

بررسی چند شکلی ژن CTSK و ارتباط آن با صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی در گوسفندان آمیخته افشاری×برولامرینو با روش PCR-SSCP

شماره صفحات

۲۳-۲۴

لیلا محمدی^۱، محمد طاهر هرکی نژاد^۲، رضا پسندیده^{۳*} و مجید پسندیده^۴

۱) دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲) دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳) پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، بوشهر، ایران.

۴) گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران.

* ایمیل نویسنده مسئول: Rezasandideh63@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۰۵

چکیده

به منظور بررسی ارتباط بین چندشکلی در اگزون ۶ ژن CTSK با صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی در گوسفندان آمیخته افشاری×برولامرینو، از ۹۷ رأس گوسفند نر این نژاد از ایستگاه دامپروری دانشگاه زنجان خون‌گیری انجام گرفت. DNA ژنومی با روش فنل-کلروفورم استخراج و سپس یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی از این ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر شد. الگوهای باندي این ژن برای تمام حیوانات با استفاده از روش PCR-SSCP شناسایی و سپس توالی‌یابی شدند. برای این ژن در ناحیه مورد مطالعه دو الگوی باندي GG و GA با فراوانی به ترتیب ۰/۷۴ و ۰/۲۶ مشاهده شد. آزمون کای مربع نشان داد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی-واینبرگ قرار نداشت. الگوی GG به طور معنی‌داری با افزایش صفات وزن دنبه، ضخامت و سطح مقطع عضله و کاهش کلسترول و VLDL ارتباط داشت. با این حال، برای استفاده از این جایگاه ژنی در برنامه‌های اصلاح نژادی بر مبنای انتخاب به کمک نشانگر، به تحقیقات بیش‌تر با اندازه نمونه بزرگ‌تر در آینده نیاز است.

کلمات کلیدی: گوسفند آمیخته افشاری×برولامرینو، ژن CTSK، صفات لاشه، فراسنجه‌های خونی و PCR-SSCP.

مقدمه

امروزه مصرف‌کنندگان گوشت تمایل بیش‌تری به استفاده از گوشت گوسفندهایی با عضله بیش‌تر و چربی کم‌تر دارند. چربی احشایی و دنبه درصد قابل توجهی از وزن بدن را در گوسفند به خود اختصاص می‌دهد که از لحاظ ضریب تبدیل خوراک و صرفه اقتصادی برای تولیدکنندگان گوشت نیز مطلوب نیست. بنابراین پرورش‌دهندگان ناچار به تولید دام‌هایی هستند که گوشتی مطابق ذائقه خریداران داشته باشند. شناسایی ژن‌های مرتبط با صفات لاشه و انتخاب و اصلاح نژاد دام‌ها بر اساس آن‌ها، می‌تواند در رسیدن به این هدف موثر باشد. چربی لاشه یک صفت کمی بوده که تحت کنترل تعداد زیادی ژن می‌باشد. هر عاملی که بر بیان ژن‌های مرتبط با سنتز چربی و ژن‌های کدکننده هورمون‌های مؤثر بر چربی اثر داشته‌باشد، می‌تواند چربی لاشه در حیوانات مزرعه‌ای را تحت تأثیر قرار دهد (Murray et al, 2006., Wu et al, 2005). یکی از ژن‌های مؤثر بر میزان چربی بدن در موش و انسان، ژن کاتپسین K (CTSK) می‌باشد که ساختار این ژن در انسان دارای ۸ اگزون و ۷ اینترون بوده و آنزیم پروتئاز سیستئین لیزوزومی را کد می‌کند (Lecaille et al, 2008). این آنزیم در ابتدا به فرم پرو آنزیم غیر فعال با وزن ۳۷ کیلو دالتون سنتز شده که پس از انتقال به محفظه لیزوزوم از طریق گیرنده مانوز-۶-فسفات، با انجام تغییراتی به شکل آنزیم فعال به وزن ۲۷ کیلو دالتون تبدیل می‌شود (Turk et al, 2001., Chiellini et al, 2003). ترشح CTSK محدود به لیزوزوم‌ها نیست و در مناطق خارج سلولی، در سطح سلول‌های آپیکال و درون حفره‌های فولیکولی نیز ترشح می‌گردد. ژن CTSK در بافت‌های مختلفی از جمله استخوان، تخمدان، قلب، جفت، ریه و عضلات اسکلتی شناسایی شده است (Buhling et al, 2001., Lecaille et al, 2008). این ژن به‌عنوان یکی از نشانگرهای چاقی در بافت‌های آدیپوز می‌باشد که باعث رشد و تمایز توده چربی در موش، انسان و خوک می‌گردد (Tepel et al, 2000). در هنگام تمایز سلول‌های 3T3-L1 در آدیپوسیت‌های بالغ، بیان این ژن به تدریج افزایش می‌یابد (Yang et al, 2008). جهش در ژن CTSK سبب بیماری‌های پیکینودیستوسیس^۱، پوکی استخوان^۲، رشد تصاعدی تومورها در سرطان بدخیم غضروفی^۳، سرطان تیروئید و کوتاهی قد می‌شود که حاکی از عدم عملکرد و بیان این ژن می‌باشد (Xiao, Chiellini et al, 2003., Fujita et al, 2000). *et al* (2006) با بررسی بیان ژن CTSK در بافت‌های چربی سفید افراد چاق گزارش کردند که این ژن اثر معنی‌داری بر افزایش وزن، محیط کمر، شاخص توده بدن (BMI)^۴ و فراسنجه‌های خونی مانند انسولین، قند، کلسترول و تری‌گلیسیرید دارد. Chiellini et al (2003) افزایش سطوح mRNA ژن CTSK را در موش‌های چاق و انسان‌های دارای اضافه وزن نسبت به گروه شاهد گزارش کردند. Russo et al (2008) با بررسی رابطه بین چندشکلی تک نوکلئوتیدی چند ژن

