بررسی مولکولی بیماری BLAD در گاوهای نر مُوّلد مرکز اصلاح نژاد دام شمال‌غرب و غرب کشور

ام‌البنین پیراهری[۱]، سلمان نومی[۲]، محمدرضا بادامی[۳]، قربان الیاسی زرین قبایی[۴] و ایرج غفاری[۵]

چکیده

بیماری‌های ژنتیکی و مغلوب اتوزومی در گاو اکثراً وابسته به نـژاد بـوده و در برخـی از نژادهـا مـشاهده می‌شود. یکی از این بیماری‌های رایج نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون (BLAD) اسـت. ایـن بیمـاری ژنتیکی تاکنون در نژاد هلشتاین مشاهده شده است. اساس مولکولی این بیماری جهش نقطه‌ای در ژن CD_{18} و در موقعیت نوکلئوتید ۳۸۳ می‌باشد که با این جهش نقطه‌ای، نوکلئوتید آدنین جایگزین گوآنین شـده و در نتیجه‌ی آن در موقعیت ۱۲۸ ساختمان پروتئینی، اسید آسپارتیک جایگزین گلایسین شده اسـت (D۱۲۸G). در حال حاضر، تشخیص این نقص ژنتیکی در گاو با استفاده از روش PCR-RFLP و آنزیم‌های برشی TaqI و HaeIII امکان‌پذیر است. در این تحقیق، DNA نمونه‌ی خون گاوهای نر مولـد و اسـپرم‌هـای تولیـدی مرکـز اصلاح نژاد دام شمال‌غرب و غرب کشور پس از استخراج و تعیین کمّیت و کیفّیت، جهت تکثیر ناحیه‌ی مولد بیماری از روی ژن CD_{18} به طول ۱۰۱ جفت باز استفاده شد. محصول PCR بـر روی ژل آگـارز ۲٪ ارزیـابی شده و در نهایت محصولات تکثیر شده با استفاده از آنزیم برشی TaqI هضم و فرآورده‌های برش داده شده بر روی ژل آکریلامید ۱۰٪ الکتروفورز و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شد. با توجه با الگوهای باندی تولید شـده، بیماری BLAD مشاهده نشد، لذا کلیه‌ی اسپرم‌های تولید شده و دام‌های نگه‌داری شده در این مرکز عاری از بیماری ژنتیکی نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون بوده و با کد TL مشخص شدند.

واژگان کلیدی: بیماری، گاو نر، هلشتاین، BLAD، PCR-RFLP، TaqI.

۱-کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام سازمان جهاد کشاورزی استان آذربایجان‌شرقی (نگارنده‌ی مسئول)
hpirahary@yahoo.com
۲-کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام سازمان جهاد کشاورزی استان آذربایجان‌شرقی
تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۳
۳- دکترای دامپزشکی مرکز اصلاح نژاد دام شمال‌غرب و غرب کشور
تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۳۰
۴- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی
۵- کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد مرکز اصلاح نژاد دام شمال‌غرب و غرب کشور

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یکی از محدودیت‌های انتخاب بر اساس رکوردهای فنوتیپی این است که در حین انتخاب، بسیاری از ژن‌های مفید احتمالاً نادیده گرفته می‌شوند یا به‌طور مؤثر مورد استفاده واقع نمی‌شوند و از طرفی دیگر ممکن است به‌طور ناخواسته تعدادی از نقایص ژنتیکی نظیر بیماری BLAD[۱]، CVM[۲]، و DUMPS[۳] به نسل بعد انتقال یابد (۵). چنین وضعیتی نیاز به کاربرد تکنیک‌های متنوع ژنتیک مولکولی را که منجر به باز شدن دریچه‌ای به جعبه‌ی سیاه ژنوم می‌گردد، روز به روز افزایش می‌دهد. هرچند تا باز کردن این جعبه‌ی اسرارآمیز راه درازی در پیش است ولی با این حال تکنیک‌های موجود امکان شناسایی بعضی از ژن‌های مهم و مفید را در برنامه‌های اصلاحی فراهم نموده است (۶).

نقص چسبندگی لکوسیت گاوی در گاو هلشتاین یک بیماری ژنتیکی مغلوب غیرجنسی[۴] است. اساس مولکولی این بیماری ژنتیکی یک جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید ۳۸۳ ژن CD_{18} می‌باشد که منجر به جایگزینی باز آلی آدنین به‌جای گوانین جایگزین شده است. در نتیجه در مولکول CD_{18} در موقعیت اسیدآمینه‌ی ۱۲۸، آسپارتیک اسید جایگزین گلایسین شده است.

