التشكل الوراثي لبروتين ناقل الحديد إلى الدم (الترانسفيرين) في الأغنام العرابية .

طالب احمد جايد منتهى يعقوب يوسف بشار فالح زغير جعفر محمد عويد

***قسم الثروة الحيوانية - كلية الزراعة - جامعة البصرة .**

الخلاصة

أجريت الدراسة في محطة أبحاث الهارثة، كلية الزراعة، جامعة البصرة وبعض القطعان التجارية في المحافظة. أخذت نماذج من الدم ودرست ظاهرة التشكل الوراثي لبروتين ناقل الحديد إلى الدم (الترانسفرين) في دم الأغنام العرابية باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي العمودي بوجود مادة متعدد الاكريلآمايد في محلول منظم متغير بوجود صبغة الاميدو السوداء. هذه أول دراسة تجرى على سلالات الأغنام في العراق. تم استخدام 119 حيوانا في هذه الدراسة لدراسة توزيع هذا الجين أي جين بروتين ناقل الحديد إلى الدم (Transferrin) في الأغنام. أشارت النتائج إلى وجود ظاهرة التشكل الوراثي في كل العينات المدروسة وبالتالي تم الكشف عن ثمانية تراكيب وراثية لهذا الجين وهي BM, AM, AB, DD, MM, BB, AA و DM طبقاً لحركاتها في الوسط القاعدي وكان المسؤول عن هذه التراكيب الثمانية 4 أليلات (A، B، D و M). كان هناك اختلافات في تكرار الجين، إذ تفوق كل من الأليل B و M (o.36 و o.31) على التوالي على الأليل A (0.26) بينما كان الأليل D أليلا نادرا (0.07). وكذلك سجلت اختلافات بين الأعداد المتوقعة والملاحظة للتراكيب الوراثية. كان الهدف من الدراسة هو استخدام تقنية الترحيل الكهربائي العمودي بوجود مادة متعدد الاكريلآمايد كطريقة سريعة وكفوءة وقليلة التكاليف لكشف الاختلافات الوراثية لجين الترانسفرين في دم الأغنام العرابية. الذي يمكن استخدامه في تشخيص نسل الأغنام.

المقدمة

تعرف الهجرة الكهربائية بأنها هجرة جزيئات البروتينات المختلفة (خلايا إنسانية، حيوانية و نباتية) في الحقل الكهربائي عند تعرض البروتين لتيار كهربائي معين. تطورت طرق الفصل المستخدمة في مجالات كيمياء البروتين واستخدمت أجهزة ترحيل كهربائي مثل جهاز الترحيل الكهربائي العمودي وتلاها جهاز الترحيل الأفقي ثم أعقبها ابتكار أجهزة ثنائية البعد (Two Dimension Electrophoresis) و جهاز الترحيل الكهربائي بمستويات مختلفة من الأس الهيدروجيني (Iso Electric Focusing-IEF) وتلاه جهاز دقيق جداً يسمى الترحيل الكهربائي الشعيري (Capillary electrophoresis) إلى أن توجت هذه الأجهزة المبتكرة بجهاز البصمة الوراثية (Polymerase Chain Reaction - PCR، إذ استخدمت بعض المركبات الكيماوية مثل مادتي النشا (Starch) و متعدد الاكريلآمايد (Polyacrylamide) والأكاروز (Agarose) لتقوم مقام الوسط الذي يتم فيه فصل المركبات البروتينية اعتمادا على أو زانها الجزيئية. وصار بالإمكان الاستفادة من هذه التقنية في انجاز تشخيص الحامض النووي الوراثي (DNA) عبر تقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز (PCR)، وأعقبها اكتشاف الطرق الخاصة بتثبيت تتابع النيوكليوتيدات المكونة للحامض النووي الوراثي (DNA Sequences).

تاريخ استلام البحث 1 / 3 / 2011 .

تاريخ قبول النشر 27 / 4 / 2011 .

