مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۲، شماره ۳، ۱۳۹۰ (۲۰۵-۱۹۹)

ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T از ژن OPN با ترکیب و تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران

مجید پسندیده[۱]*، محمدرضا محمدآبادی[۲]، علیرضا ترنگ[۳] و علی اسماعیلی‌زاده کشکوئیه[۴]
۱، ۲، ۴، دانش آموخته دوره کارشناسی ارشد و اعضای هیأت علمی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۳، بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال کشور (رشت)، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۹ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۵)

چکیده

چندین کاوش کل ژنومی، جایگاه‌های صفات کمی (QTL) مؤثر بر صفات تولیدی شیر را روی کروموزوم ۶ گاو در نزدیک موقعیت ژن OPN شناسایی کرده‌اند. OPN نوعی فسفوپروتئین است که در بافت‌ها و سلول‌های مختلف سنتز شده و در مایعات بدن ترشح می‌شود. در این تحقیق، استخراج DNA از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از ۳۹۸ راس گاو هلشتاین از استان‌های تهران و اصفهان انجام شد. برای استخراج DNA از روش نمکی استفاده گردید. سپس چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T (SNP C>T) در موقعیت ۸۵۱۴ از ژن OPN به روش RFLP-PCR تعیین ژنوتیپ شد. فراوانی ژنوتیپ‌های CC، CT و TT به ترتیب ۱۹، ۵۷ و ۲۴ درصد محاسبه شد. با استفاده از آزمون مربع کای، حالت تعادل برای جمعیت بررسی شد. ژنوتیپ‌های این جایگاه، از تعادل هاردی-واینبرگ انحراف نشان دادند. در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T از ژن OPN با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دو بار دوشش در روز و درصد پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز مشاهده شد. ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با صفات شیر، فرصت مناسبی برای استفاده از برنامه‌های انتخاب به‌کمک مارکر در گاو شیری فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گاو هلشتاین، OPN، RFLP-PCR.

مقدمه

هدف از اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی در دام‌ها، افزایش قابلیت تولید از طریق بهبود ژنتیکی دام از نظر صفات مهم اقتصادی می‌باشد. در بین دام‌ها، گاو شیری از اهمیت زیادی برخوردار است و پرورش آن یکی از بخش‌های مهم صنعت دامپروری به شمار می‌رود (Dekkers & Hospital, 2002). OPN (که SPP1 نیز نامیده می‌شود) نوعی فسفوپروتئین با وزن مولکولی ۶۰ کیلودالتون است که ژن کدکننده آن در بسیاری از گونه‌ها توالی‌یابی شده است (Wang & Denhardt, 2008). ابتدا OPN به عنوان پروتئین ماتریس استخوانی تشخیص داده شده بود، اما بعدها به عنوان سایتوکین تولید شده از فعالیت سلول‌های T معرفی شد (Denhardt et al., 2001; Patarca et al., 1993). منبع اصلی این پروتئین سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی و مونوسایت‌ها و ماکروفاژهای شیر می‌باشد (Young et al., 1990; Brown et al., 1992). این پروتئین در انسان، مسئول رشد و توسعه جنینی، آغاز و نگهداری آبستنی،

* نویسنده مسئول: مجید پسندیده تلفن: ۰۹۱۵-۳۸۶۲۹۱۸ E-mail: Majidpasandideh@gmail.com

