



"مقاله پژوهشی"

شناسایی جهش فقدان عملکرد p.Q579X موثر بر سقط جنین در ژن APAF1 در گاوهای هلشتاین

خزان عنایتی^۱، ایوب فرهادی^۲ و قدرت رحیمی میانجی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: ayoub_farhadi@gmail.com)
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ ارسال: ۹۹/۰۴/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۱۳
صفحه: ۱۴۶ تا ۱۵۶

چکیده

امروزه مشکلات تولید مثلی یکی از نگرانی‌های اصلی در صنعت گاو شیری است. هدف از پژوهش حاضر شناسایی جهش فقدان عملکرد p.Q579X موثر بر سقط جنین خود به خودی و مشکلات تولید مثلی در ژن APAF1 با روش توالی‌یابی در گاو هلشتاین بود. در مجموع ۲۰۰ نمونه خون تهیه و استخراج DNA با کیت تجاری انجام شد. سپس یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر قطعه‌ای با طول ۴۵۶ جفت باز حاوی جهش مورد نظر طراحی و تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با روش PCR-SSCP انجام شد. در جایگاه APAF1 دو آلل A و B و دو ژنوتیپ AA و AB به ترتیب با فراوانی‌های ۹۶/۷۶، ۳/۲۴، ۹۳/۵۱ و ۶/۴۹ درصد مشاهده شدند. ژنوتیپ BB در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. بعد از تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، از هر ژنوتیپ دو نمونه به صورت دو طرفه توالی‌یابی شده و بعد از هم‌ترازی توالی‌های به دست آمده، مقایسه آن‌ها با توالی رفرنس برای شناسایی جهش‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار (BioEdit (version 7.0.9.0 صورت گرفت. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که جهش p.Q579X که یکی از جهش‌های موثر بر سقط جنین در گاو هلشتاین می‌باشد در ژنوتیپ AB ژن APAF1 در گاوهای هلشتاین در ایران وجود دارد. با توجه به اینکه این جهش در حالت هموزیگوت باعث سقط جنین در گاو می‌شود، می‌توان نتایج حاصل از این پژوهش را در برنامه‌های اصلاح نژادی در راستای شناسایی حاملین و حذف آن‌ها از گله گاوهای شیری هلشتاین به کار برد.

واژه‌های کلیدی: توالی‌یابی، ژن APAF1، سقط جنین، گاو هلشتاین

مقدمه

ضرر و زیان دامدار می‌شود. اهمیت نسبی باروری و ارتباط صفات شیردهی با صنعت لبنیات، عملکرد تولید مثلی را به یک هدف بسیار مهم در برنامه‌های اصلاح نژادی گاو شیری تبدیل کرده است (۳۵،۲۲).
در گاوهای پرتولید طولانی‌شدن فاصله زایش هزینه زیادی در بر دارد که عواملی مثل قیمت شیر، میزان تولید شیر، تفاوت در هزینه جایگزینی تلیسه، هزینه اسپرم، هزینه خوراک و هزینه تلقیح و... روی آن تاثیر می‌گذارند (۷). طی دهه‌های اخیر، تولید شیر گاوهای شیری در اثر بهبود ژنتیکی به میزان قابل توجهی افزایش یافته است اما همزمان عملکرد تولیدمثلی آن‌ها به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته و انتخاب برای افزایش تولید شیر و ترکیبات آن اثر نامطلوبی بر عملکرد تولید مثل و سلامتی داشته است (۳۹). همواره همبستگی منفی بین تولید شیر و تولید مثل بهینه در گاوهای شیری مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و اعتقاد بر این است که این دو صفت در تقاضا و مصرف مواد مغذی رقابت فیزیولوژیک دارند (۲۰،۳۱). ورکوهی و همکاران (۴۲) نشان دادند که همبستگی ژنتیکی بین صفت سقط مکرر با صفت تولید شیر و چربی شیر در گاو هلشتاین به ترتیب برابر با ۰/۱۴ و ۰/۲۵ می‌باشد.
تخمین زده شده است که بخش قابل توجهی از کاهش در میزان باروری به دلیل متغیرهای ژنتیکی است (۱۴). تولید مثل

طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاو داری با ظرفیت ۲۰۴۸۵۶۳ راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند (۱۸). طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (۱۸). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هر نفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می‌باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال است (۱۸). با توجه به نتایج پژوهش‌های مختلف انجام شده روی گاوهای هلشتاین ایران (۳۰،۲۴،۱۷،۱۳،۹،۸،۵) و آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که این دام‌ها باید از جنبه‌های گوناگون مورد مطالعه قرار گیرند. به علاوه، باروری نگرانی اصلی در صنعت گاو شیری است به طوری که حجم زیادی از مطالعات را در دو دهه اخیر به خود اختصاص داده است (۶).
صفات تولید مثلی از مهم‌ترین صفات برای پایداری و حفظ تولید در دامپروری می‌باشند. به طوری که تولید شیر حاصل یک بارداری موفق و تعداد زایمان‌ها در طول زندگی گاو است. بنابراین، اگر عملکرد تولید مثلی کاهش یابد منجر به ضرر و زیان اقتصادی خواهد شد، زیرا علاوه بر کاهش تولید شیر جایگزینی حیوانات در گله برای حفظ اندازه گله نیز موجب

صفت اقتصادی پیچیده‌ای است که تحت تأثیر مؤلفه‌های محیطی و ژنتیکی بسیاری می‌باشد (۱۰). روش‌های انتخاب کلاسیک برای صفات پیچیده مانند تولید مثل، در بهبود نهایی ژنتیکی نتیجه بخش نیست. در حالی که شناسایی یک ژن بزرگ اثر می‌تواند در انتخاب صفات پیچیده برای به‌دست‌آوردن بهبود ژنتیکی سریع‌تر استفاده شود. اخیراً ژن فاکتور ۱ فعال‌کننده پروتئاز آپوتوتیک (APAF1) (۲،۲۳،۳۲) به‌عنوان ژن موثر بر کاهش کارایی تولید مثلی و سقط جنین در گاوهای هلشتاین شناسایی و معرفی شده است. طبق گزارش دانشگاه کالیفرنیا دیویس یک سقط جنین در اواسط آبستنی حدود ۸۰۰ دلار زیان به صنعت گاو شیری وارد می‌کند. طبق برآورد این دانشگاه زیان وارد شده از سقط جنین ناشی از بروز یک جهش فقدان عملکرد در ژن APAF1 در طول ۳۵ سال گذشته در کل جهان بالغ بر ۴۲۰ میلیون دلار بوده است (۴۱).

