.8087 C>T$ در نمونه‌های موردبررسی مشاهده نشد. نتایج به‌دست‌آمده در موقعیت بازی $g.7036 C>T$ در اینترون ۸ با نتایج بررسی Venkatachalapathy *et al.* (2013) روی نژادهای گاومیش هندی همخوانی دارد. میانگین ناخالصی محاسبه‌شده در جمعیت موردبررسی ۰/۳۱ بود که گویای متوسط بودن میزان چندشکلی برای جایگاه‌های موردنظر در جمعیت است. برای مشخص کردن بهتر تنوع ژنتیکی از شاخص اطلاعاتی شانون استفاده شد که دامنهٔ تغییرپذیری این شاخص بین صفر و یک قرار دارد و هر چه به صفر نزدیک‌تر شود، تنوع کمتر خواهد شد. در این پژوهش میزان شاخص شانون محاسبه‌شده برابر ۰/۴۹ بود که بیانگر تنوع ژنتیکی متوسط به بالا در جایگاه‌های موردبررسی در جمعیت است. با استفاده از آزمون کای مربع، انحراف ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ، در موقعیت $g.7338G>A$ معنی‌دار به دست آمد. از دلایل عمدهٔ احتمالی انحراف از تعادل می‌توان به اندازهٔ نمونه‌گیری و تلاقی‌های غیر تصادفی اشاره کرد. بهر حال بر پایهٔ نتایج می‌توان اظهار کرد که باوجود فرآیندهای یادشده دیگر جایگاه‌های موردبررسی در این تحقیق در تعادل هاردی-واینبرگ قرار دارند.

مشاهده نشد و با برخی گزارش‌های پیشین هماهنگ (Tantia *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2007; Özdil & İlhan, 2012; Heydari *et al.*, 2014) و با برخی دیگر ناهماهنگ است (Winter *et al.*, 2002; Spelman *et al.*, 2002; Weller *et al.*, 2003). از مقایسهٔ نتایج توالی‌یابی ژن DGAT1 در این تحقیق با گاومیش هندی ۳ SNP از ۹ جهش شناسایی‌شده در ناحیهٔ اگزونی قرار داشت که این جهش‌ها از نوع جایگزینی هم‌جنس^۱ بود. جهش در اگزون ۱۳ در موقعیت نوکلئوتیدی $g.7710C>T$ و اگزون ۱۷ در موقعیت نوکلئوتیدی $g.8367C>T$ از نوع جهش خاموش^۲ و بدون تغییر رمزینة (کدون) اسیدآمینه‌های آلانین و ایزولوسین به ترتیب در ناحیهٔ اگزونی ۱۳ و ۱۷ بوده است، درحالی‌که جهش در اگزون ۱۷ در موقعیت نوکلئوتیدی $g.8426C>T$ باعث تغییر رمزینة اسیدآمینهٔ آلانین به رمزینة اسیدآمینهٔ والین در موقعیت ۴۸۴ توالی اسیدآمینه در پلی پپتید پروتئین DGAT1 شده است، که این جهش را Yuan *et al.* (2007) در تحقیقی روی گاومیش چینی گزارش کردند. در مقایسه با توالی گاومیش هندی یک چندشکلی جدید در اینترون ۱۶ در موقعیت نوکلئوتیدی ۸۲۷۵ در نمونه‌های گاومیش ایرانی مشاهده شد. همچنین در مقایسهٔ نتایج توالی‌یابی این بررسی با توالی گاومیش چینی موجود در بانک ژن با شماره بررسی AY999090 یک جهش درج‌شدگی ۲۲ نوکلئوتیدی در اینترون ۱۰ دیده شد که تنها در گاو زیبو و گاومیش هندی گزارش شده ولی در *Bos Taurus* مشاهده نشده است که با نتایج بررسی Mishra *et al.* (2007) همخوانی دارد. وجود این چندشکلی‌ها در ناحیهٔ اینترون ممکن است به‌طور مستقیم روی صفات تولیدی تأثیری نداشته باشد ولی به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی در ارتباط با بررسی‌های چربی و تولید شیر می‌تواند سودمند واقع شود.