تنظیم التهاب، چسبندگی سلولی، تغییر وضع بافتی و بقای سلولی می‌باشد (Johnson et al., 2003; Denhardt et al., 2001). ژن OPN (SPP1) روی کروموزوم ۴ انسان، کروموزوم ۵ موش و کروموزوم ۶ گاو مکان‌یابی شده است (Nemir et al., 2000) و طول پروتئین آن تقریباً ۳۰۰ اسیدآمینه (۲۷۸ در گاو،۲۸۰ در بوفالو، ۲۹۷ در موش و ۳۱۴ در انسان) می‌باشد (Fisher et al., 2001). در موش‌های ترانس ژنیک شده (آنتی سنس-RNA)[1] که در آنها ژن OPN بیان نمی‌شود، مشاهده شده است که این ژن برای رشد غدد پستانی و نیز شیردهی ضروری است. این موش‌ها، فاقد ساختار آلوئولی پستان و عدم کارایی در شیردهی و نیز دچار کاهش شدید در میزان سنتز پروتئین‌های شیر مانند β-کازئین بودند (Nemir et al., 2000). چندین کاوش ژنومی، QTL مؤثر بر صفات تولیدی شیر را روی کروموزوم ۶ گاو در نزدیکی ژن OPN شناسایی کرده‌اند (Zhang et al., 1998; Ron et al., 2001; Olsen et al., 2004; Ashwell et al., 2004). یک QTL مؤثر بر درصد پروتئین شیر با فاصله اطمینان ۴ سانتی مورگان از مکان ژن OPN شناسایی شده است (Ron et al., 2001). اخیراً با استفاده از روش ترکیب آنالیز پیوستگی و آنالیز عدم تعادل پیوستگی (LDLA)[2] و افزایش تراکم نقشه، یک QTL در فاصله ۴۲۰ کیلو بازی بین ژن‌های ABCG2 و LAP3روی کروموزوم ۶ شناسایی شده است که بر صفات تولیدی شیر مؤثر می‌باشد (Olsen et al., 2005). این منطقه کوچک شامل چهار ژن می‌باشد که یکی از آن‌ها OPN است. شواهدی مبنی بر تأثیر نوکلئوتیدهای صفات کمی[3] در ناحیه بالا دست منطقه تنظیمی ژن OPN، بر مقدار شیر، درصد چربی و درصد پروتئین ارائه شده است (Schnabel et al., 2005; Cohen et al., 2004).

در یک تحقیق، چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T در اینترون ۴ ژن OPN روی گاوهای هلشتاین دو جمعیت CDDR[4] و UW[5] مورد بررسی قرارگرفت. در این مطالعه، آلل C در جمعیت CDDR، با افزایش درصد پروتئین و درصد چربی شیر ارتباط نشان داد. با این وجود، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های این چندشکلی تک نوکلئوتیدی با مقدار شیر، مقدار چربی، مقدار پروتئین و امتیاز سلول‌های سوماتیک (SCS)[6] مشاهده نشد. اگرچه ارتباط معنی‌داری تشخیص داده نشد اما اثر منفی آلل C بر مقدار شیر مشخص شد (Leonard et al., 2005). بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T در جمعیت UW نیز نتایجی مشابه با جمعیت CDDR نشان داد. آلل C در جمعیت UW نیز اثر مثبتی بر درصد پروتئین شیر و اثر منفی بر مقدار شیر داشت اما نتایج به سطح معنی‌دار نرسید (Leonard et al., 2005). تحقیقی دیگر، با بررسی SNPC>T از ژن OPN در جمعیت UW اثرات افزایشی برای درصد چربی، درصد پروتئین و مقدار چربی را معنی‌دار گزارش کرد. اثرات غالبیت برای هیچ‌یک از صفات مورد مطالعه، معنی‌دار مشاهده نشد (Khatib et al., 2007). مطالعه‌ای روی گاوهای گوشتی ایالات متحده، ارتباط این جانشینی تک نوکلئوتیدی را با صفات رشد مورد بررسی قرار داد. ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T با وزن سالانه، وزن زنده در زمان کشتار و افزایش وزن روزانه بعد از شیرگیری مشاهده شد. اما اثر معنی‌داری بین این جانشینی تک نوکلئوتیدی با وزن تولد و وزن از شیرگیری مشاهده نشد (White et al., 2007). تحقیق روی ژنSPP1، با بررسی بیشتر ارتباط چندشکلی این ژن با نرخ رشد بدن در جمعیت بزرگ‌تر از گاو شیری و افزایش چندین نسل، گسترش داده شد (Allan et al., 2007). در این تحقیقات، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T از ژن SPP1 با وزن تولد، وزن از شیرگیری و وزن سالانه به دست آورده شد (Allan et al., 2007). سایر مطالعات نیز ارتباط معنی‌دار نشانگرهای ریزماهواره در منطقه ژن OPN را با درصد پروتئین شیر و دیگر صفات مرتبط نشان داده‌اند (Zhang et al., 1998; Ron et al., 2001; Olsen et al., 2004). به دلیل اهمیت صنعت تولید شیر و افزایش رو به رشد تعداد گاوهای هلشتاین در کشور و نیز تاثیر ژن

1. AS-OPN Mice
2. Linkage Analysis Linkage Disequilibrium
3. Quantitative Trait Nucleotide
4. Cooperative Dairy DNA Repository
5. University of Wisconsin
6. Somatic Cell Score