¹ Cathepsin K

² Pycnodysostosis

³ Osteoperotic

⁴ Chondrosarcoma

⁵ Body mass index

کاتپسین در خوک با صفات لاشه در خوکچه های سفید ایتالیایی گزارش کردند که CTSF باعث افزایش میانگین وزن روزانه، کاهش وزن و ضخامت پشت شد و CTSD با کاهش وزن، ضخامت پشت، ضریب تبدیل خوراک و میانگین وزن روزانه ارتباط داشت. همچنین نشان دادند که CTSZ با میانگین وزن روزانه، کاهش وزن و ضریب تبدیل خوراک ارتباط داشت. Fontanesi *et al* (۲۰۱۲) ارتباط ژن های کاتپسین با چربی بین ماهیچه قابل رویت و ضخامت چربی پشت و میانگین وزن روزانه در خوک های نژاد دوروک ایتالیایی را گزارش کردند. با توجه به این که تاکنون پژوهشی در ارتباط با نقش ژن CTSK بر صفات چربی لاشه در گوسفند انجام نشده است، در این تحقیق چند شکلی اللی در اگزون ۶ ژن CTSK و ارتباط آن با صفات لاشه و فراسنجه های خونی در گوسفندان آمیخته افشاری×برولامرینو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه از حیوانات

به منظور اجرای این تحقیق، تعداد ۹۷ رأس گوسفند نر آمیخته افشاری×برولامرینو با سن یکسان (۱۱ ماهه) از گله اصلاح نژادی گوسفند افشاری مزرعه آموزشی-پژوهشی دانشگاه زنجان، به صورت تصادفی انتخاب شدند. شرایط نگهداری، واکسیناسیون و تغذیه تمامی گوسفندان یکسان بود. گوسفند ها تا سن چهار ماهگی به همراه مادرشان بودند و سن ۱۲۰ روزگی به عنوان سن از شیرگیری در نظر گرفته شد. بعد از آن جیره گوسفندها شامل یونجه خرد شده، آرد جو و مکمل ویتامینی بود. نژاد افشاری×برولامرینو نژادی سنگین وزن بوده و از پتانسیل مناسبی برای تولید گوشت برخوردار است. این گوسفندان دارای دنبه ای نسبتاً بزرگ هستند که ضریب تبدیل غذایی در لاشه را پایین می آورد. از طرفی این نژاد یکی از منابع مهم ژنتیکی کشور بوده و از نظر سرعت رشد و دوره پروار یکی از بهترین گوسفندان به شمار می رود. این گوسفندان به زیستن در شرایط آب و هوایی سردسیری استان زنجان سازگار هستند. نمونه های خون این حیوانات با استفاده از لوله های خلاء دار ۵ میلی لیتر حاوی ماده ضد انعقاد EDTA جمع آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از کشتار در سن ۱۱ ماهگی، رکوردهای مربوط به صفات لاشه (شامل درصد وزن لاشه، درصد وزن ضایعات، درصد وزن دنبه، ضخامت چربی پشت، ضخامت و سطح مقطع عضله) و فراسنجه های خونی (شامل VLDL، کلسترول و تری گلیسیرید) این حیوانات ثبت گردید. رکوردهای صفات ضخامت چربی پشت، ضخامت و سطح مقطع عضله از طریق روش سونوگرافی به دست آمدند.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از ۰/۳ میلی لیتر خون کامل با روش فنل- کلروفورم صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد و غلظت آن با روش اسپکتروفوتومتری با دستگاه نانودراپ تعیین شد.