استخدمت بروتينات الدم بشكل واسع لتوصيف عشائر سلالات الحيوانات لان معظم هذه البروتينات تتشكل وراثياً وتتبع قوانين الوراثة البسيطة لذلك درست هذه البروتينات لعدد من أنواع الحيوانات باستخدام تقنيات مختلفة وكانت معظم هذه الدراسات قيمة وخاصة فيما يتعلق بالوراثة، وراثة العشائر، التشخيص السريري والخرائط الجينية (Balakrishnan و Goswami ، 1991) الترانسفرين هو كلايكوبروتين يرتبط مع ذرتين من الحديديك لكل جزيئة ترانسفرين وهو يعمل كحامل للأوكسجين، وتركيزه في البلازما الطبيعية 240-280 ملغم/100 مل. كذلك هناك عدة مسميات لبروتين الترانسفرين وتعتمد هذه التسميات على أصل وجود البروتين مثلاً إذا وجد في الدم يسمى الترانسفرين (Evan وآخرون، 1956). في حين يسمى أوفوترانسفرين (Ovotransferrin-OTF) في الطيور ويشكل هذا البروتين حوالي 12% في بروتين بياض البيض (Williams، 1968) وفي الحليب يسمى لاكتوفيرين (Lactoferrin-LTF) وله دور كبير في نقل أيونات الحديد (Baker وآخرون ، 1987). ويسمى ميلانو ترانسفرين Melanotrans ferrin-MTF في أنسجة الإنسان (Richardson، 2000).

كان Smithies و Salisbury (1959) أول من اكتشفا التراكيب الوراثية المختلفة لبروتين الترانسفرين في الأغنام باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) يتميز هذا البروتين باحتوائه على مجموعة كبيرة من الاليلات بدأت بدراسة Roberts وآخرين (1980) إذ وجدوا أليلين فقط وهما D و E مرورا بدراسة Weimer وآخرين (1984) (أربع وخمس أليلات في أغنام الرومني مارش والكورديل على التوالي)، دراسة Steppa وآخرين (2007) (ستة أليلات في المرينو البولندي) وأخيرا وفي دراسة Ashton (1958) وجد تسعة أليلات في الأغنام. ونتيجة إلى هذا التنوع الحيوي الكبير في اليلاته، انتهز كثير من الباحثين هذه الميزة وبدؤوا يدرسون علاقة هذه الاليلات مع بعض الصفات الاقتصادية في الأغنام ومنها الوزن عند الميلاد والزيادة الوزنية (Rahman و Konuk، 1977؛ Bildik و Yur، 1999؛ Dellal، 2002)، إنتاج الصوف (Dellal، 2001)، إنتاج الحليب في الماعز (Yuce و Bilgen، 2004)، الأداء التناسلي (Weimer وآخرون ، 1984؛ Steppa وآخرون ، 2007). هذه المجموعة الكبيرة من الأبحاث والدراسات على الترانسفرين، دفعت كثيرا من الدول وخاصة دول الجوار العراقي بالسعي الحثيث في كشف بعض مزايا هذا البروتين ومن هذه الدول إيران (Lay وآخرون ، 1971؛ Shahrbabak وآخرون ، 2010) وتركيا (Bagci وآخرون ، 1993؛ Elmaci ، 1998؛ Dellal، 2002؛ Kargin وآخرون ، 2003؛ Mert، 2003). اما في العراق، فتكاد تكون الدراسات معدومة في هذا المجال ولذلك قررنا الدخول في هذا الموضوع المهم والحيوي.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على 119 نموذج من دم الأغنام العرابية (10مل لكل نموذج) من الوريد الوداجي Jugular vein. وضعت نماذج الدم في أنابيب خالية من مادة الـ (EDTA) والخاصة بتحديد التراكيب الوراثية للترانسفرين. اجري الترحيل الكهربائي باستخدام طريقة PAGE حسب AOAC مع إجراء بعض التحويرات عليها باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي العمودي Vertical Electrophoresis المجهز من قبل شركة Cleaver scientific البريطانية. حضرت محاليل هلام الفصل (Separation gel) و هلام التركيز (Staking gel) لغرض فصل بروتينات الدم وكما هو موضح في الجدول 1.

