تحقیقات تولیدات دامی
سال اول/ شماره دوم/ تابستان ۱۳۹۱ (۴۱ -۳۳)

شناسایی چندشکلی آلل‌های اگزون دو از ژن *BoLA-DRB3* در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران

غلامرضا نیکبخت بروجنی[1*]، محمد مهدی رنجبر[2]، فاطمه قاسمی[2]، فرزانه اسدیان[2]

۱- استاد گروه میکروبیولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران و ۲- دستیار تخصصی گروه میکروبیولوژی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت ۹۱/۴/۱۴- تاریخ پذیرش ۹۱/۷/۱۵)

چکیده

مجتمع اصلی سازگاری نسجی (*MHC*) شامل گروهی از ژن‌ها است که نقش مهمی را در پاسخ‌های ایمنی داشته و به سه دسته *MHC* کلاس ۱ و ۲ و ۳ تقسیم می‌شوند. در گاو *MHC* یا سیستم آنتی‌ژن لنفوسیتی به نام *BoLA* شناخته می شود و روی کروموزوم ۲۳ قرار دارد. ژن‌های اگزون ۲ از ژن *BoLA-DRB3* (*BoLA-DRB3. 2*) بخشی از *MHC* کلاس ۲ در گاو است که تنوع بسیار بالایی داشته و آلل‌های آن با مقاومت و حساسیت به بیماری‌ها و همچنین با خصوصیات باروری، رشد و تولید شیر در گاو مرتبط هستند. در این مطالعه چند شکلی *BoLA-DRB3.2* به وسیله روش *PCR-RFLP* روی ۳۵۰ نمونه خون گاو هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج *DNA* از نمونه‌های خون کامل *BoLA-DRB3.2* به وسیله روش *Seminested PCR* افزوده سازی شد و محصولات *PCR* به وسیله آنزیم‌های محدود الاثر *PsuI* ,*RsaI* و *HaeIII* برش داده شدند. در مجموع ۱۸ الگوی متفاوت در برش‌های آنزیمی مشاهده شد. با تحلیل الگوهای برش آنزیمی، ۴۸ آلل متفاوت و در این بین ۹ آلل جدید در جمعیت مورد مطالعه شناسایی شدند. در تحلیل جمعیتی، فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، میزان هموزیگوتی و هتروزیگوتی مورد انتظار و مشاهده شده سنجیده شد. نتایج این مطالعه نشان دهنده چند شکلی بالای *BoLA-DRB3.2* است. همچنین در مقایسه، فراوانی آلل‌های مستعد کننده به بیماری لکوز بیش از تب برفکی، ورم پستان و برخی بیماری‌های انگلی بود. شایان ذکر است که فراوانی آلل‌های مفید در صفات تولید شیر نیز مشابه با سایر جمعیت‌های بررسی شده بود.

واژه‌های کلیدی: ایران، گاوهای هلشتاین، *MHC, BoLA-DRB3.2, PCR- RFLP*

[*]نویسندهٔ مسئول: nikbakht@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کیفیت پاسخ دفاعی بر علیه عوامل آسیب رسان از جمله صفاتی است که به کدهای ژنتیکی به ارث رسیده بستگی دارد. از این رو یافتن نشانگرهایی برای شناسایی ساختار سیستم توارثی وتنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها و مطالعه مکان های ژنی و تصحیح کدهای ژنتیکی جهت انتخاب میزبان های مقاوم، ابزار قدرتمندی برای مبارزه با عوامل عفونی و بیماری ها است (Gibson *et al*., 2005). به عبارت دیگر، در کنار انتخاب صفات تولیدی، انتخاب ژنتیکی مقاومت نسبت به بیماری‌ها می تواند به طور همزمان به عنوان نوعی از کنترل بیولوژیک در یک استراتژی یکپارچه به کار گرفته شود. اصلاح ترکیب ژنتیکی جمعیت بر اساس مقاومت باید همزمان با اقدامات کنترل و پیشگیری و بویژه در کنار صفات تولیدی به صورت جدی لحاظ شود.

