Archive of SID

بررسی توأم ارتباط چندشکلی و بیان ژن فاکتور نکروز توموری (TNFα) با نمره سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین

پروانه رئوفیان[۱]، جلیل شجاع[۲]، رضی‌الله جعفری جوزانی[۳]، غلامعلی مقدم[۲]، آرش جوانمرد[۲]

۱. دانشجوی دکترای تخصصی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.
۴. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز- ایران.

دریافت: ۲۵ آذرماه ۹۵ **پذیرش:** ۳۰ مهر ماه ۹۶

چکیده

عارضه ورم پستان، یک بیماری مهم اقتصادی در گاوهای شیرده است. در پژوهش حاضر، ژن کاندیدای فاکتور نکروز توموری (TNFα) به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی مرتبط با بروز ورم پستان، برای دنبال کردن هم‌زمان دو هدف، شناسایی چند شکلی‌های مربوط و ارزیابی همبستگی آن‌ها با نمره سلول‌های بدنی شیر (SCS) و به‌طور هم‌زمان پروفایل بیان ژن TNFα در گاو های هلشتاین هدف‌گذاری شد. بدین‌منظور، تعداد ۱۰۰ رأس گاو شیری هلشتاین بر اساس ارزش‌های اصلاحی تخمین زده شده برای صفات تولید شیر، درصد چربی و رکوردهای SCS انتخاب شدند. سپس بر اساس مقادیر باقی‌مانده نمره سلول‌های بدنی در دو گروه‌های مقاوم و حساس تقسیم شدند و از هر حیوان ۵ میلی‌لیتر خون جمع‌آوری شد. تعیین ژنوتیپ دو گروه هدف (حیوانات حساس و مقاوم به ورم پستان) با نشانگر PCR-RFLP انجام شد و نهایتاً ژنوتیپ‌های شناسایی شده در مقابل رکوردهای فنوتیپی تجزیه و تحلیل آماری گردید، سپس بیان ژن گروه‌های مقاوم و حساس با روش Real Time PCR ارزیابی شد. نتایج این پژوهش ارتباط ژنتیکی معنی‌داری بین ژن TNFα با مقادیر باقی‌مانده نمره سلول‌های بدنی شیر را ثابت کرد ($P<0/01$). بیان ژن اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های حساس و مقاوم نشان داد ($P<0/01$) که می‌توان به‌طور غیرمستقیم ارتباط بین جهش شناسایی شده با تفاوت بیان را تفسیر کردد. به طوری که بالاترین میزان بیان ژن‌های مربوط به ژنوتیپ BB بود. به عنوان پیام نهایی این پژوهش می‌توان ژنوتیپ AA، نشانگر همبسته با افزایش مقاومت ژنتیکی نسبی در برابر ورم پستان در جمعیت مطالعه شده دانست.

واژه‌های کلیدی: ورم پستان، امتیاز سلول‌های بدنی شیر، فاکتور نکروز توموری، بیان ژن.

مقدمه

بیماری ورم پستان از جمله معمول‌ترین و پرهزینه‌ترین بیماری‌های شناسایی شده در صنعت پرورش گاو شیرده در سراسر جهان است، که متأسفانه سالیانه خسارات اقتصادی سنگینی را به گاوداران وارد می‌سازد. امروزه، این بیماری یک چالش اجتناب‌ناپذیر مهم در سیستم‌های پرورش گاو شیرده صنعتی و حتی سنتی است که بروز آن شاید ناشی از ناآگاهی دامداران و فقدان اعمال مدیریت صحیح در دامداری‌هاست. عوارض بیماری مذکور، به دلیل کاهش فاحشی که در تولید شیر سالیانه کشور دارد، از یک‌سو صدمات قابل توجهی بر اقتصاد وارد کرده و از سوی دیگر موجب کاهش عرضه شیر و فراورده‌های آن به بازار و در نتیجه افزایش سوء تغذیه در بین افراد مملکت به‌ویژه کودکان می‌شود (۱). از لحاظ ارائه آمار ایران، متأسفانه، به دلیل فقدان سیستم آمارگیری منظم، از میزان دقیق شیوع این عارضه و اثرات منفی آن در کاهش

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: parvanehraufian@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

سالیانه شیر اطلاعات دقیقی در دسترس نیست. در این راستا، یکی از راه‌کارهای موجود، انتخاب ژنتیکی برای ایجاد مقاومت به ورم پستان برای مقابله با کاهش تولید شیر است. به‌هرحال انتخاب ژنتیکی حیوانات برای افزایش مقاومت نسبی به ورم پستان، به دلیل فقدان یک معیار جهانی یکسان و همچنین پایین بودن ضریب وراثت‌پذیری (۰/۰۵-۰/۰۲) با محدودیت مواجه شده است. بنابراین با توجه به بالاتر بودن ضریب وراثت پذیری نمره سلول‌های بدنی شیر (SCS) (۰/۱۵-۰/۰۷)، در اغلب مطالعات از انتخاب بر اساس آن به عنوان شاخصی برای ارزیابی مقاومت نسبی به این بیماری استفاده می‌شود. از سوی دیگر از معایب انتخاب بر اساس اطلاعات فنوتیپی، فاصله نسل طولانی، پیشرفت ژنتیکی و دقت انتخاب پایین است. دیدگاه استفاده از اطلاعات ژن‌های کاندیدا و نشانگرهای موجود در سطح آن می‌تواند به عنوان یک راه‌کار برای فایق آمدن بر معایب انتخاب بر اساس فنوتیپ مطرح باشد(۲۴). از جمله ژن‌های کلیدی ایجاد کننده مقاومت، ژن‌های سیستم ایمنی هستند که نقش مهمی در تنظیم پاسخ ایمنی ذاتی و اکتسابی علیه ورود پاتوژن به بدن حیوان دارند به طوری که در مطالعات اخیر ارتباط چند شکلی‌های شناسایی شده روی ژن‌های همانند TLR2، CXCR1, Interleukins, TNFα با ایجاد مقاومت نسبی با ورم پستان معرفی شده است(۳، ۵، ۶، ۱۷ و ۲۳). به عنوان مثال، ژن TNFα از جمله فاکتورهای پاسخ عملکرد سیستم ایمنی است که به عنوان خط مقدم برای دفاع سیستم پستان در مقابل پاتوژن‌ها نقش دارد (۱۶)، به طوری که چندشکلی‌های موجود در ژن TNFα با ورم پستان بالینی ارتباط معنی‌داری وجود داشت (۱۸). چند شکلی ناشی از جایگزینی تک نوکلئوتید، بسته به اندازه و ناحیه جهش (اگزون، پروموتور و اینترون) روی بیان ژن اثر می‌گذارند. تجزیه و تحلیل جایگاه کنترل کننده صفات کمی بیان ژن نشان داده که جهش‌های موجود نقش مهمی در ایجاد تغییر در میزان بیان ژن می‌شوند (۸). در پژوهشی که روی گاوهای هلشتاین صورت گرفت، گزارش شد که جهش موجب افزایش سطح بیان ژن می‌شود، ژنوتیپ جهش یافته (AA) شیوع ورم پستان بیشتری داشت و بیان ژن در این ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ‌های BB و AB بیشتر بود (۱۸). Lee و همکاران گزارش کردند بیان ژن IL8 و TNFα در شیر گاوهای آلوده به اشرشیاکلی و استرپتوکوکوس آئروس افزایش یافت (۱۲). در مطالعه‌ای گزارش شد چندشکلی‌های ژن TNFα - 308G>A با سرطان سینه در جمعیت مکزیک رابطه داشت. ژنوتیپ‌های AA و GG ژن TNFα در افزایش سرطان سینه در نمونه‌های مکزیک نقش داشت (۱۰). در مطالعه‌ای گزارش شد آلل A ژن TNFα -308 با کاهش سرطان سینه در مقایسه با آلل G در جمعیت کازاسیان مرتبط است و نتایج نشان داد که ژنوتی‌های AA و AG با خطر کمتر سرطان سینه همراه است.

مطالعه‌ای در آفریقا نشان داد که ژنوتیپ AA ژن TNFα -308 با فاکتور خطر سرطان سینه مرتبط است (۲۰). هدف از این پژوهش بررسی توام ارتباط چندشکلی و بیان ژن فاکتور نکروز توموری (TNFα) با امتیاز سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین مشخص گردید.

مواد و روش کار

در پژوهش حاضر از رکوردهای نمره سلول‌های بدنی شیر گاوها از شرکت کشت و صنعت فکا متعلق به سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۸۱ استفاده گردید. اطلاعات فایل شجره شامل ۸۰۰۰ حیوان و فایل رکوردها شامل ۹۵۰۰۰ رکورد روز آزمون مربوط به ۳۷۰۰ گاو شیرده بود. تعداد ۱۰۰ کل رأس گاو حساس و مقاوم براساس اثر باقی‌مانده نمره سلول‌های بدنی شیر (بالاترین و پایین‌ترین اثرات عوامل باقی‌مانده از توزیع نرمال به دست آمده از تجزیه و تحلیل رگرسیون) که در شکم زایش یک تا ۶ داشتند برای انجام تجزیه و تجلیل مولکولی با مدل آماری زیر انتخاب

www.SID.ir

Archive of SID

گردیدند. مقاوم‌ترین و حساس‌ترین حیوانات بر اساس ۳ رکورد اولیه روز آزمون (رکوردهای مرحله اول شیرواری) به دلیل تولید شیر بالا و حساسیت بالای حیوان به ورم پستان (۴، ۷، ۹ و ۱۱) انتخاب گردیدند.

توزیع فراوانی صفت SCC انحراف زیادی از حالت نرمال دارد. در این تحقیق از فرمول زیر برای تبدیل لگاریتمی صفت SCC استفاده گردید.

$$SCS = \log_2 (SCC/100) + 4 \qquad (۱)$$

گاوهای مقاوم و حساس با مدل آماری زیر انتخاب گردیدند.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + S_j + L_k + e_{ijk} \qquad (۲)$$

μ= میانگین؛ A_i= اثر سال زایش؛ S_j= فصل زایش؛ L_k= شکم شیرواری؛ e_{ijk} = باقی‌مانده‌ها.

آستانه‌ای که بر اساس آن حیوانات مقاوم انتخاب شدند رکوردهای SCC روز آزمون کمتر از ۱۰۰۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر بود برای تمام شکم زایش بود و حیوانات هیچ‌گونه سابقه بیماری ورم پستان در طول عمر خود نداشتند. رکوردهای SCC برای حیوانات حساس بالاتر از ۳۰۰۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر بود و سابقه حداقل یک ورم پستان در طول عمر خود داشتند. ارزش‌های اصلاحی برای صفات تولید شیر و درصد چربی شیر که قبلاً از سوی مرکز بهبود شیر برای گاوهای فکا تخمین زده شده بود نیز در بین اطلاعات موجود ردیابی شد. با مشخص کردن شماره گاوهای موردنظر و با مراجعه به دامداری‌هایی که گاوهای موردنظر در آن نگهداری می‌شدند خون‌گیری حیوانات از ورید دمی، ورید پستان و ناحیه زیر مقعد گاو با لوله‌های ونوجکت حاوی EDTA انجام گردید. استخراج DNA با روش کلروفورم صورت گرفت (۱۹)، در ادامه تعیین کمیت و کیفیت DNA با دستگاه نانودراپ (مدل ND 1000) نمونه ها در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ اندازه‌گیری شد. پس از بررسی کیفیت و کمیت DNA، قطعه موردنظر تکثیر شد. در جدول ۱، توالی پرایمرها، جایگاه‌های انتخابی ژن‌های مورد بررسی در این پژوهش و شرایط مطلوب افزوده‌سازی برای همه جایگاه‌ها نشان داده شده است. برای طراحی پرایمر ژن TNFα از پرایمرهای موجود در پژوهش A -Juan و همکاران در سال ۲۰۰۹ استفاده گردید (۲). تکثیر DNA برای ژن TNFα در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. این حجم شامل ۱ میکرولیتر DNA (50 نانو گرم DNA)، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰ پیکومول هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت بود. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول به دست آمده روی ژل آگارز الکتروفورز شد تا کیفیت و طول قطعات تکثیر شده ارزیابی شود. چرخه گرمایی برای ژن TNFα شامل دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه برای ۶۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ۶۳ درجه برای ۶۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه برای ۶۰ ثانیه بود و آخرین چرخه دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه تنظیم شد. برای تعیین ژنوتیپ حیوانات از روش RFLP- PCR استفاده شد. برای هضم آنزیمی ژن TNFα، ۷ میکرولیتر از محصولات افزوده‌سازی با ۱۰ واحد از آنزیم RsaI، ۵ میکرولیتر بافر 10X Universal Buffer (UB) و ۳۷ میکرولیتر آب عاری از DNAse و RNAse مخلوط شدند و در دمای ۳۷ درجه برای ۴ ساعت انکوبه و هضم گردیدند. محصولات حاصل از هضم در ژل آگارز ۱٪ رنگ‌آمیزی شده با DNA safe جدا گردیدند و با نور UV مشاهده شدند، سپس تعیین ارتباط ژنوتیپ‌های هر ژن با مقادیر باقی‌مانده نمره سلول‌های بدنی، ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر با مدل آماری زیر و PROC GLM با نرم‌افزار SAS(9.1) صورت گرفت.

$$Y_{ijkn} = \mu + M_n + e_n \qquad (۳)$$

www.SID.ir

Archive of SID

Y_n= مقادیر باقی‌مانده نمره سلول‌های بدنی (SCS)، ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر؛ μ= میانگین؛ M_n= اثر ژنوتیپ؛ e_n= باقی‌مانده‌ها.

نمونه شیر تازه از ۲۵ گاو سالم و ۲۵ گاو مبتلا به ورم پستان برای طرح کنترل تیمار جمع‌آوری گردید (۲۱). شیر جمع‌آوری شده در دستگاه سانتریفیوژ برای مدت نیم ساعت با دور ۱۰۰۰ قرار گرفت. پس از آن محلول رویی دور ریخته شد و رسوب آن با محلول سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد و مجددا به مدت نیم ساعت در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰ rpm قرار گرفت. این عمل دو بار صورت گرفت و رسوب سلول‌های بدنی از شیر به طور کامل جدا شد. پس از جداسازی سلول‌های بدنی، استخراج RNA با کیت شرکت یکتا تجهیز آزما، صورت گرفت. RNAهای استخراج شده برای سنجش غلظت و خلوص با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شدند. در مرحله بعد سنتز cDNA انجام شد. سنتز cDNA در حجم ۱۳/۴، شامل ۰/۵ میکرولیتر الیگو (dT)، ۷/۹ احتمالاً میکرولیترآب، DEPC ۵ میکرولیتر RNA برای هر نمونه صورت گرفت. پس از آن نمونه‌ها در چرخه‌های گرمایی ۷۰ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه و ۶ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان ۲۰ دقیقه قرار گرفتند، سپس ۴ میکرولیتر 5X-first strand buffer، ۱ میکرولیتر dNTP و ۰/۶ میکرولیترRNAsin inhibitor و ۱ میکرولیتر آنزیم M-MLV به تمام نمونه‌ها اضافه شد. پرایمرهای ژن TNFα با NCBI طراحی شدند. برای طراحی پرایمر ژن βactin از پرایمرهای موجود در پژوهش Chen و همکاران در سال ۲۰۱۱ استفاده شد (۳).

جدول ۱– جزئیات پرایمرهای استفاده شده در پژوهش حاضر

جایگاه‌ها	توالی پرایمر	محل تکثیر	طول محصول (bp)	دمای اتصال (°C)
TNFα	F:5´AGAGTAGAACTGACAGGGTCG 3' R: 5'CTCGGCATAGTCCAGGTAG 3'	انتهای اگزون ۳ و بخشی از اگزون ۴	۴۴۵	۶۰
RT-TNFα	F:5'TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGC3' R: 5'CCATGAGGGCATTGGCATAC3'	اگزون ۴	۱۹۸	۵۸
RT-βactin	F:5' CATCGGCAATGAGCGGTTC3' R:5' ACAGCACCGTGTTGGCGTAG3'	اگزون ۴	۱۵۲	۵۸

سنجش میزان بیان ژن‌های TNFα و βactin با استفاده از روش Real time - PCR انجام شد. حجم کلی واکنش Real time - PCR برای ژن‌های TNFα و βactin ۱۰میکرولیتر بود. این محلول شامل ۵ میکرولیتر Master mix سایبرگرین، ۳/۵ میکرولیتر آب دیونیزه شده، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر رفت (۲۰۰ نانومولار)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر برگشت (۲۰۰ نانومولار)، ۰/۵ میکرولیتر Rox Dye بود. نمونه‌ها به دستگاه PCR – Real time انتقال داده شد. واکنش گرمایی برای ژن‌های TNFα و βactin چنین انجام شد: نخست یک چرخه واسرشت‌سازی cDNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگر ۵۸ درجه به مدت ۲۵ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. منحنی ذوب شامل ۷۲ درجه تا ۹۵ درجه هر نیم درجه ۱ ثانیه توقف بود. برای محاسبه مقدار کمّی بیان ژن‌های TNFα مقدار Ct ژن هدف TNFα به وسیله ژن کنترل داخلی βactin نرمالایز شد. تفاوت

www.SID.ir

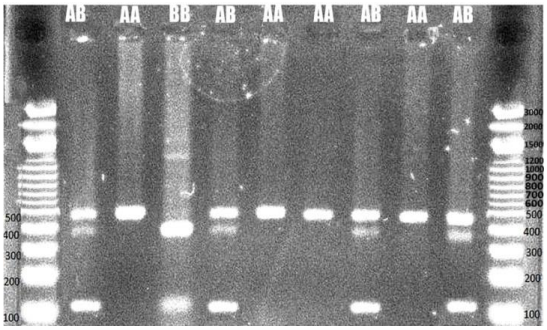
Archive of SID

سطح بیان ژن‌های نرمالایز شده بین گروه کنترل و گروه آزمایش طبق فرمول فافل (۱۸) ΔΔCt با نرم‌افزار Excel محاسبه و معنی‌داری آن به‌وسیله از نرم‌افزار SAS تست آماری (آزمون تی) شد.

$\Delta Ct=Ct(TLR2)- Ct(\beta actin)$
$\Delta\Delta ct= \Delta Ct\ (case)-average\ \Delta Ct(control)$

نتایج

نتایج هضم، سه ژنوتیپ را برای ژن TNFα مشخص کرد. ژنوتیپ AA تولید یک قطعه ۴۴۵ جفت‌باز کرد. ژنوتیپ BB یک قطعه ۳۵۰ جفت‌بازی و ۹۵ جفت‌بازی و ژنوتیپ AB سه قطعه ۴۴۵، ۳۵۰ و ۹۵ جفت‌باز را تولید کرد (شکل ۱).



شکل ۱– مشاهده ژنوتیپ های مختلف ژن TNFα در ژل آگارز

آماره کای دو، نشان داد که برای ژن TNFα جمعیت حساس در تعادل هاردی واینبرگ نبود (P<۰/۰۵) و جمعیت مقاوم در تعادل هاردی واینبرگ بود (P≥۰/۰۵).

فراوانی ژنوتیپ AA در گروه مقاوم بالاتر از فراوانی این ژنوتیپ در گروه حساس بود و فراوانی ژنوتیپ BB در جمعیت حساس بالاتر از فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت مقاوم بود (P<۰/۰۰۱)، بنابراین با توجه به نتیجه این پژوهش آلل A می‌تواند به عنوان آلل مطلوب برای مقاومت در مقابل بالارفتن ورم پستان در گاو هلشتاین ایران معرفی شود (جدول ۲).

آنالیز پیوستگی ژن TNFα با باقی‌مانده SCS و ارزش‌های اصلاحی برای تولید شیر و درصد چربی شیر نشان داد که بین چندشکلی‌های ژن TNFα با باقی‌مانده SCS و ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر ارتباط معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ‌های AA و AB روی باقی‌مانده SCS به ترتیب ۰/۵-، ۰/۲۶- ارزش‌های پایین‌تری در مقایسه با میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ BB روی باقی‌مانده SCS ۲/۰۸ داشتند. بالاترین میزان ارزش اصلاحی تولید شیر و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر ژنوتیپ BB و کمترین ارزش اصلاحی تولید شیر و ارزش اصلاحی درصد چربی شیر ژنوتیپ AA داشت. ژنوتیپ AA نشانگر مناسبی برای مقاومت به ورم پستان بود (جدول ۳).

جدول ۲– فراوانی ژنوتیپی و آللی در حیوانات حساس و مقاوم برای ژن TNFα

گروه	درصد فراوانی آللی		تعداد فراوانی ژنوتیپی (درصد)			آزمون آماری کای مربع
	A	B	AA	BB	AB	χ۲
مقاوم	۶۴	۳۵	۲۲ (۴۹)	۷ (۱۹)	۱۵ (۳۲)	۳/۳۹*
حساس	۱۵	۸۴	۷ (۰۹)	۴۰ (۷۸)	۹ (۱۳)	۱۲/۲۷
جمع	۴۰	۶۰	۲۹	۴۷	۲۴	

*تعادل هاردی واینبرگ: P<۰/۰۵

www.SID.ir

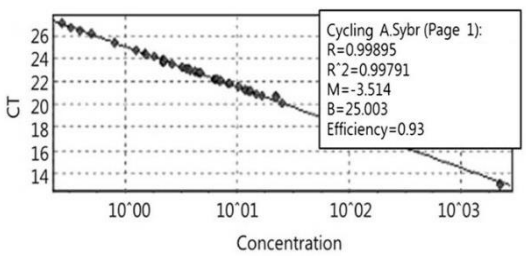
Archive of SID

جدول ۳- آنالیز پیوستگی ژن TNFα با باقی‌مانده SCS ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر

ژنوتیپ	نمره سلول‌های بدنی	ارزش‌های اصلاحی درصد چربی	ارزش‌های اصلاحی تولید شیر
AA	-۰/۵±۰/۰۸	۲۲/۰۳±۰/۰۳	۶۶۷/۵۹±۳/۱**
AB	-۰/۲۶ ± ۰/۰۹	۲۲/۴۵±۰/۰۵	۷۵۴±۳۰/۹**
BB	۲/۰۸± /۰۴	۲۳/۷±۰/۱	۷۶۲/۱۷±۵/۳**

**: معنی‌داری P<۰/۰۰۱

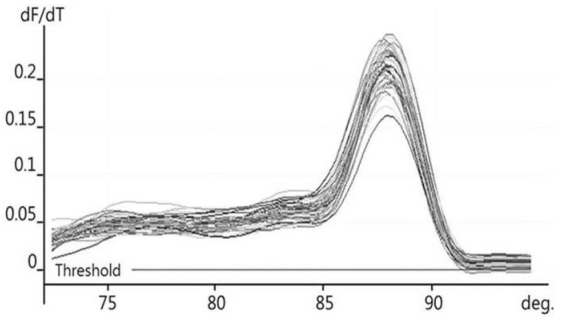
به منظور بررسی تولید حداکثر محصول Real time PCR، تست بازدهی برای ژن TNFα انجام شد. به دلیل قرارگیری کلیه نقاط R^2 نمودار (۰/۹۹٪)، از فرمول فافل ($2^{-\Delta\Delta ct}$) برای آنالیز نتایج بیان ژن در مقایسه با ژن کنترل داخلی βactin استفاده شد. آنالیز آماری نشان داد بیان ژن‌ها در گروه حساس بالاتر از گروه مقاوم بود (P<۰/۰۰۱). نمودار تست بازدهی برای ژن TNFα در زیر آورده شده است (شکل ۲).



شکل ۲- نمودار efficiency برای ژن TNFα

به منظور تأیید تولید محصول اختصاصی در طی واکنش Real time PCR و بررسی عدم تولید پرایمر دایمر نمودار منحنی ذوب (melting curve) برای ژن TNFα رسم گردید همان‌طور که مشاهده می‌گردد جز پیک یا قله محصول اختصاصی هیچ محصول جانبی دیگری به چشم نمی‌خورد (شکل ۳).

با مقایسه بیان ژن در گروه مبتلا به ورم پستان نسبت به گروه سالم گاوها مشخص شد بیان ژن در گروه بیمار بیشتر از گروه سالم بود. برای تشخیص اثر جهش روی تغییرات سطح بیان ژن و مقایسه بیان ژن در هر گروه ژنوتیپی تعداد ۷ نمونه گاو مبتلا از هر ژنوتیپ انتخاب و مقدار بیان ژن در ژنوتیپ های AA، BB و AB مقایسه شد. میزان بیان ژن در ژنوتیپ‌های BB (۱/۶±۰/۴۵)، AB (۱/۵ ±۰/۴۲) و AA (۱/۴±۰/۴۱) بود. میزان بیان در ژنوتیپ جهش‌یافته BB بیشتر از ژنوتیپ‌های دیگر وحشی بود. نتایج این پژوهش نشان داد ژن TNFα نشانگر مناسبی برای مقاومت علیه ورم پستان بود.



شکل ۳- منحنی ذوب ژن TNFα

بحث

ژن TNFα جزء مجموعه ژن‌های سازگار بافتی کلاس ۳ است، روی کروموزوم ۲۳ قرار دارد و ۴ اگزون دارد (NCBI) که همراه با عوامل دیگر سیستم ایمنی تکثیر، تمایز و فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی (لنفوسیت B، T و سلول‌های کشنده طبیعی) را تحریک می‌کند. TNFα واسطه مهم انتقال نوتروفیل‌ها به جایگاه التهاب است. TNFα همراه با عوامل دیگر سیستم ایمنی تکثیر، تمایز و فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی (لنفوسیت B، T و سلول‌های کشنده طبیعی) را تحریک می‌کند. TNFα مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و ائوزونوفیل‌ها را فعال و خواص فاگوسیتوزی نوتروفیل‌ها را افزایش می‌دهد (۵). TNFα در شیر پستان‌های آلوده با باکتری گرم منفی اشرشیاکلی،

www.SID.ir

Archive of SID

پنومونیا کلبسیلا و پسودوموناس آئروجینوسا و در غلظت‌های پایین در شیر حیوانات آلوده با استرپتوکوک آئروس وجود دارد. در مواردی تشخیص آن‌ها به علت غلظت پایینشان برای استرپتوکوک آئروس مشکل است (۵). Wodjka- Maksymie و همکاران (۲۲) گزارش کردند که بین چندشکلی‌های ژن TNFα و ورم پستان بالینی در شکم‌های مختلف زایش ارتباط معنی‌داری وجود داشت. آلل T مرتبط بود با تعداد ورم پستان بالینی کمتر در شکم‌های زایش پایین‌تر و تعداد ورم پستان بالینی بیشتر در شکم‌های زایش بالاتر. بیان ژن برای ژنوتیپ‌های TC و CC نسبت به ژنوتیپ TT بالاتر بود. درمطالعه‌ای گزارش شد وقوع اولین تخمک‌گذاری بعد از زایش در ژنوتیپ‌های AG و GG ناحیه پروموتور TNFα نسبت به گروه AA در گاو شیری بالاتر بود (۱۶). A-Juan و همکاران سال ۲۰۱۵ گزارش کردند ارتباط معنی‌داری بین جهش در موقعیت T→C۲۹۳ اگزون چهارم ژن TNFα با SCC در گاوهای هلشتاین وجود دارد. نتایج A-Juan و همکاران نتایج ما را تأیید کرد (۲). Xu و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که جهش در ناحیه پروموتور، اگزون ۱ و ۴ ژن TNFα ارتباط معنی‌داری با ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاوهای هلشتاین چین دارد (۲۳). چندین پژوهش نشان دادند TNFα در شیر پستان حیوانات آلوده با باکتری گرم منفی مانند اشرشیاکلی، پنومونیا، پسودوموناس آئروگینسا غلظت بیشتری دارد و در شیر حیوانات آلوده به استافیلوکوکوک آئروس مقدار پایین‌تری دارد که نتایج پژوهشگران، نتایج پژوهش ما را تأیید کردند (۶). Ma و همکاران سال ۲۰۱۱ گزارش کردند بیان ژن TNFα در گاوهای شیری دانمارک که با باکتری اشرشیاکلی تزریق شده بودند ۶ ساعت پس از تزریق افزایش یافت آن پژوهش نتایج پژوهش مارا تأیید کرد (۱۳). پژوهش‌های مختلف تأیید کردند TNFα نشانگر مناسبی برای اصلاح ورم پستان است. نتایج پژوهش ما نشان داد بین چندشکلی‌های ژن TNFα با صفات SCS، ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر ارتباط معنی‌داری وجود دارد بیان ژن در گروه حساس به ورم پستان بالاتر از گروه مقاوم به ورم پستان بود، بنابراین این نشانگر می‌تواند برای اصلاح مقاومت به ورم پستان در گاو هلشتاین شیری به کار گرفته شود.

منابع

۱- ضمیری، محمد جواد؛ پرورش گاو شیری؛ چاپ ششم؛ دانشگاه شیراز؛ جلد دوم؛ ۱۳۸۵؛ صفحه ۷۵-۸۵.

2- A-Juan, X. U; Xiao-Lin, L. I. U; Jia-Zhong, G. U. O. and Zhi, X. I. A; Polymorphism of bovine TNFα gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. Hereditas (Beijing); 2009; 32(9): 929-934.

3- Chen, R; Yang, Z; Ji, D; Mao, Y; Chen, Y; Li, Y; Wu, H; Wang, X. and Chang, L; Polymorphisms of the IL8 gene correlate with milking traits, SCS and mRNA level in Chinese Holstein. Mol Biol Reprod; 2011; 38(6): 4083-4091.

