

دراسة تأثير تعدد المظاهر لجين البرولاكتين (PRL) للأمهات في صفات النمو لدى حملان العواسي التركي

رياض حمد سنكال العيثاوي

كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لبيان تأثير تعدد المظاهر Polymorphism لجين البرولاكتين Prolactin-PRL في النعاج العواسية على الوزن وقياسات الجسم في حملاتها، تم استخلاص DNA من 45 نعجة. سجلت بعض صفات النمو لـ 52 حمل عند عمر الميلاد والقطام وستة اشهر. استخدم بادئ Primer محدد لمضاعفة المنطقة المطلوبة (INTRON 2) من الجين بتقانة PCR كما تم تحديد تعدد المظاهر الوراثية بتقانة RLFP وباستخدام الإنزيم القاطع HaeIII، إذ حضنت القطع المضاعفة بتقانة PCR بدرجة 37 درجة مئوية لمدة اربع ساعات وبعد ذلك رُحلت في هلام الاكروز 1.5%. بلغت نسب توزيع التراكيب الوراثية لجين PRL في عينة النعاج العواسي التركي المدروسة 13.33، 51.11 و 35.56% لكل من التراكيب الوراثية AA، AB و BB بالتتابع، وكانت الفروق بين هذه النسب عالية المعنوية، وكان تأثير التركيب الوراثي لجين PRL في الوزن عند الميلاد الحملان وستة اشهر وكذلك الزيادة الوزنية من القطام العمر ستة اشهر ومن الميلاد إلى ستة اشهر وقياس طول الجسم وارتفاع المقدمة بين معنوي والعالي المعنوية، أما باقي الصفات المقاسة فلم تتأثر معنويًا باختلاف التركيب الوراثي للجين. وقد تبين إمكانية اعتماد هذا الجين في استراتيجيات تحسين الأغنام في برامج التحسين الوراثي مما ينعكس إيجاباً على زيادة العائد الاقتصادي.

الكلمات المفتاحية: الأغنام العواسي التركي، تعدد المظاهر، جين البرولاكتين، صفات النمو، RFLP

E-mail:Reyadh_sangal@yahoo.com

Effect of prolactin (PRL) gene polymorphism for Dams in growth traits of Turkish Awassi lambs

R. H. S. Al-Ithawi

Collage of Agriculture/ University of Baghdad

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of prolactin gene polymorphism in Turkish Awassi ewes on body weight and some body measurements of their lambs. The DNA of 45 ewes were extracted and the body weights and measures were recorded in birth, weaning and 6 month's ages. Primers were supplied for amplifying the specific segment (INTRON2). Polymerase Chain Reaction (PCR) was done after finding the best condition to perform the reaction. The specific segment amplified well. RFLP markers were used for detecting the polymorphisms of the segment. Its analysis was performed by incubating of PCR product by HaeIII restriction enzyme at 37°C for 4 h. Gels were visualized using 1.5% agarose, and the distribution percentage of polymorphism of the intron2 in PRL gene of ewe's sample were 13.3, 51.11 and 35.56% for AA, AB and BB genotype respectively. The variation among these percentages was highly significant ($P \leq 0.01$). The effect of this polymorphism was significant ($P \leq 0.05$) on lambs birth, weaning and 6months age weight, body length and height at front were significant ($P \leq 0.05$) or highly significant ($P \leq 0.01$), but the remaining measurements were non significant. In conclusion gene polymorphism of PRL gene revealed possibility of adopted in sheep improvement strategy to increase the economic gain in the breeding schemes.