پروتئین APAF1 در حالت عادی در سلول به‌صورت بی‌اثر و غیر فعال حضور داشته و در فرایند آپوپتوزیس در اثر رهایی سیتوکروم-C از میتوکندری فعال می‌شود. وزن مولکولی این پروتئین ۱۳۰ کیلو دالتون بوده و در انتهای آمینی خود دارای دامین CARD و در انتهای کربوکسیلی دارای چندین بخش تکراری از موتیف WD-40 می‌باشد. برای فعال‌شدن پروتئین APAF1 ایجاد میان کنش بین این پروتئین و سیتوکروم-C ضروری است. پروتئین کد شونده توسط APAF1 ترکیب کلیدی در فرایند آپوپتوزیس به‌واسطه سیتوکروم-C می‌باشد (۴،۳۴). پروتئین APAF1 یک الیگومر را تشکیل می‌دهد که وقتی که به سیتوکروم-C و dATP متصل می‌شود، تشکیل آپوپتوزوم را می‌دهد. آپوپتوزوم یک ساختار سیتوپلاسمی است که به پیش پروتئین کاسپاز-۹ متصل شده و آن را برش داده و به فرم فعال بالغ تبدیل می‌کند. فرم فعال شده کاسپاز-۹، زنجیره کاسپاز را فعال کرده و در نهایت منجر به مرگ آپوپتوزی سلولی می‌شود (۲).

عملکرد پروتئین APAF1 به‌عنوان مکانیزم کنترل کیفیت سلولی شناخته شده است. پروتئین APAF1 هم در خودکشی سلول‌ها و هم در مسدود کردن فرایند تقسیم مجدد آن‌ها مشارکت دارد. اگر آسیب به DNA ترمیم ناپذیر باشد این پروتئین موجب خودکشی سلول می‌شود و اگر آسیب حاد بوده ولی ترمیم آن امکان‌پذیر باشد، این پروتئین وارد هسته سلول می‌شود و با DNA تماس پیدا کرده و مانع انجام تقسیمات بعدی سلول می‌شود. ژن APAF1 در گاو طبق مستندات موجود در NCBI (AC_000162.1) روی کروموزوم ۵ (BTA5) و در موقعیت ۶۳۱۲۲۲۰-۶۳۲۱۱۳۷۴ نوکلئوتیدی قرار داشته و دارای ۲۸ اگزون است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که تحریک آپوپتوزیس در اووسیت و سلول‌های کومولوس مرتبط با آن ارتباط معنی‌داری با کاهش نرخ باروری دارد (۲۱،۱۶،۱۱).

آدامز و همکاران (۲) با مطالعه هاپلوتا‌پ شماره یک گاو هلشتاین (HH1) با روش تجزیه و تحلیل کامل ژنی با استفاده از داده‌های توالی‌یابی کل ژنوم نشان دادند که بروز یک جهش فقدان عملکرد در اگزون ۱۱ ژن APAF1 باعث کاهش کارایی تولید مثل در گاو هلشتاین می‌شود. بررسی‌های بیشتر نشان داد که این جهش یک جهش بد معنی بوده و باعث تبدیل کدن اسید آمینه گلوتامین به یک کدن خاتمه می‌شود (p.Q579X). به‌طوری که بروز این جهش باعث کوتاه‌شدن ۵۳٪ درصد (۶۷۰ اسید آمینه) از پروتئین کدشونده APAF1 خواهد شد (شکل ۲-۳). حذف این قطعه از پروتئین مورد نظر سبب حذف دامین عملکردی WD40 می‌شود. این دامین در کنش متقابل پروتئین-پروتئین نقش حیاتی ایفا می‌کند (۱).

بیان ژن APAF1 در تکامل موش بین روزهای ۷ و ۹ در چندین بافت حیاتی شروع می‌شود و برای تکامل و رشد سیستم عصبی مرکزی حیاتی است. به‌طوری که ناک اوت هموزایگوس برای APAF1 در موش منجر به مرگ رویان در روز ۱۶/۵ یا زودتر شد (۱۷). پیپتید کوتاه‌شده APAF1 در گاوهای هموزایگوت احتمالاً از نظر عملکردی شبیه موش‌های ناک اوت برای این ژن عمل می‌کند. این اطلاعات این ایده را حمایت می‌کند که جهش بدمعنی p.Q579X یک جهش سببی برای از دست‌رفتن رویان و سقط جنین می‌باشد. به‌طوری که آدامز و همکاران (۲) این جهش را یک جهش موثر بر مرگ جنین گاو در ارتباط با HH1 معرفی کردند. از طرف دیگر، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی برای اصلاح نژادی و از همه مهمتر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد (۲۶). روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به‌حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به‌دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به‌دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آنها را رد کند (۳). به‌علاوه، استفاده از ژنتیک مولکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی‌دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (۳۶) همچنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به‌طور مهبجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (۲۶). همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (۲۵،۳۷). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (۱۹،۴۳). بنابراین، هدف از پژوهش حاضر شناسایی جهش فقدان عملکرد p.Q579X در ژن APAF1 با روش‌های PCR-SSCP و توالی‌یابی بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های خون، استخراج و تعیین کیفیت DNA
 تعداد ۲۰۰ نمونه خون تهیه و استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت یکتا تجهیز آزما و طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. برای تعیین کیفیت DNA استخراج‌شده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها

برای تکثیر قطعه مورد نظر که حاوی جهش فقدان عملکرد در گاو باشد، یک جفت آغازگر اختصاصی (جدول ۱) برای تکثیر قطعه‌ای با طول ۴۵۶ جفت باز از اگزون ۱۱ ژن APAF1 (شماره دسترسی AC_000162.1) با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

Table 1. Sequence of primers used in the present study

Gene	Sequence (5'...3')	Length (bp)	Position
APAF1	F-TGACAAGATCACAGAAACAG R-AAGCACCTATTTCAATGGAC	456	Exon 11

محصول PCR را با ۵ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم زایلن سیانول و برم فنول آبی مخلوط کرده، محلول حاصل را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها به سرعت و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل به یکدیگر ممانعت به عمل آید. مقدار ۵ میکرولیتر از این نمونه‌ها در داخل چاهک‌های ژل عمودی پلی‌اکریل آمید ریخته شده و پس از الکتروفورز برای مشاهده الگوهای باندهای تعیین ژنوتیپ از رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره استفاده شد. برای مشاهده قطعات حاصل از PCR از ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد و از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل VSTA-1002M استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید در پژوهش حاضر از روش نیترا ت نقره استفاده شد.

