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 العرابية

نور ماجد عواد[أ]، اسعد يحيى عايد[ب]
[أ] قسم تقنيات المختبرات الطبية، كلية الكنوز الجامعة، البصرة، العراق
[ب] قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة البصرة، العراق

noor.m.a@kunoozu.edu.iq

الخلاصة

ينتج ويفرز 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. أجري العمل المختبري في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم الثروة الحيوانية في كلية الزراعة في جامعة البصرة. تم شراء 15 حملا" ذكريا" من محافظة ميسان. كذلك جمعت 54 من عينات الدم عشوائياً من الأغنام العرابية التابعة للحقل الحيواني في كلية الزراعة وإكملت عدد عينات الدم من مجزرة البصرة لتصبح 109عينة، للكشف عن التشكل الوراثي لجين اللبتين بتقنية التفاعل السلسلي للبوليمريز- تشكل الخيط المفرد الموافق للحامض النووي. اذ وجد تشكل وراثي لجين اللبتين في الأغنام العرابية وظهور تركيبين وراثيين هما AA وAB 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

إكتشف هرمون اللبتين في عام 1953 ومستقبله في عام 1966 أما جينه فقد إكتشف 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 لـ21 حامض أميني, إذ تفصل أو تزال الحوامض الأمينية الواحدة والعشرين الأولى من سلسلة هرمون اللبتين الجزيئية ويطلق أو

*المؤلف الرئيسي Tel.: +9647712436019
البريد الالكتروني: noor.m.a@kunoozu.edu.iq
asaad.yheia@gmail.com

مراجعة الأقران تحت مسؤولية KSJ © 2021 كلية الكنوز الجامعة - مجلة الكنوز العلمية.
استضافته مجلة الكنوز العلمية. كل الحقوق محفوظة .

يتوزع هرمون اللبتين الناضج إلى الدم متكونا" 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 دورا" هاما" 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 دورا" مضادا" 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 أخر من دهون الجسم، فأن الأشخاص البدناء معرضون لمثل هذه المضاعفات، وفي دراسة حديثة إتضح إن له دورا" هاما" في خفض معدل السكر في الدم، ولهذا السبب قد يكون البديل المناسب للأنسولين لمرضى السكري من الدرجة الأولى [5] (Karthikeyan, 2006).

2- طرق العمل

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

3- التحليل الإحصائي

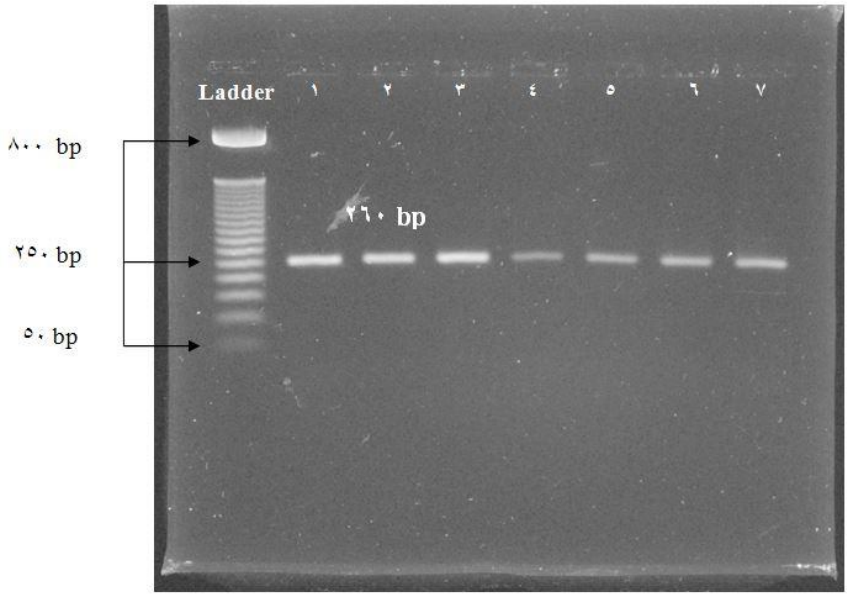
إستخدم البرنامج pop gene [7] لتقدير إحصاءات F-statistics F والتنوع الجيني ودليل الثبات ومتوسط الخلط المتوقع والمشاهد في المجاميع المختلفة (الحقل، المجزرة، ميسان) لسلالة أغنام العرابي.

