شناسایی ناقلین بیماری SCID در بین اسبان عرب ایران با استفاده از آزمایش مبتنی بر PCR

حمیدرضا سیدآبادی[۱]، فضل الله افراز [۲]، سیروس امیری نیا[۳] ، محمدحسین بناءبازی[۳] ، نرگس واسجی[۳].

چکیده:

بیماری نقص ایمنی شدید[۱]، یک بیماری وراثتی ناشی از یک ژن مغلوب غیر جنسی می باشد که در بین نژادهای مختلف اسب تنها در نژاد عرب مشاهده شده است. این نقص ناشی از حذف ۵ جفت بازی در ژن کد کننده زیر واحد کاتالتیک پروتئین کیناز وابسته به DNA [۲] می باشد. کره اسبان هموزیگوت مغلوب قبل از رسیدن به سن ۵ ماهگی به دلیل ایجاد نقص در سیستم ایمنی بدن تلف می شوند ولی حیوانات هتروزیگوت ظاهرا سالم اما ناقل این بیماری می باشند. هدف اصلی از انجام این تحقیق شناسائی ناقلین این بیماری در میان اسبان عرب ایران می‌باشد. بدین منظور از تعداد ۱۲۰ اسب عرب به طور تصادفی خونگیری و از یک جفت آغازگر برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده گردید. انواع ژنوتیپ حاصل از PCR می تواند شامل هموزیگوت مغلوب و دارای حذف ۵ جفت بازی (بیمار)، هتروزیگوت و دارای هر دو آلل وحشی و حذف ۵ جفت بازی (ناقل) و هموزیگوت غالب دارای آلل وحشی (سالم) باشد. تمامی نمونه های مورد بررسی ژنوتیپ یکسان (هموزیگوت سالم) نشان دادند.

واژه های کلیدی: SCID ، ژن DNA-PKcs ، اسب عرب ایران، واکنش زنجیره ای پلیمراز.

مقدمه:

پرورش اسب در ایران دارای قدمت طولانی بوده و به همین جهت نژادهای متنوعی در کشور وجود دارد که از آن جمله می توان از اسب عرب،کردی،ترکمن، اسبچه خزر،.... نام برد. محققین اسب شناس عمدتا اسب اصیل عرب را مهمترین عامل در اصلاح انواع نژادهای اسبان دنیا می دانند. از آنجا که این اسب با شرایط اقلیمی گوناگون، به راحتی سازگاری پیدا می کند، در تمام مناطق از سردسیر تا استوائی پراکنده می‌باشد(۱).

با توجه به ویژگی های منحصر به فرد نژادهای اسب ایرانی و مطرح شدن بحث صادرات آنها و از طرف دیگر خطر انقراض بعضی از این نژادها مانند اسب عرب، موضوع شناسائی، حفظ و تکثیر آنها بیش از پیش اهمیت پیدا نموده است. تحقیق حاضر در راستای این امر و به منظور کنترل و پیشگیری از شیوع بیماری ژنتیکی SCID به وسیله شناسائی اسبان هتروزیگوت (بخصوص نریانها) و عدم استفاده از آنها در برنامه های تلاقی به دلیل ضرر و زیان اقتصادی بسیار بالای پیدایش کره های هموزیگوت و نیز هزینه بالای کشش نریانهای با ارزش در نژاد اسب عرب صورت می گیرد.

---

۱ - کارشناس بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۲ - عضو هیئت علمی بخش ژنتیک و اصلاح نژاد دام، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۳ - عضو هیئت علمی بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور

---

۱ – Sever Combined Immune Deficiency

۲ - $DNA\text{-}PK_{CS}$

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری نقص ایمنی شدید، بیماری ژنتیکی ناشی از یک ژن مغلوب غیر جنسی می باشد که اولین بار در سال ۱۹۷۳ در بین اسبان عرب گزارش گردید. Shin و همکاران (۱۹۹۸) برای اولین بار دریافتند که علت این بیماری حذف ۵ جفت بازی در ژن $DNA\text{-}PK_{CS}$ می باشد (۸). اسبانی که برای ژن جهش یافته مذکور هموزیگوت می باشند به علت نقص در سیستم ایمنی بدنشان قبل از سن ۵ ماهگی از بین می روند. اسبان هتروزیگوت از لحاظ ظاهری سالم ولی ناقل این ژن معیوب می باشند که تشخیص این گروه برای جلوگیری از انتقال این ژن به نسلهای بعد برای ما از اهمیت زیادی برخوردار است. این بیماری تا کنون در انسان، موش، سگ و اسب عرب گزارش شده است(۸).

در حال حاضر تست این بیماری تنها در کشور آمریکا و با استفاده از پروبهای رادیواکتیو و با هزینه بسیار بالائی برای هر راس اسب صورت می گیرد(۸). با توجه به مشکلاتی که در استفاده ازپروبهای رادیواکتیو وجود دارد استفاده از یک روش جایگزین جهت شناسائی ژنهای جهش یافته ضروری می باشد. در این مقاله تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده تکنیک مولکولی مبتنی بر PCR مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها:

در این تحقیق از ۱۲۰ اسب عرب از استانهای تهران و خوزستان خونگیری به عمل آمد. استخراج DNA با روش استخراج نمکی[۱] (٦) با برخی تغییرات صورت گرفت(٤). میزان کمی وکیفی DNA با دو روش اسپکتوفتومتری و ژل آگارز ۰/۸درصد انجام گرفت. با استفاده از یک جفت آغازگر و از طریق واکنش PCR، قطعه مورد نظر تکثیر یافت. توالی آغازگرهای مورد استفاده به قرار ذیل است:

F: 5`-TTC CTG TTG CAA AAG GAG-3`
R: 5`-TTT GTG ATG ATG TCA TCC-3`

بهینه سازی شرایط PCR

پس از آزمایش غلظت های مختلف اجزاء PCR، شرایط بهینهٔ PCR به شرح زیر بدست آمد(جدول ۱):

جدول ۱: غلظت اجزای واکنشهای PCR

غلظت نهایی	اجزاء واکنش
۱X	بافر PCR
۵ mM	Mgcl2
۰/۲۵ µM	آغازگر
۲۰۰ µM	dNTPs
۱ unit/reaction	آنزیم تک پلیمراز
۱۵۰ ng/reaction	DNA الگو
متغیر	dd H2O
۲۵ µl	حجم نهایی واکنش

۱ - Salting-Out

Archive of SID

www.SID.ir

چرخه های حرارتی PCR

پس از آزمایش دماها و برنامه های مختلف، برنامهٔ حرارتی مناسب برای آغازگر مورد مطالعه به شرح زیر بدست آمد(جدول ۲):

جدول۲: برنامه حرارتی واکنشهای PCR

	مراحل PCR	درجه حرارت(c̊)	زمان
۱	واسرشته سازی	۹۵	٤ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی	۹۵	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	٥٦	۳۰ ثانیه
٤	بسط	۷۲	٤٥ ثانیه
٥	بسط نهایی	۷۲	٥ دقیقه
٦	نگهداری	٤	

مراحل دو تا چهار، ۳۵ بار تکرار گردید.

جهت الکتروفورز محصولات PCR و تفکیک قطعات حاصله، از ژل اکریل آمید ۸٪ استفاده شد.

نتایج و بحث:

پس ازخونگیری از ۱۲۰ اسب عرب و استخراج DNA از آنها، تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک جفت پرایمر و با استفاده از روش مولکولی مبتنی بر PCR صورت گرفت. پس از الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل اکریل آمید، مشاهده گردید که تمام افراد سالم و ژنوتیپ هموزیگوت غالب با طول ۲۵۹ جفت بازی دارند.(شکل شماره ۱).

popie و همکاران (۱۹۹۷) به بررسی فراوانی این بیماری پرداختند که فراوانی نسبتا بالائی (۲۸/۹ درصدی) را در بین اسبان عرب آمریکا گزارش نمودند(۷). Denise وهمکاران (۲۰۰۲) طی تحقیقی که بر روی ۲۳۸ اسب عرب در برزیل انجام دادند فراوانی هتروزیگوتها را ٤٪ گزارش نمودند(۳). Bronco وهمکاران (۱۹۹۸) طی تحقیقی که بر روی ۳۸٦ اسب عرب انجام دادند فراوانی این بیماری را ۹٪گزارش نمودند(۲).

با توجه به فراوانی نسبتا بالای مشاهده شده این بیماری در سایرکشورها ، دلائل احتمالی عدم مشاهده ژنوتیپ ناقل یا بیمار را در بررسی حاضر می توان به شرح زیر برشمرد:

۱- در گزارشات قبلی که فراوانی بالای این بیماری را گزارش نموده اند، نمونه برداری عمدتا از آزمایشگاه های تشخیص این بیماری و یا از گله های مشکوک به این بیماری صورت گرفته است .

۲- طی بررسی صورت گرفته این فرض مطرح شده است که جد همه افراد مبتلا به SCID، یک نریان می باشد که در دهه ۱۹۲۰ در آمریکا می زیسته است و احتمالا این ژن جهش یافته توسط این نریان به نسلهای بعد منتقل شده است و به احتمال قوی افراد مطالعه شده در تحقیق حاضر ارتباط شجره ای با نریان مزبور نداشته اند(۲).

۳- به دلیل همکاری ضعیف سازمانهای مربوطه جهت خونگیری از اسبان ،عملا امکان خونگیری از اسبان باشگاه های بزرگ سوارکاری جهت تست این بیماری وجود نداشت و با توجه به اینکه در گذشته تعداد زیادی اسب عرب از خارج وارد کشور شده است امکان یافتن افراد ناقل یا بیمار وجود دارد.

Archive of SID

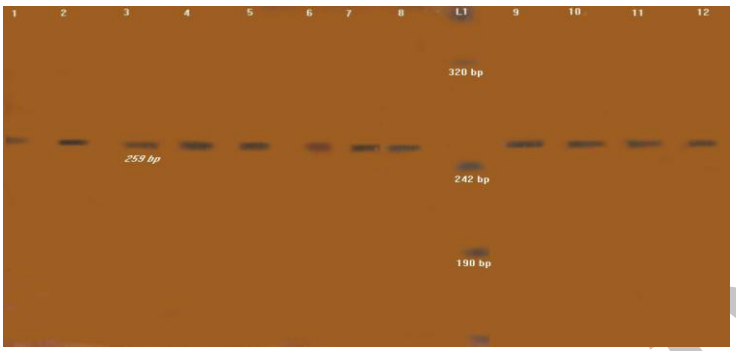
www.SID.ir

پیشنهادات:

۱-تاسیس یک آزمایشگاه مرجع جهت آزمون تمامی اسبان عرب داخل کشور.

۲-اجباری شدن ثبت مشخصات بیماری SCID در شناسنامه تمام اسبان عرب ایران.

۳-آزمون همه اسبان عرب قبل از ورود به کشور جهت جلوگیری از ورود ژن مغلوب جهش یافته.



شکل۱-الگوی باندی حاصل از روش مبتنی بر PCR بر روی قطعه مورد تکثیر (نشانگر اندازه VIII شرکت Roche آلمان می باشد)

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

۱-سیدآبادی،ح،ر.۱۳۸۰.بررسی چندشکلی ۵ پروتئین خون در دو نژاد اسب عرب و اسبچه خزر. پایان نامه کارشناسی ارشد.دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

۲. Bernoco,D., Bailey,E. 1998. Occurrence of SCID gene among the 1997 arabian horse foal crop in UNITED STATES. Plant & Animal Genome VI Conference. Town & Country Hotel, San Diego, CA, January. 18-22.

۳. Denise,A and Claudia, S. 2002. Prevalence of the Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID) in Arabian horse raised in brazil. 28 Th.ISAG.Conf.Germany.P.154.

٤. Javanrouh, A., Banabazi, M.H., Esmaeilkhanian, S., Amirinia, C., Seyedabadi, H.R. and Emrani, H. 2006. Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Antalya, Turkey 21-25.

٥. McGuire T.C. and Poppie M.J. 1973. Hypogammaglobulinemia and thymic hypoplasia in horses: A primary Combined Immunodeficiency disorder. Infection and Immunity. 8: 272-277.

٦. Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research. 16. 1215.

۷. Poppie, M.J. and McGuire, T.C. 1977. Combined immunodeficiency in foals in Arabian breeding: evaluation of mode of inheritance and estimation of prevalence of affected foals and carrier mares and stallions. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170: 31-33.

۸. Shin, E.U., Perryman, L.E and Meek, K. 1997. A Kinase-Negative mutation of DNA-PK_{CS} in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. The Journal of Immunology. 158. (8) .3565-3569.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of SCID Carriers Among Iranian Arab Horses Using a Test Based on PCR for DNA-PKcs Gene

Seyedabadi,H.[۱], F.Afraz.[۲], S.Amirinia[1], M.H.Banabazi.[1], N.Vaseji.[1]

Abstract

Severe Combined Immunodeficiency Disease (SCID) of horses was appeared as a deficiency of T and B lymphocytes in foals and resulted in death, caused by infection with opportunistic pathogens, by 5 month of age. This disease is a genetic autosomal recessive trait. A 5-basepair deletion in the horse gene encoding DNA-protein kinase catalytic subunit (DNA-PK_{CS}) was discovered which is responsible for SCID in Arabian horses. We have developed a PCR-based test for detection of the gene defect from 5-basepair deletion in DNA-PKcs gene. The carriers are heterozygote (259 and 254 bp bands) and dominant and recessive homozygotes have 259bp and 254bp bands, respectively. A total 120 Arab horse were tested and all were homozygote for 259 bp that is noncarrier. In conclusion, we suggest further study on Arab horses throughout of Iran to finding any probable carriers.

Keywords: SCID, DNA-PKcs gene, Iranian Arab horse, PCR.

Archive of SID

[۱] Animal Science Research Institute of Iran, Department of Biotechnology
[۲] Animal Science Research Institute of Iran, Department of Animal Genetics and Breeding

www.SID.ir