حجم کل واکنش PCR، ۲۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم از DNA الگو، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس شرکت یکتا تجهیز آزما، ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و ۷ میکرولیتر آب دیونیزه تهیه شد. برنامه حرارتی و دوره‌های زمانی بهینه‌شده در شرایط آزمایشگاه برای تکثیر هر یک از جایگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. محصولات PCR برای جایگاه‌های مورد نظر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و پس از الکتروفورز ژل به مدت ۵ دقیقه برای رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد. در نهایت برای مشاهده باندها، از دستگاه مستندسازی ژل استفاده شد.
 برای شناسایی تنوع آللی و تعیین ژنوتیپ نمونه‌های مورد نظر، پس از تکثیر قطعات توسط آغازگرهای اختصاصی، از روش SSCP استفاده شد. به این ترتیب که ۵ میکرولیتر از

جدول ۲- چرخه های حرارتی PCR برای تکثیر قطعه مورد مطالعه از ژن APAF1

Table 2. PCR thermal cycling to amplify studied fragment from APAF1 gene

Number of cycles	Cycle										Gene
	Final extension		Extension		Annealing		Denaturation		Primary denaturation		
	Time (min)	Temp (°C)	Time (s)	Temp (°C)	Time (s)	Temp (°C)	Time (s)	Temp (°C)	Time (min)	Temp (°C)	
۳۵	۵	۷۲	۳۰	۷۲	۳۰	۵۶	۳۰	۹۵	۵	۹۵	APAF1

تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها و برآورد شاخصه‌های ژنتیک جمعیت

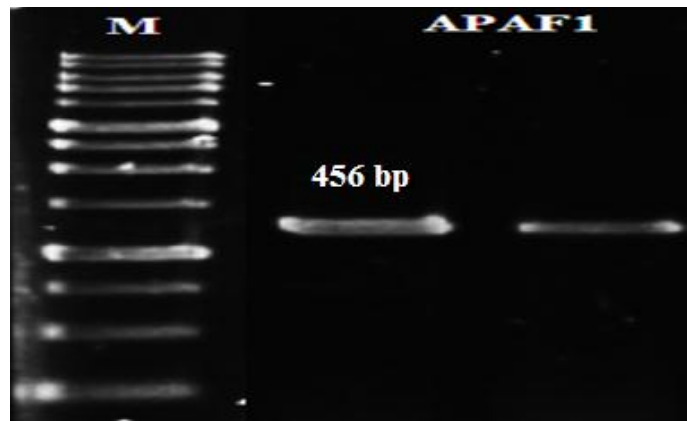
فراوانی‌های ژنوتیپی مورد نظر با شمارش مستقیم باندها از روی ژل پلی‌اکریل آمید و شمارش تعداد افراد متعلق به هر ژنوتیپ در نمونه‌های مورد مطالعه انجام شد. بعد از مرتب‌سازی ژنوتیپ افراد در اکسل، برای برآورد شاخصه‌های ژنتیک جمعیت از نرم‌افزار POPGEN ویرایش ۱/۳۱ استفاده شد. فراوانی آلی، هتروزایگوسیتی مورد انتظار و مشاهده‌شده، تعداد آلل‌های واقعی و موثر در جایگاه‌های مورد مطالعه، شاخص شانون و تعادل هاردی-واینبرگ برآورد شدند. **توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی** بعد از تعیین ژنوتیپ افراد مورد مطالعه برای ژن مورد نظر در پژوهش حاضر، از هر ژنوتیپ دو نمونه برای ارسال جهت توالی‌یابی به‌صورت دوطرفه انتخاب شدند. لازم به‌ذکر است که استخراج DNA از روی ژل آگارز توسط شرکت ژن فناوریان انجام شد. پس از آن که قطعه‌های تکثیری شامل

ژنوتیپ‌های مختلف، تعیین توالی شدند، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در ادامه، هم‌ترازی توالی‌های به‌دست‌آمده و مقایسه آن‌ها با توالی رفرنس از بانک ژنی برای شناسایی جهش‌های فقدان عملکرد مورد نظر با ابزار CLUSTALW Multiple alignment نرم‌افزار (version 7.0.9.0) BioEdit صورت گرفته و نتایج به‌صورت نمودار ارائه شد.

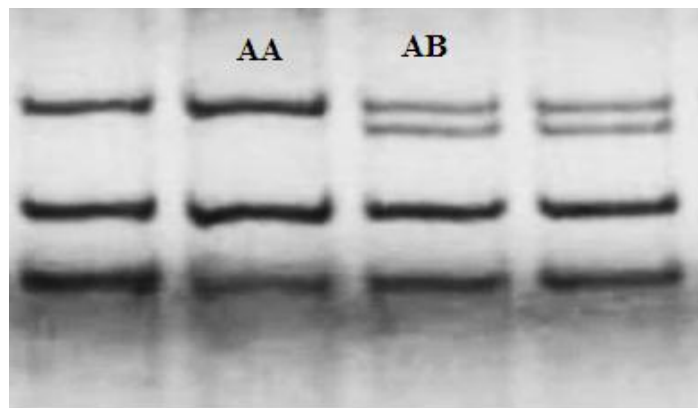
قطعه‌ای با طول ۴۵۶ جفت باز از اگزون شماره ۱۱ ژن APAF1 که حاوی جهش فقدان عملکرد بود توسط جفت آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد (شکل ۱).