المقدمة

يشفر جين البرولاكتين PRL لهورمون البرولاكتين ويبلغ حجمه في الأغنام 8486 زوج قاعدي ويقع على الكروموسوم 20 ويتكون من خمس مناطق تعبير (1)، ويتكون هذا الهرمون من 199 حامض أميني في الإنسان والأغنام والأبقار والخنازير ومن 197 حامض أميني في الجرذان والفئران (2). لدى البرولاكتين أكثر من 300 تأثير بايولوجي كالتوازن الأيوني Electrolyte balance والنمو والتطور والفعالية المناعية والتناسلية (3) وأن هذا الهرمون يشترك بفعالية في الأداء التناسلي (4) وهو يحفز على تطور الغدة اللبنية (5)، كما ان لهذا الجين تأثير على عدد المواليد في البطن الواحدة (6)، ولا يغيب عنا الدور الفاعل والرئيس لرعاية الأم وكمية الحليب التي يتغذى عليها الحمل وعدد المواليد في البطن الواحدة من تأثير على وزن المولود وانعكاس ذلك على وزن الجسم في الأعمار اللاحقة (7، 8)، ومما تقدم تتجلى أهمية دراسة جين PRL باعتباره جين مرشح ليكون واسما مرتبطا بصفات النمو ولندرة الدراسات السابقة أو انعدامها على سلالة العواسي التركي وهي سلالة متميزة ومتكيفة مع الأجواء العراقية ولكون معظم الدراسات السابقة لجين PRL كانت حول صفة إنتاج الحليب أو عدد المواليد في البطن الواحدة، كان هدف البحث دراسة تأثير تعدد المظاهر لجين البرولاكتين PRL للأمهات على صفات النمو في حملان العواسي التركي.

المواد وطرائق العمل

نفذت الدراسة في محطة بحوث المجترات التابعة للهيئة العامة للبحوث الزراعية/ وزارة الزراعة، تم جمع عينات الدم من النعاج واخذ وزن وقياسات الجسم للحملان (طول الجسم، محيط الصدر والارتفاع عند المقدمة) على عينة مكونة من 45 من نعاج العواسي التركي و52 حملا، كما تم تقدير تأثير الدورة الإنتاجية وتسلسل الولادة وجنس المولود ونوع الولادة ضمن النموذج الرياضي للتحليل الإحصائي من اجل زيادة الدقة وتقليل الخطأ القياسي، في حين تم إجراء التحاليل الوراثية في مختبرات مركز التقنيات الأحيائية في جامعة النهريين بهدف تحديد التراكيب الوراثية Genotype لجين البرولاكتين Prolactin-PRL.

- طريقة استخلاص DNA (Protocol of DNA Isolation): تم استخلاص الـ DNA من الدم حسب تعليمات العدة Kit المجهزة من شركة Geneaid.
- تحميل الـ DNA والترحيل الكهربائي: تم مزج 10 مايكروليتر من الـ DNA مع 3 مايكروليتر من صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue إذ حملت العينات في الحفر المفردة من الجل. تم ترحيل العينات على طاقة كهربائية مقدارها 70 فولت وبتيار مقداره 40 ملي أمبير ولمدة ساعة، غمر الهلام بمحلول يحوي صبغة الاثيديوم برومايد 1% لمدة 20 دقيقة. استخدم جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV light transilluminator لغرض مشاهدة حزم الـ DNA، ان الحزم الملونة بصبغة برومايد الاثيديوم Ethidium bromide fluorescence صورت باستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي Photo documentation system (9).
- اختيار البودئ (Primers): تم اختيار البودئ Primers وكما موضح في الجدول (1) لغرض إجراء الكشف الجزيئي ومعرفة التعدد المظهري لجين برولاكتين (11).

جدول (1) تسلسل البرايمرات المستخدمة المجهزة من قبل شركة ALFA الألمانية

اسم الجين ومختصره	التسلسل
Prolactin	F: 5' - ACCTCTCTTCGGAAATGTTCA -3'
	R : 5' - CTGTTGGGCTTGCTCTTTGTC -3'
INTRON 2	

جُهزت البودائ من شركة ALFA الألمانية كمسحوق مجفف Lyophilized product، تم تحضير محلول الخزين Stock solution ومحلول العمل Working solution بحسب المصدر. حُضر محلول الخزين وذلك بإضافة الماء المزال الأيون Deionized water للحصول على التركيز النهائي للعالق (100 بيكومول/ مايكروليتر). أما محلول العمل فقد تم تحضيره بوساطة سحب 10 مايكروليتر من محلول الخزين (100 بيكومول/ مايكروليتر) وتخفيفه بـ 90 مايكروليتر من الماء المزال الأيون للحصول على التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو 10 بيكومول/ مايكروليتر. تم الكشف الجزيئي باستخدام تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل لجين PRL وباستخدام العدة profi taq PCR PreMix KIT وبحجم 25 مايكروليتر ووضع في جهاز تفاعل البلمرة وحسب ظروف التفاعل الخاصة القطعة الجينية المتضاعفة، وبعد إنهاء التفاعل تم ترحيل ناتج تفاعل البلمرة للتأكد من تضاعف القطعة المطلوبة. تم الكشف الجزيئي باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل كما موضح في الجداول (2).

جدول (2) البرنامج المتبع لتضاعف جين البرولاكتين (10) مع تعديل درجة الالتحام

No.	الخطوات	درجات الحرارة	الوقت	عدد الدورات
1	مرحلة المسخ الاولى	92 C°	2 min.	1
2	المسخ	92 C°	45 sec.	35
3	الالتحام	56.5 C°	45 sec.	
4	الاستطالة	72 C°	3 min	
5	مرحلة الاستطالة النهائية	72 C°	7 min	1
6	المرحلة النهائية للحضن	4 C°	-	-

التوصيف الجزيئي لمعرفة التعدد المظهري لجين PRL باستعمال تقنية (PCR-RFLP) بوساطة إنزيم القطع *HeaIII*: تم الكشف عن الاختلاف الأليلي لحزمة جين البرولاكتين (2500 زوج قاعدي) عن طريق هضم الحزمة المذكورة باستعمال أنزيم (*HeaIII*) وكما موضح في الجدول (3) وتم حضن مزيج التفاعل في درجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 4 ساعات ثم أجري الترحيل الكهربائي للعينات المهضومة للكشف عن مواقع القطع ووفقاً لنتيجة الهضم ثم تحديد الأليلات الناتجة: فالحزم 1400 و 530 و 360 و 150 زوج قاعدي تمثل الأليل A أما الحزم 1400 و 510 و 360 و 150 زوج قاعدي فتمثل الأليل B.

جدول (3) البرنامج المتبع للهضم الأنزيمي لجين البرولاكتين

Component	Reaction size 9 reaction
HeaIII (2000 units/ml)	0.8 µl
Product PCR	10 µl
BSA	0.2 µl
10X Buffer	2 µl
Deionized Water	3 µl

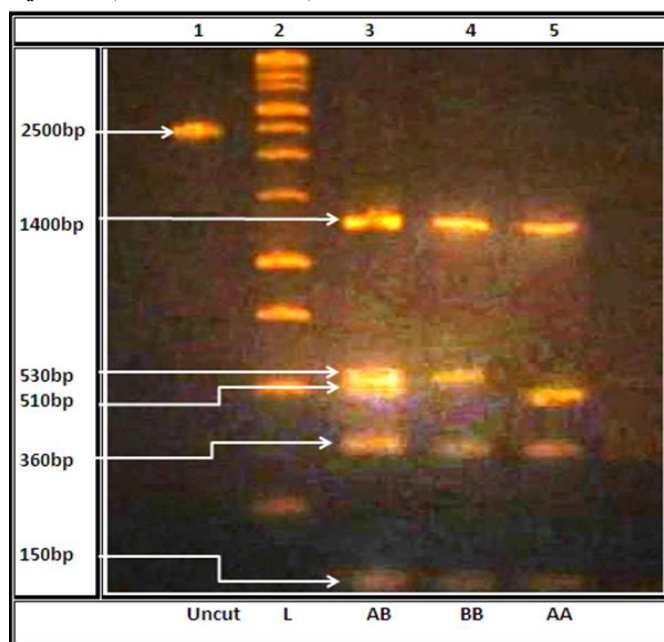
تم تحليل البيانات إحصائياً باستعمال البرنامج SAS- Statistical Analysis System (11) لدراسة تأثير تعدد المظاهر الوراثية البرولاكتين PRL في الصفات المختلفة (أوزان الجسم وإبعاده)، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار متوسط المربعات الصغرى (Least square means)، وكما في معادلة النموذج الرياضي.

$$Y_{ijklm} = \mu + G_i + P_j + S_k + T_l + e_{ijklm}$$

إذ ان: Y_{ijklm} : قيمة المشاهدة m العائدة للتركيب الوراثي i وتسلسل الدورة الإنتاجية z وجنس المولود k ونوع الولادة a. μ : المتوسط العام للصفة. G_i : تأثير تعدد المظاهر الوراثية للجين (AA و AB و BB). P_j : تأثير تسلسل الدورة الإنتاجية (من الأولى إلى الرابعة). S_k : تأثير جنس المولود (ذكور، أناث). T_l : تأثير نوع الولادة (فردية، توأمية). e_{ijklm} : الخطأ العشوائي الذي يتوزع طبيعياً بمتوسط يساوي صفر وتباين قدره $\sigma^2 e$. كما استعمل اختبار مربع كاي (χ^2 -Chi-square) للمقارنة بين النسب المئوية لتواجد الجين في عينة الأغنام المدروسة.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج تقنية RFLP الشكل (1) وجود نفس التعدد المظهري الناتج من الطفرة المسجلة عالمياً (10) في منطقة البنية الثانية لجين البرولاكتين تبعاً لاختلاف الحزم الناتجة عن الهضم الانزيمي.



الشكل (1) التراكيب الوراثية للمنطقة البينية الثانية (Intron2) لجين البرولاكتين: 1. حزمة غير مهضومة 2. الدليل الحجمي 3. التركيب الوراثي AA 4. التركيب الوراثي AB 5. التركيب الوراثي BB

نسب التراكيب الوراثية لجين PRL: يتبين من الجدول (4) العدد والنسبة المئوية لـ PRL في العينة المدروسة، إذ يظهر وجود فروق عالية المعنوية ($P \leq 0.01$) بين نسب التراكيب الوراثية المختلفة للأمهات والتي بلغت 13.33، 51.11 و 35.56% للتراكيب الوراثية AA، AB و BB بالتتابع، أي ان هنالك شيوخ واضح للإفراد الحاملة للتركيب الهجين AB على التركيبين الآخرين AA و BB وقد جاءت النتيجة غير متوافقة مع ما توصل إليه (10) لنفس المنطقة في سلالات Whitefaced و Suffolk و Coopworth و Texel إذ كان التفوق للتركيب الوراثي AA، وقد يعود ذلك نتيجة اختلاف السلالة وحجم العينة المدروسة.

جدول (4) أعداد جين البرولاكتين (PRL) ونسبة المئوية لدى الأغنام العواسي التركيبي

النسبة المئوية (%)	العدد	التركيب الوراثي
13.33	6	AA
51.11	23	AB
35.56	16	BB
% 100	45	المجموع
** 9.736	-	قيمة مربع كاي (χ^2)
** ($P \leq 0.01$)		

علاقة المظاهر المتعددة لجين البرولاكتين (PRL) في أوزان الجسم عند الميلاد والقطام وعند عمر 6 أشهر للعواسي التركيبي: أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن هنالك فروقاً معنوية ($P \leq 0.05$) في الوزن عند الميلاد للحملان باختلاف التركيب الوراثي لجين البرولاكتين (PRL) في النعاج (الأمهات)، إذ كانت الحملان العائدة للنعاج ذات التركيب الوراثي AA متفوقة معنوياً في الوزن عند الميلاد على نظيراتها العائدة للنعاج من التركيبين AB و BB ويعزى هذا التفوق إلى الدور الذي يلعبه هرمون البرولاكتين خلال المرحلة الجنينية باعتباره احد الهرمونات التي تنظم عملية الحمل ونمو الغدة اللبنية (3) أما عند عمر القطام فقد كان AA متفوقاً على التركيب BB ومماثلاً لتأثير التركيب الهجين AB وقد يعود ذلك بشكل كبير إلى ما أكدته الدراسات السابقة

على نفس المنطقة من جين PRL فقد أشار (12) إلى وجود تأثير معنوي لجين البرولاكتين في إنتاج الحليب في الأغنام، وبما ان الحملان في المرحلة من الولادة إلى الفطام تعتمد بشكل كبير في تغذيتها على الرضاعة يبدو جليا مدى تأثير ذلك في أوزانها، كذلك عند عمر ستة اشهر كان التفوق علي المعنوية ($P \leq 0.01$) للحملان العائدة لنعاج تحمل التركيب الوراثي AA على نظيراتها في التركيبين الآخرين، وقد يعود ذلك إلى الارتباط الموجب بين وزن الفطام والأوزان اللاحقة علما أن الوزن عند الفطام يعد احد اهم الصفات الاقتصادية في قطعان تربية الأغنام ولاسيما انه المحدد الرئيس للوزن عند التسويق بأي عمر بعد الفطام كما انه يعكس قابلية الأم على إنتاج الحليب ورعاية مواليدها (7، 8)، ومما سبق يمكن تحسين صفة الوزن للمواليد من خلال انتخاب الأمهات الحاملة للتركيب AA لجين البرولاكتين.

جدول (5) علاقة المظاهر المتعددة لجين البرولاكتين (PRL) في أوزان الجسم عند الميلاد والفطام وعند عمر

6 أشهر للعواسي التركي

المتوسط \pm الخطأ القياسي (كغم)			العدد	التركيب الوراثي
الوزن عند الميلاد	الوزن عند الفطام	الوزن عند عمر 6 أشهر		
a 0.19 \pm 4.02	a 0.62 \pm 20.27	a 1.33 \pm 28.89	6	AA
b 0.16 \pm 3.62	ab 0.52 \pm 19.60	b 0.94 \pm 26.74	23	AB
b 0.20 \pm 3.51	b 0.68 \pm 18.84	b 0.72 \pm 25.97	16	BB
($P \leq 0.05$)*	($P \leq 0.05$)*	($P \leq 0.01$)**	-	مستوى المعنوية

- علاقة المظاهر المتعددة لجين البرولاكتين (PRL) في بعض معدلات الزيادة الوزنية: حققت المواليد العائدة للأمهات ذات التركيب الوراثي AA وتوقفا معنويا في الزيادة الوزنية بين الميلاد و6 أشهر 1.09 ± 24.87 كغم على التركيب الوراثي BB 1.15 ± 22.46 في حين تفوق التركيب الوراثي AA معنويا على التركيبين الوراثيين AB وBB من الفطام إلى عمر 6 اشهر وهذا يتلائم مع ما حققه التركيب الوراثي AA من تفوق في وزن الحملان على التركيبين الآخرين (جدول 5).

جدول (6) علاقة المظاهر المتعددة لجين البرولاكتين (PRL) في بعض معدلات الزيادة الوزنية

المتوسط \pm الخطأ القياسي (كغم)			العدد	التركيب الوراثي
من الميلاد إلى الفطام	من الميلاد إلى عمر 6 أشهر	من الفطام إلى عمر 6 أشهر		
a 0.84 \pm 16.25	a 1.09 \pm 24.87	a 0.52 \pm 8.62	6	AA
a 0.71 \pm 15.98	ab 0.96 \pm 23.12	b 0.44 \pm 7.14	23	AB
a 0.64 \pm 15.33	b 1.15 \pm 22.46	b 0.59 \pm 7.13	16	BB
NS	($P \leq 0.05$)*	($P \leq 0.05$)*	-	مستوى المعنوية

NS: غير معنوي.

- علاقة المظاهر المتعددة لجين البرولاكتين (PRL) في بعض قياسات الجسم عند عمر 6 أشهر: أظهرت نتائج التحليل الإحصائي (الجدول 7) أن هنالك تباينا معنويا ($P < 0.05$) في بعض قياسات الجسم للحملان مع اختلاف التركيب لجين PRL عند عمر 6 اشهر، إذ تفوق التركيب الوراثي AA على التركيب BB بينما لم يختلف معنويا مع التركيب AB في كل من قياس طول الجسم والارتفاع عند المقدمة فقد بلغ 57.28 ± 2.14 ، 52.84 ± 1.96 و 55.92 ± 2.09 سم على التوالي بالنسبة الطول الجسم (جدول 7) أما بالنسبة للارتفاع عند المقدمة فقد بلغ 62.47 ± 2.81 ، 56.79 ± 1.59 و 59.74 ± 2.25 سم على التوالي (جدول 7) بينما لم يكون هناك فرق معنوي بين التراكيب الثلاثة مع قياس محيط الصدر، وهذا يتفق مع وجود الارتباط الموجب بين بعض قياسات الجسم في الأغنام مع وزن الجسم (13، 14) وهذا يتناغم مع التفوق الذي حققه التركيب AA في وزن الجسم والزيادة الوزنية على التركيبين الآخرين في هذه الدراسة (الجدولين 5 و6).