ژن‌های مجتمع اصلی سازگاری نسجی (*MHC*) به واسطه ارتباط با پاسخ های ایمنی و مقاومت و یا حساسیت به بیماری ها اهمیت ویژه ای در دامپزشکی و دامپروری دارند (Lewin *et al*., 1999). MHC در واقع مکان ژنی کد کننده آنتی ژن‌ها و پروتئین‌های سطحی لنفوسیت‌هایی است که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی دخالت دارند. وجود این مکان ژنی با توجه به نقشی که مولکول‌های آن در شناسایی آنتی ژن‌های خودی از انواع بیگانه ایفاء می‌کنند، یک نیاز اساسی برای بقای موجود زنده است (Williams *et al*., 1990). تاکنون سه کلاس عمده *MHC* در پستانداران مشخص شده که ملکول‌های *MHC* کلاس یک و دو، در اتصال به پپتیدهای ایمونوژن و عرضه آنها به لنفوسیت‌های *T* دخالت دارند. *MHC* کلاس دو، به صورت هتروداِیمر $\alpha\beta$ بوده و به طور گسترده در سلول‌های عرضه کننده حرفه‌ای آنتی‌ژن بیان می‌شود (Tizard, 2009). دومین‌های α_1 و β_1 واجد ناحیه اتصال پپتید هستند و پپتیدها پس از اتصال به این ناحیه توسط لنفوسیت‌های *T* کمکی $CD4^+$ شناسایی خواهند شد (Schaschl *et al*., 2004). در گاو این مکان ژنی *BoLA*[1] نامیده می‌شود و واجد سه خوشه ژنی کلاس‌های یک، دو و سه است که روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۲۳ قرار گرفته‌اند (Tizard, 2009). در این بین، کلاس دو خود به دو زیر گروه *IIa* و *IIb* تقسیم می‌شود. گروه *IIa* شامل نواحی ژنی *DRA*، *DRB1*، *DRB2*، *DRB3*، *DQA*، *DQA2*، *DQB1* و *DQB2* است. جایگاه ژنی *DRB3* از پلی مورفیسم (چند شکلی) بسیار بالایی برخوردار بوده و در تشکیل پاکت اتصال به پپتید شرکت می‌کند. هر آلل سبب ایجاد پاکت اتصالی متفاوتی می شود که مخصوص پپتید ویژه‌ای است. از این رو *DRB3* به عنوان نشانگر ژنی در ارتباط با بیماری‌ها و صفات ایمونولوژیک گاو مورد مطالعه قرار می‌گیرد. در اگزون شماره ۲ این جایگاه ژنی حدود ۸۸ آلل متنوع شناسایی شده که با صفات ایمنی دام ارتباط نزدیکی دارند (Sharif *et al*., 1998; Udina *et al*., 2003). گزارش‌های بسیاری مبنی بر ارتباط ژن *BoLA DRB3* با مقاومت و حساسیت به ورم پستان و بیماری‌های عفونی مانند بیماری‌های انگلی و لوکوز آنزئوتیک گاوان (*EBL*[2])، تب برفکی (*FMD*[3])، تب بدخیم نزله‌ای گاو، تیلریوز و همچنین خصوصیات تولیدی (مانند شیر، پروتئین و چربی) و میزان سلول‌های سوماتیک شیر (*Somatic cell count - SCS*) در گاو هلشتاین موجود است (Xu *et al*., 1993; Zanotti *et al*., 1996; Sharif *et al*., 1999; Garcia-Briones *et al*., 2000; Sharif *et al*., 2000; Ballingall *et al*., 2004).

روش‌هایی که تا به حال برای شناسایی و تعیین انواع آلل‌های *DRB3.2* استفاده شده‌اند، عبارتند از: روش‌های سرولوژیک، کشت مخلوط لنفوسیت‌ها، ایزوالکتریک فوکوسینگ[4]، روش توالی یابی مستقیم، *PCR-RFLP*، *PCR-SSCP*، آنالیز *هترودوپلکس*[5] ، استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی و ریزماهواره‌ها (Nikbakht and Emam, 2008). روش *PCR-RFLP* که قابلیت شناسایی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های

[1] Bovine Leukocyte Antigen
[2] Enzootic Bovine Leukosis
[3] Foot and mouth disease
[4] Isoelectric focusing
[5] *Heteroduplex analysis*

Archive of SID

www.SID.ir

جایگاه ژنی را دارد به طور رایج جهت ارزیابی تنوع ژنی استفاده می‌شود (Van Eijk *et al*., 1992; Takeshima *et al*., 2001;Babik, 2010). در این تحقیق تنوع آلل‌های ناحیه *DRB3.2* با روش *PCR-RFLP* در جمعیتی از گاوهای هلشتاین مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته و فراوانی آلل‌های مرتبط با حساسیت و مقاومت به برخی بیماری‌ها و پارامترهای تولید شیر در جمعیت تعیین شده است. در تحقیق حاضر در مقایسه با گزارش‌های پیشین تعداد بیشتری از نمونه‌ها با گستردگی جغرافیایی بیشتری مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین فراوانی آلل‌های *BoLA DRB3.2* مرتبط با بیماری‌های عفونی و صفات تولیدی و فراوانی آنها مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج *DNA*