4- **النتائج Results**

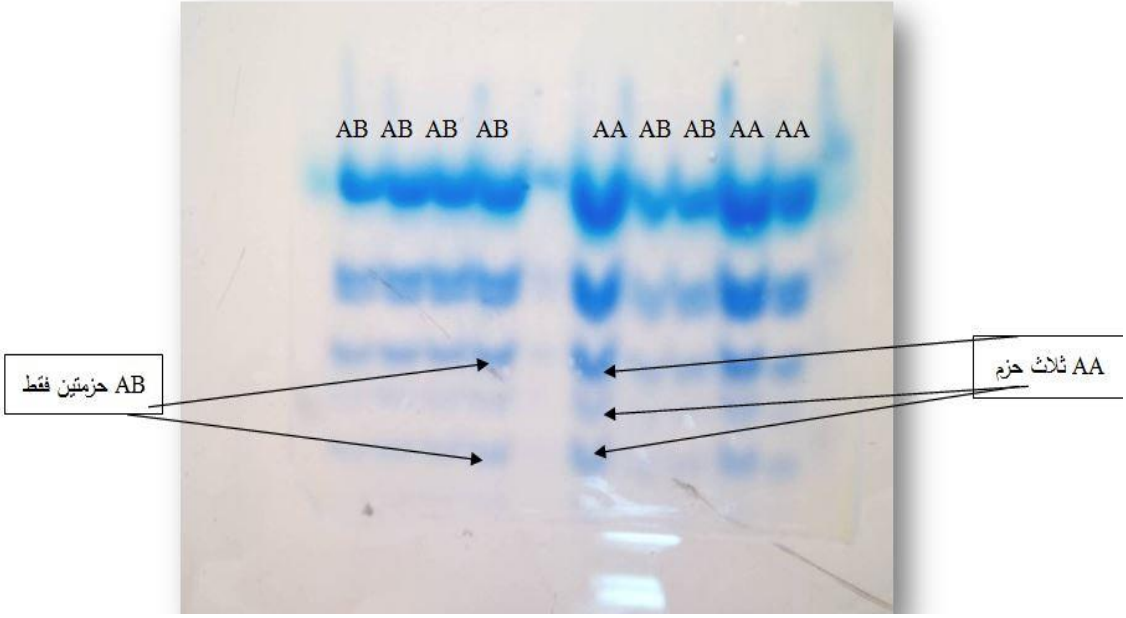
4-1- منتج التضخيم

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 لبادئ جين اللبتين على هلام الأكاروز



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

التشكل الوراثي بإستخدام تقنية PCR – SSCP

إستخدمت 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 بادئ 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 وB لكل المجاميع إذ ظهر من خلال البحث تشكل وراثي لبادئ جين اللبتين المستخدم في الدراسة للأغنام العرابية وكان هناك تركيبين وراثيين هما (AA,AB) مسؤول عنهما أليلين هما A وB. بلغ تكرار الأليل A 0,65 و0,61 و 0,67 بينما تكرار الأليل B 0,35 و0,39 و 0,33 لمجموعة المجزرة والحقل الحيواني وميسان على التوالي، ويتضح منه إن أعلى تكرار للأليل A هو0,67 وجد في مجموعة ميسان، أما أعلى تكرار للأليل B فهو 0,39 وجد في مجموعة الحقل الحيواني. بلغ تكرار التراكيب الوراثية AA وAB لبادئ جين اللبتين 0,76 و0,33 على التوالي لمجموعة المجزرة ولم يظهر التركيب الوراثي BB (تكراره يساوي صفرا") أما مجموعة الحقل الحيواني فكانت تكرار التراكيب الوراثية 0,22 و 0,77 على التوالي ومجموعة ميسان 0,33 و0,66 على التوالي.

أما دليل ثبات الفرد في المجاميع داخل العشيرة Fis للأليلين A وB 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 العرابية وقد كان منتج التضخيم بحجم 260 زوجا" قاعديا" 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

إستخدمت 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 العرابية متمثل بالتركيب الوراثي السائد AA متكون من ثلاثة حزم والتركيب الوراثي الخليط AB متكونٌ 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.

التباين الوراثي

تكرار الأليلات وتكرار التراكيب الوراثية لمجاميع الدراسة

توضح النتائج تكرار الأليلات A وB لكل المجاميع إذ ظهر من خلال الدراسة تشكل وراثي لجين اللبتين المستخدم في الدراسة للأغنام العرابية 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 إنخفاض أعداد هذه المجموعة أما أعلى تكرار للأليل B فقد وجد في مجموعة الحقل الحيواني والتفسير المعقول لهذه النتيجة الذي لا يحتاج إلى إحتمال يرجع إلى إرتفاع أعداد هذه المجموعة.

توفر الأليل A وندرة الأليل B قد يعود الى تأقلم الأليل الأول للظروف البيئية التي تعيش بها الأغنام العراقية من إرتفاع في درجات الحرارة لمعظم أشهر السنة وإرتفاع نسبة الرطوبة في فصل الصيف وندرة الأمطار والنقص الحاد بالتغذية أو إعتماد 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 صلاحيتان 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 [9،8] حيث وجدوا تشكلا" وراثيا" لهذا البادئ في سلالات مختلفة من الأغنام وكانت نتائجنا جزئيا" 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 وL1 و L3 كانت56,25 و25 و18,75% على التوالي.

أما دليل ثبات الفرد في المجاميع داخل العشيرة Fis أو التربية الداخلية المتوقعة داخل العشيرة للأليلين A وB لكل المجاميع المجزرة والحقل الحيواني وميسان فهو أقل من الصفر وهذا يدلل 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 فأن التزاوج غير عشوائي. وإن فائدة F-stat هي تقدير التربية الداخلية النسبية نتيجة إختلاف 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 دليلا" للثبات منخفض.

6- الإستنتاجات

وجد تركيبان وراثيان AA و AB لبادئ الأكسون الثاني وجزء من الإنترون الثاني لجين اللبتين في الأغنام العرابية. وبنسبة خلط أليلي لاتقل عن 67%.

شكر وتقدير:

احب ان اشكر كل من ساعدني لإتمام هذا البحث ولاسيما الكادر التدريسي في قسم الانتاج الحيواني وكادر الحقل الحيواني لما قدموه من مساعدة في جمع العينات واجراء 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- Ingvartsen, 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., Gariepy, 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.