بر اثر جهش ایجاد شده، گیرنده‌های موجود در غشای گلبول‌های سفید تغییر ماهیت داده و دیگر نمی‌توانند اتصال قوی و مؤثری را به‌مدت طولانی با دیواره‌ی رگ ایجاد نموده و توانایی عبور از دیواره‌ی رگ برای مقابله با عفونت را از دست می‌دهد، در نتیجه حیوان قادر نخواهد بود بیماری باکتریایی را به‌طور کامل از بین ببرد. از این‌رو، ممکن است عامل عفونت مقاومت کرده و مجدداً عود نماید. تاکنون منابع مختلفی حضور تنها یک آلل را به‌عنوان عامل این بیماری در جمعیت گاوهای هلشتاین تایید کرده‌اند. دام‌های حامل آلل جهش یافته، بیماری را نشان نمی‌دهند اما علایم کلینیکی در گوساله‌های بیمار هموزیگوت شامل کاهش رشد، التهاب روده، عود پنومونی، عفونت‌های مکرر، ریختن پشم و دندان‌ها، زخم‌ها و قرحه‌های لثه، افزایش مداوم نوتروفیل‌های خون، التهاب بافت‌های اطراف دهان، طولانی شدن مدت التیام زخم‌ها، پاسخ ضعیف به عفونت‌های قارچی و باکتریایی، کاهش مقاومت طبیعی اعضای مختلف بدن نسبت به عفونت‌های مختلف باکتریایی و قارچی و ناتوانی عمیق برای ایجاد یک پاسخ التهابی طبیعی به حضور فلور طبیعی یا پاتوژن‌ها در بافت‌های مبتلا، گزارش شده است که در نهایت به مرگ زود هنگام دام منجر می‌شود (۱، ۲، ۳، ۷، ۸، ۹ و ۱۱).

تاکنون درمانی برای این بیماری ژنتیکی گزارش نشده و گاوهای مبتلا بسته به درجه‌ی ابتلا و جایگاه عفونت و ارگان‌های مبتلا اغلب در ماه‌های اول زندگی تلف می‌شوند. در حال حاضر دقیق‌ترین، ارزان‌ترین و سریع‌ترین روش تشخیص گاوهای حامل آلل جهش یافته بیماری BLAD، آزمون DNA است که اساس این روش بر شناسایی جهش در ژن CD_{18} استوار است. برای این منظور با استفاده از آنزیم‌های برشی نظیر

۱- Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency
۲- Complex Vertebral Malformation
۳- Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase
۴- asexual

Archive of SID

www.SID.ir

TaqI و HaeIII قطعه‌ی تکثیر شده را هضم می‌کنند که جهش ایجاد شده ناحیه‌ی قطع شونده را برای آنزیم TaqI از بین برده و ناحیه‌ی برشی جدیدی را برای آنزیم HaeIII ایجاد می‌کند با الکتروفورز فرآورده‌های هضم شده بر روی ژل‌های آگارز و یا پلی‌آکریلامید، امکان تفکیک ژنوتیپ‌ها با دقت ۱۰۰ درصد وجود دارد. در کاتالوگ‌های اسپرم دام‌های حامل با کد BL[1] و دام‌های سالم با کد TL[2] معرفی شده و ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب به‌علت مرگ زود هنگام جنینی قابل تعیین کد نمی‌باشد. در حال حاضر ژن CD_{18} گاوی و جهش نوکلئوتیدی موجود در آن توالی‌یابی شده است که به غیر از جهش ایجاد شده در ناحیه‌ی ۳۸۳ ژن CD_{18}، جهش دیگری نیز یافت شده که در آن سیتوزین جایگزین تیمین بین آلل سالم و حاملBLAD در نوکلئوتید ۷۷۵ شده که یک جهش خاموش[3] می‌باشد (۱۳).

مواد و روش‌ها

برای اجرای این تحقیق تعداد ۴۶ نمونه پایوت اسپرم تولید شده در مرکز اصلاح نژاد دام شمال‌غرب و غرب کشور و ۱۵ نمونه‌ی خون از گاوهای نر هلشتاین موجود در آن مرکز استفاده شد. برای جلوگیری از انعقاد خون به‌میزان ۰/۱ حجم نمونه‌ی خون، محلول EDTA (۰/۵ مولار با PH =۸) به لوله‌های حاوی خون اضافه شد. استخراج DNA از ۵۰ میکرولیتر خون و ۱۰۰ میکرولیتر اسپرم منجمد با استفاده از کیت DIAtom DNA Prep بر اساس روش بوم و همکاران (۷) که توسط شیخایف (۱۲) تغییراتی در آن داده شده بود، انجام گرفت. جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA از روش‌های الکتروفورز و اسپکتروفتومتری[4] استفاده شد. برای تکثیر ژن CD_{18} گاو، آغازگرهای BLAD۱ و BLAD۲ با توالی زیر مورد استفاده قرار گرفت (۱۴) که شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[5] (PCR) در جداول ۱ و ۲ ارایه شده است:

