



<http://doi.org/10.36582/j.Alkuno.2022.05.07>

Al-Kunooze University College

Journal homepage: <http://journals.kunoozu.edu.iq/1/archive> &
<http://www.iasj.net>



كشف الأشكال الوراثية لجين اللبتين بتقنية SSCP في الاغنام العربية

نور ماجد عواد^أ، اسعد يحيى عايد^ب

^أ قسم تقنيات المختبرات الطبية، كلية الكونوز الجامعة، البصرة، العراق

^ب قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

noor.m.a@kunoozu.edu.iq

الخلاصة

يُنْتَج ويَفَرز هرمون اللبتين من قبل النسيج الدهني وبالأخص النسيج الدهني الأبيض الذي يعد المصدر الرئيسي لإنتاج هرمون اللبتين في الإنسان ويقع بشكل رئيس في النسيج الدهني تحت الجلد، كما يمكن أن يفرز من أنسجة أخرى مثل المشيمة والعضلة الهيكلية. أُجري العمل المختبري في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة في جامعة البصرة. تم شراء 15 حملاً "ذكراً" من محافظة ميسان. كذلك جمعت 54 من عينات الدم عشوائياً من الأغنام العربية التابعة للحقل الحيواني في كلية الزراعة وإكملت عدد عينات الدم من مجزرة البصرة لتصبح 109 عينة، للكشف عن التشكل الوراثي لجين اللبتين بتقنية التفاعل السلسلي للبوليميريز - تشكل الخيط المفرد الموافق للحامض النووي. إذ وجد تشكل وراثي لجين اللبتين في الأغنام العربية وظهور تركيبين وراثيين هما AA و AB بتكرار 0,64 للأليل A وبتكرار 0,36 للأليل B من حجم الحيوانات الكلية.

الكلمات المفتاحية: هرمون اللبتين، تقنية SSCP، التشكل الوراثي لجين اللبتين

1- المقدمة

اكتشف هرمون اللبتين في عام 1953 ومستقبله في عام 1966 أما جينه فقد اكتشف عام 1994 من قبل العالم Zhang بتقنية الإستنساخ وقد إشتقت كلمة لبتين من التعبير اليوناني "leptos" وتعني نحافة [1]. وهرمون اللبتين يتكون من 167 حامض أميني بعد إنفلاق متسلسل أو متدرج [2] حامض أميني، إذ تفصل أو تزال الحوامض الأمينية الواحدة والعشرين الأولى من سلسلة هرمون اللبتين الجزيئية ويطلق أو

53

*المؤلف الرئيسي Tel.: +9647712436019

البريد الإلكتروني: noor.m.a@kunoozu.edu.iq

asaad.yheia@gmail.com

يتوزع هرمون اللبتين الناضج إلى الدم مكوناً من 146 حامض أميني فقط ويطلق على هذه العملية تنظيم التعبير الجيني ما بعد الترجمة [1]. وكان إكتشافه نتيجة أبحاث حول أهمية الأنسجة الدهنية في إرسال الإيعازات الفسيولوجية التي تخص توازن الطاقة في الجسم [2].

يقع جين اللبتين على الكروموسوم الرابع في الأبقار والأغنام والماعز ويقع جين مستقبل هرمون اللبتين للعائلة البقرية على الكروموسوم الثالث أما في الإنسان فيقع جين اللبتين على الكروموسوم السابع [3]. ينتج هرمون اللبتين من قبل جين يسمى Ob، ويعد اللبتين هرمونا "ببتيديا" ذا وزن جزيئي يقدر بـ 16000 دالتون [4].

يلعب هذا الهرمون دوراً هاماً في تنظيم تناول العلف وأيض الطاقة وتوازنها في الجسم في المجترات، وتتركز مستقبلاته في غدة تحت المهاد، وتؤدي زيادة كمية النسيج الدهني إلى زيادة تركيز اللبتين في الدم، مما ينتج عنه خفض إستهلاك العلف، لأنه يلعب دوراً مضاداً لهرمون الشبع (Neuropeptide Y (NPY) الذي يفرز من غدة تحت المهاد، بالإضافة لذلك يقوم هذا الهرمون بزيادة ضغط الدم وزيادة نبضات القلب، ولأنه يفرز من النسيج الدهني أي بمعنى آخر من دهون الجسم، فإن الأشخاص البدناء معرضون لمثل هذه المضاعفات، وفي دراسة حديثة إتضح إن له دوراً هاماً في خفض معدل السكر في الدم، ولهذا السبب قد يكون البديل المناسب للأنسولين لمرضى السكري من الدرجة الأولى [5] (Karthikeyan, 2006).