تعیین ژنوتیپ در جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه با روش SSCP

برای این نشانگر در گاوهای هلشتاین مورد مطالعه دو ژنوتیپ AA و AB مشاهده شدند. ژنوتیپ BB در این پژوهش مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱- باندهای مربوط به محصول PCR ژن APAF1 در گاو هلشتاین. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی
Figure 1. Bands of PCR products of APAF1 gene in Holstein cattle. M: 100 bp DNA molecular weight marker

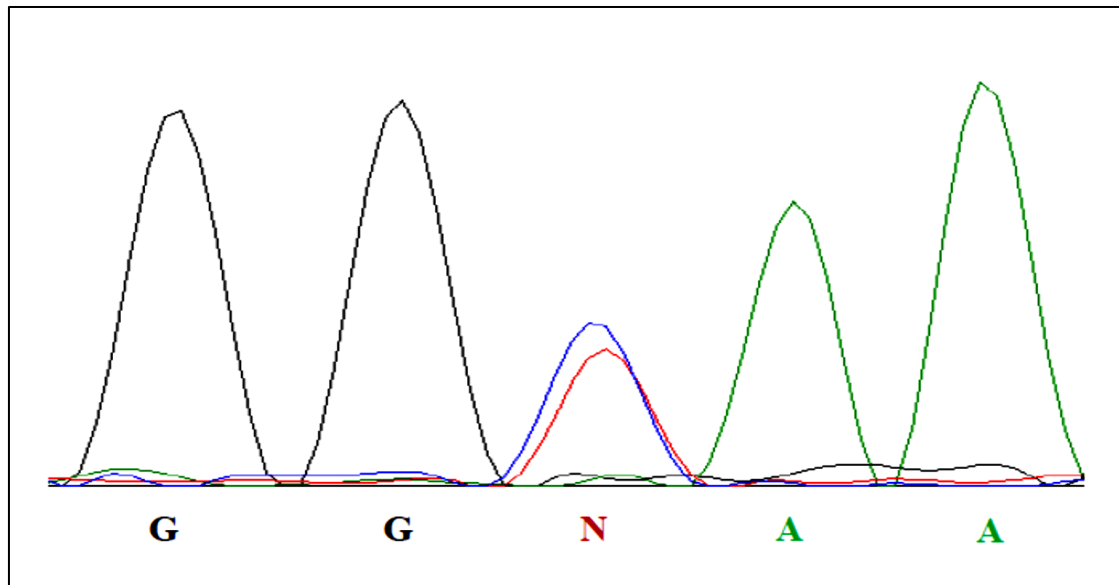


شکل ۲- ژنوتیپ‌های مشاهده شده در جایگاه APAF1 در گاوهای هلشتاین
Figure 2. Observed genotypes in APAF1 locus in Holstein cattle

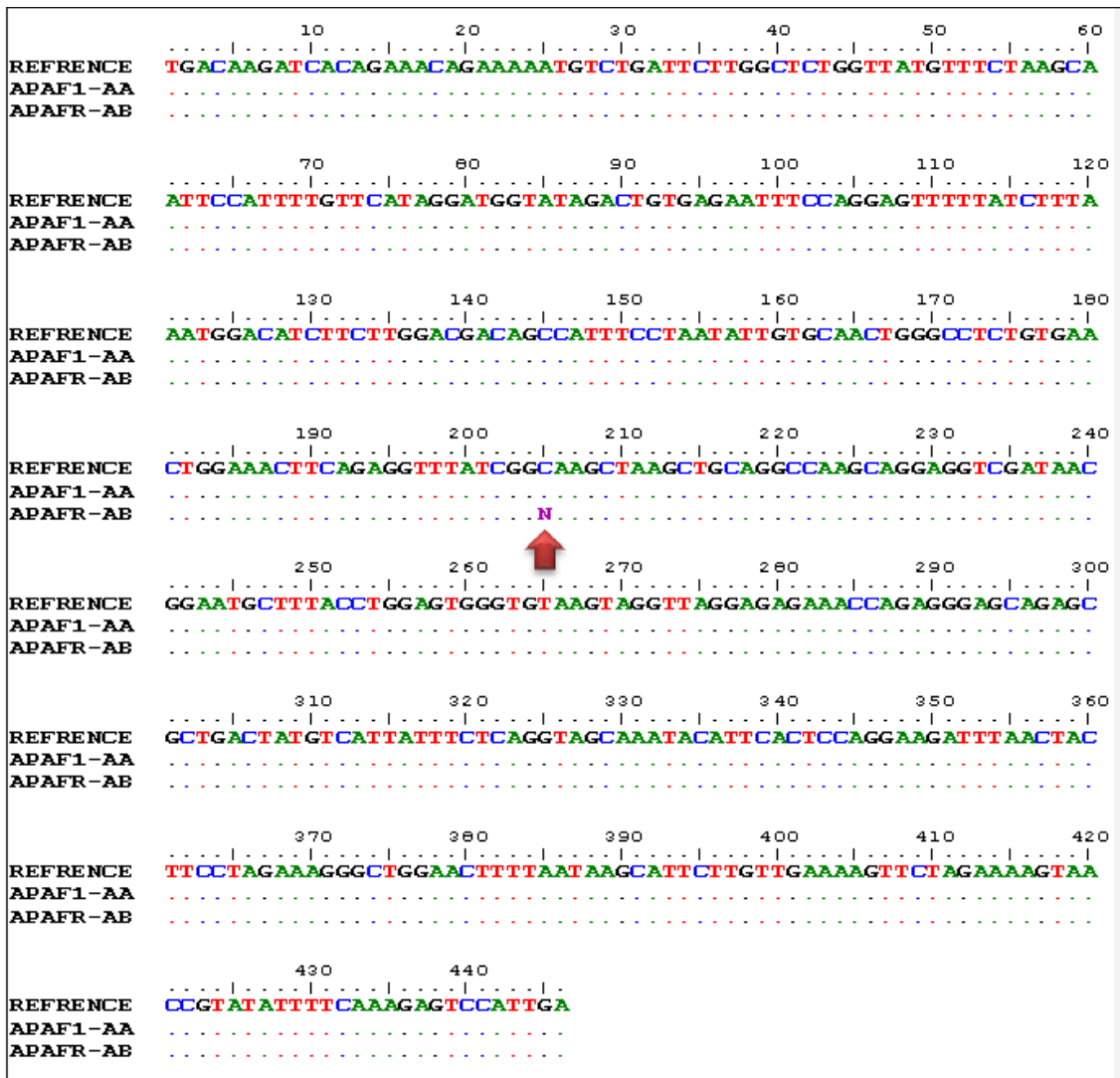
توالی یابی و بررسی بیوانفورماتیک

نظر می‌باشد. به طوری که افراد AB همگی حامل این جهش می‌باشند. در شکل ۵ توالی اسید آمینه‌ای قطعه مورد نظر از پروتئین ژن APAF1 نشان داده شده است. همانگونه که نشان داده شده است در توالی مربوط به ژنوتیپ هتروزایگوت AB یک کدن توقف (XXX, TAA) به جای اسید آمینه گلوتامین (Gln) قرار گرفته است.