تحليل عينات الترحيل الكهربائي

تم تحليل عينات الترحيل الكهربائي بجهاز توثيق البيانات Gel Documentation المصنع من شركة Cleaver Scientific Ltd البريطانية سنة 2009 ومزود ببرنامج تطبيقي (Software) من جامعة كامبردج البريطانية.

جدول1.نظام الترحيل الكهربائي لترانسفرين دم الأغنام العرابي (الأس الهيدروجيني 8.9).

هلام الانفصال			هلام التركيز		
رقم المحلول	كمية المحلول / 100 مل	كمية المحلول في الخليط	رقم المحلول	كمية المحلول / 100 مل	كمية المحلول في الخليط	كمية المحلول/ 1000 مل
1	حامض الهيدروكلوريك 48.0 مل ترس 36.6 غم تيميد 0.5 مل	جزء واحد	4	الفوسفات المائية (25.6 مل) ترس 5.7 غم) تيميد 1.0 مل	جزء واحد	ترس 6.0 غم)
2	أكريلأمايد 30.0 غم مثيلين بز أكريلأمايد 1.0 غم	جزأين	5	أكريلأمايد 15.0 غم مثيلين بز أكريلأمايد 2.5 غم	جزأين	كلايسين 28.8 غرام
3	بير سلفات الأمونيوم 0.28 غم يوريا 9 مولاري	أربعة أجزاء	6	رايبوفلافين 4.0 ملغم سكروز 40.0 غم	جزء واحد أربعة أجزاء	
			7			

التحليل الإحصائي: لحساب التراكيب الوراثية، استخدمت طريقة العد المباشر. ولحساب تكرار الجين استخدمت المعادلة التالية:

$$q = \frac{2(x1x1) + (x1x2) + (x1x3).....(x1xn)}{2N}$$

حيث يمثل q تكرار الاليل الأول.

x1x1= عدد التراكيب الوراثية المتماثلة للاليل الأول.

2x1x و 3x1x و x1xn= عدد التراكيب الوراثية غير المتماثلة للاليل الأول.

N= العدد الكلي للحيوانات قيد الدراسة.

لبيان اتزان العشيرة استخدمت المعادلة التالية:

$$\chi 2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

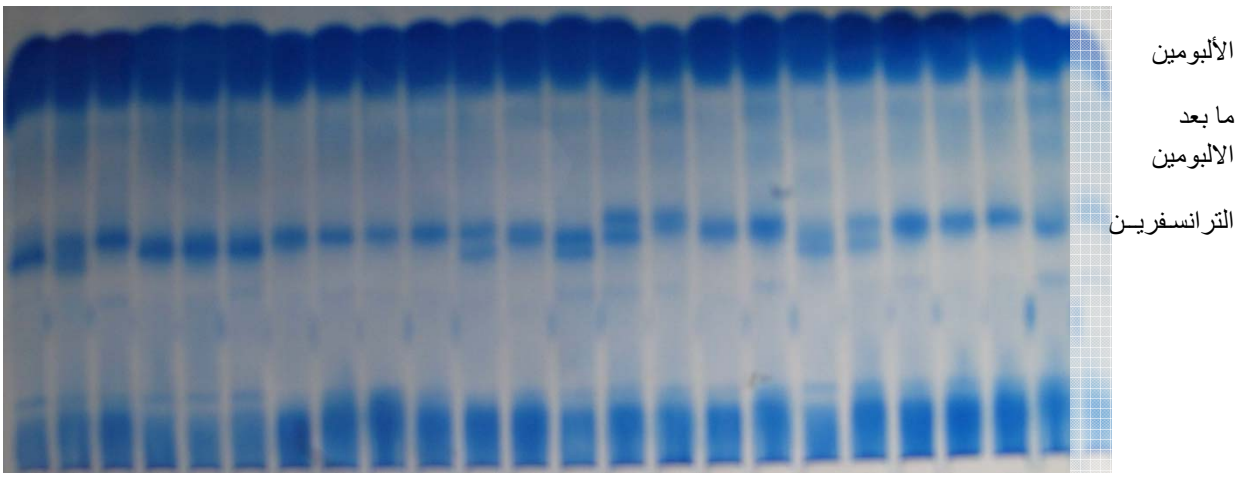
حيث تمثل O عدد البيانات الملاحظة بينما تمثل E عدد البيانات المتوقعة.