طراحی آغازگرها و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

آغازگرها از روی توالی ژن CTSK در گوسفند به صورت زیر طراحی و توسط شرکت تکاپوزیست سنتز شدند. با استفاده از BLAST کردن این آغازگرها با توالی ژن CTSK مشخص گردید که آن‌ها قادر به تکثیر یک قطعه ۵۰۰ جفت بازی از اگزون ۶ و بخشی از اینترون ۵ این ژن در گوسفند بودند.

F:5' AGACCCTTGGTGGAGACTC3'

R:5' ACGCTAGGAGACRCTCTG3'

واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۶ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۸ واحد آنزیم Taq پلیمرز (شرکت فرمنتاز)، ۰/۱ میکرولیتر PCR بافر (۱۰X)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs (شرکت فرمنتاز)، ۲ میلی‌مولار MgCl₂ و ۵۰ میلی‌مولار KCl انجام گرفت. برنامه حرارتی مناسب برای تکثیر ژن CTSK به این صورت در نظر گرفته شد: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. برای تعیین اندازه قطعه تکثیر شده، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و با نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی با ولتاژ ۸۵ بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

تعیین ژنوتیپ حیوانات در ناحیه تکثیر شده ژن CTSK به روش PCR-SSCP

برای انجام چند شکلی ساختمان فضایی تک رشته‌ای^۶، ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۶ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP مخلوط شد. برای واسرشت‌سازی رشته‌های DNA، نمونه‌ها به مدت ۱۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. سپس بلافاصله ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند. سپس ۸ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR با بافر بارگذاری SSCP داخل هر یک از چاهک‌های دستگاه الکتروفورز عمودی ریخته شد و با جریان الکتریسیته ۱۵۰ ولت به مدت ۴ ساعت روی ژل اکریل آمید ۱۲٪ در دمای اتاق الکتروفورز شد. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از روش رنگ‌آمیزی نترات نقره استفاده شد. بر اساس قرار گرفتن الگوهای باندها، ژنوتیپ حیوانات تعیین شد.

مراحل تعیین توالی

به منظور تایید ژنوتیپ‌های تشخیص داده شده، از هر ژنوتیپ سه نمونه به طور تصادفی برای تعیین توالی انتخاب شد. به این منظور پس از تکثیر مجدد توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، این قطعات با استفاده از کیت Accuprep-Gel (Bioneer) purification kit-k-3035-1 (کره جنوبی) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، از روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

^۶ Basic Local Alignment Search Tool

^۷ Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

خالص‌سازی شدند. سپس نمونه‌ها برای تعیین توالی به شرکت Bioneer (کره جنوبی) ارسال شدند. توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های گوسفند، گاو، خوک و انسان موجود در پایگاه‌های داده‌های زیستی (Emsemble) مطابقت‌سازی شدند و با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench5 مورد بررسی قرار گرفتند (Kelump *et al*, 2010).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل ژنتیک جمعیت

در این پژوهش با مشاهده چشمی و شمارش مستقیم الگوهای بانندی و با استفاده از نرم‌افزار POPGENE نسخه ۱/۳۱ (POPGENE, ۱۹۹۹) فراوانی اللی و ژنوتیپی جایگاه مورد مطالعه تعیین شد. فراسنجه‌های مربوط به تنوع ژنتیکی و آزمون کای مربع برای بررسی تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار POPGENE نسخه ۱/۳۱ محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل ژنتیک کمی