جهش p.Q579X در هاپلوتایپ شماره یک گاو و در اگزون شماره ۱۱ ژن APAF1 طبق گردآوری UMD3.1 ژنوم گاو در موقعیت نوکلئوتیدی ۶۳/۱۵۰/۴۰۰ جفت بازی قرار دارد. جایگاه این جهش در قطعه تکثیر شده در پژوهش حاضر در شکل‌های ۳ و ۴ با حرف لاتین N نشان داده شده است. حرف N به معنی هتروزایگوت بودن (C/T) توالی مورد

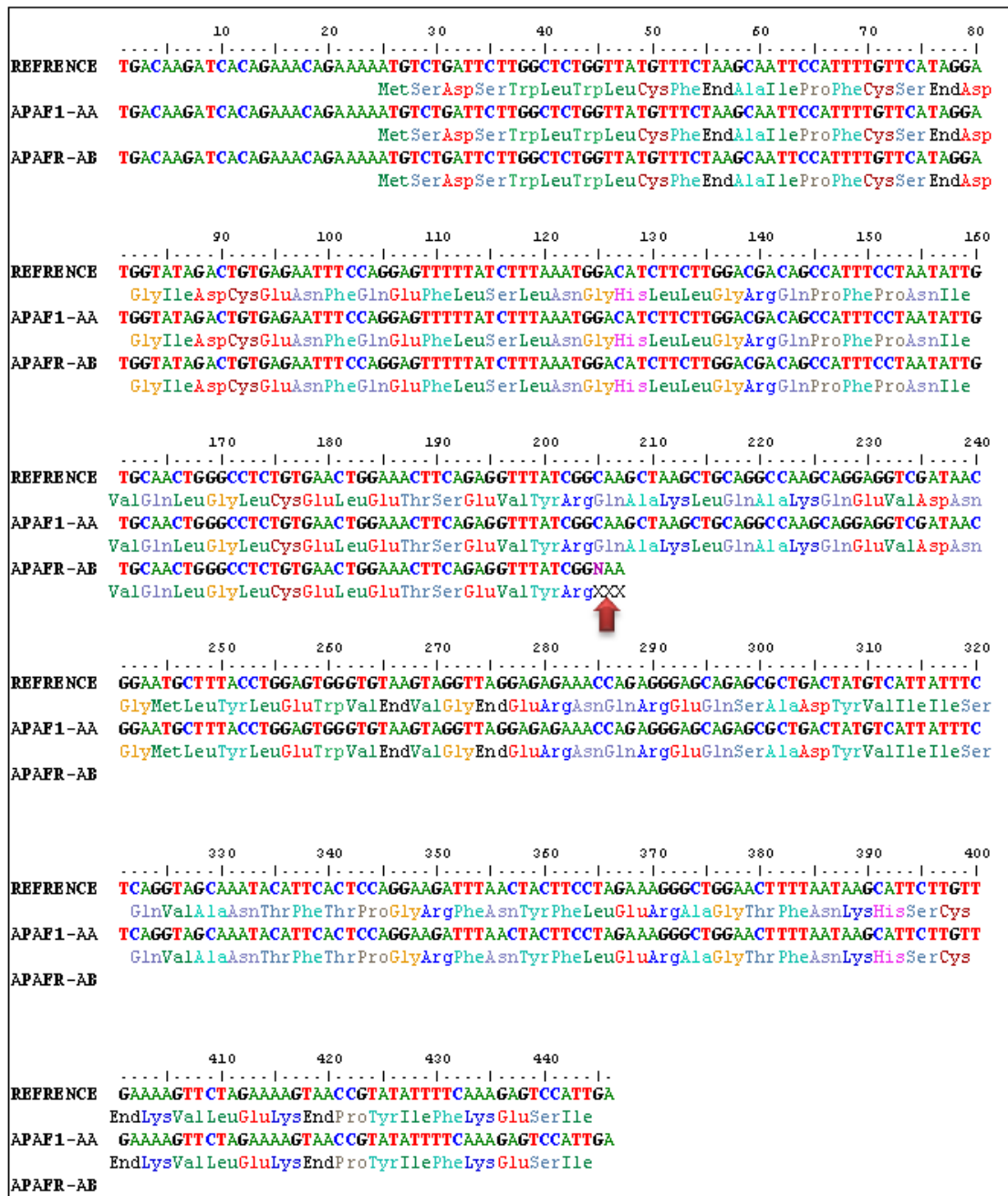


شکل ۳- تفاوت بین دو ژنوتیپ مشاهده شده در جایگاه ژنی APAF1 در گاوهای هلشتاین، N: هتروزایگوت C/T
Figure 3. Difference between two observed genotypes in APAF1 locus in Holstein cattle. N: heterozygous C/T



شکل ۴- هم‌ترازی توالی ژنوتیپ‌های مشاهده شده در ژن APAF1: REFERENCE: توالی قطعه مورد نظر برگرفته از بانک ژنی (AC_000162.1) و APAF1-AA و APAF1-AB: ژنوتیپ‌های مشاهده شده در گاو هلشتاین، N: هتروزایگوت C/T

Figure 4. Alignment of sequence from observed genotypes in APAF1 gene. Reference: sequence of interested fragment from gene bank (AC_000162.1). APAF1-AA and APAF1-AB: observed genotypes in Holstein cattle, N: heterozygous C/T



شکل ۵- توالی ترجمه شده از ژنوتیپ‌های مشاهده شده در ژن APAF1: REFERENCE. توالی قطعه مورد نظر برگرفته از بانک ژنی (AC_000162.1) APAF1-AA و APAF1-AB: ژنوتیپ‌های مشاهده شده در گاو هلشتاین، N: هتروزایگوت C/T، XXX: کدن خاتمه

Figure 5. Translated sequence of observed genotypes in APAF1 gene. Reference: sequence of interested fragment from gene bank (AC_000162.1). APAF1-AA and APAF1-AB: observed genotypes in Holstein cattle, N: heterozygous C/T, XXX: stop codon TAA

تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت

در جدول ۳ شاخصه‌های ژنتیک جمعیت از جمله تعداد آلل موثر، میانگین هتروزایگوسیتی و شاخص شانون برای جایگاه APAF1 در گاو هلشتاین نشان داده شده‌اند.

