دراسة المظاهر المتعددة لجين DRB1 وعلاقتها مع بعض صفات النمو لدى الاغنام العواسي التركي

ميساء احمد ناصر نصر نوري الانباري

قسم الانتاج الحيواني/كلية الزراعة/جامعة بغداد

المستخلص

أجري البحث في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة (20 كم غرب مدينة بغداد)، فضلا عن مختبر الفسلجة/كلية الزراعة/جامعة بغداد ومختبر جسر المسيب المتخصص بالتقانة الاحيائية وتحاليل الوراثة الجزيئية من 2015/03/1 ولغاية 2016/01/15، بهدف تحديد المظاهر الوراثية لجين DRB1 وعلاقة تلك المظاهر بعدد من صفات النمو لدى الاغنام العواسي التركي بأستعمال تقانة PCR–RFLP. بلغت نسب توزيع المظاهر الوراثية لجين DRB1 في عينة الأغنام العواسي التركي المدروسة 22.50 و 42.50 و 35.00 % لكل من الاليلات A و B و C بالتتابع ، وكان التباين بين هذه النسب عالي المعنوية، وتبين أن تأثير المظهر الوراثي لجين DRB1 في الوزن عند الميلاد وعند الفطام وفي معدل الزيادة الوزنية بينهما عالي المعنوية($P\leq0.01$)، أما ابعاد الجسم للحملان عند الفطام فلم تتأثر بالمظهر الوراثي لجين DRB1 لدى امهاتها بأستثناء محيط الصدر ($P\leq0.05$). يمكن أن نستنتج من خلال دراسة المظاهر المتعددة Polymorphism للجين DRB1 أمكانية اعتماده في وضع استراتيجيات التحسين الوراثي، لدى الأغنام لتعظيم العائد الاقتصادي من مشاريع تربيتها بانتخاب وتضريب التراكيب او المظاهر الوراثية التي حققت افضل نمو لدى الحملان.

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

Study of polymorphism of DRB1 gen and associated with some growth traits in Turkish Awassi sheep

Animal Res./College of Agric/ Univ. of Baghdad.

Nasr_noori@yahoo.com

Abstract

This study was undertaken at the Ruminants Researches Station (20 km west of Baghdad) pertaining to the Directorate for Agricultural Researches / Ministry of Agriculture, Reproductive laboratory at the College of Agriculture/University of Baghdad as well as Laboratory Bridge Musayyib specialist to technology and bio-analysis and molecular genetics, and analysis of molecular genetics from 01/03/2015 to 15 / 01/2016 .The aim of this study was determind polymorphism of gene DRB1 and relationship of this polymorphism with some growth traits.The distribution percentage of polymorphism of gene DRB1 in ewe's sample were 22.50 and 42.50 and 35.00% for each of the alleles A, B and C respectively. The variation among these percentages were highly significant ($P\leq0.01$) showing that effect phenotype of gene DRB1 in on lambs birth , weaning weight and increase the weight gain was significant ($P\leq0.01$), the body dimensions of the lambs at weaning did not affected by phenotype of the DRB1 gene with the exception of their dams chest circumference ($P\leq0.05$). It can be

conclud through the study of polymorphism of the gene DRB1 revealed possibility of adopted them in sheep improvement strategy to increased the economic gain in the breeding schemes, by selecting and crossing the highly growth lambs genotypes or phenotypes, the best growth of the lambs.