برای ژنوتیپ‌های مربوط در جایگاه‌های موردنظر جمعیت یادشده، فراوانی ژنوتیپی، فراوانی همدیف‌های ژنی، فراوانی ناخالصی مشاهده‌شده و



شکل ۱. نتایج افزایش قطعه ۱۰۱۸ جفت بازی ژن DGAT1 پس از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد
Figure1. Agarose gel (%2) electrophoresis examination of amplification product 1018 bp of DGAT1 gene



شکل ۲. نتایج توالی‌یابی برای موقعیت‌های نوکلئوتیدی g.8259G>A و g.8275G>A ژن DGAT1. (الف) خالصی GG؛ (ب) خالصی AA؛ (ج) ناخالصی A/G

Figure 2. Sequencing results for nucleotide positions g.8259G>A and g.8275G>A of DGAT1 gene. (a) homozygote GG; (b) homozygote AA; (c) heterozygote A/G of DGAT1 in different positions

جدول ۲. فراوانی‌های ژنوتیپی، همردیف‌های ژنی، ناخالصی مشاهده‌شده و مورد انتظار و آزمون تعادل هاردی- واینبرگ جایگاه‌های ژنی در قطعه ۱۰۱۸ جفت بازی

Table 2. Genotype frequencies, allele frequencies, heterozygosity (observed and expected) and Hardy-Weinberg equilibrium ($p \geq 0.05$) of SNPs detected in the amplification product 1018 bp of DGAT1 gene

SNP ID (gene region)	Position	Genotyped SNPs	No.	Allele freq.	Genotype freq.	Heterozygosity		χ^2
						Observed	Expected	
g.6097A>G	Intron 3	AA	166	0.92 (A)	0.83	0.17	0.16	1.726 ^{ns}
		AG	34	0.08 (G)	0.17			
		GG	--	--	--			

جدول ۳. فراوانی‌های ژنوتیپی، همردیف‌های ژنی، ناخالصی مشاهده‌شده و مورد انتظار و آزمون تعادل هاردی-واینبرگ جایگاه‌های ژنی در قطعه ۹۵۶ جفت بازی

Table 3. Genotype frequencies, allele frequencies, heterozygosity (observed and expected) and Hardy-Weinberg equilibrium ($p \geq 0.05$) of SNPs detected in the amplification product 956 bp of DGAT1 gene

SNP ID (gene region)	Position	Genotyped SNPs	No.	Allele freq.	Genotype freq.	Heterozygosity		χ^2
						Observed	Expected	
g.7036 C>T	Intron 8	CC	69	0.57 (C)	0.345	0.445	0.49	1.748 ^{ns}
		CT	89	0.43 (T)	0.445			
		TT	42		0.21			
g.7338 G>A	Intron 10	GG	191	0.98 (G)	0.955	0.035	0.053	23.89
		AG	7	0.02 (A)	0.035			
		AA	2		0.01			
g.7710 C>T	Exon 13	CC	69	0.57 (C)	0.345	0.445	0.49	1.748 ^{ns}
		CT	89	0.43 (T)	0.445			
		TT	42		0.21			

ns: عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال ($p > 0.05$).

جدول ۴. فراوانی‌های ژنوتیپی، همردیف‌های ژنی، ناخالصی مشاهده‌شده و مورد انتظار و آزمون تعادل هاردی-واینبرگ جایگاه‌های ژنی در قطعه ۹۴۷ جفت بازی

Table 4. Genotype frequencies, allele frequencies, heterozygosity (observed and expected) and Hardy-Weinberg equilibrium ($p \geq 0.05$) of SNPs detected in the amplification product 947 bp of DGAT1 gene

SNP ID (gene region)	Position	Genotyped SNPs	No.	Allele freq.	Genotype freq.	Heterozygosity		χ^2
						Observed	Expected	
g.8087 C>T	Intron 15	CC	194	0.985 (C)	0.97	0.03	0.03	0.046 ^{ns}
		CT	6	0.015 (T)	0.03			
		TT	-		-			
g.8259 G>A	Intron 16	GG	38	0.41 (G)	0.19	0.445	0.48	1.34 ^{ns}
		AG	89	0.59 (A)	0.445			
		AA	73		0.365			
g.8275 G>A	Intron 16	GG	63	0.55 (G)	0.315	0.46	0.49	1.05 ^{ns}
		AG	92	0.45 (A)	0.46			
		AA	45		0.225			
g.8426 C>T	Exon 17	CC	73	0.59 (C)	0.365	0.445	0.48	1.34 ^{ns}
		CT	89	0.41 (T)	0.445			
		TT	38		0.19			

ns: عدم معنی‌داری و معنی‌دار در سطح احتمال ($p > 0.05$).

یافته‌های این پژوهش می‌توان گفت که ژن DGAT1 در کنار جایگاه‌های ژنی و نشانگرهای مولکولی دیگر می‌تواند به‌عنوان نشانگر ژنتیکی مناسبی در زمینه اصلاح نژاد گاومیش‌های بومی ایران توجه شود.