۳۵۰ نمونه خون کامل (حاوی *EDTA*) مربوط به گاوهای هلشتاین ایرانی از استان های تهران و چهار محال بختیاری جمع‌آوری و جهت مطالعه انتخاب شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج *DNA* در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج *DNA* از نمونه‌های خون بر اساس روش ذکر شده توسط نیکبخت و همکاران صورت گرفت.

افزوده سازی *BoLA-DRB3.2* و آزمون چندشکلی طولی قطعات حذف شده (*RFLP*)

بررسی تنوع *BoLA-DRB3.2* و استفاده از آنزیم ها و مراحل کار بر اساس روش پیشنهادی Van Eijkو همکاران (۱۹۹۲) صورت گرفت، به استثنای آنکه به جای آنزیم *BstyI* از *PsuI* استفاده شد. سه آنزیم محدود کننده (Roch Co.) *RsaI*، *HaeIII* (Roch Co.) و *PsuI* (Fermentas Co.) جهت برش محصولات *PCR* و انجام آزمون *RFLP* استفاده شد. هضم آنزیمی روی ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله دوم *PCR* با طول ۲۸۴ جفت باز انجام گرفت و محصولات برش خورده در کنار نشانگر (Fermentas Co.) *MspI-digested pBR322* روی ژل اکریلامید ۱۲٪ به مدت یک ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت الکتروفورز و سپس با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد. تصاویر ژل ها با دستگاه *UV* ترانس لومیناتور ثبت شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

پرایمرها برای مرحله اول *PCR*

MHC-F1: 5′-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3′ and

MHC-R1: 5′-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3′

بودند. پرایمر (*Forward*) مشابه پرایمر افزوده سازی مرحله اول و پرایمر برگشتی مرحله دوم (Reverse) افزوده سازی *MHC-R2*: 5′-TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC-3′

بود.

تحلیل داده‌ها

تصاویر به دست آمده از ژل‌ها به کمک نرم‌افزار *Photo-captMw Ver. 99.03* تحلیل شده و طول قطعات برش خورده تعیین شد. برای هر نمونه اطلاعات مربوط به برش هر سه آنزیم با الگوهای مشخص شده توسط Van Eijk *et al.* (1992) و Maillard *et al.* (1999) مقایسه و الگوهای موجود شناسایی شدند. ترکیب الگوهای به دست آمده از مجموع سه آنزیم برای هر نمونه تعیین شد و پس از شناسایی شماره الگوی *PCR-RFLP*، آلل‌های موجود مشخص شد. درصد فراوانی هر یک از الگوهای به دست آمده و آلل‌های شناسایی شده، فراوانی ژنوتیپ‌ها، میزان هموزیگوتی و هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار با استفاده از نرم‌افزار *Popgene32* محاسبه شدند.