BLAD۱:
(5'-GTCAGGCAGTTGCGTTCAA-3')

BLAD۲:
(5'-GAGGTCATCCACCATCGAGT-3')

برای تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز ۲ درصد از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. برای تعیین ژنوتیپ‌های ژن CD_{18}، برش آنزیمی محصولات PCR با استفاده از ۵ واحد آنزیم برشی TaqI به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. محصولات هضم شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۱۰ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند.

۱- BLAD Carrier
۲- Test Free as Carrier of BLAD
۳-Silent Mutation
۴- Spectrophotometeric
۵- Polymerase Chain Reaction

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- پروفیل حرارتی مورد استفاده برای تکثیر ناحیه مورد نظر ژن $CD_{۱۸}$ گاو

Step	**دما** (درجه‌ی سانتی‌گراد)	**زمان**	**چرخه**
Initial Denaturation	۹۵	۳'	۱
Denaturation	۹۵	۴۵"	
Annealing	۵۹	۳۰"	۳۵
Extension	۷۲	۴۵"	
Final Extension	۷۲	۱۰'	۱

جدول ۲- غلظت مواد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

Ingredient	غلظت نهایی
Taq DNA Polymerase	۱U
PCR Buffer	۱X
$MgCl_2$	۱/۵ mM
dNTPs	۰/۲ mM
DNA	۷۵ ng
BLAD1 Primers	۱۰pmol
BLAD2 Primers	۱۰pmol

نتایج و بحث

DNAی استخراج شده به روش کیت DIAtom DNA Prep، مولکول‌های بزرگی حاصل نمود که بر روی ژل آگارز هم سطح با λDNA حرکت می‌کردند (شکل ۱). هر چند که، تعیین دقیق طول قطعات DNAی استخراج شده ممکن نبود ولی به‌نظر می‌رسد که اندازه‌ی این مولکول‌ها جهت کارهای مهندسی ژنتیک و تحقیقات مولکولی بسیار مناسب باشد که این امر قدرت روش سلیکاژل را در استخراج مولکول‌های DNA نمایان می‌سازد. در کلیه‌ی نمونه‌های تکثیر شده قطعه‌ی ۱۰۱ جفت بازی از ژن $CD_{۱۸}$ بدون هیچ گونه باند غیر اختصاصی موجود بوده (شکل ۲) و شرایط تکثیر ژن بسیار عالی می‌باشد و انتظار می‌رود که مراحل و گام‌های بعدی تشخیص بیماری BLAD بدون مشکل انجام شود. قطعات مشاهده شده در بین دو سایز مارکر $PUC_{۱۹}$ دارای مقادیر بسیار بالایی از DNA می‌باشد که برای برش آنزیمی ایده‌آل است. قطعه‌ی تکثیر شده کمی پایین‌تر از قطعه‌ی ۱۱۰ جفت بازی سایز مارکر قرار گرفته است و با توجه به این‌که توالی قطعه‌ی تکثیر شده در دسترس می‌باشد (شکل ۳)

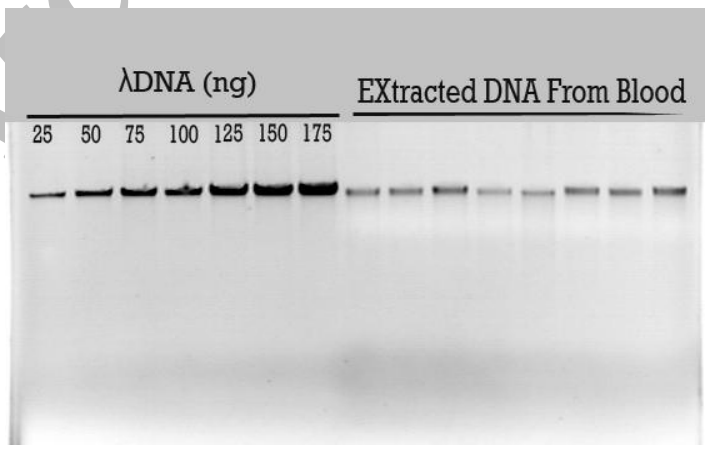
Archive of SID

www.SID.ir

نشان دهنده‌ی تکثیر موفقیت‌آمیز و صحیح ناحیه‌ی چند شکل ژن کنترل کننده‌ی بیماری ژنتیکی نقص چسبندگی گلبول‌های سفید (BLAD) است.