به‌منظور بررسی ارتباط چندشکلی ژن CTSK با صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی، تجزیه و تحلیل اثر ژنوتیپ‌ها بر صفات مذکور با استفاده از رویه مدل خطی عمومی (GLM) نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ (SAS, ۲۰۰۴) صورت گرفت. لازم به ذکر است که وزن گوسفندها و سن مادر به‌عنوان عامل همبسته (کوواریت) در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شدند اما به‌دلیل معنی‌دار نشدن از مدل حذف گردیدند. میانگین‌ها با آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. مدل آماری مورد استفاده به‌صورت زیر بود:

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + K_j + D_k + e_{ijkl} \quad \text{رابطه ۱}$$

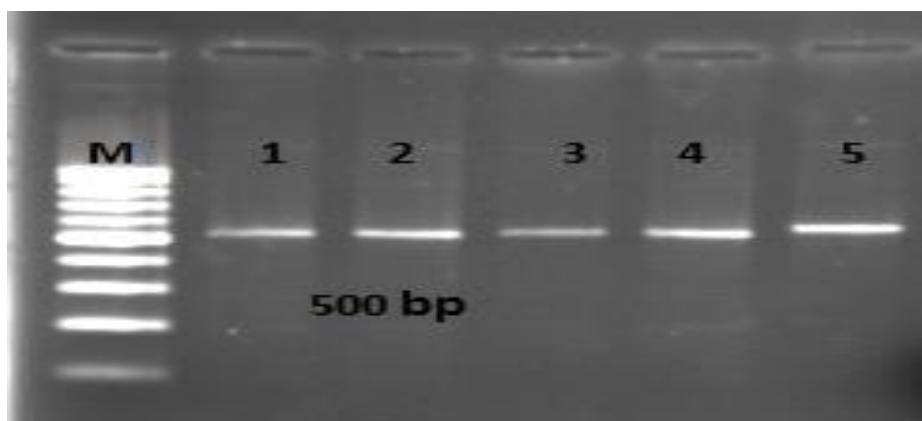
در این مدل y_{ijkl} : ارزش صفت اندازه‌گیری شده، μ : میانگین صفت، G_i : اثر آلمین ژنوتیپ، K_j : اثر آلمین تیپ تولد، D_k : اثر متقابل k آلمین ژنوتیپ و تیپ تولد و e_{ijkl} : اثر خطای آزمایشی می‌باشند.

نتایج و بحث

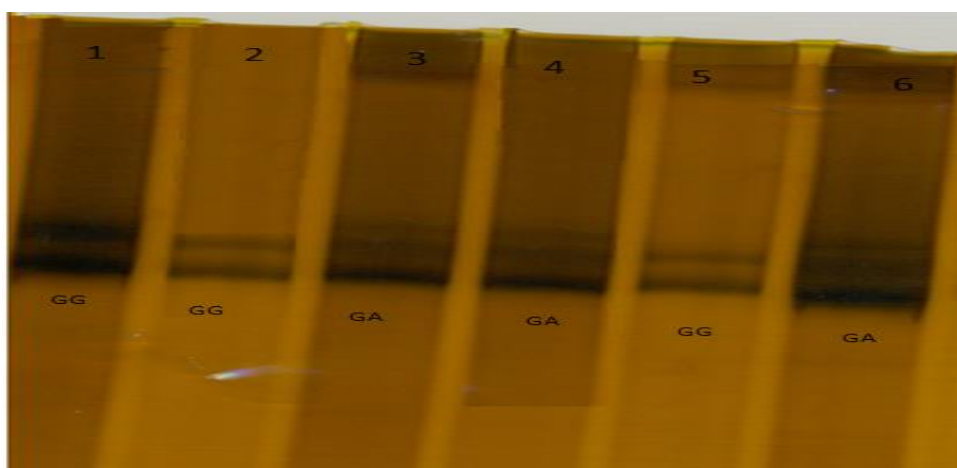
تعیین ژنوتیپ حیوانات در ناحیه تکثیر شده ژن CTSK و توالی‌یابی

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز، تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۰۰ جفت باز از ژن CTSK را نشان داد (شکل ۱). با توجه به الگوهای بانندی مشاهده شده برای ژن CTSK دو آلل A و G شناسایی شد که براساس موقعیت آن‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، ژنوتیپ‌های ممکن برای این جایگاه ژنی تعیین گردید. الگوهای بانندی مربوط به ژن CTSK شامل دو الگوی GA و GG در این حیوانات بود (شکل ۲). در پژوهش‌های گذشته چند شکلی‌های تک

نوکلئوتیدی ژن CTSK et al Fontanesi (2010) در اینترون ۴ این ژن در خوک و Russo *et al* (2008) در اینترون ۶ این ژن در انسان شناسایی شدند که نتیجه تحقیق حاضر با آن نتایج مطابقت داشت.



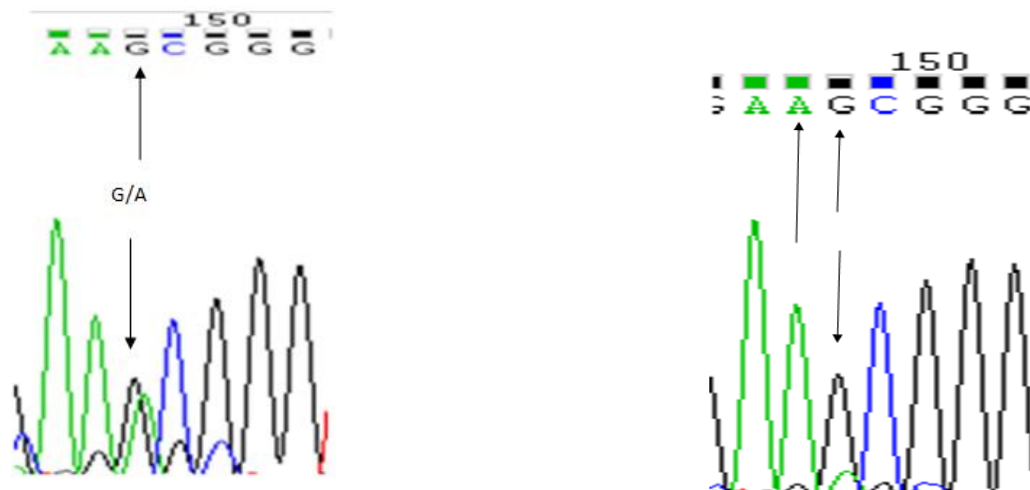
شکل ۱- باندهای ۵۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن CTSK بر روی ژل آگارز ۲٪. (M: نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی).
Figure 1. The 500 bp bands of amplified CTSK gene on 2% agarose gel. (M: 100 bp DNA Marker)



شکل ۲- نمونه‌ای از الگوهای به دست آمده برای ژن CTSK در گوسفندان آمیخته افشاری×برولامرینو با استفاده از تکنیک SSCP-PCR.

Figure 2. An example of the patterns obtained for the CTSK gene in Afshari×Booroola-Merino crossbred sheep using the PCR-SSCP technique.

با بررسی نمودارهای حاصل از توالی‌یابی، وجود دو الگوی GA و GG در ژن CTSK تایید شد. با مقایسه این نمودارها مشخص شد که در نوکلئوتید ۲۶ در اگزون ۶، دو نقطه اوج مربوط به نوکلئوتید G و A وجود دارد که نشان دهنده حالت هتروزیگوت می‌باشد. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار CLC Main Workbench5 نشان داد که اسید آمینه تریپتوفان به اسید آمینه گلوتامین تغییر یافته است. در حالی که در دام‌های هموزیگوت تنها منحنی مربوط به نوکلئوتید G مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- وجود SNP بر روی اگزون ۶ و بخشی از اینترون ۵ ژن CTSK. تصویر سمت راست الگوی GG و تصویر سمت چپ الگوی GA را نشان می‌دهد.

Figure 3. SNP on exon 6 and part of the intron 5 of the CTSK gene. The right picture shows the GG pattern and the left picture shows the GA pattern.

فراوانی‌های اللی و ژنوتیپی و فراسنجه‌های تنوع ژنتیکی

فراوانی الگوهای ژنوتیپی و اللی در جایگاه ژنی CTSK در گوسفندان آمیخته افشاری^۸، پرولامرینو در جدول ۱ آورده شده‌اند. در این مطالعه بیشترین فراوانی اللی در این گوسفندان برای ال G با فراوانی ۰/۸۷ و کمترین فراوانی اللی برای ال A با فراوانی ۰/۱۳ به دست آمد. Fontanesi (2010) فراوانی ال‌های A و G را در نژادهای خوک دوروس^۹، میشان^{۱۰} و هامپشیر^{۱۱} به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۸۹، ۰/۲۹ و ۰/۷۱ و ۰/۱۳ و ۰/۸۷ گزارش کردند که نتیجه این تحقیق با فراوانی‌های اللی نژاد هامپشیر مطابقت ولی با دو نژاد دیگر تفاوت داشت. این تفاوت در فراوانی اللی می‌تواند ناشی از تفاوت گونه، تعداد دام مورد بررسی و نیز شرایط آب و هوایی پرورش به‌عنوان یک ابزار مهم انتخاب طبیعی باشد. با استفاده از آزمون مربع کای مشخص شد که جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی واینبرگ قرار ندارد (جدول ۱). وجود انتخاب و آمیزش‌های غیر تصادفی در جمعیت و نیز مهاجرت ژنی را می‌توان به‌عنوان مهم‌ترین دلایل احتمالی برای تغییر فراوانی اللی و در نتیجه بر هم خوردن تعادل در جایگاه ژنی CTSK در گوسفندان آمیخته افشاری^۸، پرولامرینو ذکر کرد. فراسنجه‌های تنوع ژنتیکی برای جایگاه ژنی CTSK در جدول ۲ آورده شده است. هتروزیگوسیتی شاخص تنوع ژنتیکی در جمعیت است. هر چه سطح هتروزیگوسیتی بیشتر باشد، تنوع ژنتیکی جمعیت بیشتر است. با توجه به جدول ۲ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که میزان هتروزیگوسیتی و تنوع ژنتیکی برای جایگاه ژنی CTSK در جمعیت گوسفندان آمیخته افشاری^۸، پرولامرینو پایین بوده است. مقادیر شاخص‌های شانون و به‌ویژه نئی برای جایگاه ژنی CTSK در این جمعیت پایین بود که نشان دهنده سطح پایین تنوع ژنتیکی در جمعیت

⁸ Duroc

⁹ Meishan

¹ Hampshire

مورد مطالعه است. شاید کوچک بودن اندازه نمونه مورد بررسی در به‌دست آمدن این نتیجه موثر باشد. با توجه به این که وجود تنوع ژنتیکی مهم‌ترین ویژگی یک جمعیت جهت انجام کارهای اصلاح نژادی می‌باشد، بنابراین به‌نظر می‌رسد جایگاه ژنی CTSK کاندیدای مناسبی جهت انتخاب و اصلاح نژاد گوسفندان آمیخته افشاری×برولامرینو به‌منظور بهبود صفات لاشه نمی‌باشد.

اثر ژن CTSK بر صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی

آنالیز صفات اندازه‌گیری شده نشان داد که چندشکلی اللی در اگزون ۶ ژن CTSK با وزن دنبه، ضخامت و سطح مقطع عضله، VLDL و کلسترول خون در ارتباط است (جدول ۳). نتایج نشان داد که حیوانات دارای ژنوتیپ GG به‌طور معنی‌داری وزن دنبه، ضخامت و سطح مقطع عضله بالاتری نسبت به گوسفندان با ژنوتیپ GA داشتند ($P < 0.05$). با توجه به وجود همبستگی فنوتیپی و ژنتیکی مثبت بین وزن دنبه و عضله این نتیجه منطقی به‌نظر می‌رسد. با بررسی فراسنجه‌های خونی مشخص شد که گوسفندان با ژنوتیپ GG به‌طور معنی‌داری سطوح پایین‌تری از VLDL و کلسترول را نسبت به حیوانات با ژنوتیپ GA داشتند ($P < 0.05$). چندشکلی اللی در اگزون ۶ ژن CTSK اثر معنی‌داری روی صفات درصد وزن لاشه و ضایعات، ضخامت چربی پشت و میزان تری‌گلیسرید خون نداشت ($P > 0.05$). Fontanesi (2010) گزارش کردند که چند شکلی تک نوکلئوتیدی اینترون ۴ ژن CTSK با ضخامت چربی پشت خوکیه‌های نژاد دوروس ایتالیایی ارتباط معنی‌داری دارد ($P < 0.05$) که نتیجه تحقیق حاضر با آن مغایرت دارد.

جدول ۱- فراوانی ژنوتیپی و اللی در جایگاه ژنی CTSK در گوسفندان آمیخته افشاری×برولامرینو

Table 1. Genotypic and allelic frequency in CTSK gene locus in Afshari×Booroola-Merino crossbred sheep

اندازه نمونه Sample size	فراوانی ژنوتیپی Genotypic frequency		فراوانی اللی Allelic frequency		مربع کای χ^2	P value
	GA	GG	A	G		
97	0.26	0.74	0.13	0.87	0.53*	0.035

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۲- فراسنجه‌های تنوع ژنتیکی برای جایگاه ژنی CTSK

Table 2. Genetic diversity parameters for the CTSK gene locus

الل واقعی (Na)	2
هتروزایگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	0.26
هتروزایگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	0.25
شاخص نئی (Nei) Nei index	0.24
شاخص شانون (I) Shannon index (I)	0.66

جدول ۳- مقادیر صفات لاشه و فراسنجه‌های خونی برای ژنوتیپ‌های ژن CTSK

Table 3. Values of carcass traits and blood parameters for genotypes of CTSK gene

صفات (میانگین±SE) Traits Traits (mean ± SE)	ژنوتیپ Genotype		P value
	GA	GG	
وزن لاشه (درصد) Carcass weight (%)	43.37±0.45	42.76±0.27	0.31 ^{ns}
وزن ضایعات (درصد) Waste weight (%)	4.65±0.37	3.65±0.24	0.45 ^{ns}
وزن دنبه (درصد) Fat-tail weight (percent)	4.8 ±0.25	6.5±0.33	0.026*
ضخامت چربی پشت Back-fat thickness (cm)	0.28 ±0.04	0.33±0.02	0.15 ^{ns}
ضخامت عضله Muscle thickness (cm)	2.21 ±0.08	2.4±0.05	0.037
سطح مقطع عضله Muscle cross-sectional (cm ²)	9.3± 0.48	10.7±0.31	0.045
VLDL (mmol/l)	3.84 ±0.22	3.76±0.13	0.022
کلسترول Cholesterol (mmol/l)	49.07 ±2.6	47± 1.63	0.020
تری گلیسرید (mmol/l) Triglyceride (mmol/l)	18.19±0.38	18.62±0.22	0.1 ^{ns}

ns و * : به ترتیب عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) و معنی‌دار ($P < 0.05$)

ns and * : non-significant difference ($P > 0.05$) and significant difference ($P < 0.05$), respectively

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ GG جایگاه ژنی CTSK در گوسفندان آمیخته افشاری «برولامرینو از لحاظ صفات وزن دنبه، ضخامت و سطح مقطع عضله، VLDL و کلسترول خون، ژنوتیپ برتری بود. با این حال به دلیل این که تنوع ژنتیکی این جایگاه ژنی در جمعیت مورد مطالعه پایین بود، نمی‌توان با قطعیت آن را کاندیدای مناسبی جهت انتخاب و اصلاح نژاد این گوسفندان در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر به منظور بهبود کیفیت لاشه معرفی نمود. با توجه به این که تعداد نمونه در این تحقیق کوچک بود، به منظور شناخت دقیق‌تر نقش ژن CTSK بر روی صفات لاشه پیشنهاد می‌شود که جایگاه‌های دیگر این ژن در نژادهای بومی با تعداد نمونه بزرگ‌تر بررسی شوند.

منابع

- Buhling, F., Reisenauer, A., Gerber, A., Kruger, S. (2001). Cathepsin K a marker of macrophage differentiation. *J. Pathol.* 195: 375-382.
- Chiellini, C., Costa, M., Novelli, S., Amri, E., Benzi, L., Bertacca, A., Cohen, P., Del Prato, S., Friedman, J. M. (2003). Identification of cathepsin K as a Novel marker of adiposity in white adipose tissue. *J Cell Physiol.* 195:309-321.
- Fontanesi, F., Scotti, E., Buttazzoni, L., Dall'Olio, S., Davoli, R and Russo, V. (2010). A Single nucleotide polymorphism in the porcine cathepsin K (CTSK) gene is Associated with back fat thickness and production traits in Italian Duroc pigs. *Mol Biol Rep.* 37: 491-49
- Fontanesi, L., Speroni, C., Buttazzoni, L., Scotti, E., Dall'Olio, S., Davoli, R. and Russo, V. (2012). Association between polymorphisms in cathepsin and cystatin genes with meat production

and carcass traits in Italian Duroc pigs: confirmation of the effects of a cathepsin L (CTSL) gene marker. *Mol Biol Rep.* 39:109–115.