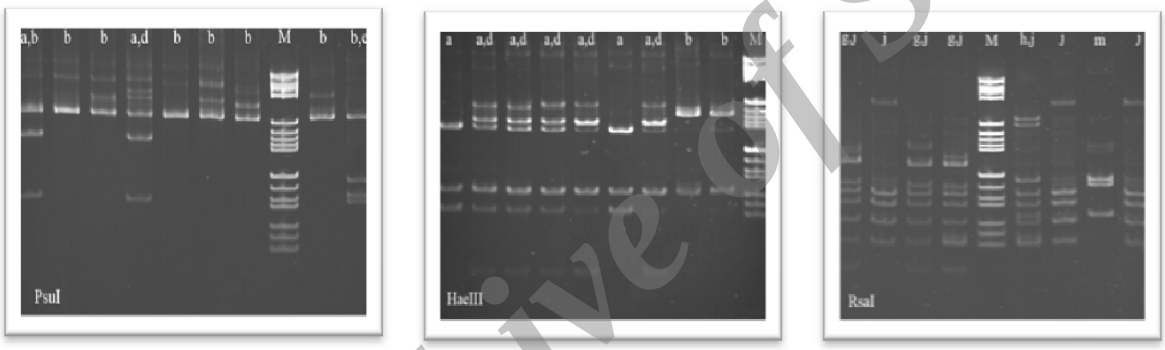
نتایج و بحث

با بررسی و مقایسه الگوهای به دست آمده ۱۸ الگوی متفاوت (a, b, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, s, u, v) در برش آنزیم *RsaI* (تصویر شماره ۱-A)، ۵ الگوی متفاوت (a, b, c, d, e) در برش آنزیم *PsuI* (تصویر شماره ۱-B) و ۶ الگوی متفاوت (a, b, c, d, e, f) در برش آنزیمی *HaeIII* (تصویر شماره ۱-C) مشاهده شد. در نهایت ۴۸ آلل متفاوت بر اساس ترکیب الگوهای برش سه آنزیم در گاوهای هلشتاین مشاهده شد و سپس درصد فراوانی هر یک از آلل‌ها مشخص شد (جدول شماره ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

فراوانی آلل‌های حساسیت و یا مقاومت به بیمارهای لکوز، تب برفکی، ورم پستان، کیست تخمدانی، تعداد سلول سوماتیک (SCC)، بیماری های انگلی و برخی شاخص های تولیدی نیز در جدول۱ نشان داده شده اند. آلل‌های جدید با حروف نشان داده شده اند و سایر آلل‌های بر اساس جدول ارائه شده توسط Van Eijk *et al.* (1992) شماره گذاری شدند. در این مطالعه از مجموع آلل‌های به دست آمده آلل‌های dea, ebc, gba, gbb, hba, icd, jba, nbd, nce و vaa جدید بوده و در مطالعات قبلی گزارش نشده بودند. آلل‌های 24* و 16* به ترتیب بیشترین فراوانی را با۱۷/۱۴و ۱۴/۸۶ درصد و آلل‌های 20*, 41*, vaa, 14*,dea,*43, icd, ebc, jba, و nce با ۰/۱۴ درصد کمترین فراوانی را به خود اختصاص داده اند. همچنین در کل ۱۴۱ نوع ژنوتیپ مشاهده شد که بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ‌های(16* ,16*) با ۷/۱۲ درصد، (24* ,24*) با ۴ درصد و ژنوتیپ‌های (22* ,23*) و (22* ,24*) با ۳/۷۱ درصد بوده است. از سوی دیگر فراوانی سایر ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت بین ۰/۲۸ تا ۱/۱۴ درصد از کل محاسبه شدند. هوموزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار با روش *Levene به ترتیب۰/۱۹۴۳ و ۰/۰۸۲۴ و هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار با روش Levene و Nei به ترتیب۰/۸۰۵۷، ۰/۹۱۷۶ و۰/۹۱۶۳ به دست آمد.



تصاویر شماره ۱- سه تصویر از نتایج الکتروفورز محصول *PCR* هضم شده با آنزیم‌های اندونوکلئاز *RsaI*، *HaeIII* و *PsuI* بر روی ژل پلی اکریلامید ۱۲ درصد. M: مارکر *pBR 322*

Fig. 1. Three images of electrophoresis resulted from digestion of PCR products by restriction endonuclease enzymes *RsaI*, *HaeIII*, *PsuI* on 12% polyacrylamide gel. M: marker pBR 322

Archive of SID

www.SID.ir

جدول شماره ۱- درصد فراوانی هر یک از آلل‌های *BoLA-DRB3.2* افزوده شده با روش *PCR-RFLP* در نمونه‌های گاو هلشتاین ایران و ارتباط آن با برخی از بیماری‌های شایع

Table 1. Frequency of each allele within the *BoLA-DRB3.2* that amplified by PCR-RFLP method in Iranian Holstein cow population and their associations with susceptibility resistance to some diseases.