OPN بر صفات ترکیب و تولید شیر، انجام چنین مطالعه‌ای ضروری به نظر رسید. به همین منظور در این تحقیق، ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T در موقعیت نوکلئوتیدی ۸۵۱۴ از ژن OPN با صفات ترکیب و تولید شیر در نمونه‌های اخذ شده از گاوهای هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق روی ۳۹۸ راس گاو هلشتاین گاوداری‌های استان‌های تهران و اصفهان انجام شد. نمونه‌گیری خون از ۱۰ گاوداری این دو استان (هر استان ۵ گاوداری) با استفاده از ونوژیکت حاوی EDTA (جهت جلوگیری از انعقاد خون) انجام شد. سپس استخراج DNA از نمونه‌های خون به روش نمکی[1] انجام شد (Miller et al., 1988). برای بررسی کیفی DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. تعیین غلظت DNA با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام پذیرفت و با توجه به مقدار عددی مشاهده شده از دستگاه، رقیق‌سازی نمونه‌های DNA با آب دو بار تقطیر به نسبت ۵۰ نانوگرم در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گردید. واکنش PCR برای تکثیر قطعه ۲۹۰ جفت بازی واقع در اینترون ۴ از ژن OPN انجام پذیرفت. توالی آغازگرهای پیشرو و پسرو برای تکثیر قطعه ۲۹۰ جفت بازی در مکان ۸۵۱۴ این ژن به این صورت بود (Leonard et al., 2005):

F5′-GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC-3′

R5′-CCAAGCCAAACGTATGAGTT-3′

واکنش تکثیر در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۶ پیکومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPS، ۲ میکرولیتر PCR بافر 10X، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱/۵ واحد Taq پلیمراز صورت پذیرفت. چرخه‌های واکنش PCR به این صورت برنامه ریزی شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال به روش Touchdown از دمای ۶۰ تا ۵۳ درجه سانتیگراد (۰/۷ درجه سانتیگراد کاهش به ازای هر سیکل) به مدت ۴۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و سنتز نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه. با انجام این واکنش، قطعه ۲۹۰ جفت بازی از ژن OPN تکثیر شد. سپس برای تعیین ژنوتیپ در مکان C>T، محصولات PCR با آنزیم برشی *BseNI (BsrI)* مورد هضم واقع شدند (Leonard et al., 2005). ترکیب واکنشگرهای هضم آنزیمی برای موقعیت c.8514C>T، به صورت ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱ میکرولیتر بافر B (10X) و ۲ واحد آنزیم *BsrI* استفاده شد که به مدت ۵ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در دستگاه DryBath انجام شد. نمونه‌های هضم شده روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند و ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. در مکان چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T، آلل T (برش نخورده) به‌وسیله باند ۲۹۰ جفت بازی و آلل C (برش خورده) توسط باند ۲۰۰ جفت بازی تشخیص داده شد. برای حصول اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده و نیز قطعات حاصل از برش، از نشانگرهای pUC Mix, 8 و GeneRuler100 bp استفاده شد. با توجه به ژنوتیپ‌های به دست آمده، فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و قابل انتظار و تعادل هاردی- واینبرگ با کمک نرم افزار Pop Gene به دست آورده شد (Yeh et al., 1999). برای آنالیز ارتباط ژنوتیپ‌ها با صفات تولید و ترکیب شیر، از نرم‌افزار SAS (ویرایش ۸/۱) با روش GLM[2] استفاده شد (SAS, Institute, 1999). مدل استفاده شده در این تحقیق، مدل اثرات ثابت بود که به صورت زیر نوشته شد:

$$y_{ijkmnr} = \mu + G_i + H(S)_{ij} + M_{ijk} + N_{ijkm} + C_{ijkmn} + e_{ijkmnr}$$

پارامترها در این مدل عبارتند از:

y_{ijkmnr}: بردار مشاهدات شامل: MILK (تولید شیر تصحیح شده براساس ۳۰۵ روز)، MILK2X (تولید شیر بر اساس دوبار دوشش در روز)، MILKME (تولید شیر تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ)، BVM (ارزش اصلاحی تولید شیر)، BVF (ارزش اصلاحی تولید چربی شیر)، BVFP (ارزش اصلاحی درصد چربی شیر)، FAT2X (تولید چربی تصحیح شده بر اساس دوبار

1. Salting Out

2. General Linear Model

دوشش در روز)، FATP2X (درصد چربی شیر تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز)، PRO305 (تولید پروتئین تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز)، PROPER305 (درصد پروتئین تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز) و PROME (تولید پروتئین تصحیح شده بر اساس وزن بلوغ).

μ: میانگین، G_i: اثر ژنوتیپ، $H(S)_{ij}$: اثر گله (داخل استان نست[1] شده است)، M_{ijk}: اثر سال تولد، N_{ijkm}: اثر ماه تولد، C_{ijkmn}: اثر اولین سال زایش و e_{ijkmnr}: اشتباهات آزمایش.

نتایج

در مرحله بررسی کیفی DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪، نمونه‌هایی که باند روشن با وضوح کامل ایجاد کردند قابل قبول بودند. محصولات به‌دست آمده از واکنش PCR، جهت حصول اطمینان از تکثیر قطعات ۲۹۰ جفت بازی از ژن OPN، روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. نمونه‌های تکثیر شده، باند روشن و واضحی در موقعیت‌های ۲۹۰ جفت بازی ایجاد کردند که برای ادامه تحقیق انتخاب شدند (شکل ۱).

با توجه به قطعات حاصل از برش آنزیم، ژنوتیپ‌های افراد در هر موقعیت تعیین شد. با استفاده از آنزیم *BsrI* در موقعیت c.8514C>T، سه نوع ژنوتیپ CC، CT و TT مشخص شد. قطعه برش نخورده ۲۹۰ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ TT و دو قطعه ۲۰۰ و ۹۰ جفت بازی، بیانگر ژنوتیپ CC است. همچنین سه قطعه ۲۹۰، ۲۰۰ و ۹۰ جفت بازی، نشاندهنده ژنوتیپ CT می‌باشد (شکل۲).

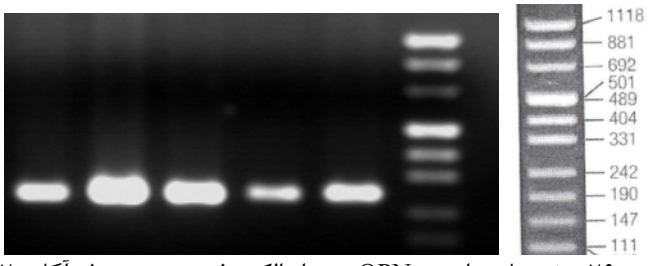
از بین ۳۹۸ فرد تعیین ژنوتیپ شده، ۷۵ فرد ژنوتیپ CC، ۲۲۶ فرد ژنوتیپ CT و ۹۷ فرد ژنوتیپ TT نشان دادند. مقادیر محاسبه شده فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار و نیز مربع‌کای در جدول ۱ آورده شده است.

1. Nest

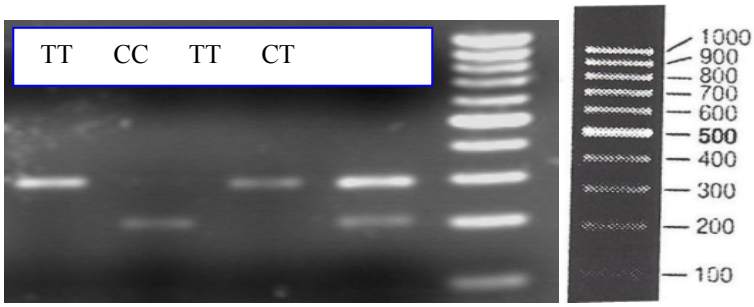
جدول ۱- نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ جمعیت در موقعیتc.8514C>T از ژن OPN

SNP	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی			هتروزیگوسیتی		تعادل
c.8514C>T	C	T	CC	CT	TT	Obs[1]	Exp[2]	χ^2
	۰/۵۳	۰/۴۷	۰/۱۹	۰/۵۷	۰/۲۴	۰/۵۷	۰/۴۹	۷/۵۰

۱. هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۲. هتروزیگوسیتی مورد انتظار



شکل ۱- قطعه تکثیر شده ۲۹۰ جفت بازی از ژن OPN پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪ و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد (نشانگر pUC Mix,8)



شکل ۲- قطعات حاصل از هضم آنزیمی قطعه ۲۹۰ جفت بازی از ژن OPN با آنزیم *BsrI* (نشانگر GeneRuler 100 bp)

با بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های موقعیت c.8514C>T از ژن OPN با صفات تولید و ترکیب شیر، ارتباط معنی‌دار این ژنوتیپ‌ها با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دو بار دوشش در روز (P<۰/۰۵) و درصد پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز (P<۰/۰۱) مشاهده شد. به‌طوری‌که افراد با ژنوتیپ CT، درصد چربی تصحیح شده بر اساس دو بار دوشش بیشتری (به ترتیب ۰/۱۷ و ۰/۰۴ درصد) نسبت به ژنوتیپ‌های CC و TT تولید می‌کردند. همچنین این افراد درصد پروتئین شیر تصحیح شده بر اساس ۳۰۵ روز بیشتری (به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۰۲ درصد) نسبت به افراد دارای ژنوتیپ CC و TT نشان دادند. ارتباط معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های این موقعیت با سایر صفات مورد مطالعه مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین حداقل مربعات و اشتباه استاندارد برای صفات شیر، در ژنوتیپ‌های مختلف موقعیت c.8514C>T از ژن OPN

c.8514C>T	CC (n= ۷۵)	CT (n= ۲۲۶)	TT (n= ۹۷)	*p* value
MILK	۷۵۸۷/۹۰±۵۴۰/۱۷	۷۴۲۸/۵۱±۴۹۷/۲۴	۷۶۰۵/۸۰±۵۰۸/۳۷	۰/۷۵۵۵
MILK2X	۷۳۳۷/۸۳±۲۵۲/۰۸	۷۳۳۱/۶۲±۲۳۲/۰۵	۷۲۱۶/۱۹±۲۳۷/۲۴	۰/۴۹۷۰
MILKME	۸۵۰۵/۷۸±۲۸۸/۶۹	۸۵۱۴/۱۰±۲۶۵/۷۵	۸۳۹۹/۸۲±۲۷۱/۷۰	۰/۶۱۴۹
FAT2X	۲۲۲/۰۲±۹/۳۷	۲۳۲/۴۳±۸/۴۳	۲۳۰/۲۲±۸/۷۸	۰/۱۵۲۶
FATP2X	[b]۳/۰۷±۰/۰۹۱۷	[a]۳/۲۴±۰/۰۸۲۴	[c]۳/۲۰±۰/۰۸۵۹	۰/۰۲۵۶*
BVM	۷۷/۷۲±۵۳/۶۰	۶۱/۹۶±۲۸/۴۳	۶۹/۶۷±۵۵/۹۲	۰/۱۸۱۲
BVF	۴/۷۸±۲/۶۳	۳/۴۹±۲/۱۰	۱/۹۱±۲/۳۶	۰/۲۹۱۷
BVFP	۰/۰۳±۰/۰۱	۰/۰۴±۰/۰۱	۰/۰۱±۰/۰۱	۰/۰۸۹۶
PRO305	۲۲۰/۴۷±۷/۸۸	۲۲۴/۲۳±۷/۰۹	۲۱۷/۸۵±۷/۵۵	۰/۵۱۲۶
PROPER305	[b]۳/۰۵±۰/۰۴	[a]۳/۰۸±۰/۰۳	[b]۳/۰۶±۰/۰۳	۰/۰۰۴۸**
PROME	۲۵۵/۳۷±۹/۰۱	۲۵۹/۹۱±۸/۱۱	۲۵۲/۸۷±۸/۶۳	۰/۵۰۱۷

بحث

پیشرفت قابل توجهی در بهبود ژنتیکی جمعیت‌های دامی، با استفاده از انتخاب مصنوعی برای صفات کمی ایجاد شده است. بیشتر این انتخاب‌ها بر مبنای فنوتیپ ظاهری حیوان و بدون در نظر گرفتن ساختار ژنتیکی انجام شده است. با این‌حال، پیشرفت دانش ژنتیک مولکولی در جمعیت‌های دامی منجر به شناخت ساختار ژنتیکی صفات کمی شده است (Dekkers & Hospital, 2002). در این تحقیق، ژنوتیپ‌های چندشکلی تک نوکلئوتیدی c.8514C>T از ژن OPN، به‌روش RFLP-PCR تعیین شد و سپس ارتباط آن‌ها با صفات ترکیب و تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت. ژن OPN به دو دلیل برای این تحقیق انتخاب شد. اول، مطالعات QTL بود؛ به‌طوری‌که چندین کاوش ژنومی، QTL مؤثر بر صفات تولیدی شیر را روی کروموزوم ۶ گاو در نزدیکی ژن OPN شناسایی کرده بودند (Zhang et al., 1998; Ron et al., 2001; Olsen et al., 2004; Ashwell et al., 2004). دلیل دیگر، وجود پروتئین OPN در شیر و بیان گسترده این ژن در سلول‌های اپیتلیال غدد پستانی است که مشخص شده است بر صفات تولیدی شیر مؤثر می باشد (Leonard et al., 2005). در این مطالعه، بیشترین فراوانی ژنوتیپی در موقعیت c.8514C>T از ژن OPN، برای ژنوتیپ CT و کمترین فراوانی برای ژنوتیپ CC محاسبه شد. این نتایج با مطالعات قبلی توسط Pareek et al. (2008) و Khatib et al. (2007) که بیشترین و کمترین فراوانی را به ترتیب برای ژنوتیپ‌های CT و CC به دست آورده بودند مطابقت دارد. با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2)، انحراف ژنوتیپ‌ها از تعادل هاردی-واینبرگ، مشخص شد. از دلایل احتمالی این انحراف از تعادل، می‌توان به تلاقی‌های غیرتصادفی (تلقیح مصنوعی) اشاره کرد که از عوامل بر هم زننده تعادل می‌باشد.

همان‌طور که ذکر شد، در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین جانشینی تک نوکلئوتیدی C>T از ژن OPN با دو صفت درصد چربی تصحیح شده بر اساس دوبار دوشش در روز و درصد پروتئین شیر تصحیح شده

براساس ۳۰۵ روز به‌دست آورده شد. Leonard et al. (2005)، نشان دادند که آلل C در این موقعیت، با افزایش درصد پروتئین و درصد چربی شیر ارتباط دارد. Khatib et al. (2007) اثرات افزایشی را برای درصد چربی، درصد پروتئین و مقدار چربی در این جایگاه معنی‌دار گزارش کردند. Schnabel et al. (2005) در مطالعه خود بر روی OPN، این ژن را به عنوان کاندیدای اصلی مؤثر بر درصد پروتئین شیر تشخیص دادند. نتایج این تحقیق با مطالعات قبل که ارتباط معنی‌دار ژنوتیپ‌های جانشینی تک نوکلئوتیدی C>T از ژن OPN را با درصد پروتئین شیر گزارش کرده‌اند مشابهت دارد. ارتباط چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T در اینترون ۴ از ژن OPN با صفات ترکیب و تولید شیر، می‌تواند به دلیل عدم تعادل پیوستگی احتمالی این جایگاه با چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی تشخیص داده نشده در این ژن باشد.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، وجود ارتباط معنی‌دار بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی C>T از ژن OPN با صفات ترکیب و تولید شیر، فرصت مناسبی برای استفاده از برنامه‌های انتخاب به‌کمک مارکر (MAS)[1] در گاوهای شیری فراهم می‌آورد. هدف از انتخاب به‌کمک مارکر این است که انتخاب در سطح DNA جایگزین انتخاب بر مبنای فنوتیپ شود. انتخاب به کمک مارکر توانایی افزایش فراوانی آلل مطلوب در جمعیت را دارد. همچنین در گاوشیری می‌توان از انتخاب به‌کمک مارکر به عنوان انتخاب اولیه گوساله‌های نر (قبل از پروژنی تست) استفاده کرد و از این طریق باعث افزایش شدت انتخاب، کاهش فاصله نسل و افزایش کارایی ژنتیکی در جمعیت شد. از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعات مشابه، می‌توان به تفاوت پتانسیل ژنتیکی افراد مورد مطالعه و نیز اختلاف در اندازه نمونه اشاره نمود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در این ژن، در نژادهای دیگر گاو شیری با تعداد نمونه بیشتر نیز بررسی شود.

1. Marker Assisted Selection

REFERENCES

1. Allan, M. F., Thallman, R. M., Gushman, R. A., Echternkamps, E., White, S. N., Kuehn, L. A., Casas, E. & Smith, T. P. L. (2007). Association of a single nucleotide polymorphism in SPP1 with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate. *Journal of Animal Science*, 85, 341-347.
2. Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Da, Y., VanRaden, P. M., Ron, M., Weller, J. I. & Lewin, H. A. (2004). Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 87, 468-475.
3. Brown, L. F., Berse, B., Van DeWater, L., Papadopoulos-Sergiose, A., Peruzzi, C.A., Manseau, E. J., Dvorak, H. & Senger, D. R. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with lumenal epithelial surfaces. *Molecular Biology of the Cell*, 3, 1169-1180.
4. Cohen, M., Seroussi, E., Band, M. R., Lewin, H. A., Drackley, J. K., Larkin, D. M., Everts-van der Wind, A., Heon-Lee, J., Loor, J. J., Shani, M., Weller, J. I. & Ron, M. (2004). SPP1 is a candidate gene for the QTL affecting milk protein concentration on BTA6 in Israeli Holstein. *Society of Animal Genetics*, Tokyo, Japan. 29th Int.
5. Dekkers, J. C. M. & Hospital, F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*, 3, 22-32.
6. Denhardt, D. T., Noda, M., O'Regan, A. W., Pavlin, D. & Berman, J. S. (2001). Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *Journal of Clinical Investigation,* 107, 1055-61.
7. Fisher, L. W., Torchia, D. A., Fohr, B., Young, M. F. & Fedarko, N. S. (2001). Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 460-5.
8. Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Bazer, F. W. & Spencer, T. E. (2003). Osteopontin: Roles in implantation and placentation. *Biology of Reproduction*, 69, 1458-1471.
9. Khatib, H., Zaitoun, I., Wiebelhaus-Finger, J., Chang, Y. M. & Rosa, G. J. M. (2007). The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 90, 2966-2970.
10. Leonard, S., Khatib, H., Schutzkus, V., Chang, Y. M. & Maltecca, C. (2005). Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. *Journal of Dairy Science,* 88, 4083-4086.

11. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. (1988). A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215-1220.
12. Nemir, M., Bhattacharyya, D., Li, X., Singh, K., Mukherjee, A. B. & Mukherjee, B. B. (2000). Targeted Inhibition of Osteopontin Expression in the Mammary Gland Causes Abnormal Morphogenesis and Lactation Deficiency. *Journal of Biological Chemistry*, 14, 969-976.
13. Olsen, H. G., Lien, S., Gautier, M., Nilsen, H., Roseth, A., Berg, P. R., Sundsaasen, K. K., Svendsen, M. & Meuwissen, T. H. (2005). Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. *Genetics*, 169, 275-283.
14. Olsen, H. G., Lien, S., Svendsen, M., Nilsen, H., Roseth, A., Aasland Opsal, M. & Meuwissen, T. H. E. (2004). Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *Journal of Dairy Science*, 87, 690-698.
15. Pareek, C. S., Czarnik, U., Pierzchała, M. & Zwierzchowski, L. (2008). An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (SPP1) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 26, 251-257.
16. Patarca, R., Saavedra, R. A. & Cantor, H. (1993). Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early Tlymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Critical Reviews in Immunology*, 13, 225-46.
17. Ron, M., Kliger, D., Feldmesser, E., Seroussi, E., Ezra, E. & Weller, J. I. (2001). Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. *Genetics,* 159, 727-735.
18. SAS Institute. (1999). SAS OnlineDoc, Version 8. *SAS Institute Inc., Cary, NC.* www.jmu.edu/docs/**sas**doc/**sas**html/common/copyrite.htm
19. Schnabel, R. D., Kim, J. J., Ashwell, M. S., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Connor, E. E. & Taylor, J. F. (2005). Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. In: Proceedings of *the Nationatl Academy of Sciences of the United States of America,* 102, 6896-6901.
20. Wang, K. W. & Denhardt, D. T. (2008). Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19, 333-345.
21. White, S. N., Casas, E., Allan, M. F., Keele, J. W., Snelling, W. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M. & Smith, T. P. L. (2007). Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated with postweaning growth. *Journal of Animal Science,* 85, 1-10.
22. Yeh, F. C., Yang, R. & Boyle, T. (1999). *Pop Gene version 1.31, Microsoft windows-based free ware for population genetic analysis*, University of Alberta. Edmonton, AB, Canada.
23. Young, M. F., Kerr, J. M., Termine, J. P., Weever, U. M., Wang, M. G., McBride, O. W. & Fisher, L. W. (1990). cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity,chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*, 7, 491-502.
24. Zhang, Q., Boichard, D., Hoeschele, I., Ernst, C., Eggen, A., Murkve, B., Pfister-Genskow, M., Witte, L. A., Grignola, F. E., Uimari, P., Thaller, G. & Bishop, M. D. (1998). Mapping QTL for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics*, 149, 1959-1973.