در برش آنزیمی ناحیه‌ی تکثیر شده با توجه به محل برش آنزیم TaqI انتظار این بود که برای نمونه‌های گاوهای ناقل BLAD چهار قطعه ۸۴، ۵۲، ۳۲ و ۱۷ جفت بازی حاصل شود و نمونه‌هایی که عاری از بیماری باشند سه قطعه ۵۲، ۳۲ و ۱۷ جفت بازی حاصل نمایند که در عمل هم تمامی نمونه‌ها سه قطعه ایجاد کردند و همگی با کد TL (عاری از بیماری) مشخص شدند (شکل ۴). در صورتی‌که، نصیری و همکاران (۱۰) از تعداد ۳۰ رأس گاو نر موّلد مرکز اصلاح نژاد عباس‌آباد یک مورد را به‌عنوان حامل بیماری شناسایی کردند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این بررسی، می‌توان کد TL را بر روی تمامی پایوت‌های اسپرم تولیدی ثبت کرد تا واحدهای گاوداری بدون هیچ گونه نگرانی از شیوع آلل بیماری BLAD تکنیک تلقیح مصنوعی را با استفاده از این پایوت‌ها انجام دهند و از طرفی این تحقیق نشان داد که تکنیک PCR-RFLP با اطمینان ۱۰۰٪ می‌تواند حاملین بیماری BLAD را در جمعیت گاوهای پروف شده شناسایی نموده و از انتشار این بیماری ژنتیکی در جمعیت گاوهای شیرده و با ارزش هلشتاین جلوگیری نماید و از بروز خسارتی که در اثر مرگ گوساله‌های متولد شده در اوایل سن متوجه دامدار می‌گردد پیشگیری نماید.

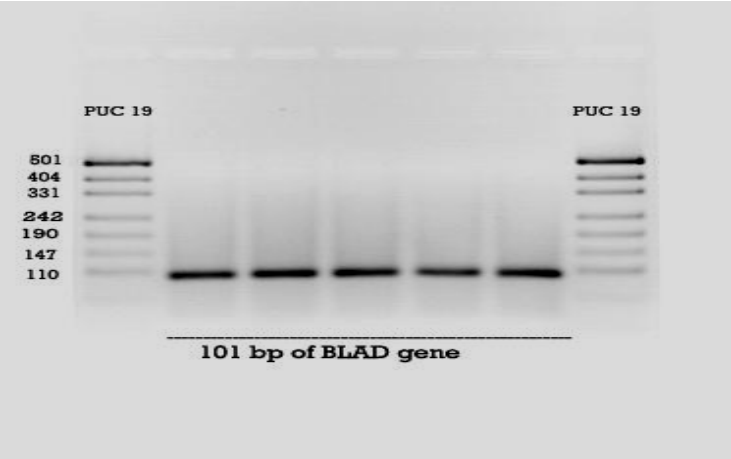
با توجه به این‌که، هزینه انجام آزمایش‌های ژنتیکی برای تعیین ژنوتیپ ژن‌های اقتصادی و بیماری‌های ژنتیکی بسیار پایین‌تر از هزینه‌هایی است که در اثر مرگ و میر دام و یا کاهش تولید متوجه دامدار می‌گردد، انتظار می‌رود که مراکز اصلاح نژاد قبل از تولید اسپرم برای تلقیح مصنوعی و پخش آن در جمعیت‌های دامی نسبت به انجام آزمایش‌های ژنتیکی اقدام و ژنوتیپ‌های حاصل را بر روی شناسنامه اسپرم‌ها درج نمایند.



شکل ۱- نمونه‌های DNAی استخراج شده از گاوهای نر و اسپرم‌های تولیدی در کنار DNAی استاندارد λ