Associations of allele with diseases susceptibility (S)/resistance (R) and production traits	Allelic Frequency (%)	Allele number	Enzyme cutting patterns RsaI/PsuI/HaeIII
R. to FMD	0.29	01*	aaa
-	0.14	*041	aba
R. to Ovarian cysts	0.14	*02	bba
S. to leukemia, R. to FMD, Mastitis and SCC	1.57	*03	bbb
S. to leukemia	1.57	*06	daa
-	0.14	*New	dea
R. to FMD, Increasing milk production, Increasing protein content of milk	1.86	*07	ecc
-	0.14	*New	ebc
S. to leukemia and Mastitis, Decreasing of Milk production and Protein/fat content of milk	7	*08	faa
-	3.14	*10	fba
S. to bovine *Dermatophilosis*	1.43	*09	fda
-	3.57	*51	gaa
-	0.29	*New	gba
-	0.57	*Nassiri	gbb
R. to Leukemia, Mastitis and SCC, Increasing all milk production factors	5.86	*11	gea
S. to FMD and R. to Leukemia	3	*12	haa
-	0.57	*13	hba
-	0.29	*14	hbb
-	0.29	*New	hbd
-	2	*15	iba
-	0.14	*New	icd
-	0.14	*New	jba
S. to Leukemia, R. to Mastitis , SCC, Ovarian cysts and Tick-borne diseases	14.86	*16	jbd
-	0.43	*54	jdb
-	0.14	*17	kbb
-	0.14	*43	kbf
-	0.29	*34	lab
-	1	*36	lba
R. to Tick-borne diseases	0.14	*20	lbb
-	0.43	*21	lbe
S. to FMD and R. to Tick-borne diseases	2.14	*18	lbf
-	0.43	*32	maa
S. to Leukemia and Mastitis, R. to Ovarian cysts, increasing depth of mammary gland	7.71	*22	mba
Resistance Leukemia, S. to Mastitis and SCC	9.86	*23	nba
S. to Leukemia, Mastitis and SCC, increasing fat content of milk	17.57	*24	nbb
-	0.29	*New	nbd
-	0.57	*33	nbf
-	0.14	*New	nce
R. to Leukemia	2	*25	oaa
Decrease in milk production and fat/protein content of milk	1.57	*26	oab
-	1.14	*37	oba
R. to Leukemia	1.29	*28	obb
S. to Leukemia and R. to Tick-borne diseases	1.57	*27	obf
-	1.43	*29	pcc
-	0.29	*52	sda
-	0.43	*40	uba
-	0.29	*46	vba
-	0.14	*New	vaa

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در مطالعه حاضر پلی‌مورفیسم *BoLA-DRB3.2* جمعیت گاوهای هلشتاین ایران همانند سایر مطالعات صورت گرفته توسط Nassiri *et al.* (2004) و Sharif *et al.* (1998) بالا بوده و شش آلل *BoLA-DRB3.2**8,*11,*16,*22,*23,*24 بسیار شایع بودند که فراوانی کل آنها در جمعیت حدود ۶۲/۵۷ درصد کل گزارش شده‌اند. آلل‌های 24* و 16* به ترتیب بیشترین فراوانی را در جمعیت گاو هلشتاین مورد مطالعه داشته‌اند.