جدول ۳- شاخصه های ژنتیک جمعیت در جایگاه APAF1 در گاو هلشتاین

Table 3. Population genetic indices in APAF1 locus in Holstein cattle

Shannon index	Mean heterozygosity	*Ne	Allelic frequency (%)		Genotype frequency (%)		
			A	B	AA	AB	BB
۰/۱۴	۶/۲۸	۱/۰۷	۹۶/۷۶	۳/۲۴	۹۳/۵۱	۶/۴۹	۰

*Ne: effective number of allele

نتایج و بحث

برای شناسایی جهش فقدان عملکرد در ژن APAF1 انجام توالی‌یابی و ریزچینش آن با توالی رفرنس ضروری بود. بررسی‌های بیوانفورماتیک روی توالی تکثیر شده از آگزون ۱۱ ژن APAF1 نشان داد که جهش فقدان عملکرد p.Q579X که منجر به نواقص تولید مثلی از جمله سقط جنین در گاو هلشتاین می‌شود، در افراد هتروزایگوت AB در پژوهش حاضر وجود دارد. این جهش یک جهش بد معنی بوده و باعث تبدیل کدن اسید آمینه گلوتامین به یک کدن خاتمه دهنده شده و نهایتاً باعث کوتاه شدن ۵۳/۷ درصد (۶۷۰ اسید آمینه) از پروتئین کد شونده APAF1 می‌شود. حذف این قطعه از پروتئین مورد نظر سبب حذف دامین عملکردی WD40 می‌شود که در کنش متقابل پروتئین-پروتئین نقش حیاتی ایفا می‌کند. نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که بررسی‌های بیوانفورماتیک ابزار مفید و کم‌هزینه‌ای برای شناسایی عوامل تنظیمی از جمله میکرو RNAها و همچنین شناسایی محل دقیق جهش‌های اتفاق افتاده در ژن‌های کاندید می‌باشند (۳۸،۳۳،۲۸،۱۵).

اخیراً جهش p.Q579X در ژن APAF1 به‌عنوان جهشی که باعث ضرر و زیان گسترده در صنعت گاو شیری به‌دلیل سقط جنین می‌شود معرفی شده است (۲). بنابراین توسعه یک روش مولکولی به منظور غربالگری برای این جهش می‌تواند یک روش سریع و موثر در حذف افراد حامل این جهش در گله‌های گاو شیری باشد. در پژوهش حاضر فراوانی افراد حامل این جهش (AB) ۶/۴۹ درصد و فراوانی افراد AA ۹۳/۵۱ درصد برآورد گردید. افراد BB در نمونه‌ها مشاهده نشدند که دلیل آن می‌تواند مرگ این افراد در دوران جنینی باشد.

در توافق با یافته‌های پژوهش حاضر قانم و همکاران (۱۲) وجود جهش p.Q579X را در ۲۴۰ گاو هلشتاین ژاپنی و ۱۵ جنین مومیایی (سقط) شده با روش Allele specific PCR و توالی‌یابی تایید کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که فراوانی افراد حامل این جهش در گاوهای هلشتاین در ژاپن برابر با ۲/۹ درصد و کمتر از فراوانی افراد حامل در جمعیت هلشتاین ایران بود. همچنین آن‌ها نشان دادند که فراوانی جنین‌های مومیایی شده حامل جهش ۳۳/۳ درصد می‌باشد. در پژوهش حاضر دو آلل A و B به‌ترتیب با فراوانی‌های ۹۶/۷۶ و ۳/۲۴ در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران شناسایی شدند. در پژوهش قانم و همکاران (۱۲) فراوانی آلل جهش یافته در گاوها و جنین‌های مومیایی شده به‌ترتیب ۲ و ۱۷ درصد برآورد شد.

ون رادن و همکاران (۴۰) فراوانی هاپلوتایپ HH1 را ۲/۲۵ درصد برآورد نمودند. علاوه بر این، فراوانی افراد حامل این هاپلوتایپ در گاوهای هلشتاین آمریکا بین سال‌های ۱۹۸۰ تا ۱۹۹۰ برابر با ۸ درصد بوده است که سپس تا سال ۲۰۱۰ به ۳ درصد کاهش یافته است. سپس انتخاب مستقیم بر علیه هاپلوتایپ HH1 منجر به کاهش فراوانی حاملین به ۲ درصد در سال ۲۰۱۵ شده است (۲). تست‌های مولکولی انجام شده روی هاپلوتایپ HH1 توسط کمپانی Neogen (4131 N) (48th St, Lincoln, NE 68504, USA) تعداد ۵۲۹۹ فرد حامل (۲/۱ درصد) را در بین ۲۴۶۷۷۳ راس گاو شیرده هلشتاین شناسایی نمود. از میان این تعداد، افراد هموزایگوت مشاهده نشدند. عدم مشاهده افراد هموزایگوت برای هاپلوتایپ HH1 تاییدی بر این فرضیه است که جهش هاپلوتایپ HH1 در گاو کشنده می‌باشد (۲).

وجود هاپلوتایپ مضر HH1 در گاو هلشتاین به یک گاو نر بسیار با ارزش به‌نام Pawnee Farm Arlinda Chief در سال ۱۹۶۲ در گله گاوهای شیری دانشگاه کالیفرنیا به‌دنیا آمده و امروزه حدود ۱۴ درصد از ژنوم جمعیت هلشتاین آمریکا را به‌خود اختصاص داده است. پیش‌بینی شده است که این گاو نر تاکنون مسوول ۵۰۰ هزار سقط جنین خودبخودی در گله‌های هلشتاین در سراسر جهان بوده است (۴۰).

رومانسکووا و همکاران (۳۲) وجود جهش فقدان عملکرد در ژن APAF1 در هاپلوتایپ HH1 گاو هلشتاین روسیه با روش‌های RFLP و Allele specific-PCR مورد مطالعه قرار دادند. نسبت حاملین این جهش‌ها در نرها و ماده‌ها به‌ترتیب برابر با ۰/۰۴ و ۱/۸۳ درصد برای ژن APAF1 برآورد شد که کمتر از مقدار مشاهده شده در گاوهای هلشتاین در ایران است.

در پژوهش حاضر جهش فقدان عملکرد p.Q579X در ژن APAF1 واقع شده در هاپلوتایپ شماره ۱ گاو هلشتاین با روش توالی‌یابی در گاوهای هلشتاین ایران شناسایی شد. از آنجایی که این جهش نقش بسیار مهمی در سقط جنین در گاو دارد، یافته‌های این پژوهش قدم موثری در راستای حذف آلل مضر p.Q579X از جمعیت گاوهای شیری کشور است. بنابراین می‌توان نتایج حاصل شده از این پژوهش را مستقیماً در برنامه‌های اصلاح نژادی گاو هلشتاین در گاوداری‌های صنعتی و حتی کوچک و روستایی در راستای شناسایی حاملین این جهش و حذف آن‌ها از گله به‌کار برد.

منابع

1. Acehan, D., X. Jiang, D.G. Morgan, J.E. Heuser, X. Wang and C.W. Akey. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell*, 9(2): 423-432.
2. Adams, H.A., T.S. Sonstegard, P.M. VanRaden, D.J. Null, C.P. Van Tassell, D.M. Larkin and H.A. Lewin. 2016. Identification of a nonsense mutation in APAF1 that is likely causal for a decrease in reproductive efficiency in Holstein dairy cattle. *Journal of dairy science*, 99(8): 6693-6701.
3. Alinaghizadeh, H., M.R. Mohammad Abadi and S. Zakizadeh. 2010. Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2(1): 69-80 (In Persian).
4. Apweiler, R., A. Bairoch, C.H. Wu, W.C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M.J. Martin, D.A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, L.S. Yeh. 2004. UniProt: The Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 32: D115-D119.
5. Barazandeh, A., M.R. Mohammadabadi, M. Ghaderi and H. Nezamabadipour. 2016. Predicting CpG Islands and their relationship with genomic feature in cattle by hidden markov model algorithm. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6: 571-579.
6. Capitan, A., P. Michot, A. Baur, R. Saintilan, C. Hoze and D. Valour. 2015. Genetic tools to improve reproduction traits in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(1): 14-21.
7. Cochran, S.D., J.B. Cole, D.J. Null and P.J. Hansen. 2013. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BMC Genetics*, 14: 49.
8. Ebrahimi, Z., M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailizadeh, A. Khezri and A. Najmi Noori. 2015a. Association of PIT1 gene with milk fat percentage in Holstein cattle. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5: 575-582.
9. Ebrahimi, Z., M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailizadeh and A. Khezri. 2015b. Association of PIT1 gene and milk protein percentage in Holstein cattle. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 3: 41-49.
10. Elmac, C., S. Sahin and Y. Oner. 2013. Distribution of different alleles of aromatase cytochrome P450 (CYP19) and melatonin receptor 1A (MTRN1A) genes among native Turkish sheep breeds. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19: 929-933.
11. Feng, W.G., H.S. Sui, Z.B. Han, Z.L. Chang, P. Zhou, D.J. Liu, S. Bao and J.H. Tan. 2007. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, 67: 1339-1350.
12. Ghanem, M.E., M. Nishibori, N. Isobe and K. Hisaeda. 2018. Detection of APAF1 mutation in Holstein cows and mummified fetuses in Japanese dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1): 137-142.
13. Ghasemi, M., A. Baghizadeh and M.R.M. Abadi. 2010. Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 5758-5760.
14. Høglund, J.K. 2013. Gene mapping of reproduction traits in dairy cattle. Ph.D. thesis, Swedish university of Agricultural Sciences, Aarhus university, 114 p.
15. Hoseinpour Kol-Mahaleh, M., A. Farhadi, G. Rahimi-Mianji and M. Gholizadeh. 2019. Molecular and bioinformatics analysis of regulatory upstream region of leptin and SIGLEC5 genes in association with production and reproduction traits in Holstein cattle. *Animal Production Research*, 8(3): 73-85 (In Persian).
16. Host, E., A.L. Mikkelsen, S. Lindenberg and S. Smidt-Jensen. 2000. Apoptosis in human cumulus cells in relation to maturation stage and cleavage of the corresponding oocyte. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 79: 936-940.
17. Kharrati Koopaei, H., M.R. Mohammad Abadi, S. Ansari Mahyari, A.R. Tarang, P. Potki, A.K. Esmailizadeh. 2012. Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. *Animal Science Papers and Reports*, 30(3): 231-240.
18. Kharrati Koopaei, H., M.R. Mohammadabadi, S. Ansari Mehryari, A.K. Esmailizadeh, A. Tarang and M. Nikbakhti. 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(2): 185-192 (In Persian).
19. Khodabakhshzadeh, R., M.R. Mohammadabadi, A. Esmailizadeh Koshkoieh, H. Moradi-Shahrehabak, F. Bordbar, S. Ansari Namin. 2016. Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19: 281-289.
20. Leblanc S.J. 2013. Is a high level of milk production compatible with good reproductive performance in dairy cows? *Anim. Frontiers*, 3(4): 84-91.
21. Lee, K.S., B.S. Joo, Y.J. Na, M.S. Yoon, O.H. Choi, W.W. Kim. 2001. Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18: 490-498.