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج الدراسة وجود ظاهرة التشكل الوراثي لبروتين ناقل الحديد إلى الدم (الترانسفرين) بشكل جلي من خلال وجود أكثر من تركيب وراثي وكما موضح في الجدول رقم 2. وهذه النتيجة متفقة مع كثير من البحوث الذين أشاروا إلى وجود التشكل الوراثي لهذا الجين في كثير من حيوانات المزرعة وحتى الإنسان فقد وجدت ظاهرة التشكل الوراثي في الأبقار (Smithies و Salisbury، 1959) وفي

الجاموس (Tan وآخرون ، 1980) وفي الماعز(Elmaci، 1998) وفي الإنسان (Smithies و Hiller، 1959) وكثير من الحيوانات المختبرية مثل الأرانب (Zaragoza وآخرون ، 1990). فهذا البروتين ينفرد بصورة واضحة عن غيره بوجود مجموعة كبيرة من الاليلات وفرتها له القابلية الوراثية في إحداث الطفرة وبالتالي امتلاكه لهذا القدر الكبير من الاليلات، فتشير البحوث إلى وجود 9 أليلات لهذا الجين (Ashton، 1958) وبالتالي نتوقع وجود 45 تركيب وراثي.

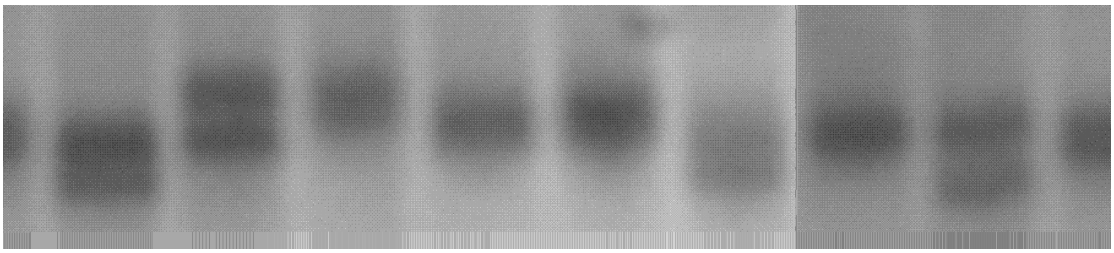
تعطي الإشكال رقم 1-3 صور توضيحية حول أهم بروتينات المصل في دم الأغنام، فنلاحظ من الأعلى وجود بروتين الألبومين والذي يعتبر البروتين الأكبر من حيث الكمية في دم الأغنام ويلاحظ في بعض العينات وجود تشكل وراثي بسيط إلا انه لا يرتقي إلى المثالية لكون طريقة العمل مخصصة لجين الترانسفرين. يلي بروتين الألبومين بروتين الترانسفرين والذي يكون في الوسط انسجاماً مع محتواه من الأحماض الامينية المتعادلة وفيه نلاحظ وجود أكثر من تركيب وراثي اعتماداً على وجود حزمة واحدة أو حزمتين لكل عينة وكذلك توزيع هذه الحزم إذ كانت مرتفعة أو منخفضة في وسط الهلام وهكذا، إذ أشارت البحوث إلى وجود التركيب الوراثي الهجين من خلال وجود حزمتين ووجود تركيب وراثي متماثل من خلال وجود حزمة واحدة (Ashton، 1958). نتائج دراستنا تتفق مع **كثير من الدراسات** في هذا الاتجاه، إذ تم إيجاد كثير من التراكيب الوراثية المتماثلة -حزمة واحدة وتراكيب وراثية غير متماثلة – حزمتين (Roberts وآخرون ، 1980؛ Weimer وآخرون ، 1984؛ Steppa وآخرون ، 2007).