در مطالعات گذشته آلل‌های 8* ,16* ,27* ,24* ,22* با حساسیت به بیماری لکوز گاوی مرتبط بوده‌اند (Xu *et al*., 1993; Zanotti *et* al., 1996) و در جمعیت مورد مطالعه ما در مجموع ۴۸/۲۸ درصد فراوانی کل آلل‌های به دست آمده را شامل می‌شوند. حضور بالای آلل‌های حساسیت به لوکوز استعداد بالای جمعیت را نسبت به ابتلای به بیماری نشان می‌دهد. از طرف دیگرآلل‌های 28* ,23* 12*,11* با مقاومت به بیماری لوکوز گاوی مرتبط می باشند (Juliarena *et al*.,1993; Xu *et al*., 2008). فراوانی این آلل‌ها در جمعیت مورد مطالعه ما در مجموع ۲۰ درصد بوده‌است. آلل‌های 12* و 18* حساس به بیماری تب برفکی و آلل‌های 1*,3* و7* با مقاومت به بیماری تب برفکی گاو مرتبط هستند (Garcia-Briones *et al*., 2000). در تحقیق حاضر فراوانی آلل‌های حساسیت به تب برفکی در مجموع ۵/۱۴ درصد و آلل‌های مقاوم در مجموع ۳/۷۲ درصد بوده است. Eveline *et al.* (2008) اظهار داشته‌اند که آلل‌های 23* و 8* با افزایش احتمال ابتلا به ورم پستان بالینی و آلل 23* با افزایش ورم پستان کلی فرمی و کشنده مرتبط هستند. Ledwidge *et al.* (2001) آلل 16* را به آلل مقاوم به ورم پستان و *SCC* در گاوهای هلشتاین کانادایی معرفی کردند. در جدیدترین مطالعه در این مورد آلل‌های 11* و 3* خطر ورم پستان و *SCC* هر دو را کاهش داده و آلل‌های23* و 24* ، *SCC* را افزایش می دهند. گاوهای با *SCC* پایین به میزان کمتری ورم پستان را نشان می‌دهند و مقاوم‌ترین گاوها به ورم پستان هستند (Rupp *et al*., 2007, Yoshida *et al*., 2009 ; Ledwidge *et al*., 2001, Eveline and Ibeagha-Awemu, 2008;). در تحقیق حاضر آلل‌های مربوط به حساسیت به ورم پستان به میزان قابل توجهی وجود داشته (۴۲/۱۴ در صد) و فراوانی آلل‌های مقاومت به ورم پستان در سطح کمتری به چشم می‌خورد (۲۲/۲۹ درصد). آلل‌های حساس و مقاوم به افزایش *SCC* نیز مشاهده شد (به ترتیب ۴۲/۸۴ و ۲۹/۲۲ درصد). آلل‌های 2* 22* و 16* در مطالعات پیشین (Sharif *et al*., 1998) به عنوان آلل‌های مقاومت و کاهش خطر به ابتلا به کیست تخمدانی معرفی شده بودند که در مطالعه اخیر در مجموع حدود ۲۲/۷۱ درصد از کل آلل‌ها را شامل می‌شدند. Martinez *et al.* (2006) در برزیل حضور آلل‌های 16* ,27* ,20 و 18*را با کاهش معنی‌دار تعداد کنه *بوفیلوس میکروپولوس (Boophilus microplus)* در گاوهای هلشتاین مرتبط دانستند و در این بین آلل 16* را موثرتر از سایرین دانستند. Maillard *et al.* (2003) نیز ارتباط قوی میان آلل‌های 9* و 045* با حساسیت به درماتوفیلوز گاوی را گزارش کردند. آلل‌های ذکر شده در تحقیقات Martinez *et al.* (2006) نیز، در جمعیت گاوهای مورد مطالعه ما همگی حضور داشتند (۱۸/۷۱ درصد). همچنین تنها یکی از دو آلل (09*) معرفی شده به عنوان آلل‌های مستعد به درماتوفیلوز گاوی در جمعیت مورد مطالعه ما حضور کمی داشت (۱/۴۳ درصد). در مورد ارتباط *BoLA* با ویژگی‌های تولیدی شیر در گاو هلشتاین نیز گزارش‌هایی وجود دارد. در بین آلل‌های *BoLA-DRB3*، آلل 7* با افزایش میزان شیر و پروتئین آن، آلل 8* و 26* با کاهش میزان شیر و پروتئین ارتباط داشته است. آلل 24* با افزایش چربی شیر (بدون ارتباط با ویژگی‌های دیگر) و آلل 8* مرتبط با کاهش کاهش چربی مرتبط بوده اند. همچنین Starkenburg *et al.* (1996) آلل‌های 11* و 13* را نیز موجب افزایش کلی شاخص های تولیدی شیر دانسته بوند. آلل‌های *BoLA-DRB3* با شاخص های فیزیکی نیز ارتباط دارند. به طور مثال آلل 22* با افزایش عمق غده پستانی ارتباط دارد (Rupp *et al*., 2007). در مطالعه حاضر تمامی آلل‌های ذکر شده حضور

Archive of SID

www.SID.ir

داشتند (جدول ۱) و آلل 7* فراوانی۱/۸۶ درصد داشته است، فراوانی آلل 8*و 26* و همچنین آلل 24* و 8* در مجموع ۸/۱۴ درصد بوده است. در این میان آلل‌های مرتبط با کاهش چربی شیر فراوانی نسبتاً بالایی داشتند (۲۴/۵۷ درصد). آلل‌های 11* و 13* که با افزایش کلی شاخص های تولیدی مرتبط هستند در جمعیت ما حضور قابل توجهی ندارند (۶/۴۳). از مجموع الگو های به دست آمده ۱۰ الگو کاملاً متفاوت با گزارشات موجود (Garcia-Briones *et al*., 2000، van Eijk *et al*.,1992; Maillard *et al*., 1999) بوده و جدید هستند. یکی از الگوهای جدید (gbb) توسط Nassiri *et al.* (2004) مشخص و به ثبت رسیده است (Menshad *et al*., 2006)، از این رو ۹ الگوی دیگر مشاهده شده در گاو هلشتاین ایرانی این تحقیق برای اولین بار گزارش می‌شوند و کاملاً جدید هستند.