يتضح مما سبق أهمية اعتماد جين البرولاكتين كواسم (مؤشر) مهم مرتبط بصفات النمو في الأغنام العواسي التركي وكذلك إمكانية اعتماد قياس طول الجسم وارتفاع المقدمة في معادلات التنبؤ بوزن الجسم في العواسي التركي. جدول (7) علاقة المظاهر المتعددة لجين البرولاكتين (PRL) في بعض قياسات الجسم عند عمر 6 أشهر

المتوسط \pm الخطأ القياسي (سم)			العدد	التركيب الوراثي
الارتفاع عند المقدمة	محيط الصدر	طول الجسم		
a 2.81 \pm 62.47	a 2.69 \pm 77.41	a 2.14 \pm 57.28	6	AA
ab 2.25 \pm 59.74	a 3.27 \pm 75.64	ab 2.09 \pm 55.92	23	AB
b 1.59 \pm 56.79	a 2.66 \pm 75.92	b 1.96 \pm 52.84	16	BB
(P \leq 0.05)*	NS	(P \leq 0.05)*	-	مستوى المعنوية
NS: غير معنوي				

المصادر

1. NCBI. (2014). prolactin: Sequence: NC_019477.1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
2. Freeman, M. E.; Kanyicska, B.; Lerant, A. & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.*, 80: 1523-1631.
3. Gregerson, K. A. (2006). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (J. D. Neill, Ed). Academic Press, St. Louis.
4. Kruger, T. H.; Haake, P.; Haverkamp, J.; Kramer, M.; Exton, M. S.; Saller, B.; Leygraf, N.; Hartmann, U. & Schedlowski, M. (2003). Effects of acute prolactin manipulation on sexual drive and function in males. *J. Endocrinol.*, 179: 357-365.
5. Kaplan, S. (2010). The Determination of Prolactin Gene Polymorphism Using PCR-RFLP Method within Indigenous natolian Water Buffalo and Brown Swiss *issd2010_science_book_p168-p173*.
6. Chu, M. X.; Wang, X. C.; Jin, M.; Di, R.; Chen, H. Q.; Zhu, G. Q.; Fang, L.; Ma, Y. H. & Li, K. (2007). (DNA polymorphism of 5' flanking region of prolactin gene and its association with litter size in sheep. *J. Anim. Breed. Genet.*, 126: 63-68.
7. الأنباري، نصر نوري خضير. (1998). التحليل الوراثي لأوزان الجسم وإبعاده بأعمار مختلفة في بعض المجاميع الوراثية لدى الأغنام. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
8. أبو رهياف، محمد. (2013). تأثير التغذية علي الأداء التناسلي في النعاج، مجلة علوم الاغذية والزراعة، كلية علوم الاغذية والزراعة جامعة الملك سعود.
9. Sambrook, J.; Maniatis, T. & Fritsch, E. F. (1989). *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
10. Vincent, A. L. & Routhschild, M. F. (1997). Rapid communication: a restriction fragment length polymorphism in the ovine prolactin gene. *J. Anim. Sci.*, 75:1686.
11. SAS. (2012). *Statistical Analysis System, User's Guide*. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
12. Ramos, A. M.; Matos, C. A.; Russo-Almeida, P. P. A.; Bettencourt, C. M.; Matos, V. J.; Martins, A.; Pinheiro, C. & Rangel-Figueiredo, T. (2009). Candidate genes for milk production traits in Portuguese dairy sheep. *Small Rumin. Res.*, 82:117-121.
13. Kazzal, N. T. (1973). Evaluation of some genetic and environmental factors affecting growth and development of Awaasi sheep in Iraq. Ph.D. Dissertation, Univ. Tennessee Knoxville, Tennessee, U.S.A.
14. المهداوي، مزهر كاظم كعيبر. (2011). تأثير استخدام مستويات مختلفة من البروتين في العليقة وفترة التسمين على أبعاد الجسم في الحملان العراقية. مجلة ديالى للعلوم الزراعية، 3 (1): 38-50.