شكل 1. نواتج التحلل البروتيني على هلام الفصل (متعدد الاكريلآمايد) بطريقة الهجرة الكهربائية لبروتين الترانسفرين في دم الأغنام العرابية .

تم الكشف عن ثمانية تراكيب وراثية لهذا البروتين وهي BM, AM, AB, DD, MM BB, AA و DM طبقاً لحركتها الكهربائية في الوسط القاعدي، مسؤول عن هذه التراكيب الوراثية الثمانية 4 أليلات (A، B، D و M) تتبع في توارثها السيادة المشتركة (Co dominants) وحسب قوانين مندل في الوراثة (Jaayid، 2003). كان عدد التراكيب الوراثية المتماثلة أربعة (AA، BB، DD و MM) كما كانت أعداد التراكيب الوراثية غير المتماثلة أربعة (AB، AM، BM و DM) (الجدول 2). حيث يبين الجدول زيادة أعداد التراكيب الوراثية غير المتماثلة (68.07%) مقارنة بأعداد التراكيب الوراثية المتماثلة (31.93%) وهذه النتيجة تؤكد غياب الانتخاب والتزاوج المسيطر عليه وبالتالي وجود نسبة التراكيب الوراثية المتماثلة بنسب قليلة. تتفق نتائج دراستنا مع كثير من الدراسات حيث وجدت هذه الاليلات في الأغنام التركية (Soysal وآخرون ، 1986؛ Bagci وآخرون ؛ 1993) وفي كثير من سلالات الأغنام الأوربية (Ashton، 1958). تفوق كل من الأليل B و M (o.36 و o.31) على التوالي على الاليل A (0.26) بينما كان الأليل D أليلا نادرا (0.07). تتفق هذه النتيجة مع Soysal وجماعته

(1986)، إذ حصلوا على نتائج متقاربة على الأغنام التركية وهذا دليل على التقارب الوراثي بين الأغنام العراقية والتركية .

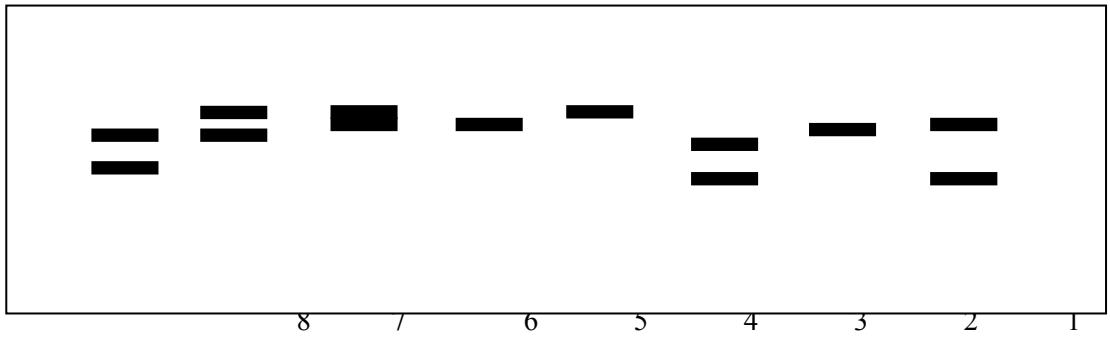


8 7 6 5 4 3 2 1

شكل 2. بروتين الترانسفرين على هلام الفصل (متعدد الاكريلآمايد) بطريقة الهجرة الكهربائية في دم الأغنام العرابية .

جدول 2. توزيع التراكيب الوراثية لبروتين الترانسفرين في الأغنام العرابية .