سپاسگزاری

از مسئولان مرکز اصلاح نژاد و بهبود تولیدات دامی کشور که بخشی از حمایت مالی انجام این پژوهش را از راه قرارداد با شرکت "دانشگاهی توسعه کشت و دام نواندیش البرز" میسر ساختند و از پیگیری‌های آن شرکت و همچنین دکتر لی (گروه زیست‌فناوری حیوانی) از دانشگاه ملی هنک‌یونگ کره جنوبی که بخش شایان‌توجهی از هزینه پژوهش به عهده ایشان بود، تشکر و قدردانی می‌گردد.

نتیجه‌گیری کلی

اگرچه در این پژوهش تنها به بررسی چندشکلی‌های موجود و تنوع در نواحی مختلف ژن DGAT1 پرداخته شد که نتایج بسیار شایان‌توجه به دست آمد، ولی بررسی ارتباط بین این جایگاه‌ها و صفات تولیدی شیر و ترکیب‌های آن به وجود داده‌های مطمئن از این صفات نیاز دارد. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش و نتایج دیگر بررسی‌ها در گاومیش‌های نژادهای دیگر نشان داده است که ناحیه K232A در اگزون ۸ این ژن یک ناحیه حفاظت‌شده و بدون تغییر بود. دست یافتن به شماری دیگر جایگاه چند شکل در این ژن که در گزارش‌های دیگران در رابطه با دیگر جمعیت‌های گاومیش گزارش نشده است نیز از دستاوردهای این تحقیق است. با تحقیقات بیشتر درباره این ژن و تأیید

REFERENCES

1. Alinaghizadeh, R., Mohammad Abadi, M.R. & Moradnasab Badrabadi, Sh. (2007). Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (*Bos indicus*) using PCR-RFLP. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(23), 4291-4294.
2. Angiolillo, A., Amills, M., Urrutia, B., Domenech, A., Sastre, Y., Badaoui, B. & Jordana, J. (2007). Identification of a single nucleotide polymorphism at intron 16 of the caprine acyl-coenzymeA: Diacylglycerolacyltransferase 1 (DGAT1) gene. *Journal of Dairy Research*, 74, 47-51.
3. Anonymous. Statistical Center of Iran (2012). Available from: <http://www.amar.org.ir/>.
4. Borghese, A. (2005). *Buffalo International Organizations*. Buffalo production and research, 297.
5. Bovenhuis, H. & Schrooten, C. (2002). Quantitative trait loci for milk production trait in dairy cattle. In: *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics applied to Livestock Production*, Montpellier, France.
6. Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M. & Snell, R. (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*, 12, 222-231.
7. Heydarian, D., Miraei-Ashtiani, S. R. & Sadeghi, M. (2014). Study on DGAT1-exon8 Polymorphism in Iranian Buffalo. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(7), 2276-2282.
8. Javanmard, A., Mohammadabadi, M.R., Zarrigabayi, G.E., Gharahedaghi, A.A., Nassiry, M.R., Javadmansh, A., Asadzadeh, N. (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 44(4), 495-497.
9. Kharrati Koopaei, H., Mohammad Abadi, M.R., Ansari Mahyari, S., Esmailzadeh Koshkoiyeh, A., Tarang, A.R., Potki, P. (2012). Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. *Animal Science Papers and Reports*, 3, 231-239.
10. Kharrati Koopaei, H., Mohammad Abadi, M.R., Ansari Mahyari, S., Esmailzadeh Koshkoiyeh, A., Tarang, A.R., Nikbakhti, M. (2011). Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 3, 185-192. (in Farsi)
11. Mao, Y., Chen, R., Chang, L., Chen, Y. & Ji, D. (2012). Effects of SCD1-and DGAT1-genes on production traits of Chinese Holstein cows located in the Delta Region of Yangtze River. *Livestock Science*, 145, 280-286.
12. Mishra, B., Tantia, M. S., Kumar, S. T. B. & Vijn, R. K. (2007). Characterization of the DGAT1 gene in the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology*, 30, 1097-1100.
13. Mohammadi, A., Nassiry, M.R., Mosafer, J., Mohammadabadi, M.R., Sulimova, G.E. (2009). Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian journal of genetics*, 45(2), 198-202.
14. Naderfard, H. R. & Qanemy, A. W. (1997). Buffalo breeding in Islamic Republic of Iran. In: *Proceedings of 5th World Buffalo Congress*, Caserta, Italy.
15. Nei, M. (1977). *F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations*. *Annals of Human Genetics London*. 41, 225-233.
16. Ozdil, F. & Ilhan, F. (2012). DGAT1-exon8 polymorphism in Anatolian buffalo. *Livestock Science*, 149, 83-87.
17. Pimentel, E. C. G., Erbe1, M., König, S. & Simianer, H. (2011). Genome partitioning of genetic variation for milk production and composition traits in Holstein cattle. *Frontiers in Genetics*, 2, 1-11.
18. Rahmaninia, J. (2015) *Population structure analysis within Iranian buffalo breeds using dense SNP markers*. PhD Thesis in Animal Breeding and Genetics, Dept. Animal Science, University of Tehran.
19. Raut, A. A., Kumar, A., Kala, S. N., Chhokar, V. & Rana, N. (2012). Identification of novel single nucleotide polymorphisms in the DGAT1 gene of buffaloes by PCR-SSCP. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 610-613.
20. Riquet, J., Coppieters, W., Cambisano, N., Arranz, J. J., Berzi, P., Davis, S. K., Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Mni, M., Simon, P., Taylor, J. F., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Womack, J. E. & Georges, M. (1999). Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 16, 9252-9257.
21. Ruzina, M.N., Shtyfurko, T.A., Mohammadabadi, M.R., Gendzhieva, O.B., Tsedev, T., Sulimova, G.E. (2010). Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. *Russian journal of genetics*, 46 (4), 456-463.
22. Spelman, R. J., Ford, C. A., McElhinney, P., Gregory, G. C. & Snell, R. G. (2002). Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*, 85, 3514-3517.

