

## "التأثير الجيني للجين المسؤول عن كمية الدهن في حليب ابقار الفريزيان المهجن مع السلالة المحلية لمحافظة بابل"

محمد حسن دخيل

فرع الصحة العامة/ كلية الطب البيطري/ جامعة القاسم الخضراء

mohammed\_aldakeel@yahoo.com

الخلاصة :

تهدف دراستنا الحالية الى تحليل مكونات الحليب الاساسية باستعمال جهاز تحليل مركبات الحليب ( Milk Analysis) والكشف عن الاشكال الجينية لجين (Diglyceride acyltransferase) و الذي اخصر بالرمز (DGAT1) للعينات المدروسة ، حيث ان هذا الجين يعتبر واحد من الجينات المسؤولة عن كمية الدهن في الحليب. سحبت عينات الدم بالاضافة الى عينات الحليب لنفس العينة الواحدة وبواقع 40 بقرة فريزيان المهجنة (Friesian crossbred cows) مع السلالات المحليه لمحافظة بابل وللفترة ما بين تشرين الاول 2016 الى ايار 2017 , ان الشكل الجيني للجين المدروس تم تحديده باستخدام تقنية RFLP-PCR . تم تحليل عينات الحليب لكل بقرة في مختبر الصحة العامة / كلية الطب البيطري/ جامعة القاسم الخضراء, وايضا" تم استخلاص DNA من عينات دم الابقار المذكورة سابقا". توصلت الدراسة الحالية الى وجود ثلاثة اشكال من تغييرات ال DGAT1 وهي KK,KA&AA حيث كان الشكل الجيني KK مرتبطا" مع العينات الحاوية على اكبر نسبة دهن في حليبها في حين كان الشكل الجيني AA مع اقلها.

الكلمات المفتاحية : الفريزيان المهجن , DNA , DGAT1 , RFLP-PCR .

## "Genetic Effect for Responsible gene on Fat percentage in Milk of Friesian Crossbred with Local Breed in Babylon City"

Mohammed Hasan Dakheel

### Abstract:

The aim of present study is to analyze the milk component by using milk analysis to discover the genotype of DGAT1 gene for the samples, this gene is one of genes are responsible for fat percentage in milk. The blood samples and milk samples were collected from same samples. 40 samples from Frisian crossbred cattle with local Babylonian cattle breeds were used in the present study, between October 2016 to May 2017 by using RFLP-PCR. The milk samples were analyzed for each sample at Public health lab/ college of Veterinary Medicine/ Al-Qasim Green University. DNA samples were extracted from blood. The results indicated the precense of three genotypes of DGAT1 gene, namely KK, KA and AA. KK genotype were present with all samples have high percentage of fat in their milk while AA genotype were present with less percentage of fat in their milk.

Key Word: Friesian Crossbred, DNA, DGAT1, RFLP-PCR.

الدراسة الحالية هي استخدام تقنية RFLP-PCR و التي تعد من التقنيات السهلة و سريعة التطبيق في مجال الانتاج الحيواني<sup>(4)</sup>، و ذلك للكشف عن التغيرات الجينية لجين ال DGAT1 في ابقار الفريزيان المهجن لمحافظة بابل.

مواد وطرق العمل :Material and Method:

اخذت العينات من 40 بقرة لسلالة الفريزيان المهجن مع السلالات المحلية من مناطق مختلفة من محافظة بابل حيث كانت 25 بقرة من سلالة الفريزيان المهجن من منطقة الرانجية في جنوب محافظة بابل و 10 عينات من قضاء المحاويل و 5 عينات من الحقل الحيواني في كلية الطب البيطري جامعة القاسم الخضراء. جمعت جميع العينات من الحيوانات المذكورة سابقا<sup>(5)</sup> والعائدة الى مربين محليين، وثبتت ارقام لهذه الحيوانات من اجل معرفة انتاجها من الحليب خلال فترة الدراسة والتي استمرت من تشرين الاول 2016 الى ايار 2017 و كانت جميع العينات المدروسة في فترة انتاج الحليب . تم عزل ال DNA من عينات الدم المسحوب من الوريد الوداجي لكل بقرة بعد ان تم وضعه في انابيب EDTA الحاوية على مادة مانعة للتخثر وايصالها للمختبر بواسطة وضعها بحافظه درجة حرارتها 20 درجة مئوية، وتم تحليل DNA المذكور باستخدام طريقة sambrok method<sup>(6)</sup> .

التنبأ للتباين الوراثي، تم باستخدام الجين ( DGAT1 ) و باستخدام احدى تقنيات ال PCR هي RFLP- PCR Restriction Fragment Length ) Polymerase Chin Polymorphism - Reaction ( تبعا ل<sup>(8)</sup> وكان الوزن الجزيئي للبرايمر المستخدم (100 pb) ، تم تضخيمه بواسطة PCR للبرايمر المستخدم في هذه التجربة.

