

بررسی تنوع ژن BoLA-DRB3.2 در گاوهای هلستاین ایرانی با استفاده از روش PCR-RFLP

● غلامرضا نیکبخت بروجنی و ● سید مهدی امام

گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،

تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۶

Email: nikbakht@ut.ac.ir

چکیده

در حیوانات با برنامه‌های اصلاح ژنتیکی می‌توان مقاومت نسبت به بیماری‌ها را افزایش داد. MHC از جمله ژن‌های مهمی است که نقش کنترلی آن در مقاومت و پاسخ ایمنی میزبان به بیماری‌ها به خوبی مشخص شده است. پاسخ اختصاصی به پادگن‌ها وابستگی زیادی به ژن‌های MHC داشته و کشف این ارتباط می‌تواند برای درک واکنش‌های متقابل میزبان و عامل بیماری‌زا ارزشمند باشد. در گاو بین ناحیه ژنتیکی DRB3 (MHC class II) با مقاومت یا حساسیت نسبت به بیماری‌های عفونی ارتباط نزدیکی وجود دارد. در این مطالعه با استفاده از روش PCR-RFLP، تنوع ژنتیکی اگزون ۲ ژن BOLA-DRB3 در ۵۵ نمونه از گاوهای هلستاین ایرانی تحت بررسی قرار گرفت. ۲۶ آلل مختلف در این بررسی شناسایی شدند و فراوانی هر یک از آلل‌ها نیز محاسبه گردید. از میان مجموع آلل‌های بدست آمده در این بررسی دو ترکیب (gba و pec) تا کنون گزارش نشده بودند. فراوانی آلل‌هایی که در مطالعات قبلی به عنوان عوامل حساسیت و یا مقاومت نسبت به برخی از بیماری‌ها مانند لکوز، تب برفکی و ورم‌پستان استافیلوکوکی معرفی شده بودند نیز در جمعیت مورد مطالعه تعیین گردید. فراوانی بالای آلل‌های مرتبط با حساسیت نسبت به لکوز و تب برفکی و شیوع کم آلل‌های ایجاد حساسیت نسبت به ورم‌پستان می‌تواند به دلیل دیدگاه‌های خاص در برنامه‌های اصلاح نژاد گاو شیری باشد که معمولاً با عدم توجه به بیماری‌هایی که موجب خسارت‌های غیر مشهود اقتصادی می‌شوند، همراه است.

کلمات کلیدی: هلستاین ایرانی، PCR-RFLP، BOLA-DRB3، MHC

Pajouhesh & Sazandegi No 77 pp: 141-148

Polymorphism of BOLA-BRB 3.2 gene in Iranian holstein by use of PCR-RFLP method

By: Gh. Nikbakht Brojeni and S.M. Emam, Member of Scientific Board of Faculty of Veterinary, Tehran University

Enhancing disease resistance in animal production can be achieved by genetic improvement programs. The best-characterized genetic control of disease resistance and immune response in animals is that associated with the MHC. Respond to specific antigens is closely related to MHC genes and their associations might therefore provide precious answers to main questions about the host pathogen interactions. In cattle there is an association between possession of certain BoLA-DRB3 locus (MHC class II) and resistance or susceptibility to infectious diseases. Polymorphism of exon 2 of the BoLA-DRB3 gene was investigated by the PCR-RFLP method in 55 Iranian Holstein cattle. In this study, 26 different alleles were recognized. Among those identified are known alleles as well as 2 previously unrecognized alleles. As a second goal, allelic frequencies were determined in a total sample. Frequencies of alleles mediating resistance and susceptibility to leukemia, FMD and mastitis were revealed. High frequency of the alleles related to FMD and EBL in Iranian cattle and low level of mastitis susceptible alleles could be due to special point of view in breeding programs neglecting resistance to diseases that have no obvious economic burden.