البروتين	التركيب الوراثي	عدد الحيوانات=119			X^2	تكرار الأليلات			
		الحقيقي	%	المتوقع		A	B	D	M
الترانسفرين	AA	9	7.56	8.34					
	BB	19	15.97	8.34					
	DD	1	0.84	15.18		0.26	0.36	0.07	0.31
	MM	9	7.56	0.54					
	AB	25	21.01	11.50					
	AM	20	16.81	22.50					
	BM	22							
	DM	14	11.76	26.43					
			18.49	19.59	1.87				



شكل 3. بعض التراكيب الوراثية لجين الترانسفرين على هلام الفصل (متعدد الاكريلآمايد) بطريقة الهجرة الكهربائية في دم الأغنام العرابية .

الاستنتاج: من خلال ما تقدم يمكن الاستنتاج بان جين ترانسفرين الأغنام العرابية قد تشكل وراثيا أسوة ببقية الأغنام العالمية وتفوق على أكثر من سلالة في عدد التراكيب الوراثية على بعض سلالات الأغنام العالمية وبالتالي يمكن الاستفادة من هذه الفسيفسائية الكبيرة في عدد الاليلات في عمليات الانتخاب والتحسين للحيوانات المحلية ومحاولة فك رموز أسباب التشابه والاختلاف بين حيواناتنا المحلية نفسها وبينها وبين الحيوانات الأجنبية وخاصة القريبة من الرقعة الجغرافية للقطر العراقي.

المصادر

Ashton, G.C. 1958 . Further G-globulin phenotypes in sheep. Nature, *Lond.* 182, 1101-1102.

Bagcı, C., Sulu, N. and B. Emre . 1993. The types of haemoglobin and transferrin in Akkaraman X German Black Headed Mutton crosses. A. U. Vet. Fak. Derg., 40: 535-512.

Baker, E.N., S.V. Rumball and B.F. Anderson .1987. Transferrin in sighs into structure and function from studies lactoferrin. Trends Biochem. Sci., 12: 350-353.

Balakrishnan, C.R. and S. L. Goswami. 1991. Biochemical polymorphism in river buffalo in: Tulloh, N.M(Ed), Buffalo and Goats in Asia, genetic diversity and its application proceeding of a warkshop, Kualo lumepur, Malaysia, 10-14 February. Aciarl proceedings No.

Bildik, A. and F. Yur . 1999. Investigation of Relationship Between Transferrin and Birth Weight and Live Weight Gain in Lambs. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 23: 43-48.

Dellal, G. 2001. The Relationships Between Transferrin (Tf) Types and Some Wool Characteristics in Akkaraman and Anatolian Merino Ewes. Turk J. Vet. Anim. Sci., 25: 135-138.

Dellal., G. 2002. Effects of Environmental and Hereditary Factors on Lamb Production Traits in White Karaman and Anatolian Merino Ewes. Turk J. Vet. Anim. Sci., 26: 581-586.

Elmaci, C. 1998. Transferrin (Beta-Globulin) Polymorphism in Angora Goat. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 22: 321–323.

Evan, J.V., J.W. King , H. Harris F.L. and Warren . 1956. Genetic of hemoglobin and blood potassium differences in sheep. Nature. 178: 849-850.

Jaayid, T.A. 2003. The study of the milk proteins and its influence on the lambs in Precos and Romanov ovine breeds. PhD. Thesis. Kazan State Academy of Veterinary Medicine, Russia.

Kargin, F., A. Bulduk and K. Seyrek . 2003. Haemoglobin and Transferrin Types in Ine Type Sheep, Turk J Vet Anim Sci., 27 1451-1455

Lay, D.M., F. Charles and Z. Nadler.1971. The transferrins and hemoglobins of wild Iranian sheep (ovis linnaeus). comp. biochem. physiol., vol. 40b, pp. 521 – 529.

Mert, N. 2003. Correlation between Biochemical Parameters and Production Traits in Merino Cross Sheep. II- Hemoglobin and Transferrin Types. Turk J Vet Anim Sci., 27: 575-581.