22. Lucy, M.C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*, 84: 1277-1293.
23. McClure, M.C., D. Bickhart, D. Null, P. VanRaden, L. Xu, G. Wiggans, G. Liu, S. Schroeder, J. Glasscock, J. Armstrong, J.B. Cole, C.P. Van Tassell, T.S. Sonstegard. 2014. Bovine exome sequence analysis and targeted SNP genotyping of recessive fertility defects BH1, HH2 and HH3 reveal a putative causative mutation in SMC2 for HH3. *PLoS One*, 9(3): e92769.
24. Mohammad Abadi, M.R. and A. Mohammadi. 2010. Study of beta-lactoglobulin genotypes in native and Holstein cattle of Kerman province. *Journal of Animal Productions*, 12(2): 61-67.
25. Mohammadabadi, M.R., E. Esfandyarpoor and A. Mousapour. 2017. Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. *Journal of Research and Development*, 5: 154-157.
26. Mohammadabadi, M.R. 2017. Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. *Journal of Advances in Agriculture*, 7: 1117-1121.
27. Mohammadi, A., M.R. Mohammadabadi, H. Mirzaei, A. Baghizadeh, O. Dayani, M. Asadi Fozi and V. Bahrampoor. 2009. Study of Kappa Casein gene of local and Holstein dairy cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources*, 16: 125-132 (In Persian).
28. Mohammadi, F., A. Farhadi, G. Rahimi-Mianji and M. Gholizadeh. 2016. Molecular genetics and bioinformatics analysis of EDG1 and AKIRIN2 genes in Iranian fat-tailed and nonfat-tailed sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 144: 263-268.
29. Muller, M., J. Berger, N. Gersdorff, F. Cecconi, R. Herken and F. Quondamatteo. 2005. Localization of Apaf1 gene expression in the early development of the mouse by means of in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Developmental Dynamics*, 234: 215-221.
30. Pasandideh, M., M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailizadeh and A. Tarang. 2015. Association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk production and composition in Holstein cattle. *Czech Journal of Animal science*, 60: 97-104.
31. Rodriguez-Martinez, H., J. Hultgren, R. Båge, A.S. Bergqvist, C. Svensson, C. Bergsten and B. Berglund. 2008. Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice. *IVIS Reviews in veterinary Medicine*.
32. Romanenkova, O.S., V.V. Volkova, O.V. Kostyunina, E.A. Gladyr', E.N. Naryshkina, A.A. Sermyagin and N.A. Zinovieva. 2017. The distribution for LoF mutations in the FANCI, APAF1, SMC2, GART and APOB genes of the Russian Holstein cattle population. *Journal of Animal Science*, 95(4): 83-83.
33. Seyeddokht, A., H. Ahmadi, A.A. Aslaminejad, A. Masoudi-Nejad, M. Nassiri and B. Sadeghi. 2017. Detecting of functional short non-coding RNAs using bioinformatics methods in sheep and goat. *Research on Animal Production*, 8(15): 161-170 (In Persian).
34. Shakeri, R., A. Kheirollahi and J. Davoodi. 2017. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie*, 135: 111-125.
35. Shook, G.E. 2006. Major advances in determining appropriate selection goals. *Journal of Dairy Science*, 89: 1349-1361.
36. Vajed Ebrahimi, M.T., M.R. Mohammad Abadi and A.K. Esmailizadeh. 2016. Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 7: 143-158.
37. Vajed Ebrahimi, M.T., M.R. Mohammad Abadi and A.K. Esmailizadeh. 2017. Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. *Archiv fuer Tierzucht (Arch. Anim. Breed)*, 60: 183-189.
38. Valipour-Koutanaee, O., A. Farhadi, S.H. Hafezian and M. Gholizadeh. 2019. Molecular and bioinformatics analysis of allelic diversity in IGFBP2 gene promoter in indigenous Makuee and Lori-Bakhtiari sheep breeds. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(2): 283-289.
39. VanRaden, P.M., A.H. Sanders, M.E. Tooker, R.H. Miller, H.D. Norman, M.T. Kuhn, G.R. Wiggans, 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*, 87: 2285-2292.
40. VanRaden, P.M., K.M. Olson, D.J. Null and J.L. Hutchison. 2011. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science*, 94: 6153-6161.
41. VanRaden, P., D. Null, J. Hutchison and T. Cooper. 2013. New fertility and stillbirth haplotypes and changes in haplotype status. Changes to evaluation system (August 2013). Council on Dairy Cattle Breeding.
42. Varkoohi, S., S. Khosravi, S. Forotanifar and M.B. Sayadnejad. 2018. Estimation of genetic parameters for some reproductive disorders and Its relationship with production traits in Iranian holstein cows. *Research on Animal Production*, 9(19): 71-75 (In Persian).
43. Zamani, P., M. Akhondi and M.R. Mohammadabadi. 2015. Associations of inter-simple sequence repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Research*, 132: 123-127.

Detection of Lack of Function Mutation of p.Q879X Affecting Abortion in APAF1 Gene in Holstein Cattle

Khazan Enayati¹, Ayoub Farhadi² and Ghodrat Rahimi Mianji³

1- Graduated M.Sc. Student, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2- Associate Professor, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, (Corresponding author: ayoub_farhadi@ymail.com)

3- Professor, Department of Animal Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: 24 June, 2020

Accepted: 3 August, 2020

Abstract

Today, reproductive problems are one of the major concerns in the dairy industry. The aim of this study was to detect the lack of function mutation of p.Q579X affecting spontaneous abortion and reproduction problems in APAF1 gene in Holstein cattle. In total, 200 blood samples were prepared and DNA was extracted with commercial kit. Then a specific pair of primers was designed to amplify a fragment with lengths of 456 bp from the exons 11 of the APAF1 gene and genotyping was performed by PCR-SSCP method. In APAF1 locus two alleles of A and B and two genotypes of AA and AB with frequencies of 96.76, 3.24 and 93.51 and 6.49 were observed, respectively. The BB genotype was not observed in the studied samples. After determining the genotype of the samples, two samples from each genotype were sequenced from both end and alignment of the obtained sequences and their comparison with the reference sequence from the gene bank to detect the mutation was carried out using BioEdit (version 7.0.9.0) software. The results of bioinformatics analysis showed that the lack of function mutation of p.Q579X, which is one of the mutations affecting abortion in Holstein cattle, is present in the AB genotype of APAF1 gene in Holstein cattle in Iran. Given that this mutation causes abortion in cow in homozygous form, the results of this study can be directly used in breeding programs in order to identify the carriers of this mutation and culling them from Holstein dairy herd.

Keywords: Abortion, APAF1 gene, Holstein cattle, Sequencing