المقدمة

هنالك طريقان لتحسين السلالات الحيوانية، الأول يتمثل بالتحسين الوراثي بالطرق التقليدية مثل الانتخاب في الحيوانات على أساس القيمة التربوية لاسيما على أساس القدرات الانتاجية والكفاءة التناسلية والمقاومة للإمراض او بالخلط بين السلالات، أما الطريق الثاني لتحسين السلالات يكون بوساطة ايجاد التفوق الوراثي بوسائل التكنولوجيا الحيوية مثل تكنولوجيا التعديل الوراثي لتكوين افراد ذات تراكيب وراثية مطلوبة لتكوين قطعان النواة لنشر تلك التراكيب الوراثية المتميزة على نطاق واسع. لذلك يجب تحديث طرق التحسين الوراثي ودراسة التركيب الوراثي لهذه الحيوانات واختيار الافضل منها من خلال دراسة الجينات التي تؤثر في بعض الصفات الاقتصادية ومنها النمو ومعرفة الطفرات الوراثية وربطها بالتركيب المظهري باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتقانة تعدد المظاهر لأطوال القطع مقيدة الطول (Restriction Fragment Length Polymorphism– RFLP) وتتابع القواعد النتروجينية(Sequencing) وهي بمجموعها تساعد في دراسة الجينات المطلوبة وتكثيرها مختبريا وتحديد التركيب الوراثي لكل حيوان [1 و 4]. جين DRB1 هو احد جينات المعقد النسيجي الرئيس، من جينات DR Class II β1 والذي يعود الى عائلة الكلوبيولينات المناعية (Immunoglobulin super family) وهذه الجينات عبارة عن كلايكوبروتينات ومن اكثر جينات معقد التوافق النسيجي (Major histocompatibility complex–MHC) متعدد المظاهر [3]، ومؤلفة من تسع اواصر تساهمية نوع α وβ [9]، وصنفت الى خمسة مجاميع من الجينات تمثلت بكل من MHC و DQ و DO و DM و DP [8]، ويقع على الكروموسوم 20 الـ Exon 2 والذي يشفر مواقع ارتباط المستضد وتم تحديد اكثر من 1,000 من اليلات OLA–DRB1 و160 اليل من HLA–DRB1 وبهذا اعتبرت من اكثر الاليلات تحديداً [6 و 9]. لهذا هدفت الدراسة الحالية على تحديد التراكيب الوراثية لجين DRB1 وتوزيع نسبها في عينة من الاغنام العواسي التركي وعلاقة تلك المظاهر الوراثية بعدد من صفات النمو لدى الحملان لاغراض الانتخاب.

المواد وطرائق العمل

اجري البحث في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة، للمدة من 2015/03/1 ولغاية 2016/01/15، على عينة مكونة من94 نعجة (عواسي تركي) ومواليدها هذا فيما يخص الجزء الحقلي، في حين تم أجراء التحاليل الوراثي (الجزء المختبري) جزءاً منها في مختبرات كلية الزراعة/جامعة بغداد والجزء الاخر في مختبر شركة جسر المسيب للتحليلات الوراثية للمدة من 2015/11/15 لغاية 2016/1/15 على 40 عينة DNA بهدف فصل المادة الوراثية وتحديد الاليلات لجين DRB1 وعلاقتة بعدد من صفات النمو.

تم جمع 5 مل من الدم من الوريد الوداجي (Jugular vein) من كل حيوان في انبوبة جمع مضاف لها مانع تخثر من نوع K2 EDTA من انتاج شركة AFCO الاردنية، ونقلت بصندوق مبرد الى المختبر لحفظها بالتجميد على درجة 18° م لحين وقت الاستخلاص. تم استخلاص الحامض النووي DNA من عينات الدم للنعاج (الامهات) لغرض اجراء الفحص الجزيئي للجين المدروس (DRB1). وتم استخلاص DNA من الدم حسب تعليمات العدة (Kit) المجهزة من شركة Geneaid. بعد استخلاص الـ DNA اعتمدت طريقة Sambrook وزملاؤه [12] للتأكد من وجود إلـ DNA المستخلص من الدم وبأستخدام العدة الخاصة بألاستخلاص (Kite).

تم مزج 8 مايكروليتر من الـ DNA مع 2 مايكروليتر من loading dye (صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue) وتركيز الاكروز 1.5% إذ حملت العينات في الحفر المفردة من الجل. تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها (70 فولت) وبتيار مقداره 40 ملي أمبير ولمدة ساعة. استخدم جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV light transillminator) لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، ان الحزم الملونة بصبغة بروماید الاثيديوم (Ethidium bromide fluorescence) صورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوعرافي (Photo documentation system).