## المقدمة Introduction:

يعتبر القطاع الزراعي بشقيه الانتاج الحيواني والنباتي قطاعا حيويا مهما لانه يدخل في قوت الشعوب، حيث اصبح اليوم مدى تطور البلدان يقاس على اساس تطور القطاع الزراعي والصناعي لان الاقتصاد الزراعي في اغلب الدول المتقدمة يعتبر ركنا<sup>(1)</sup> مهما<sup>(2)</sup> من العائد القومي كما في امريكا واستراليا ونيوزلندا التي لها شهرة عالمية في القطاع الزراعي، اما في العراق، فقد كان العراق على مر العصور بلدا<sup>(3)</sup> زراعيا<sup>(3)</sup> يحضى بأرض خصبه ووفره في مياه الانهار اضافة الى تنوع حيواناته المزرعية التي كانت تربيتها هي جزء من ثقافات سكانها، لكن في وقتنا الحالي تأثر هذا القطاع الحيوي بعوامل عدة منها كثرة الحروب وقلة اهتمام الجانب الحكومي فيه، لذا وجب علينا الاعتناء بهذا الجانب من خلال اجراء الابحاث واعداد برامج التحسين الحديثه للسلالات المحلية لزيادة عائدتها الانتاجية لتصبح اكثر ربحا للمربي وبهذا نصل الى مستويات قريبه من الاكتفاء الذاتي دعما منا لاقتصادنا القومي العراقي.

تعد الابقار عنصرا<sup>(4)</sup> اساسيا<sup>(4)</sup> من عناصر الثروة الحيوانية كما وتعد محافظة بابل من المحافظات التي تشتهر بتربية الحيوانات المزرعية كالابقار والجاموس والاعنام. تعتبر نسبة الدهن بالحليب من الصفات الانتاجية المهمة في مجال الانتاج الحيواني ، والتي يهتم بها العديد من الدارسين في هذا المجال<sup>(8)</sup>. في دراستنا الحالية تم اختيار احد الجينات المسؤولة عن كمية الدهن بالحليب هو (DGAT1) (Diacylglycerol acyltransferase) كما اوضحه<sup>(9)</sup>، وعلاقته بالاشكال الجينية المتكونه ومدى تأثيرها على الصفات الانتاجية والنوعية المهمة في الحليب والتي تم مشاهدتها ايضا من قبل العديد من الدارسين منهم<sup>(2)</sup>. ان الهدف من

Forword : 5:GTA,CCT,GCA,AGA,CGC,TAC,CG-3 Reverse 5:

ACG,ATC,TTG,GGC,ACA,CAT,GCG-3.

Buffer و باستخدام صبغة بروميد الاثيديوم و ذلك باضافة ما يقارب 5µl منها الى الهلام قبل الترحيل الكهربائي . و لاجل اجراء تحليل RFLP يتوجب اخذ 7µl من DNA المستخلص، ونضيف له 2µl من انزيمات القطع، ثم نضيف 2.5µl من assay buffer, نحضن عند 37 درجة مئوية لمدة ساعة، بعدها نرحل العينات على هلام الاكاروز من اجل الحصول على نتائج التجربة.

تم تحليل التكرار الجيني و تكرار التراكيب الوراثية للاشكال الوراثية المتكونه بعد استخدام العينات بالتجربه وبتطبيق قاعدة هاردي واينبرج وذلك لمعرفة تأثير الجين المنتخب على انتاج الحليب والصفات التكاثرية للحيوانات المستخدمة في التجربة وباستخدام البرنامج الاحصائي SAS statistical analysis system, (Version 9.2,2008)، حيث استخدم النموذج الرياضي التالي لتقدير القيم التربويه لصفة انتاج الحليب:

$$y_{ij} = \mu + G_i + A_j + e_{ij}$$

بان اعلى نسبة تكرار جيني كانت مع الجين A حيث بلغت 0.60 , في حين ان نسبة التكرار الجيني للجين K بلغت 0.40 وهذا يتطابق مع ما ذكره<sup>(5)</sup> و لكنه يتناقض مع ماتوصل اليه<sup>(3)</sup> عندما كانت دراستهم عن ابقار الفريزيان في الهند، حيث وجدوا بان التكرار الجيني للجين K (0.59) في حين ان التكرار الجيني للجين A