23. Tantia, M. S., Vijn, R. K., Mishra, B. P., Mishra, B., Kumar, B. ST. & Sodhi, M. (2006). DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *Bio Med Central Veterinary Research*, 2, 32.
24. Thaller, G., Kramer, W. & Winter, A. (2003). Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *Journal of Animal Science*, 81, 1911-1918.
25. Venkatachalapathy, R. T., Sharma, A., Battacharta, T. K. & Sukla, S. (2013). Single nucleotide polymorphism in DGAT1 locus of Indian cattle and buffalo breeds. *Animal Genetic Division*, 3, 68-71.
26. Weller, J. I., Golik, M., Seroussi, E., Ezra, E. & Ron, M. (2003). Populationwide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 86, 2219-2227.
27. Winter, A., Kramer, W., Werner, F. A. O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G. & Fries, R. (2002). Assotiation of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl coA:diacylglycerolacyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9300-9505.
28. Xu, Q. L., Chen, Y. L., Ma, R. X. & Xue, P. (2009). Polymorphism of DGAT1 associated with intramuscular fat-mediated tenderness in sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(2), 232-237.
29. Yuan, J., Zhou, J., Deng, X., Hu, X. & Li, N. (2007). Molecular cloning and single nucleotide polymorphism detection of buffalo DGAT1 gene. *Biochemical Genetic*, 45, 611-621.

Investigation of polymorphism of DGAT1 gene in Iranian buffaloes

Masoumeh Naserkheil¹, Seyed Reza Miraie-Ashtiani^{2*}, Mostafa Sadeghi³,
Ardeshir Nejati-Javaremi³ and Deukhwan Lee⁴

1, 2, 3. Ph.D. Student, Professor and Associate Professors, Department of Animal Science, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Professor, Department of Animal Biotechnology, Graduate School of Bio. & Technology, Hankyong National University, Anseong, South Korea

(Received: Nov. 20, 2015 - Accepted: May 17, 2016)

ABSTRACT

Diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) is a key enzyme in synthesis of triglycerides. A transition mutation resulting substitution of guanine by adenine in DGAT1 gene and substitution of lysine by alanine in diacylglycerol-acyltransferase enzyme in cattle has a major effect on milk yield and milk composition traits. In this research, the polymorphism of the region spanning exon 3 to exon 17 of the DGAT1 gene of three indigenous Iranian buffalo populations was investigated. A total number of samples of 200 buffaloes (Khuzestani, Shomali and Azari) were collected to extract DNA and the desired fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Genotyping was performed using direct sequencing and analyzed by BioEdit software. Sequence analysis showed novel SNPs in comparative to the reference sequence GenBank (DQ886485) at nucleotide positions g.6097A>G, g.7036C>T, g.7338G>A, g.7710C>T, g.8087C>T, g.8259G>A, g.8275G>A and g.8426C>T of DGAT1 gene in buffalo populations. A comparison with Indian buffalo revealed three exonic SNPs, one of which was non-synonymous. A Unique 22 base insertion has been observed in the intron 10. The results described here genetic diversity and could be useful in genetic and breeding programs in Iranian buffalo.

Keywords: DGAT1 gene, Iranian buffalo, sequence analysis, SNPs.