تم اختيار البادئ (Primers) لغرض أجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري للجينات والطفرات الموجودة للجينDRB1 : Exon 2 [8]، وذلك من الشركة الالمانية ALFA.

F : 5'–ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC –3'

R : 5'–TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT –3'

بعد انتهاء تفاعل البلمرة تم الكشف عن وجود الطفرة وعدم وجودها عن طريق استعمال إنزيم القطع (*RSAI*) من شركه Biolabs وبتركيز 1000 وحده لكل مول وحسب الجدول (3–5) وتم حضن مزيج التفاعل في درجة حرارة 37 مئوي ولمدة 4 ساعات وخلالها يتعرف الانزيم على موقع معين ضمن القطعة المتضاعفة وتقطع بالإنزيم القاطع وتم اجراء الترحيل الكهربائي للعينات المقطوعة للكشف عن مواقع القطع ومن خلال التقنية اعلاه تم التعرف على التعدد المظهري للمنطقة الجينية المضاعفة من الجين DRB1 . تم تحميل 4 µl من الـ DNA ladder مع 7 µl من نواتج PCR–RFLP في جل الأكاروز وبتركيز3% (1X TBE Buffer) ثم غمر الجل بصبغة بروميد ألاثيديوم السائلة وبتركيز2.5% وتم الترحيل بفرق جهد مقداره 50 فولت/سم وبتيار 40 ملي فولت ولمدة نصف ساعة بعدها ترفع الفولطية الى 100 ولمدة ساعة ونصف وتم مشاهدة الحزم بوساطة UV transiluminater، وتم تصويرها باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي (Photo documentation system).

تم تحليل البيانات احصائيا باستعمال البرنامج SAS– Statistical Analysis System [9] لدراسة تأثير جين DRB1 في عدد من صفات النمو للحملان، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار Duncan [5] متعدد الحدود من خلال تطبيق طريقة متوسطات المربعات الصغرى (Least square means).

الانموذج الرياضي.

$$Yijklm = \mu + Gi + Pj + Sk + Tl + eijklm$$

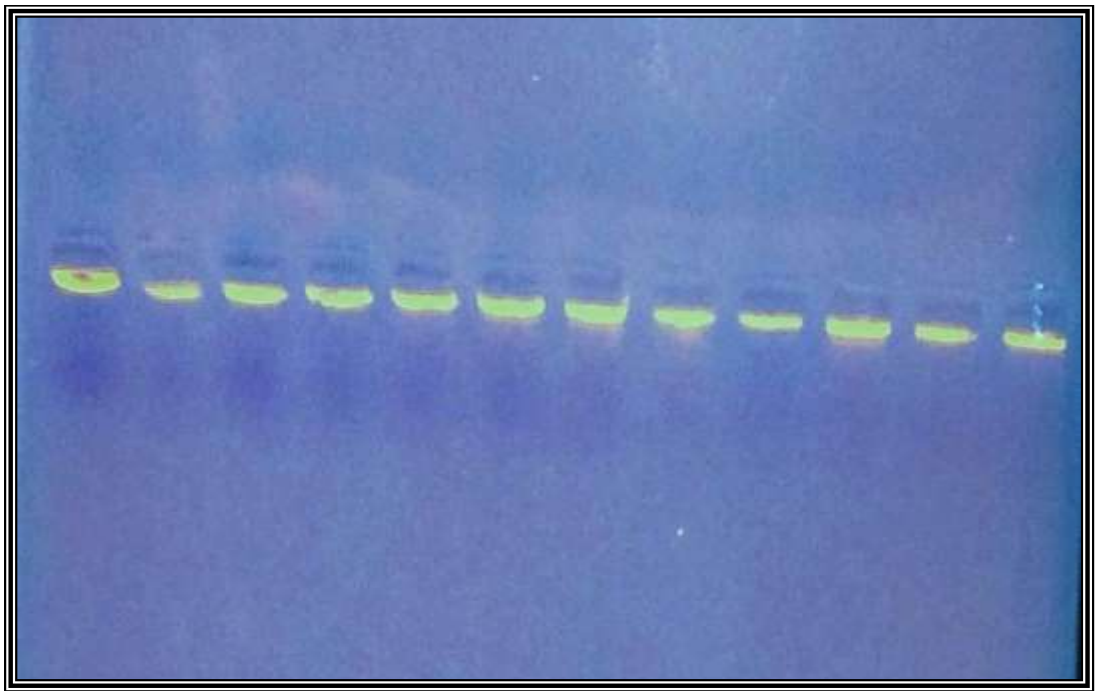
Yijkl: قيمة المشاهدة لكل صفة. Gi: تأثير اليلات جين DRB1 (A و B و C). Pj: تأثير تسلسل الدورة الانتاجية (من الاولى الى الرابعة). SK : تأثير جنس المولود (ذكر ، أنثى). Tl: تاثير نوع الولادة (مفردة ، توامية). eijkl : الخطا العشوائي الذي يتوزع طبيعيا بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma 2e$

كما استعمل اختبار مربع كاي ($\chi 2$ –Chi-square) للمقارنة بين النسب المئوية لتواجد الاليلات للجين في عينة الاغنام المدروسة.

النتائج والمناقشة

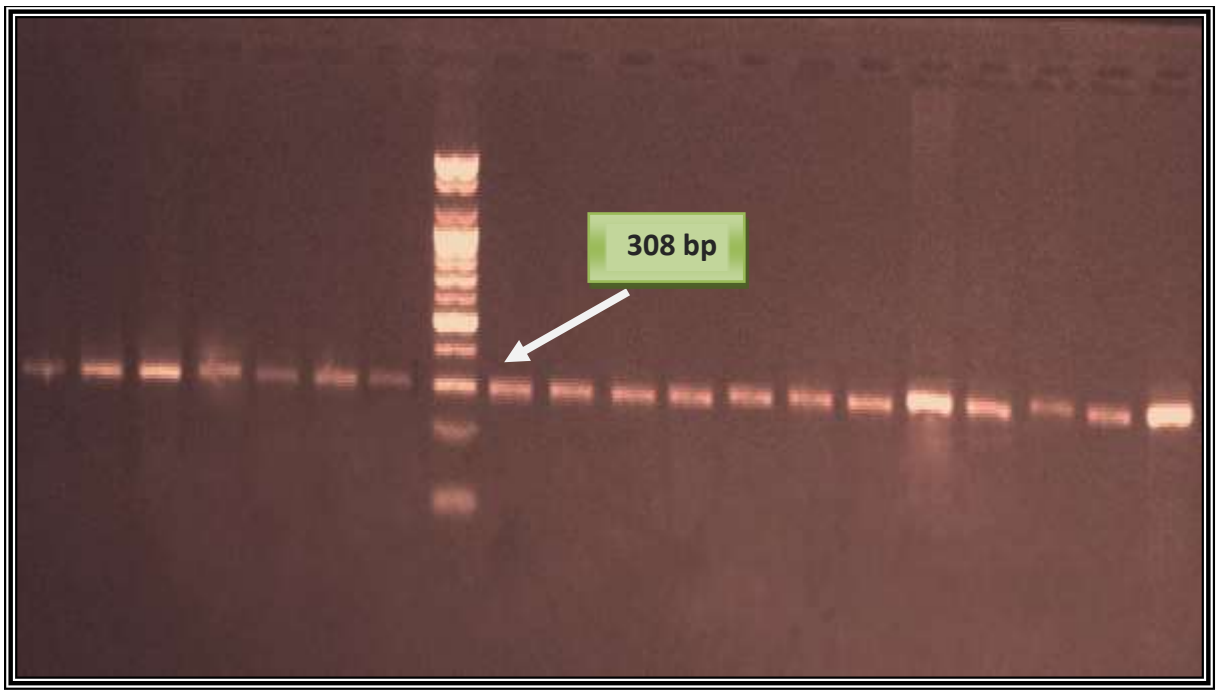
فصل الدنا (DNA) واستخلاص جين DRB1

تم استخلاص DNA (الشكل**1**) كخطوة اولى لاستخلاص جين DRB1 ضمن تقانة PCR بعدها تم استخلاص جين DRB1 (الشكل 2) بتقانة PCR وباستخدام عدة الـ PCR والبادئ وعينات