تم تشكيل ال PCR على اساس (28µl) من خليط الحاوي على (1µl) من (DNA) و (2µl) من البرايمر المستخدم و (17µl) من الماء المقطر، تم وضعه في ال Master Mix و المجهز من شركة Bio near الكورية و المتكون مما يلي: [30 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 250 µM of each dNTP , 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Top Thermal DNA polymerase] ، و تم تشغيل جهاز Cycling وحسب البرنامج الخاص به والذي يتضمن: الدنتره الاولى , الدنتره, الارتباط , الاستطال m واخيرا" الامتداد النهائي وكمايلي : 95 درجة مئوية لمدة 5 دقائق يتبعها 95 درجة مئوية لمدة 30 ثانية يتبعها 51 درجة ولمدة 40 دقيقه ومن ثم 72 درجه لمدة 30 ثانية واخيرا" 73 درجة لمدة 3 دقائق . بعد الحصول على نتائج PCR تم ترحيل 6µl من مكونات ال PCR على هلام الاكاروز (1.8%) والذي تم تشكيله مع TBE

حيث ان :

$y_{ij}$ : هي القيم التربويه للصفات المشاهده

$\mu$ : المتوسط العام للسكان للعشيرة

$G_i$ : هي التأثير المحدود للجين في الاشكال الوراثية الظاهره

$A_j$ : التأثير العشوائي للحيوانات

$e_{ij}$ : الخطا العشوائي

### النتائج والمناقشه **Results and Dissection**:

وجدت ثلاث اشكال جينية لل 40 عينه من الابقار المحلية المهجنه بسلاله الفريزيان, وحسب ما موضح في الجدول رقم (1) و الشكل ( 2 و 1 ). اغلب هذه الحيوانات لاحظنا بانها تنتمي الى الشكل الجيني المتماثل AA و ذلك باستخدام تقنية RFLP-PCR . لوحظ ايضا

الحليب. لا توجد فروق معنوية من خلال تطبيق قاعدة هاردي واينبرج للمواقع الجينية المذكورة وبمستوى معنوية ( $P>0.05$ ).  
جدول (1): التكرار الجيني والتراكيب الوراثية لسلالة الفريزيان المهجن.

بلغ (0.41). لايجاد الانحرافات من خلال قاعدة هاري واينبرج تم استخدام مربع كاي للاشكال الجينية لجين DGAT1 للسلالة المستخدمة في دراستنا الحالية، حيث انها ترتبط مع الشكل الجيني لعينات الحيوانات وبالتالي تساعد بالانتخاب المباشر لتلك الحيوانات ذات المواقع الجينية الحاوية على نسبة عالية من الدهن في تركيب

Table (1): Gene Frequency and Genotype of Friesian Crossbred.

Breed	NO.	Allele Frequency		Genotype frequency			H.W.E.	
		A	K	AA	AK	KK	X <sup>2</sup>	P value
Friesia n	40	0.60	0.40	0.425	0.350	0.225	0.346	0.499

بالمقارنة مع بقية الاشكال الجينية الاخرى. اما الشكل الجيني AK لنفس السلالة فمتوسط كمية الدهن في عيناته بلغ  $3.68 \pm 0.139$ ، واخيرا" الشكل الجيني AA بلغ متوسط كمية الدهن في عيناته حوالي  $3.30 \pm 0.414$ ، اما نسبة البروتين فكانت أعلاها مع الشكل الجيني AA حيث بلغت  $2.72 \pm 0.18$ ، و أدناها مع الشكل KK وقد بلغت مع الاخير حوالي  $2.36 \pm 0.051$ . و تراوحت نسب اللاكتوز ما بين  $4.14 \pm 0.086$  و  $3.84 \pm 0.117$  للاشكال الجينية السابقة الذكر، وكما موضح في الجدول 2.

لوحظ وجود ثلاثة اشكال جينية هي AA و AK و KK في سلالة الفريزيان المهجن بالسلالات المحلية في محافظة بابل و هذا يشابه ماوجده (3) حيث كشف وجود ثلاثة اشكال جينية لجين ال DGAT1 عندما درسوا على سلالة الفريزيان وكانت الاشكال الجينية هي KK، AA و KA، فالشكل الجيني لسلالة الفريزيان المهجن KK لوحظ تواجده مرتبط مع العينة الذي يمتاز بكون متوسط كمية الدهن في حليبها حوالي  $4.09 \pm 0.206$ ، و هذا يشابه ما توصل اليه (3) عندما ذكر بان الشكل الجيني KK هو الشكل الاعلى انتاجية والافضل

جدول (2): الاشكال الجينية و مكونات الحليب الخاصة بكل شكل جيني.

Table (2): Genotypes and Milk Composition for Per Genotype.