آلل‌های *BoLA DRB3.2* در جمعیت گاوهای هلشتاین ایرانی از تنوع بالایی برخوردار بوده و آلل‌های مستعد کننده به بیماری های لکوز، تب برفکی، ورم پستان و آلودگی به کنه فراوانی قابل توجه در این جمعیت دارند. همچنین در این میان فراوانی آلل‌های مستعد کننده به بیماری لکوز گاوی بیشتر از سایرین بود. بر این اساس می‌بایست در برنامه‌های اصلاح‌نژاد، کنترل، پیشگیری و مدیریت واکسیناسیون به استعداد ابتلا به بیماری های ذکر شده در جمعیت گاو ایران و همچنین انتخاب دام های مقاوم توجه نمود. توجه به آلل‌های موثر در مقاومت و حساسیت به بیماری ها در کنار شاخص های تولیدی کمک شایانی به روند بهبود مشکلات اقتصادی گله‌های گاو هلشتاین ایران خواهد کرد.

فهرست منابع

Babik W. 2010. Methods for MHC Genotyping in Non-Model Vertebrates. Molecular Ecology Resources: 10: 237-251.

Ballingall K. T., Luyai A., Rowlands G. J., Sales J., Musoke A. J., Morzaria S. P., and McKeever D. J. 2004. Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*2703 and DRB3*1501 alleles are associated with variation in levels of protection against Theileria parva challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. Infection and Immunity (IAI): 72: 2738-2741.

Eveline M., and Ibeagha-Awemu P. K. 2008. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. Mammalian Genome: 19: 226-245.

Garcia-Briones M. M., . Russell G. C., Oliver R. A., Tami C., Taboga O., Carrillo E., Palma E. L., Sobrino F. and Glass E. J. 2000. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. Vaccines: 19: 1167-1171.

Gibson J. P. and Bishop S. C. 2005. Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: a global approach. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizootic: 24(1): 343-353.

Juliarena MA., Poli M., Sala L., Ceriani C., Gutierrez S., Dolcini G., et al. 2008. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene. Animal Genetics: 39(4): 432-438.

Ledwidge S. A., mallard B. A., Gibson J. P., Jansen G. B. and Jiang Z. H. 2001. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. Animal Genetics: 32: 219-221.

Lewin, H. A., Russell G. C. and Glass E. J. 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. Immunological Reviews: 167: 145-58.

Maillard J. C., Berthier D., Chantal I., Thevenon S., Sidibe I., Stachurski F., Belemsaga D., Razafindraibe H. and Elsen J. M. 2003. Selection assisted by a BoLADR/ DQ haplotype against susceptibility to bovine dermatophilosis. Genetics SelectionEvolution: 35: S193-S200.

Maillard J. C., Renard C., Chardon P., Chantal I., and Bensaid A.1999. Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. Animal Genetics: 30: 200-203.

Martinez M.L., Machado MA., Nascimento CS., Silva MVGB, Teodoro RL. and et al. 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (Boophilus microplus) resistance in cattle. Genetic and Molecular Research(GMR): 5: 513-524.

Menshad A., Eftekhar shahroodi F., Nassiry R., Valizadeh R. and et al. 1385. Study of genetic polymorphism and allelic frequency of BoLA-DRB3.2 loci in Mazandaran Waterbuffaloes. In: Proceeding of 9thCongress of Iranian genetic society 20-22 May. Tehran, Naghshine publication. pp. 481. (In Farsi)

.

Archive of SID

www.SID.ir

Nassiry M. R., Eftekhar shahroodi F., Mosafer J., Norouzy A., and Javadmanesh A. 2004 Distribution of bovine
lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. In: Proceeding of 11th Asian-Australian Animal Production Congress. Malaysia, pp. 266-268.

Nikbakht Gh. and Emam M. 2008. Polymorphism of BOLA-BRB 3.2 gene in Iranian Holstein cattle by PCR-RFLP method. Pajouhesh & Sazandegi: 77: 141-148. (In Farsi)

Rupp R., Hernandez A. and Mallard BA. 2007. Association of Bovine Leukocyte Antigen(BoLA)DRB3.2 with Immune Responce, mastitis and production and type traits. Dairy science: 90: 1029-1039.

Schaschl H., Goodman S. J. and Suchentrunk F. 2004. Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (Rupicapra r. rupicapra). Developmental and Comparative Immunology (DCI): 28: 265-277.

Sharif S., Mallard BA., Wilkie BN., Sargeant JM.,Scott HM., Dekkers JCM. and Leslie KE. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. Animal Genetics: 29: 185-193.