Rahman, M.F. and T. Konuk . 1977. A note on transferrin genotypes and their relationship with weight gain in sheep. Animal Production. 25: 99-101.

Richardson, D.R. 2000. The role of the mcnibrane-douno luniour antigen melanotransferrin (p97) in iron uptake by the human maligna melanoma cell. Eur. J. Biouchem., 267:1290-1298.

Roberts, P.R., D.J. Nash and R.E. Keiss . 1980. Transferrin polymorphism in bighorn sheep, Ovis canadensis, in Colorado. Western North American Naturalist. 2.

Shahrbabak, H., A. H. Farahani , M. Shahrbabak and H. Yeganeh . 2010. Genetic variations between indigenous fat-tailed sheep populations African Journal of Biotechnology. 9: 5993-5996.

Smithies, D.C. and H. Hiller . 1959 The genetic control of transferrins in humans Biochem. J., 72:121-125.

Smithies, D.C. and G.W. Salisbury . 1959. Distribution and inherited variations in the serum proteins of cattle. Genetics. 43: 374-385.

Soysal, M.I., K. Tanaka and S. Suzuk . 1986. Hemoglobin and transferring polymorphisms in some Turkish Native Sheep and their several crosses. Proc. Japan Acad., 62: 10.

Steppa, R., P. Losarz , A. Strojna and M. Stanisz .2007. Transferrin genotypes as genetic markers of lifetime prolificacy of ewes in a flock of prolific sheep. ANNALES Universities Mariae curie – Skłodowskalublin Polonia. 25: 55-62.

Tan, S.K. , S.G. Tan , Y.Y. Gan, and M.R. Jainudeen . 1980. Biochemical Polymorphisms in the Malaysian Water Buffaloes. Pertanika, 3: 103-112.

Weimer, T.A., M. Helena , P. Franco and C.F. Moraes. 1984. Hemoglobin and transferrin types in Corriedale and Romney-Marsh sheep in Brazil. Rev. Brazil Genet. 2: 287-297.

Williams, J. 1968. Comparison of glycopeptides from the ovotransferrin and serum transferrin of the hen. Biochem. J., 108: 57-67.

Yuce, H. and G. Bilgen . 2004. Relationships between blood proteins polymorphism and some milk yield traits in Bornova goats. Hayvansal Uretim 45: 28-32.

Zaragoza, P., A. Arana , C. Rodellar , I. Zarazaga and B. Amorena .1990. Blood biochemical polymorphisms in rabbits II. Genetic variation and distance among populations of Spanish wild rabbits and relationships with other rabbit populations. Options Mediterranean's – Series Seminaries. 8: 53-56.

GENETIC POLYMORPHISM OF TRANSFERRIN IN ARABI SHEEP BREED .

T.A. Jaayid M.Y. Yousief B.F. Zaqeer J.M. Owaid

*** Animal Production Department - College of Agriculture - Basrah University.**

ABSTRACT

This study was carried out at the Animal Farm, Hartha Research Station, College of Agriculture, Basrah University and several farms in Basrah Provence. Polymorphism of transferrin biochemical system was examined in the blood of Arabi sheep breed using vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in discontinuous buffer system and staining (Amido Black). This is the first study on transferrin on sheep breeds in Iraq. Totally 119 blood samples were analyzed. Transferrin loci were found to be polymorphic among all analyzed samples. Eight transferrin variants have been found in Arabi sheep breed sera which are designated AA, BB, DD, MM, AB, AM, BM and DM in order of decreasing mobility caused by four alleles of that locus (A, B, D and M). Sheep populations were studied which differed in gene frequencies. The superiority of allele B and M (o.36 and o.31), respectively on the allele A (0.26) while the D allele was rare allele (0.07). Differences between expected and observed number of transferrin genotypes were significant. The aim of this study was to use the PAGE as a fast, efficient and low cost method to detect the genetic variants of transferrin gene in Arabi sheep breed. The polymorphism of sheep transferrins can be used for the identification of offspring.