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

مقدمه

ژنی کاذب است و تک ژن DRA تنوعی ندارد (۱۳، ۱۹، ۲۳). به دلیل نقش کلیدی BoLA در پاسخ‌های ایمنی، ارتباط با بیماری‌های عفونی و تنوع ژنتیکی آن در ارتباط با تاریخ تکامل، در دو دهه اخیر مطالعات بسیاری روی این ژن انجام گرفته است (۱۵). گزارشات زیادی مبنی بر ارتباط BoLA با خصوصیات ایمنولوژیک (۴، ۶، ۸، ۹)، مقاومت یا حساسیت نسبت به بیماری‌های مختلف عفونی مانند: لوز انزوتیک گاوان (EBL)، (۲۵، ۲۶) اورام پستان (۱۷، ۲۱)، تب برفکی (۹، ۱۰)، تیلریوز گاو (۶) و همچنین خصوصیات تولیدی در گاو هلشتاین (۲۰) وجود دارد. تاکنون روش‌های گوناگونی مانند: سرولوژی، کشت مخلوط لئوسیت‌ها^۱، ایزوالکتریک فوکوسینگ^۲، PCR-RFLP^۳، آنالیز هترو دوپلکس^۴، استفاده از الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی به منظور تعیین انواع آلل‌های اگزون دو ژن DRB3 مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۴، ۲۲). در این بررسی از روش PCR-RFLP که مورد تایید انجمن بین المللی ژنتیک حیوانات است و از میان روش‌های مذکور یکی از توانمندترین آن‌ها در تفکیک آلل‌ها در ناحیه DRB3,2 به شمار می‌رود (۱۳)، جهت بررسی تنوع و تعیین آلل‌های ناحیه مذکور از گاوهای هلشتاین ایران استفاده شده است.

مجتمع اصلی سازگاری نسجی^۱ (MHC) ناحیه‌ای از ژنوم است که پروتئین‌های سلولی دخیل در پاسخ‌های ایمنی را رمز می‌کند. تا کنون سه کلاس عمده MHC در پستانداران مشخص شده است. ملکول‌های MHC کلاس یک و دو، در اتصال به پپتیدهای ایمونوژنیک و عرضه آن‌ها به لئوسیت‌های T دخالت دارند. MHC کلاس دو، به صورت هترو دایمر $\alpha\beta$ بوده و به طور گسترده در سلول‌های عرضه کننده پادگن (APC) بیان می‌شود (۱، ۳، ۲۳). ناحیه‌های β_1 و α_1 ناحیه اتصال پپتید (PBR)^۲ هستند و پپتیدهای آنتی‌ژنیک پس از اتصال به این ناحیه توسط لئوسیت‌های T کمکی CD_4^+ شناسایی می‌شوند (۳، ۱۹). تشریح ساختار سه بعدی مولکول‌های MHC کلاس دو در انسان (HLA-DR)، مشخص کرده است که پاکت ملکولی ناحیه PBR تأثیر زیادی در اتصال پپتیدهای عرضه شده و پاسخ متعاقب لئوسیت‌های T دارد (۱۹).

ژن MHC گاو^۳ (BoLA) در ناحیه کلاس دو شامل لوسی‌های DI و DR، DQ، DO، DY می‌شود (۲۳). در این میان DR شامل سه ژن DRB و یک ژن DRA است. از بین سه ژن DRB، بیان ژن DRB3 غالب بوده و چند شکلی وسیعی را نشان می‌دهد، بطوریکه بیش از ۱۰۰ آلل در ناحیه DRB3 تا کنون شناسایی شده است. معمولاً تنوع ژن‌های MHC کلاس دو منحصر به اگزون ۲ بوده که ناحیه β_1 را در ناحیه PBR رمز می‌کند. ژن DRB2 در سطح بسیار کمی بیان شده، DRB1

نتایج

پس از بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه‌ها، در نهایت ۱۲ الگوی متفاوت (a, e, f, g, h, i, j, l, m, n, o, p) در برش آنزیم RsaI (تصویر شماره ۱)، ۴ الگوی متفاوت (a, b, c, e) در برش آنزیم PstI (تصویر شماره ۲) و ۶ الگوی متفاوت (a, b, c, d, e, f) در برش آنزیم HaeIII (تصویر شماره ۳) مشاهده گردید. طول قطعات بدست آمده و فراوانی هر یک از این الگوها نیز به تفکیک آنزیم مورد استفاده در جدول شماره ۱ و ۲ مشخص شده است.

در نهایت ۲۶ ژنوتیپ مختلف به شرح زیر مشخص گردید: aaa, ecc, faa, fba, gaa, gba, gbb, gea, haa, iba, jbd, lba, lbe, lbf, maa, mba, nba, nbb, nbf, oaa, oab, oba, obb, obf, pcc, pec یک از این الگوها ی برش آنزیم بر اساس هر آنزیم و با استفاده از نرم‌افزار Popgene32 مشخص و در جدول شماره ۲ ارائه گردیده‌اند. درصد فراوانی هر یک آل‌ها نیز بر اساس ترکیب الگوهای برش آنزیمی و دستورات عمل ارائه شده توسط vanEijk و همکاران (۲۴)، مشخص و در جدول شماره ۳ نشان داده شده‌اند. آل‌های jbd و haa، fba به ترتیب بیشترین فراوانی را با ۱۰/۸، ۱۱/۷ و ۱۰/۰ درصد و آل‌های nbf, mba, oab, oba, obb, pec با ۰/۹ درصد کمترین فراوانی را به خود اختصاص داده بودند.

از مجموع آل‌های بدست آمده در این مطالعه آل‌های gba و pec جدید بوده و در مطالعات قبلی گزارش نشده بودند و مابقی آل‌ها قبلاً معرفی شده بودند.

بحث

بررسی تنوع آل‌های MHC کلاس ۲ از جنبه‌های مختلف مورد توجه است. اگرچه از ۲ BoLA DRB3 بخشی از ملکول MHC کلاس ۲ در گاو را رمز می‌کند که در ارتباط نزدیک با ساختار پادگن است. این بخش از MHC تنوع قابل ملاحظه‌ای داشته تا عرضه پادگن‌های مختلف امکان پذیر گردد و در همین حال ارتباط آل‌های آن با حساسیت یا مقاومت به بیماری‌های مختلف مشخص شده است. تاکنون بیش از ۱۰۰ آل برای BoLA DRB3 شناسایی کرده‌اند (۱۹). بهترین راه تفکیک آل‌ها آنزیم PCR-RFLP است که با استفاده از آنزیم‌های RsaI و HaeIII صورت می‌گیرد (۱۳). در این تحقیق از آنزیم PstI استفاده شد که در محل برش کاملاً مشابه BstYI است. در یک گاو ترکیب الگوهای الکتروفور تیک بدست آمده از برش سه آنزیم آل BoLA-DRB3.2 را مشخص می‌کند.

قطعات بدست آمده از برش آنزیم RsaI پنج محل برش آنزیم را در ناحیه مذکور نشان داده است. نتایج حاصل از برش آنزیم‌های PstI و HaeIII نیز به ترتیب ۲ و ۶ ناحیه بوده است. بیشترین تنوع در استفاده از آنزیم RsaI به دست می‌آید که تا ۲۲ قطعه متفاوت (۳bp تا ۲۸۴bp) را در ۲۵ الگوی الکتروفور تیک مشخص می‌کند. قطعات ناشی از برش آنزیم‌های PstI و HaeIII از تنوع کمتری برخوردارند و به طور معمول ۷ و ۱۳ قطعه متفاوت (۳bp تا ۲۸۴bp) در ۵ الگوی الکتروفور تیک و ۱۳ HaeIII قطعه متفاوت (۴bp تا ۲۱۹bp) را در ۹ الگو مشخص می‌کنند (۱۰، ۱۴، ۲۴).

تحقیق حاضر ۱۷، ۷ و ۱۰ قطعه را در ۱۲، ۴ و ۶ الگو به ترتیب برای آنزیم‌های PstI، RsaI و HaeIII مشخص کرده است. از مجموع الگوهای

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

در این بررسی ۵۵ نمونه شامل ۲۴ نمونه بافتی (عقدۀ لفاوی) و ۳۱ نمونه خون کامل (حاوی EDTA) گاوهای هلشتاین ایرانی مربوط به استان‌های 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 Miretti و همکاران صورت گرفت (۱۶). نمونه‌های استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های بافتی پس از هموژنیزه کردن در PBS^۸ استریل بر اساس روش پیشنهادی Ausubel و همکاران و با استفاده از فنل-کلروفرم-ایزو آمیل الکل صورت گرفت (۵).

افزوده سازی ژن BOLA-DRB3.2

جهت بررسی تنوع دومین اگزون ژن BOLA-DRB3 از روشی که vanEijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ ارائه کرده بودند استفاده گردید (۲۴). در ابتدا ژن مذکور با روش seminested PCR افزوده شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول مرحله دوم روی ژل آگارز الکتروفورز شد تا کیفیت و طول قطعه تکثیر شده بر اساس روش‌های معمول مورد ارزیابی قرار گیرد (۱۵، ۱۶، ۱۸).

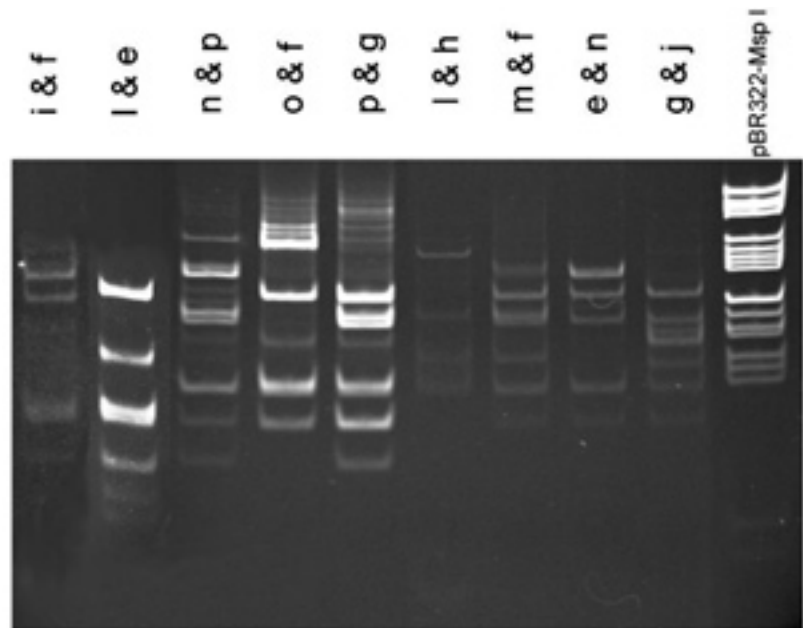
آزمون پلی مرفیسم طولی قطعات حذف شده (RFLP)

استفاده از آنزیم‌ها و مراحل کار بر اساس روش پیشنهادی vanEijk و همکاران بود (۲۴)، به استثنای آنکه به جای آنزیم PstI از BstYI استفاده گردید. سه آنزیم محدود کننده HaeIII (Roch Co)، RsaI (Roch Co) و PstI (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 بریده شده در کنار نشانگر MspI-digested pBR322 (Fermentas Co) روی ژل اکریلامید ۱۲٪ به مدت یک ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت الکتروفورز و سپس با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد. تصاویر ژل‌ها با دستگاه UV ترانس لومیناتور ثبت شدند.

آنالیز داده‌ها

تصاویر بدست آمده از ژل‌ها به کمک نرم‌افزار Photo-captMw Ver. ۹۹،۰۳ آنالیز شده و طول قطعات بریده شده تعیین گردید. برای هر نمونه اطلاعات مربوط به برش هر سه آنزیم با الگوهای مشخص شده توسط vanEijk و همکاران (۲۴)، Gelhaus و همکاران (۱۱) و Maillard و همکاران (۱۴) مقایسه و الگوهای موجود شناسایی گردیدند. ترکیب الگوهای بدست آمده از مجموع سه آنزیم برای هر نمونه تعیین شد و پس از شناسایی شماره الگوی PCR-RFLP، آل‌های موجود مشخص گردید.

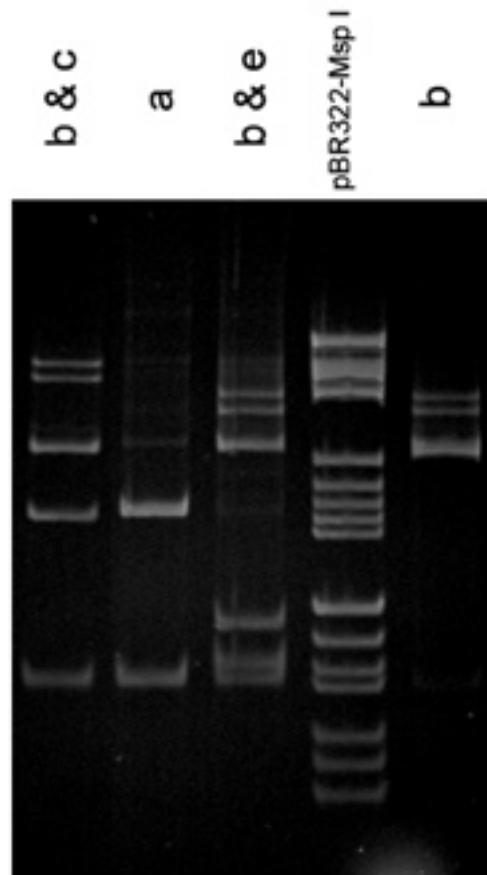
درصد فراوانی هر یک از الگوهای بدست آمده و همچنین آل‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار Popgene32 محاسبه شدند.



تصویر شماره ۱- الگوهای حاصل از برش آنزیمی Rsa I

بدست آمده از برش‌های آنزیمی ۲۶ ترکیب بدست آمده است که هر کدام مشخصه یک آلل است. این تحقیق توانسته است به ۴۷/۳ درصد از تنوع شناخته شده (۵۵ الگو) در ناحیه BoLA-DRB3.2 دست یابد. از مجموع الگوهای بدست آمده سه الگو کاملاً متفاوت با گزارشات موجود (۱۰، ۱۴، ۲۴) بوده و جدید هستند. یکی از الگوهای جدید (gbb) توسط نصیری و همکاران اخیراً مشخص و به ثبت رسیده است (۲) و دو الگوی دیگر (gba و pec) در این مقاله برای اولین بار گزارش می‌شوند و کاملاً جدید می‌باشند. آلل BoLA-DRB3.2×2 در نتایج سایر محققین کمترین فراوانی را داشته است و در تحقیق حاضر نیز ۰/۹ درصد را نشان می‌دهد. آلل‌های اروپا داشته‌اند که در این تحقیق در بین گاوهای ایران مشاهده نشده اند (۸، ۱۶، ۱۸). آلل‌های BoLA-DRB3.2×21 و BoLA-DRB3.2×22 در Bos taurus شناخته شده‌اند و در نتایج بدست آمده از گاوهای ایران نیز فراوانی بالایی را نشان نمی‌دهند (۸، ۱۸). آلل‌های BoLA-DRB3.2×2 در گاوهای آمریکای جنوبی حضور داشته‌اند ولی در گاوهای هلستاین ایران تشخیص داده نشدند (۱۶). در مجموع چنین به نظر می‌رسد که فراوانی آلل‌های MHC کلاس II در گاوهای هلستاین ایران با گاوهای اروپا و آمریکای جنوبی تفاوت‌های آشکاری دارد.

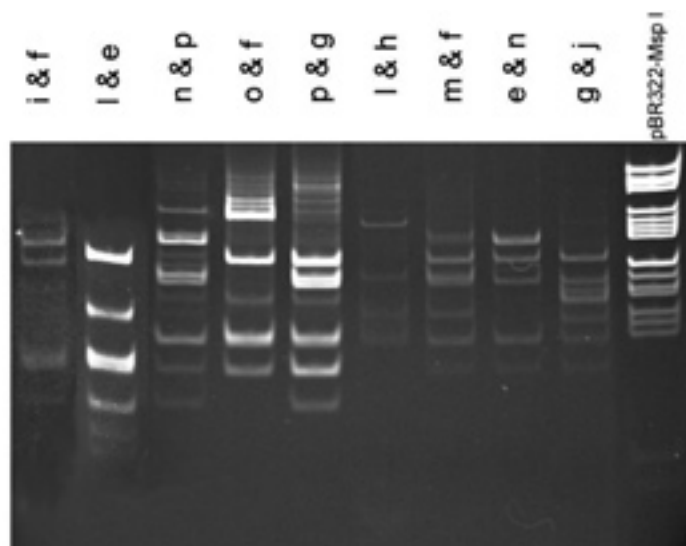
آلل‌های *8، *16، *24، *27، *22 و BoLA-DRB3.2 حساس به بیماری لکوز ویروسی گاو (EBL) معرفی شده اند (۲۵، ۲۶). در تحقیق حاضر تمامی آلل‌های فوق در جمعیت مورد مطالعه حضور داشته و در مجموع ۳۰ درصد کل آلل‌های بدست آمده را شامل می‌شود. حضور بالای



تصویر شماره ۲- الگوهای حاصل از برش آنزیمی Pvu I

جدول شماره ۱: طول قطعات الگوهای برش آنزیمی بدست آمده در این تحقیق به تفکیک آنزیم مورد استفاده در PCR-RFLP. اوزان باندهای بدست آمده بر حسب جفت

Rsa I										Pvu I					Hae III						
a	e	f	g	h	i	j	l	m	n	o	p	a	b	c	e	a	b	c	d	e	f
۷۸	۱۴۱	۱۴۱	۱۴۱	۱۱۱	۱۸۰	۹۳	۳۳۴	۱۱۱	۱۸۰	۲۸۴	۱۱۱	۱۹۹	۲۸۴	۱۹۶	۱۱۲	۱۶۷	۲۱۹	۱۶۷	۱۹۰	۱۶۷	۱۶۷
۵۴	۵۴	۵۴	۱۰۴	۶۹	۵۴	۷۸	۵۰	۱۰۴	۱۰۴		۵۱	۸۵		۸۵	۸۷	۶۵	۶۵	۶۵	۶۵	۱۱۷	۶۵
۵۰	۵۰	۵۰	۳۹	۵۴	۵۰	۶۳					۵۰				۸۵	۵۲		۲۹			۴۸
۳۹	۳۹	۳۹		۵۰		۵۰			۳۹												۴
۳۳																					
۳۰																					



تصویر شماره ۳- الگوهای حاصل از برش آنزیمی Hae III

آلل‌های حساس به لکوز در گاوهای مورد مطالعه استعداد بالای این جمعیت را نسبت به ابتلا به بیماری مشخص می‌نماید. آللهای ۲۳*، ۱۱*۲، ۳*۱۱-DRB3-BoLA and ۲۸* با مقاومت به بیماری لکوز ویروسی گاو مرتبط هستند (۲۵). الگوهای مقاوم در جمعیت مورد مطالعه ما در مجموع به میزان ۸ درصد حضور داشته‌اند. واقعیتی که شاید آمار بالای لکوز در ایران را توجیه نماید (۷).

آلل‌های ۱۸* and ۱۲*۲-DRB۳-BoLA حساس به بیماری تب برفکی معرفی شده‌اند (۱۰). در تحقیق حاضر تمامی آللهای فوق در جمعیت مورد مطالعه حضور داشته و در مجموع ۷/۲۰ درصد کل آللهای بدست آمده را شامل می‌شود. آللهای ۷*، ۳*، and ۱*۲-DRB۳-BoLA با مقاومت به بیماری تب برفکی گاو مرتبط هستند (۱۰). فراوانی الگوهای مقاوم به تب برفکی در جمعیت مورد مطالعه در مجموع ۴/۵ درصد بوده است.

آلل‌هایی در ارتباط با حساسیت به ورم پستان استافیلوکوکی نیز معرفی شده‌اند (۲۱) (۲۲*، ۲۳*، ۲*۲-DRB۳-BoLA) که در مجموع ۵/۴ درصد از آللهای مشخص شده در این مطالعه را شامل می‌شوند.

نکته قابل توجه در نتایج بدست آمده فراوانی بالای آللهای حساس به لکوز و تب برفکی و فراوانی کم آللهای حساس به ورم پستان در جمعیت مورد مطالعه بوده است. در مدیریت اصلاح گله‌های گاو شیری ایران بیشتر به افزایش تولید شیر و بیماری‌هایی با چهره بالینی بارز توجه خاص می‌شود و کمتر بیماری‌های مزمن و بدون علامت مشخص مثل لکوز گاوی و حذف دام‌های مبتلا مورد توجه است. عدم حذف دام‌های آلوده به لکوز و عدم توجه به گسترش آللهای مقاوم در جمعیت می‌تواند دلیلی بر گسترش آللهای حساس باشد. در خصوص بیماری تب برفکی یکی از موارد کاهش کارایی واکسن، عرضه ناموفق پادگن‌های ویروس توسط MHC مربوط به آللهای حساس به بیماری است (۱۰، ۱۲). در مجموع به نظر می‌رسد آللهایی که حضور آن‌ها در این تحقیق به میزان بالایی مشخص شده بهتر است در مدیریت واکسیناسیون مورد توجه قرار گیرند.

جدول شماره ۲: فراوانی الگوهای برش آنزیمی به تفکیک آنزیم مورد استفاده در PCR-RFLP

RsaI	PsuI	HaeIII
a(1)	a(37)	a(61)
e(5)	b(60)	b(13)
f(17)	c(7)	c(8)
g(14)	e(6)	d(13)
h(12)		e(1)
i(1)		f(14)
j(13)		
l(14)		
m(10)		
n(13)		
o(7)		
p(3)		

جدول شماره ۳: درصد فراوانی هر یک از آلل‌های BoLA-DRB۳ مشخص شده با روش PCR-RFLP در نمونه‌های گاو هلستاین ایران. آلل‌ها با مقایسه الگوهای برش آنزیمی (تحقیق حاضر) با الگوهای تعیین شده قبلی و بر اساس روش VanEijk و همکاران (۲۴) صورت گرفته است.

ردیف	ترکیب الگوهای برش آنزیمی	شماره آلل	درصد فراوانی در آلل بر جمعیت	ارتباط آلل با حساسیت/مقاومت نسبت به بیماری
۱	aaa	DRB3.2*01	۰/۹	مقاوم به تب برفکی
۲	ecc	DRB3.2*07	۴/۵	-
۳	faa	DRB3.2*08	۶/۳	حساس به لکوز
۴	fba	DRB3.2*10	۱۰	-
۵	gaa	DRB3.2*51	۵/۴	-
۶	gba	DRB3.2*New	۰/۹	-
۷	gbb	DRB3.2*Nassiri	۱/۸	-
۸	gea	DRB3.2*11	۴/۵	مقاوم به لکوز
۹	haa	DRB3.2*12	۱۰/۸	حساس به تب برفکی
۱۰	iba	DRB3.2*15	۰/۹	-

حساس به لکوز	۱۱/۷	DRB3.2*16	jbd	۱۱
-	۱/۸	DRB3.2*36	lba	۱۲
-	۰/۹	DRB3.2*21	lbe	۱۳
حساس به تب برفکی	۹/۹	DRB3.2*18	lbf	۱۴
-	۷/۲	DRB3.2*32	maa	۱۵
حساس به لکوز و ورم پستان	۱/۸	DRB3.2*22	mba	۱۶
مقاوم به لکوز و حساس به ورم پستان	۲/۷	DRB3.2*23	nba	۱۷
حساس به لکوز	۸/۳	DRB3.2*24	nbb	۱۸
-	۰/۹	DRB3.2*33	nbf	۱۹
-	۱/۸	DRB3.2*25	oaa	۲۰
-	۰/۹	DRB3.2*26	oab	۲۱
-	۰/۹	DRB3.2*37	oba	۲۲
مقاوم به لکوز	۰/۹	DRB3.2*28	obb	۲۳
حساس به لکوز	۱/۸	DRB3.2*27	obf	۲۴
-	۱/۸	DRB3.2*29	pcc	۲۵
-	۰/۹	DRB3.2*New	pec	۲۶

رحیمیان، ق. و ج. راسل. ۱۳۸۵؛ بررسی چندشکلی ژنتیکی و فراوانی آلی جایگاه ژنی ۲، DRB3-BoLA در گاو میش‌های مازندرانی. خلاصه مقالات نهمین کنگره ژنتیک ایران. شرکت چاپ نقشینه جهان. ص ۴۸۱

3- Abbas A.K. and A. H. Lichtman. 2003; Cellular and molecular immunology, Saunders, Philadelphia, pp 65-81.

4- Alizadeh, Z., N. Karrow, and B. A. Mallard. 2003; Biological effect of varying peptide binding affinity to the BoLA-DRB3*2703 allele. Genet. Sel Evol. 35 Suppl 1: S51-S65.

5- Ausubel, F.M., R. Kingstone., D.D. Moore., J.G. Seidman., J.A. Smith and K. Struhl. 2002; Short protocols in molecular biology John Wiley & Sons, Inc. New York, pp 232- 237

6- Ballingall, K. T., A. Luyai, G. J. Rowlands, J. Sales, A. J. Musoke, S. P. Morzaria, and D. J. McKeever. 2004; Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II

پاورقی‌ها

- 1- Major Histocompatibility Complex
- 2- Peptide Binding Site
- 3- Bovine Lymphocyte Antigen
- 4- Mixed lymphocyte culture
- 5- Isoelectric focusing
- 6- Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism
- 7- Heteroduplex analysis
- 8- Phosphate Buffer Saline

منابع مورد استفاده

- ۱- تاج بخش، حسن، ۱۳۷۴؛ ایمنی شناسی بنیادی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، چاپ ششم، شماره ۱۸۰۹، ص ۵۲۵-۵۴۰
- ۲- منشاد، ا.، افتخار شاهرودی، ف.، نصیری، م.، ر. ولی‌زاده، ر.، مسافر، ج.

- 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. *Infect. Immun.*;72: 2738-2741.
- 7- Bazargani, T.T., Barin, A., and H. Hadadzadeh. 1987; A survey on frequency of infection to the virus of enzootic bovine leucosis in dairies around Tehran XXIII World Veterinary Congress, Brazil.
- 8- da Mota, A. F., J. E. Gabriel, M. L. Martinez, and L. L. Coutinho. 2002; Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *Eur. J. Immunogenet.* 29: 223-227.
- 9- Dietz, A. B., J. C. Detilleux, A. E. Freeman, D. H. Kelley, J. R. Stabel, and M. E. Kehrli, Jr. 1997; Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 80: 400-405.
10. Garcia-Briones, M. M., G. C. Russell, R. A. Oliver, C. Tami, O. Taboga, E. Carrillo, E. L. Palma, F. Sobrino, and E. J. Glass. 2000; Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine.* 19: 1167-1171.
- 11- Gelhaus, A., L. Schnittger, D. Mehlitz, R. D. Horstmann, and C. G. Meyer. 1995; Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet.* 26: 147-153.
- 12- Haghparast, A., M. H. Wauben, M. C. Grosfeld-Stulemeyer, P. Van Kooten, and E. J. Hensen. 2000; Selection of T-cell epitopes from foot-and-mouth disease virus reflects the binding affinity to different cattle MHC class II molecules. *Immunogenetics.* 51: 733-742.
- 13- Lewin, H.A. 1996; The major histocompatibility complex region of domestic animals. CRC Press. Chapter 4: 65-98.
- 14- Maillard, J. C., C. Renard, P. Chardon, I. Chantal, and A. Bensaid. 1999; Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet.* 30: 200-203.
- 15- Miltiadou, D., A. S. Law, and G. C. Russell. 2003; Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue Antigens.* 62: 55-65.
- 16- Miretti, M. M., J. A. Ferro, M. A. Lara, and E. P. Contel. 2001; Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. *Biochem. Genet.* 39: 311-324.
- 17- Park, Y. H., Y. S. Joo, J. Y. Park, J. S. Moon, S. H. Kim, N. H. Kwon, J. S. Ahn, W. C. Davis, and C. J. Davies. 2004; Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J. Vet. Sci.* 5: 29-39.
- 18- Ripoli, M. V., J. P. Liron, J. C. De Luca, F. Rojas, F. N. Dulout, and G. Giovambattista. 2004; Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in Saavedreno Creole dairy cattle. *Biochem. Genet.* 42: 231-240.
- 19- Schaschl, H., S. J. Goodman, and F. Suchentrunk. 2004; Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois (*Rupicapra r. rupicapra*). *Dev. Comp Immunol.* 28: 265-277.
- 20- Sharif, S., B. A. Mallard, B. N. Wilkie, J. M. Sargeant, H. M. Scott, J. C. Dekkers, and K. E. Leslie. 1999; Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) with production traits in Canadian dairy cattle. *Anim Genet.* 30: 157-160.
- 21- Sharif, S., B. A. Mallard, and J. M. Sargeant. 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76: 231-238.
- 22- Takeshima, S., M. Ikegami, M. Morita, Y. Nakai, and Y. Aida. 2001; Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics.* 53: 74-81.
- 23- Tizard, I. R. 2004; *Veterinary immunology*, Saunders, Philadelphia. p: 67-77.
- 24- Van Eijk, M. J., J. A. Stewart-Haynes, and H. A. Lewin. 1992; Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet.* 23: 483-496.
- 25- Xu, A., M. J. van Eijk, C. Park, and H. A. Lewin. 1993; Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151: 6977-6985.
- 26- Zanotti, M., G. Poli, W. Ponti, M. Polli, M. Rocchi, E. Bolzani, M. Longeri, S. Russo, H. A. Lewin, and M. J. van Eijk. 1996; Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim Genet.* 27: 337-341. Lorero elit lummy niam