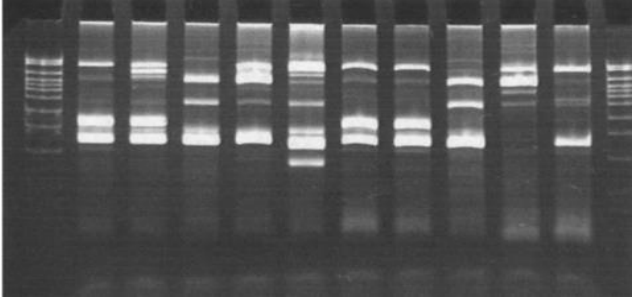
Breeds	Genotypes	Fat%	Protein%	Lactose%
Frisian	KK	$4.09 \pm 0.206$	$2.36 \pm 0.051$	$3.74 \pm 0.120$
	AK	$3.68 \pm 0.139$	$2.57 \pm 0.251$	$4.14 \pm 0.086$
	AA	$3.30 \pm 0.414$	$2.72 \pm 0.180$	$3.84 \pm 0.117$

نسبة دهن، و هذا يشابه ما توصل اليه الباحث (7) عندما كانت تتضمن دراستهم انواع الاشكال الجينية و تأثيرها على نسبة الدهن في ابقار الفريزيان في سلوفاكيا، حيث

مما سبق نستنتج بان الشكل الجيني KK يمثل عينات الحليب والتي تحوي على نسبة عالية من الدهن في عيناتها بالمقارنة مع الشكل الجيني AA والذي يمثل اقل

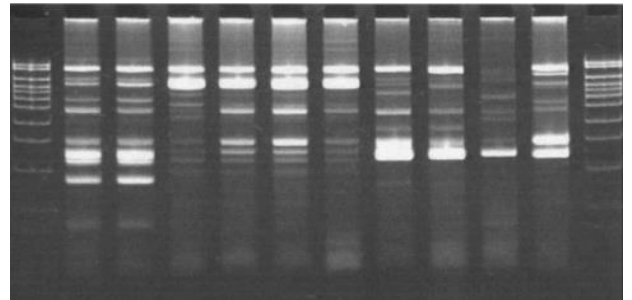
حينما درسوا على الماشية السلوفاكية، ولكنه يتناقض مع مذكوره<sup>(1)</sup> عندما ذكروا بأن الشكل الجيني AA هو الاعلى مقارنة" مع الشكل الجيني الاخر (KK) في دراستهم على الدهن الموجود في حليب الابقار.

M AK AK AK AK AK AK AK AA AK



وجدوا بأن الشكل الجيني KK هو الاعلى من حيث نسبة الدهن في العينات المستخدمة، وايضا يتطابق مع ما ذكره<sup>(5)</sup> حيث وجدوا بأن الشكل الجيني KK هو الاعلى في نسبة الدهن بالحليب بالمقارنة مع الشكل الجيني AA

M AK AK AA AK AK KK AK AK KK AK



الشكل (1, 2): يوضح الاشكال الجينية لعشرين عينة دم باستخدام البرايمر المذكور و تقنية RFLP-PCR

3. Patel, R. K., J. B. Chauhan, K. J. Soni and K. M. Singh. 2009. Genotype and Allele Frequencies of *DGAT* 1 Gene in Indian Holstein Bulls. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 3(4): 385 – 388.
4. Pascoal, A., M. Prado, J. Castro, A. Cepeda, J. Barrosvelasquez. 2004. Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *In Eur. Food Res. Technol* 218, P: 306 – 312.
5. Lenka, L., M. Bauer, P. Chrenek, Z. Lackova, J. Sorocinova, V. Petrovic, and G.

#### REFERENCES:

1. Argaman, A., K. Mida, B.C. Cohen, and K. Hettinga. 2013. Milk fat content and *DGAT1* genotype determine lipid composition of the milk fat globule membrane. *PLoS One*. J., 18: 8(7).
2. Kaupe, B., H. Brandt, E. M. Prinzenberg and G. Erhardt. 2007. Joint analysis of the influence of *CYP11B1* and *DGAT1* genetic variation on milk production, static cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science*, 85: 11-21.

(DGAT) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 99: 9300-9305.

Kovac. 2013. Detection of DGAT1 gene polymorphism and its effect on selected biochemical indicators in dairy cows after calving. ACTA VET. BRNO, 82: 265–269.

6. Sambrook, J., and Russell, R.W.(2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, N.Y.
7. Tomka, J., K. Vasickova, M. Oravcova, M. Bauer, J. Huba, D. Vasicek, and D. Peskovicova. 2016. Effects of polymorphisms in DGAT1 and LEP genes on milk traits in Holstein primiparous cows. Mljekarstvo J., 66 (2): 122-128.
8. Tomar, S., S. 2011. Textbook of Animal Breeding. Kalyani Publishers, New Delhi, India.
9. Winter, A., W. Kramer, F. A. O. Wernere, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J. E. Womack, G. Thaller and R. Fries. 2002. Association of a lysine 232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase