

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

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

*

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 (الترانسفيرين) في دم الأغنام العراقية باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي العمودي بوجود مادة متعدد الاكربلامايد 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, AA, MM, BB, DD, و DM طبقاً لحركاتها في الوسط القاعدي وكان المسؤول عن هذه التراكيب الثمانية 4 أليلات (M, D, B, A). كان هناك اختلافات في تكرار الجين، إذ تفوق كل من الأليل B و M (0.36 و 0.31) 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 الاكربلامايد كطريقة سريعة وكفوءة وقليلة التكاليف لكشف الاختلافات الوراثية لجين الترانسفيرين في دم الأغنام العراقية. 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 الاكربلامايد (Polyacrylamide) والأكاروز (Agarose) لتقوم مقام الوسط الذي يتم فيه فصل المركبات البروتينية اعتمادا على أوزانها الجزيئية. وصار بالإمكان الاستفادة من هذه التقنية في إنجاز تشخيص الحامض النووي الوراثي (DNA) عبر تقنية التفاعل السلسلي للبوليميريز (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، وراثه العشائر، التشخيص السريري والخرائط الجينية (Balakrishnan و Goswami ، 1991) الترانسفيرين هو كلايكوبروتين يرتبط مع ذرتين من الحديد لكل جزيئة ترانسفيرين وهو يعمل كحامل للأوكسجين، وتركيزه في البلازما الطبيعية 240-280 ملغم/100 مل. كذلك هناك عدة مسميات لبروتين الترانسفيرين وتعتمد هذه التسميات على أصل وجود البروتين مثلاً إذا وجد في الدم يسمى الترانسفيرين (Evan وآخرون، 1956). في حين يسمى أوفوترانسفيرين (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 ترانسفيرين Melanotrans ferrin-MTF في أنسجة الإنسان (Richardson، 2000).

كان Smithies و Salisbury (1959) أول من اكتشفا التراكيب الوراثة المختلفة لبروتين الترانسفيرين 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 مروراً بدراسة Weimer وآخرين (1984) (أربع وخمس أليلات في أغنام الرومني مارش والكورديل على التوالي)، دراسة Steppa وآخرين (2007) (ستة أليلات في المرينو البولندي) وأخيراً 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 (Konuk و Rahman، 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 الترانسفيرين، دفعت كثيراً من الدول وخاصة دول الجوار العراقي بالسعي الحثيث في كشف بعض مزايا هذا البروتين ومن هذه الدول إيران (Lay وآخرون ، 1971؛ Shahrabak وآخرون ، 2010) وتركيا (Bagci وآخرون ، 1993؛ Elmaci ، 1998؛ Dellal، 2002؛ Kargin وآخرون ، 2003؛ Mert، 2003). أما 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 العراقية (10مل لكل نموذج) من الوريد الوداجي Jugular vein. وضعت نماذج الدم في أنابيب خالية من مادة الـ (EDTA) والخاصة بتحديد التراكيب الوراثة للترانسفيرين. اجري الترحيل الكهربائي باستخدام طريقة PAGE حسب AOAC مع إجراء بعض التحويرات عليها باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي العمودي (Vertical Electrophoresis Separation) من قبل شركة Cleaver scientific البريطانية. حضرت محاليل هلام الفصل (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.

جدول 1. نظام الترحيل الكهربائي لترانسفيرين دم الأغنام العربي (الأس الهيدروجيني 8.9).

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

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.

$x1x1$ و $3x1x$ و $x1xn$ = عدد التراكيب الوراثية غير المتماثلة للاليل الأول.

N = العدد الكلي للحيوانات قيد الدراسة.

ليبيان اتزان العشيرة استخدمت المعادلة التالية:

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

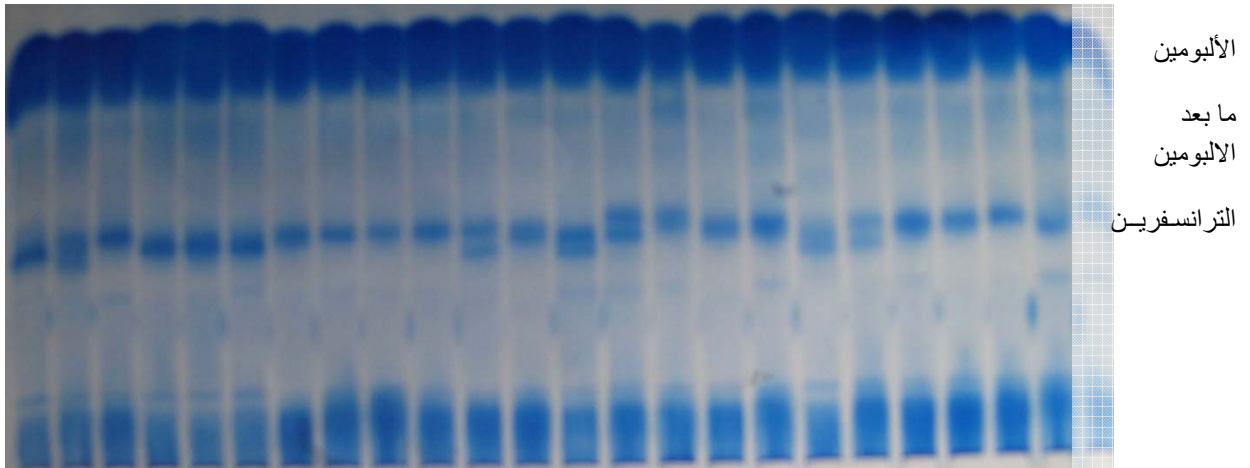
حيث تمثل O عدد البيانات الملاحظة بينما تمثل E عدد البيانات المتوقعة.

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج الدراسة وجود ظاهرة التشكل الوراثي لبروتين ناقل الحديد إلى الدم (الترانسفيرين) 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 ألييلات لهذا الجين (Ashton، 1958) وبالتالي نتوقع وجود 45 تركيب وراثي.

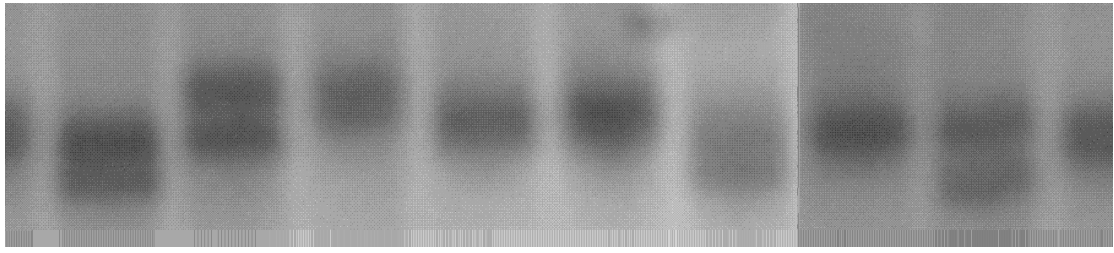
تعطي الإشكال رقم 1-3 صور توضيحية حول أهم بروتينات المصل في دم الأغنام، فنلاحظ من الأعلى وجود بروتين الألبومين والذي يعتبر البروتين الأكبر من حيث الكمية في دم الأغنام ويلاحظ في بعض العينات وجود تشكّل وراثي بسيط إلا أنه لا يرتقي إلى المثالية لكون طريقة العمل مخصصة لجين الترانسفيرين. يلي بروتين الألبومين بروتين الترانسفيرين والذي يكون في الوسط انسجماً مع محتواه من الأحماض الأمينية 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 متمثل من خلال وجود حزمة واحدة (Ashton، 1958). نتائج دراستنا تتفق مع كثير من الدراسات في هذا الاتجاه، إذ تم إيجاد كثير من التراكيب الوراثية المتمثلة -حزمة واحدة وتراكيب وراثية غير متمثلة - حزمتين (Roberts وآخرون ، 1980؛ Weimer وآخرون ، 1984؛ Steppa وآخرون ، 2007).



شكل 1. نواتج التحلل البروتيني على هلام الفصل (متعدد الاكريلامايد) بطريقة الهجرة الكهربائية لبروتين الترانسفيرين في دم الأغنام العراقية .

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 ألييلات (A، B، D و M) تتبع في توارثها السيادة المشتركة (Co dominants) وحسب قوانين مندل في الوراثة (Jaayid، 2003). كان عدد التراكيب الوراثية المتمثلة أربعة (AA، BB، DD و MM) كما كانت أعداد التراكيب الوراثية غير المتمثلة أربعة (AM، AB، BM و DM) (الجدول 2). حيث يبين الجدول زيادة أعداد التراكيب الوراثية غير المتمثلة (68.07%) مقارنة بأعداد التراكيب الوراثية المتمثلة (31.93%) وهذه النتيجة تؤكد غياب الانتخاب والتزاوج المسيطر عليه وبالتالي وجود نسبة التراكيب الوراثية المتمثلة 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 الأليل 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 التركبية وهذا دليل على التقارب الوراثي بين الأغنام العراقية والتركية .

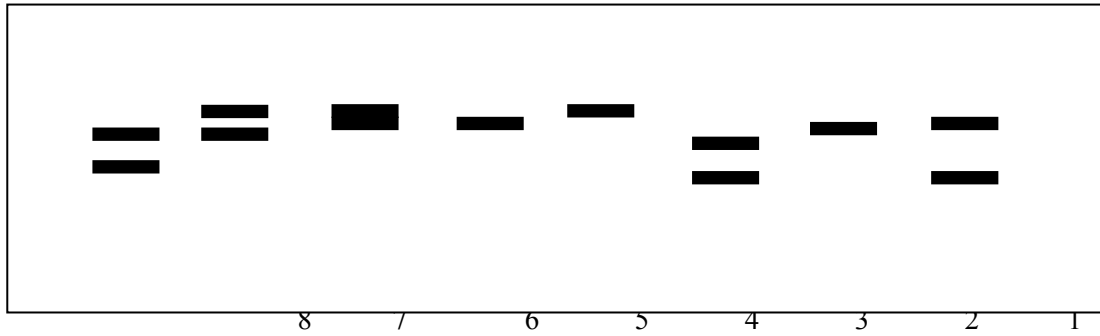


8 7 6 5 4 3 2 1

شكل 2. بروتين الترانسفيرين على هلام الفصل (متعدد الاكريلامايد) بطريقة الهجرة الكهربائية في دم الأغنام العربية .

جدول 2. توزيع التراكيب الوراثية لبروتين الترانسفيرين في الأغنام العربية .

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



شكل 3. بعض التراكيب الوراثية لجين الترانسفيرين على هلام الفصل (متعدد الاكريلامايد) بطريقة الهجرة الكهربائية في دم الأغنام العراقية .

الاستنتاج: من خلال ما تقدم يمكن الاستنتاج بان جين ترانسفيرين الأغنام العراقية قد تشكل وراثيا أسوة ببقية الأغنام العالمية وتقوم 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. Stanisiz .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 Seminars.* 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 Province. 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 (0.36 and 0.31), 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.