2- بطرق العمل

أجري العمل المختبري في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة في جامعة البصرة على عينات دم الأغنام لـ 109 عينة. إستخلص الحامض النووي منقوص الأوكسجين من الدم باستعمال العدة المجهزة من قبل شركة Promega الأمريكية. بعدها كشف عن وجود الـ DNA بتقنية الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز 1% باستخدام صبغة بروميد الاثيديوم [6]. ضخمت نسخ جين اللبتين باستخدام تقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز Polymerase chain reaction بواسطة جهاز المبلر الحراري، بعدها استخدمت تقنية SSCP لتحديد الأشكال الوراثية لموقع اللبتين.

3- التحليل الإحصائي

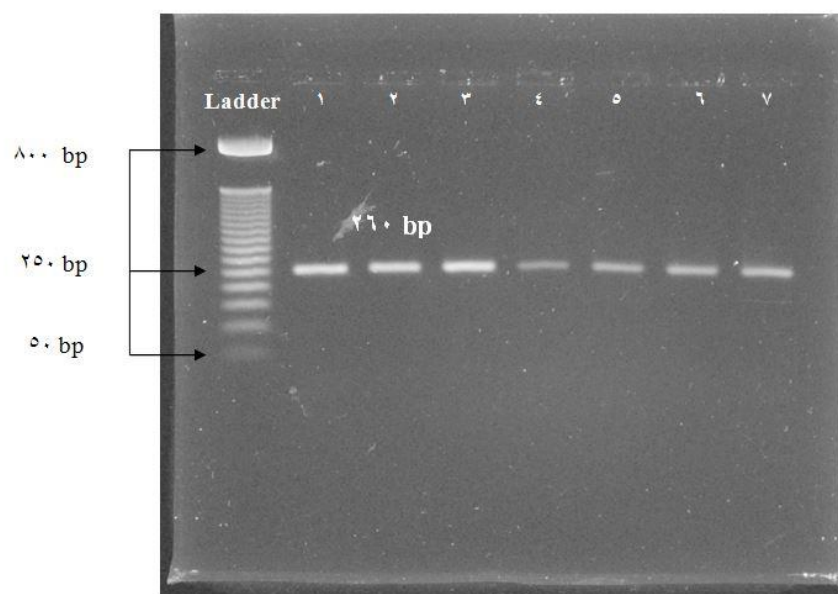
إستخدم البرنامج pop gene [7] لتقدير إحصاءات F-statistics F والتتنوع الجيني ودليل الثبات ومتوسط الخلط المتوقع والمشاهد في المجاميع المختلفة (الحقل، المجزرة، ميسان) لسلالة أغنام العرابي.

4- النتائج Results

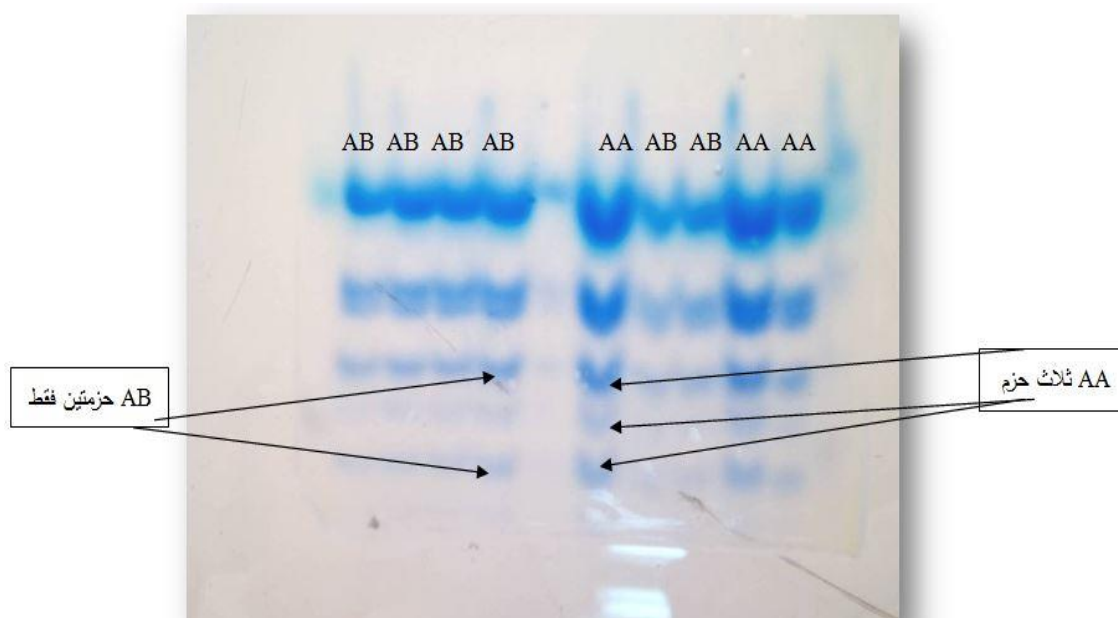
4-1- منتج التضخيم

يوضح الشكل (1) منتج التضخيم لبادئ جين اللبتين على هلام الأكاروز بحجم 260 زوج قاعدي بإستخدام المعلم DNA Marker (50bp) Ladder، إذ أظهرت جميع عينات DNA المستخلصة من دم الأغنام حزمة

مفردة خاصة



الشكل (1) صورة لمنتج التضخيم PCR لبداي جين اللبتين على هلام الأكاروز



الشكل (2): صورة للتشكل الوراثي لبداي جين اللبتين بتقنية PCR – SSCP على هلام الأكريلاميد

التشكل الوراثي باستخدام تقنية PCR – SSCP

استخدمت نماذج PCR في تحليل تقنية SSCP، إذ يلاحظ من الشكل 2 تركيبين وراثيين هما AA و AB ومسؤول عنهما أليلين (A و B) قد حددت في بداي جين اللبتين المستخدم في الدراسة لعينات محافظتي البصرة

وميسان، كما يلاحظ إن التركيب الوراثي AA يتكون من 3 حزم أما التركيب الوراثي AB فيتكون من حزمتين فقط .

2-4 التباين الوراثي

تكرار الأليلات وتكرار التراكيب الوراثية لمجاميع الدراسة

يبين الجدول (1) تكرار الأليلات A و B لكل المجاميع إذ ظهر من خلال البحث تشكل وراثي لبادئ جين اللبتين المستخدم في الدراسة للأغنام العربية وكان هناك تركيبين وراثيين هما (AA,AB) مسؤول عنهما أليلين هما A و B. بلغ تكرار الأليل A 0,65 و 0,61 و 0,67، بينما تكرار الأليل B 0,35 و 0,39 و 0,33 لمجموعة المجزرة والحقل الحيواني وميسان على التوالي، ويتضح منه إن أعلى تكرار للأليل A هو 0,67 وجد في مجموعة ميسان، أما أعلى تكرار للأليل B فهو 0,39 وجد في مجموعة الحقل الحيواني. بلغ تكرار التراكيب الوراثية AA و AB لبادئ جين اللبتين 0,76 و 0,33 على التوالي لمجموعة المجزرة ولم يظهر التركيب الوراثي BB (تكراره يساوي صفراً) أما مجموعة الحقل الحيواني فكانت تكرار التراكيب الوراثية 0,22 و 0,77 على التوالي ومجموعة ميسان 0,33 و 0,66 على التوالي.

أما دليل ثبات الفرد في المجاميع داخل العشيرة Fis للأليلين A و B لكل المجاميع المجزرة والحقل الحيواني وميسان فهو أقل من الصفر (- 0,54 ، - 0,64 ، - 0,50) على التوالي مما يوضح عدم وجود التربية الداخلية لاسيما مع الإشارة السالبة.

الجدول (1): تكرار الأليلات وتكرار التراكيب الوراثية ودليل الثبات fixation (Fis) لمجاميع الدراسة

المجموعة	العدد	تكرار الأليلات		تكرار التراكيب الوراثية		Fis	
		A	B	AA	AB	A	B
المجزرة	40	0,65	0,35	0,33	0,76	0,54 -	0,54 -
الحقل	54	0,61	0,39	0,22	0,77	0,64 -	0,64 -
ميسان	15	0,67	0,33	0,33	0,66	0,50 -	0,50 -
العدد الكلي	109	0,64	0,36	28,0	0,71	0,56 -	0,56 -

5- المناقشة

تضخيم البادئ

أظهرت نتائج الدراسة نجاح تضخيم البادئ primer لموقع جين اللبتين للأغنام العربية وقد كان منتج التضخيم بحجم 260 زوجاً " قاعدياً " من الإكسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني لجين اللبتين وقد إتفقت هذه النتائج مع كل من [8] و [9] إذ درس الباحثون على البادئ نفسه المستخدم في دراستنا لسلالات مختلفة من الأغنام.

التشكل الوراثي

استخدمت تقنية تشكل الخيط المفرد الموافق Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) لغرض تحليل الأشكال الوراثية لبادئ جين اللبتين المتمثل بالإكسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني.

من النتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة يتبين لنا إن هناك تركيبان وراثيان لموقع جين اللبتين في الأغنام العربية متمثل بالتركيب الوراثي السائد AA متكون من ثلاثة حزم والتركيب الوراثي الخليل AB متكون من حزمتين فقط.

يتضح لنا أن هناك أليلين مسؤولين عن موقع بادئ جين اللبتين المستخدم في هذه الدراسة هما الأليل A والأليل B ونتيجة لعدم تحديد مواقع القواعد النيتروجينية التي حدثت فيها الطفرات ونتج عنها التشكل الوراثي لذا سميت التراكيب الوراثية بهذه الطريقة التي تطابق التشكل الوراثي في دراسات أخرى.

النتائج الوراثية

تكرار الأليلات وتكرار التراكيب الوراثية لمجاميع الدراسة

توضح النتائج تكرار الأليلات A و B لكل المجاميع إذ ظهر من خلال الدراسة تشكل وراثي لجين اللبتين المستخدم في الدراسة للأغنام العربية وكان هناك تركيبان وراثيان هما (AA,AB) مسؤول عنهما أليلين هما (A,B).

يتضح من النتائج أن أعلى تكرار للأليل A وجد في مجموعة ميسان وقد يعزى سبب ذلك إلى انخفاض أعداد هذه المجموعة أما أعلى تكرار للأليل B فقد وجد في مجموعة الحقل الحيواني والتفسير المعقول لهذه النتيجة الذي لا يحتاج إلى احتمال يرجع إلى ارتفاع أعداد هذه المجموعة.

توفر الأليل A وندرة الأليل B قد يعود إلى تأقلم الأليل الأول للظروف البيئية التي تعيش بها الأغنام العراقية من ارتفاع في درجات الحرارة لمعظم أشهر السنة وارتفاع نسبة الرطوبة في فصل الصيف وندرة الأمطار والنقص الحاد بالتغذية أو اعتماد الحيوانات على الأعلاف الخشنة الرديئة.

كما نلاحظ أن تكرار التركيب الوراثي AB أعلى من تكرار التركيب الوراثي AA لمجاميع الدراسة ككل. والتركيبان الوراثيان AA و AB لهما صلاحيات في العيش والتأقلم مع الظروف البيئية المحلية ويأتي التركيب الوراثي AB في المقدمة ذلك لأن تكراره أعلى من تكرار التركيب الوراثي AA. غير أن التركيب الوراثي النقي للأليل B غير متوفر مما قد يعكس إنعدام صلاحيته في مثل هذه الظروف.

أكد عدد من الباحثين وجود تراكيب وراثية للبادئ المستخدم في دراستنا وكانت هذه النتيجة مطابقة لما توصل إليه [8,9] حيث وجدوا تشكلاً وراثياً لهذا البادئ في سلالات مختلفة من الأغنام وكانت نتائجنا جزئياً ضمن المدى الذي توصل إليه عدد من الباحثين.

أشارت البحوث السابقة أن هناك مستويات مختلفة لتكرار الأليلات وتكرار التراكيب الوراثية في سلالات مختلفة إذ ذكر [10] أن التركيب الوراثي L2 هو السائد في سلالة أغنام البلوش Baluchi الإيرانية وتكرار التراكيب الوراثية L2 و L1 و L3 كانت 56,25 و 25 و 18,75% على التوالي.

أما دليل ثبات الفرد في المجاميع داخل العشيرة Fis أو التربية الداخلية المتوقعة داخل العشيرة للأليلين A و B لكل المجاميع المجزرة والحقل الحيواني وميسان فهو أقل من الصفر وهذا يدل على عدم وجود تربية داخلية بين الحيوانات للمجاميع كلها أي يشير إلى زيادة الخلط الأليلي في العشيرة. وبما إن معامل التربية الداخلية Fis أقل من الصفر فإن التزاوج غير عشوائي. وإن فائدة F-stat هي تقدير التربية الداخلية النسبية نتيجة اختلاف التراكيب الوراثية في العشيرة بمعنى آخر نقيس النقص الحاصل لنسبة الخليط مقارنة مع التزاوج العشوائي.

يعكس متوسط دلائل الثبات Fixation indices تراكم درجة الخلط في المواقع الجينية وإتزان العشيرة، إذ أن العشائر المتزنة لها دليلاً للثبات منخفض.

6- الاستنتاجات

وجد تركيبان وراثيان AA و AB لبادئ الأكسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني لجين اللبتين في الأغنام العربية. ونسبة خلط أليلي لا تقل عن 67%.

شكر وتقدير:

أحب أن أشكر كل من ساعدني لإتمام هذا البحث ولا سيما الكادر التدريسي في قسم الانتاج الحيواني وكادر الحقل الحيواني لما قدموه من مساعدة في جمع العينات وإجراء التحاليل المطلوبة.

References :المصادر

- 1- Liefers, S. (2004). Physiology and genetics of leptin in perparturient dairy cows. Wageningen University. Ph.D. Thesis.
- 2- Hill, J.W., Elmquist, J.K., and Elias, C.F. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction .American. J. Physiol. Endocrinol Metab. 294: 827–832.
- 3- Perucatti, A., Di Meo, G.P., Vallinoto, M., Kierstein, G., Schneider, M.P.C., Incarnato, D., Caputi Jambrenghi, A., Mohammadi, G., Vonghia, G., Silva, A., Brenig, B. and Iannuzzi, L. (2006). FISH-mapping of *LEP* and *SLC26A2* genes in sheep, goat and cattle R-banded chromosomes: comparison between bovine, ovine and caprine chromosome 4 (BTA4/OAR4/CHI4) and human chromosome 7 (HSA7). Cytogenet Genome Res., 115: 7-9.
- 4- Ingvarsten, K.L. and Boisclair, Y.R. (2001). Leptin and the regulation of food intake, energy homeostasis and immunity with special focus on perparturient ruminants. Domest. Anim. Endocrinol. 21: 215–250.
- 5- Karthikeyan, B.V. (2006). Estimation of Leptin Levels in Gingival Crevicular Fluid And Serum in Periodontal Health And Disease–A Clinico-Biochemical Study. University Bangalore. Master of thesis.
- 6- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Liak, K.J., Rafalski, J. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as enatic marker Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.
- 7- Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T. (1999). POPGENE, Version 1.31. Microsoft Windows- based Freeware for Population Genetics Analysis. Molecular Biology and Technology Center, University of Alberta, Canada.
- 8- Boucher, D., Palin, M.F., Castonguay, F., Gariépy, C. and Pothier, F. (2006). Detection of polymorphisms in the ovine leptin (*LEP*) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Can J Anim Sci., 86: 31-35.
- 9- Barzehkar, R., Salehi, A. and Mahjoubi, F. (2009). Polymorphisms of the ovine *leptin* gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. J. Biotechnology. 7 (4) : 241-246
- 10- Tahmoorespur, M., Taheri, A., Saghi, M.V.D.A . and Ansary, M. (2010). Assessment Relationship Between Leptin and Ghrelin Genes Polymorphisms and Estimated Breeding Values (EBVs) of Growth Traits in Baluchi Sheep. Journal of Animal and Veterinary Advances. 9 (19) : 2460-2465.