Archive of SID

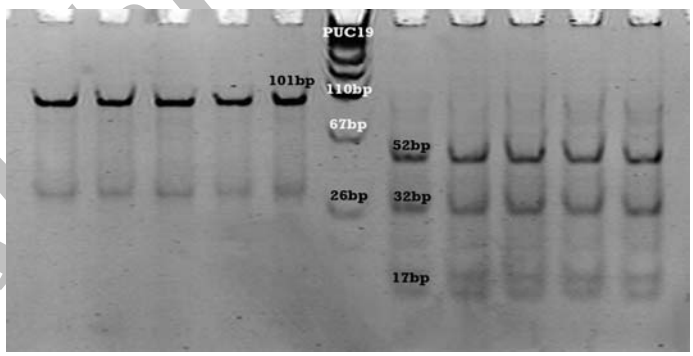
www.SID.ir



شکل ۲- تکثیر قطعه ۱۰۱ جفت بازی از ناحیه موثر در ایجاد BLAD بر روی ژن CD18

*GTCAGGCAGTTGCGTTCAA*CGTGACCTTCCGGAGGGCCAAGGGCTACCCCAT↓*CGA*
CCTGTACTACCTGATGGACCTCTCCT*ACT↓CGATGGTGGATGACCTC*

شکل ۳- توالی ناحیه‌ی تکثیر شده‌ی ژن $CD_{۱۸}$ گاو با پرایمرهای BLAD۱ و BLAD۲ (نواحی مورب)، ↓ محل برشی آنزیم TagI می باشد



شکل ۴- الکتروفورز فرآورده‌های PCR (چپ) و هضم آنزیمی همان قطعات با آنزیم TaqI (راست)

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور جناب آقای دکتر محمدامین حجازی، همکاران محترم آزمایشگاه ژنومیکس آن پژوهشکده و هم‌چنین، همکاران محترم مرکز اصلاح نژاد دام شمال‌غرب و غرب کشور سپاس‌گزاری می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

1- Agerholm, J.S., H. Houe, C.B. Jorgensen, and A. Basse. 1993. Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Holstein-Friesian cattle. II. Patho-anatomical description of affected calves. Acta Vet. Scand. 34: 237-243.

2- Andrews, A.H., J. Fishwick, and R.J. Waters. 1996. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in a one year old Holstein Friesian bull-The first report in the United Kingdom. Br. Vet. Journal. 152: 347-351.

3- Arrayet, J.L., A.M. Oberbauer, T.R. Famula, I. Garrett, J.W. Oltjen, J. Imhoof, M.E.J.R. Kehrli, and T.W. Graham. 2002. Growth of Holstein calves from birth to 90 days: the influence of dietary zinc and BLAD status. Journal Anim. Sd. 80: 545-552.

4- Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-Van Dillen, and J. van Der Noordaa. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology. 28 (3): 495-503.

5- Citek, J. and B. Blahova. 2004. Recessive disorder a serious health hazard. Journal Appl. Bbiomed. 2: 187-194.

6- Dekkers, J.C.M. 1999. Breeding Values for identified Quantitative Trait loci under Selection. Genet. Sel. Evol. 31: 421-436.

7- Gilbert, R.O., W.C. Rebhun, C.A. Kim, M.E.J. R. Kchrli, D.E. Shuster, and M.R. Ackermann. 1993. Clinical manifestations of leukocyte adhesion deficiency in cattle: 14 cases (1977-1991). J. Am. Vet. Med. Assoc. 202: 445-449.

8- Mueller, K.E., W.E. Bernadina, H.C. Kalsbeek, A. Hock, V.P.M.G. Rutten, and G.H. Wentink. 1994. Bovine leukocyte adhesion deficiency-Clinical course and laboratory findings in eight affected animals. Vet. Quart. 16: 65-71.

9- Nagahata, H., M.E.J.R. Kehrli, H. Murata, H. Okada, H. Noda, and G.J. Kociba. 1994. Neutrophil function and pathologic findings in Holstein calves with leukocyte adhesion deficiency. Am. J. Vet. Res. 55: 40-48.

10- Nassiry, M.R., A. Norouzy, F. Eftekhari Shahroudi, A. Javadmanesh, and M. Ali Shad. 2005. Investigation of two recessive disorders in breeder bulls of Abbas Abad animal breeding center. Iranian Journal of Biotechnology. 3: 125-128.

11- Olchowy, T.W.J., P.N. Bochsler, and M.G. Welborn. 1994. Clinicopathological findings in a Holstein calf with peripheral leukocytosis and leukocyte adhesion deficiency. Can. Vet. J. 35: 242-243.

12- Shaikhayev, G.O. 1995. Extraction of DNA from the whole blood by silica gel. Inc.Gene Biology. Moscow.

13- Shuster, D.E., B.T. Bosworth, and M.E.J.R. Kelnh. 1992. Sequence of bovine CD18 cDNA: comparison with human and murine sequences. Gene. 114: 267-271.

Archive of SID

www.SID.ir

14- Tammen, I., H. Klippert, A. Kuczka, A. Treviranus, J. Pohlenz, M. Stober, D. Simon, B. Harlizus. 1996. An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency. Res. Vet. Sci. 60: 218-221.

Archive of SID

www.SID.ir