الشكل (1) عملية استخلاص الـ DNA

ال DNA الكلي والحصول على القطعة المطلوبة بحجم 308 bp ، تم استخدام قطع DNA معلومة الحجوم (Marker 100-2500 bp).



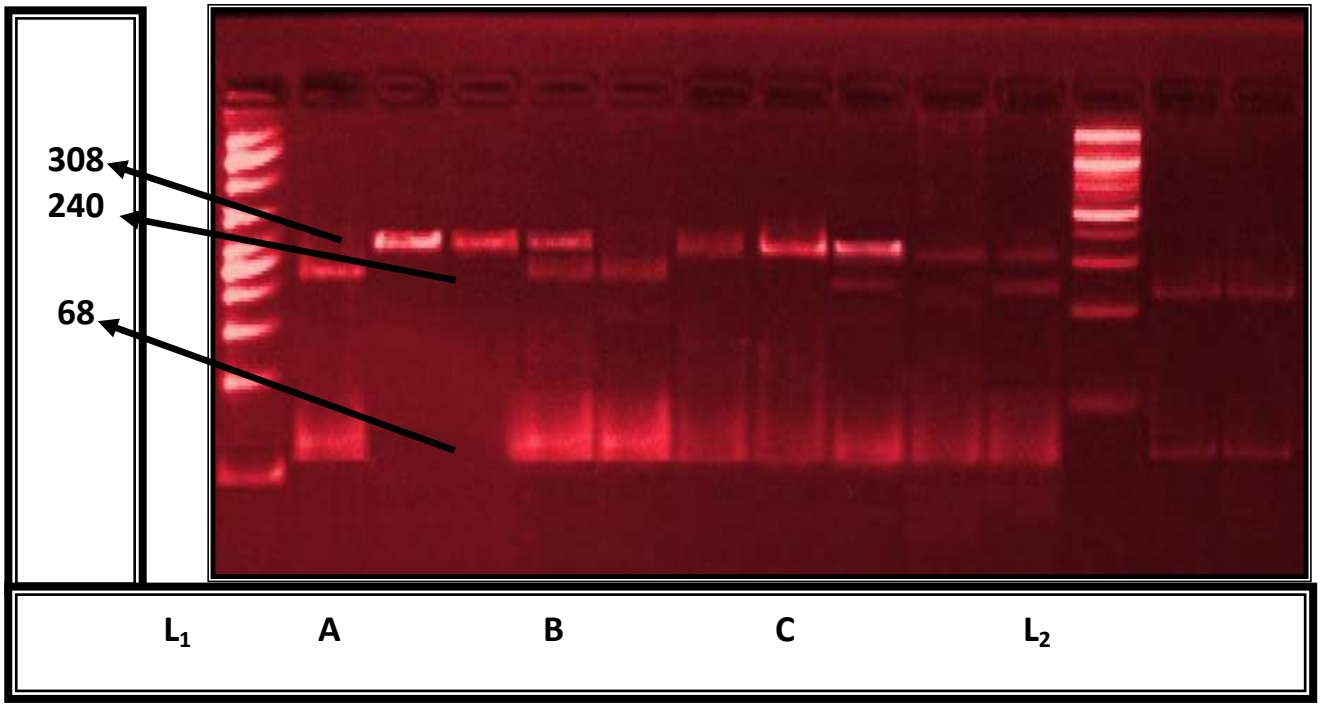
الشكل (2) عملية استخلاص الجين DRB1.

4-2 : نسب المظاهر الوراثية لجين DRB1

اختلفت المظاهر الوراثية (Polymorphism) للجين DRB1 (Exon 2) لمنطقة التشفير β_1 التي تكون منطقة ارتباط الانتجين antigen-binding site [11] تبعا لاختلاف الحزم الوراثية الناتجة عن الهضم الانزيمي (الشكل 3) ويلاحظ من الجدول (1) العدد والنسب للمظاهر الوراثية للجين DRB1، أذ تظهر فروق عالية المعنوية ($P\leq0.01$) بين نسب هذه المظاهر الوراثية المختلفة والتي بلغت 22.50 و 42.50 و 35.00 % لكل من الاليلات A و B و C بالتتابع، أي ان هنالك شيوع أكثر للإفراد ذات المظهر B موازنة بكلا المظهرين الوراثيين الاخرين لاسيما المظهر الوراثي A، وفي الوقت الذي أشارت فيه الدراسة الحالية الى ارتفاع نسبة المظهر الوراثي B، من خلال تحليل جين DRB1 للنعاج العواسي التركي أفادت دراسات أجريت على نعاج المرينو الصينية ونعاج Kazakh الـ [10 و 11 و 15] في الكشف عن المظاهر المتعددة لجين DRB1 ودورها في مقاومة طفيلي الاكياس المائية (Cystic Echinococcosis) وباستخدام تقانة(PCR-RFLP) وبعدة انزيمات قاطعة فقد حصلت االدراسة على عدة اليلات (6,4,3,2) واتفقت مع الدراسة الحالية في تفوق المظهر الوراثي B لاحد الانزيمات القاطعة على باقي المظاهر الوراثية واكدت الدراسات ايضا على وجود التنوع الوراثي(Diversity) في مواقع MHC فقد اعطت مصادر وراثية قيمة للمعلمات الوراثية في الكشف عن علاقة الارتباط مابين التركيب الوراثي للمضيف ومقاومة الامراض او التحسس [3] .

من ناحية أخرى توصل كلاً من[2] الى أمكانية الحصول على المظاهر لنفس الموقع دون الحاجة الى أجراء عملية الهضم الأنزيمي وذلك بإحداث تغيير بتسلسل القواعد المكونة للبادئات بالشكل الذي ينجم عنه الحصول على حزم مختلفة مباشرة كناتج لعملية تفاعل البلمرة المتسلسل دون ان يكون للأنزيم الهاضم دور في أظهار الاختلاف الوراثي.من جهة اخرى اظهرت العديد من الدراسات تعدد المظاهر الوراثية والحصول على عدة

اليلات لجين DRB1 فقد اوجدت اكثر من 22 اليل مسجلة في Gene bank (M73984 و Z92726 و Z92735 و AF324840 و AF324861) [9].



1- الدليل الحجمي 50
2- المظهر الوراثي A
3- المظهر الوراثي B
4- المظهر الوراثي C
5- الدليل الحجمي 100

الشكل(3): المظهر الوراثي لمنطقة التشفير β_1 (Exon 2) للجين DRB1.

الجدول (1) العدد والنسب المئوية للمظاهر الوراثية (Polymorphism) لجين DRB1 في الاغنام العواسي التركي المدروسة.

المظهر الوراثي (Polymorphism)	العدد	النسبة المئوية(%)
A	9	22.50
B	17	42.50
C	14	35
المجموع	40	% 100
قيمة مربع كاي (χ^2)	----	*8.226
** ($P\leq0.01$).		

3-4 : علاقة المظاهر الوراثية لجين DRB1 في صفات النمو المدروسة

الوزن عند الميلاد وعند الفطام ومعدل الزيادة بينهما

يلاحظ من الجدول (**2**) أن المظاهر المتعددة لجين DRB1 في الوزن عند الميلاد وعند الفطام وفي معدل الزيادة الوزنية بين هذين الوزنين كان عالي المعنوية، وبلغت معدلات الوزن عند الميلاد 4.06 ± 0.19 و 3.49 ± 0.12 و 3.25 ± 0.09 كغم، وعند الفطام 26.00 ± 1.29 و 20.02± 0.26 و 22.16± 1.12 كغم في حين كانت معدلات الزيادة الوزنية بينهما 21.49 ± 1.23 و 16.53± 0.55 و 18.91± 1.14 كغم للمظاهر الوراثية A و B و C بالتتابع، من خلال هذه النتائج يتبين بقوة التفوق للحملان الناتجة من امهات ذات المظهر الوراثي A من خلال تحليل الجين DRB1 موازنة بمثيلاتها ذات التركيبين B أو C. نتائج هذه الدراسة تدعم بصورة كبيرة امكانية اعتماد التحليل الوراثي لهذا الجين في برامج الانتخاب ان كان الهدف هو تحسين صفات النمو لدى الحملان في قطعان الاغنام لاسيما الوزن عند الميلاد وعند الفطام ومعدل الزيادة الوزنية بينهما، علما ان اوزان الجسم بعمر مبكر ذات اراتباط وراثي موجب وعالي المعنوية مع اوزان وقياسات الجسم اللاحقة مما يدعم امكانية اعتماد هذه النتائج في تسريع برامج التحسين لتعظيم العائد الاقتصادي من القطيع، اذ ان صفات النمو تعد واحدة من اهم الصفات الاقتصادية في مشاريع تربية الاغنام.

الجدول (2) علاقة المظاهر الوراثية (Polymorphism) لجين DRB1 في صفات النمو لدى العواسي التركي.

المظهر الوراثي (Polymorphism)	العدد للنعاج	المتوسط ± الخطأ القياسي (كغم)		
		الوزن عند الميلاد (العدد= 52)	الوزن عند الفطام (العدد=52)	معدل الزيادة الوزنية (العدد= 52)
A	9	a 0.19 ±4.06	a 1.29 ±26.00	a 1.23 ±21.94
B	17	b 0.21 ±3.49	b 0.64 ±20.02	b 0.55 ±16.53
C	14	b 0.09 ±3.25	b 1.12 ±22.16	b 1.14 ±18.91
مستوى المعنوية	العدد الكلي40	**	**	**

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

** ($P\leq0.01$).

ابعاد الجسم عند الفطام

يتضح من الجدول (3) ان طول الجسم للحملان عند الفطام لم يتأثر معنويا بأختلاف المظهر الوراثي (Polymorphism) لجين DRB1، إذ بلغ معدل طول الجسم 54.67± 1.37 و 55.41± 1.40 و 55.93± 1.56 سم للحملان التي امهاتها ذات مظهر وراثي A و B و C بالتتابع، في حين كان التباين معنويا ($P\leq0.05$) فيما يخص محيط الصدر لدى الحملان عند الفطام، وقد حققت الحملان الناتجة من امهات

ذات مظهر وراثي B أقصى محيط صدر عند الفطام (84.94 ± 2.80سم) وتلتها الحملان الناتجة من امهات ذات مظهر A وبواقع 83.66± 3.72 سم في حين جاءت مثيلاتها الناتجة من امهات ذات مظهر وراثي C بأدنى محيط للصدر (81.21 ± 3.51 سم) ويعد محيط الصدر مؤشرا مهما على قابلية النمو للمواليد. يتبين من نتائج التحليل الاحصائي ان المظهر الوراثي لجين DRB1 لم يؤثر معنويا في الارتفاع عند المقدمة لدى الحملان عند الفطام إذ كانت المعدلات متقاربة بشكل كبير في هذه الصفة (الجدول3). من خلال دراسة المظاهر المتعددة Polymorphism للجين DRB1 يمكن اعتمادها في وضع استراتيجيات التحسين الوراثي وتطبيق الدراسة على عينة أكبر ولعدة مواسم إنتاجية من شأنه يعطي نتائج أكثر دقة لتطبيق إستراتيجية الاستبعاد والاستبدال.

الجدول (3) علاقة المظاهر الوراثية (Polymorphism) لجين DRB1 في ابعاد الجسم عند الفطام لدى العواسي التركي.

المظهر الوراثي (Polymorphism)	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي (سم)		
		طول الجسم (العدد= 52)	محيط الصدر (العدد= 52)	الارتفاع عند المقدمة (العدد= 52)
A	9	1.37 a ±54.67	ab 3.72 ±83.66	a 2.65 ±59.33
B	17	1.40 a ± 55.41	a 2.80 ±84.94	a 1.71 ±58.76
C	14	a 1.56 ±55.93	3.51b±81.21	a 1.47 ±58.71
مستوى المعنوية	العدد الكلي40	Ns	*	ns

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

* ($P\leq0.05$)، NS: غير معنوي.

المصادر

1- **Alain, V., Dens, M., Magali, S. & Andre, E. 2002 .** A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics Genet. Sel. Vol. 34 . 275_305.

2- **Al-Atiyat, R.M., & Aljumaah, R.S. 2014.** Genetic distances and phylogenetic trees of different Awassi sheep populations based on DNA sequencing. Genetics and Molecular Research 13 (3): 6557-6568.

3- **Ballingall, K.T., Fardoe K, McKeever, D.J. 2008.** Genomic organisation and allelic diversity within coding and non-coding regions of the Ovar-DRB1 locus. Immunogenetics . 60: 95–103**.**

4- **Cordess, J.F., & Liu, J. 2004**. DNA marker technology and their Applications in aquaculture genetics , aquaculture1-37.

5- **Duncan, D.B. 1955. Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics. 11: 4-42.**

6- **Herrmann-Hoesing, L. M., White, S. N., Mousel, M. R., Lewis, G. S., & Knowles, D. P. 2008. Ovine Progressive Pneumonia Provirus Levels Associate with Breed and Ovar-DRB1. Immunogenetics 60: 749-58.**

7- **Jamshidi, M.M., & Ramezanianpour, A.A. 2011**. Laboratory and industrial investigations on hybrid of acrylic and glass short fibers as an alternative for substituting asbestos in Hatschek process. Construction and Building Materials**.**

8- **Klein, J., Sato, A., & O'hUigin, C.1998 .** Evolution by gene duplication in the major histocompatibility complex. Cytogenet. Cell Genet. 80: 123-127.

9- **Konnai, S., Nagaoka Y., Takeshima S., Onuma M., Aida Y. 2003.** Sequences and diversity of 17 new Ovar-DRB1 alleles from three breeds of sheep, Eur. J. Immunogenet. 30: 275–282.

10- **Peng, L. Z., Shen, H., & Jia, B. 2007.** Polymorphism analysis of MHC-DRB1 gene in Chinese merino sheep by PCR-RFLP. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, China. 38:1115-1119.

11- **Ren-Yan Li., Bin Jia, Wen-Ju Zhang, Zong-Sheng Zhao, Guo-Qing Shi, Hong Shen,Qiang Peng, Li-Min Lv, Qi-Wei Zhou & Ying-Chun Du. 2011.** Analysis of the Relationship between MHC-DRB1 Gene Polymorphism and Hydatidosis in Kazakh Sheep. Asian-Aust. J. Anim. Sci.Vol. 23, No.9:1145-1151.

12- **Sambrook, J., Maniatis, T., & Fritsch, E.F.1989.** Molecular cloning: A labrotrayManual.cold spring harbor labrotray press, Cold Spring Harbor, N.Y.

13- **SAS. 2012.** Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

14- **Scott, P. C., Maddox, J. F., Gogolin-Ewens, K. J., & Brandon, M. R. 1991.** "The nucleotide sequence and evolution of ovine MHC class II B genes: DQB and DRB," Immunogenetics, vol. 34, no. 2, pp. 80–87.

15- **Shen , H., Han G., Jia, B., Jiang, S., & Du Y .2014.** MHC-DRB1/DQB1Gene Polymorphism and Its Association with Resistance/Susceptibility to Cystic Echinococcosis in Chinese Merino Sheep. Journal of Parasitology Research. doi: 10.1155/2014/272601.