Sharif S., Mallard B. A., Wilkie B. N., Sargeant J. M., Scott H. M., Dekkers J. C. and Leslie K. E. 1999. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) with production traits in Canadian dairy cattle. Animal Genetics: 30: 157-160.

Sharif S., Mallard B. A. and Sargeant J. M. 2000. Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by Staphylococcus species. Veterinary Immunology and Immunopathology: 76: 231-238.

Starkenburg R. J., Hansen L. B. and Kehrli M. E. and Chester-Jones H**.** 1997. Frequencies and Effects of Alternative DRB3.2 Alleles of Bovine Lymphocyte Antigen for Holsteins in Milk Selection and Control Lines. Dairy Scinece: 80: 3411-3419.

Takeshima SN., Ikegami M., Morita M. and Nakai Yand Aida Y. 2001. Identification of new cattle BoLADRB3 alleles by sequence-based typing. Immunogenetics: 53: 74-81.

Tizard, I. R. 2009. Veterinary Immunology (7th ed.), Acquired immunity: Antigen-presenting receptors (pp. 67-76) Saunders, Philadelphia.

Udina IG, Karamysheva EE, Turkova SO, OrlovaAR and Sulimova GE. 2003. Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire andBlack pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene BoLA-DRB3. Russian Journal of Genetics: 39(3):306-317.

Van Eijk MJ., Stewart Haynes JA. and Lewin HA. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3gene distinguished by PCR-RFLP. Journal of Animal Genetic: 23(6): 483-496.

Williams JKG, Rubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA andTingley SV 1990. DNA polymorphisms amplified byarbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research, 18: 6531-6535.

Xu A., Van Eijk MJ., Park C. and Lewin HA. 1993. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. The Journal of Immunology: 151(12): 6977.

Yoshida T., Mukoyama H., Furuta H., Kondo Y., Takeshima S., Aida Y., et al. 2009. Association of the amino acid motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. Animal Science Journal: 80(5): 510-9.

Zanotti M, Poli G, Ponti W, Polli M, Rocchi M, Bolzani E, Longeri M, et al., 1996. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. Animal Genetics: 27(5): 337-341.

Archive of SID

www.SID.ir

Allelic polymorphism in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in Iranian Holstein cows

Gh. Nikbakht[1]*, M. M. Ranjbar[2], F. Ghasemi[2], F. Asadian[2]
1. Protessor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Resident in department of microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: 4-7-2012- Accepted: 6-10-2012)

Abstract

Major histocompatibility complex (MHC) of vertebrates comprises a group of genes, which plays a central role in immune response and includes MHC- class I, II and III. The bovine MHC system is known as BoLA and its corresponding genes are located on chromosome 23. The BoLA-DRB3.2 genes are part of the MHC class II in cattle. These genes are highly polymorphic, found to be associated with resistance/susceptibility to infections and also with fertility, growth and milk production parameters. Polymorphism of exon 2 of the BoLA-DRB3 gene was detected by the PCR-RFLP method in 350 Iranian Holstein cattle. After DNA extraction, second exon of BOLA-DRB3 was amplified by the seminested PCR method. The fragments produced by amplifying second exon were cut by three enzymes, RsaI, PsuI and HaeIII. In restriction fragment analysis 18, 5 and 6 different allelic patterns were observed for RsaI, PsuI and HaeIII restriction enzymes, respectively. In total, 48 different alleles were detected where ۹ out of 48 alleles were previously unreported. Allelic frequencies, genotype frequencies, expected and observed homozygosty and heterozygosity were calculated. The other step was evaluating the frequencies of alleles mediating resistance and susceptibility to Bovine leukosis(BLV), Foot and mouth disease (FMD), mastitis and somatic cell count (SCC), Cystic ovarian disease, some parasitic infections and increasing or decreasing milk production traits. The result of this study indicates that the exon 2 region of BoLA-DRB3 gene is highly polymorphic in the Iranian Holstein cattle. Also the high presence of alleles that are sensitive to BLV, mastitis, FMD and to some extent tick borne disease was a remarkable point. Alleles associated with susceptibility to BLV were most frequent. Frequency of alleles associated with milk production traits was similar to previous studied populations.

Key words: Iranian, Holstein cow, PCR-RFLP, BoLA-DRB3.2, MHC

Archive of SID

*Corresponding author: nikbakht@ut.ac.ir

www.SID.ir