Fujita, Y., Nakata, K., Yasui, N. (2000). Novel mutation of the cathepsin K gene in patients with Pyknodysostosis and their characterization. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:425-431.

Lecaille, F., Bromme, D., Lalmanach, G. (2008). Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *J Biochimie.* 90:

Murray, R. K. Granner, D. K. Mayes, P. A. and Rodwell, V. W., (2006). *Harpers illustrated biochemistry.*

Ramos, A. M., Glenn, K. L., Serenius, T. V., Stalder, K. L., Rothschild, M. F. (2008). Genetic markers for the production of US country hams. *J Breed Genet.* 125:248-257.

Russo, V., Fontanesi, L., Scotti, E., Beretti, F., Davoli, R., Nanni Costa, L., Virgili, R. and Buttazzoni, L. (2008). Single nucleotide polymorphisms in several porcine cathepsin Genes are associated with growth, carcass and production traits in Italian Large White Pigs. *J Anim Sci.* 86: 3300–3314.

SAS Institute Inc. (2004). *SAS/STAT User's Guide, Version 9.1.* SAS Institute Inc., Cary, NC. ISBN. 1-59047- 243-8.

Tepel, C., Bromme, D., Herzog, V. and Brix, K. (2000). Cathepsin K in thyroid epithelial Cells: sequence, localization and possible function in extra cellular proteolysis of Thyroglobulin. *J Cell Sci.* 113:4487–4498.

Turk, V., Turk, B. and Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and Opportunities. *The EMBO Journal.* 20(17):4629-4633

Wu, X. L., MacNeli, M. De.S., Xiao, Q. J., Michal, J., Gaskins, C., Reeve, J., Busboom, J., Wright, R. and Jiang, Z. (2005). Evaluation of candidate Gene Effects for Beef backfat via Bayesian model selection. *J of Genetica.* 125(1):103-113

Xiao, Y., Junfeng, H., Tianhong, L., Shulin, C., Yu, Z., Xiaohua, L., Weixia, J., Sheng, Z., Yanyun, G., Guo, L. and Min, L. (2006). Cathepsin K in adipocyte Differentiation and its potential role in the pathogenesis of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:4520–4527

Yang, M., Sun, J., Zhang, T., Liu, J., Zhang, J. and Shi, M. (2008). Deficiency and Inhibition of Cathepsin K Reduce Body Weight Gain and Increase Glucose Metabolism in Mice. *J Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:2202-2208.

Investigation of polymorphism in CTSK gene and its association with carcass traits and blood parameters in Afshari×Booroola Merino sheep

Leila Mohammadi¹, MohammadTaher Haraki Nezhad², Reza Pasandideh^{*3} and Majid Pasandideh⁴

- 1) M. Sc. Graduated of Genetics and Animal Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
- 2) Associate Professor of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
- 3) Iranian Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran.
- 4) Department of Animal Science, Faculty of Animal and Aquatic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Corresponding Author, Email: Rezapasandideh63@gmail.com

Accepted: 2021.08.10

Received: 2021.05.26

Abstract

In order to study of polymorphism in exon 6 of CTSK gene and its association with carcass traits and blood parameters in Afshari×Booroola Merino sheep, blood samples were collected from 97 lambs of animal husbandry station of Zanjan University. DNA was extracted using phenol-chloroform method and a fragment of 500 bp from CTSK gene was amplified with polymerase chain reaction (PCR). The binding patterns for all animals were determined by single stranded conformation polymorphism (SSCP) and then sequenced. For this gene, two binding patterns of GG and GA were identified with the frequencies of 0.74 and 0.26, respectively. Chi-square test (χ^2) showed that this population was not in the Hardy-Weinberg equilibrium. Results showed that genotype of GG was significantly associated with increased of tail weight, muscle thickness and muscle cross-sectional area and decreased of cholesterol and VLDL traits. However the more investigations with larger sample size are necessary in future for usage from this locus in breeding programs based on marker-assisted selection.

Keywords: Afshari×Booroola Merino sheep, Carcass traits, CTSK gene, Blood parameters, PCR-SSCP.