4- Dadpasand, M; Zamiri, M. J; Atashi, H. and Akhlaghi A. Genetic relationship of conformation traits with average somatic cell score at 150 and 305 days in milk in Holstein cows of Iran. J. Dairy. Sci.; 2012; 95:7340-7345.

5- Fonseca, G. R; Antunes, D. S; Paiva, C. C; Lange, S. E. F; Guimarães, S. E. F. and Martins, M. F; Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbreed dairy cows. Genet. Mol. Res.; 2011; 10(3): 1295-1303.

6- Fonseca, I; Silva, P. V; Lange, C. C;

www.SID.ir

Archive of SID

Reproductive Performance and Immune Function in Dairy Cattle. J .Rep. Develop; 2012; 60(3): 173-178.

12- Lee, J. W. D; Bannerman, D; J. PAAPE, M; Huang, M. K. and Zhao, X; Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with Escherichia coli or Staphylococcus aureus by real-time PCR. Vet. Res.; 2006; 37: 219-229.

13- Ma, J. L; Zhu, Y.H; Zhang, L; Zhuge, Z. Y; Liu, P. Q; Yan, X. D; Gao, H. S. and Wang, J. F; Serum concentration and mRNA expression in milk somatic cells of toll-like receptor 4, and cytokines in dairy cows following intramammary inoculation with Escherichia coli. J. Dairy .Sci.; 2011; 94: 5903-5912.

14- Martins, A. M; Silvestre A. M; Petim-Batista M. F. and Colaco J. A; Somatic cell score genetic parameter estimates of dairy cattle in Portugal using fractional polynomials. J. Anim. Sci.; 2011; 89: 1281-1285.

15- Miller, R. H; Norman, H. D; Wiggans, G. R. and Wright J. R; Relationship of Test-Day Somatic Cell Score with Test-Day and Lactation Milk Yields. J. Dairy. Sci.; 2004; 87: 2299-2306.

Oviedo-Boyso, J; Valdez-Alarco´n, J; Cajero-Jua´rez, M; Ochoa-Zarzosa, A. E; Lo´pez-Meza, J; Bravo-Patin˜o A, M; and Baizabal-Aguirre, V; Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect; 2007; 54: 399-409.

Guimaraes, M. F. M; Weller, M. M. D. C. A; Sousa, K. R. S; Lopes P. S. and Guimaraes S. E. F; Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. Genet Mol Boil; 2009; 32(4): 776-781

7- Hagnestam-Nielsen, C; Emanuelson, U; Berglund, B. and Strandberg, E; Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. J. Dairy. Sci; 2009; 92 :3124-3133.

8- Haraksingh, R. and Snyder, M;. Impacts of Variation in the Human Genome on Gene Regulation. J. Mol. Biol.; 2013; 425: 3970-3977.

9- Hand, K. J; Godkin A. and Kelton D. F; Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. J. Dairy. Sci.; 2012; 95 :1358-1362.

10- Gómez Flores-Ramos, L; Escoto-De Dios, A; Puebla-Pérez, A. M; Figuera-Villanueva, L. E; Ramos-Silva, A; Ramírez-Patiño, R; Delgado-Saucedo, J. I; Salas-González, E; Zúñiga-González, G. M; Alonzo-Rojo, A; Gutiérrez-Hurtado, I. and Gallegos-Arreola, M. P; Association of the tumor necrosis factor-alpha -308G>A polymorphism with breast cancer in Mexican women. Genet. Mol. Res.; 2013; 12(4): 5680-6773.

11- Kawasaki, Y; Yuka, A; Magata, F; Miyamoto, A; Kawashima, C; Hojo, T; Okuda, K; Koumei, S. and Shimizu, T; The Effect of single nucleotide polymorphisms in the Tumor Necrosis Factor-α Gene on

www.SID.ir

Archive of SID

Z; Polymorphism of bovine TNF-a gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. Yi Chuan; 2010; 32(9): 929-34.

23- Zhang, L. P; Gan, Q. F; Ma, T. H; Li, H. D; Wang, X. P; Li, J. Y; Gao, X; Chen, J. B; Ren, H. Y. and Xu, S. Z; Toll-likereseptor2 gene polymorphism and its relationship with SCS in dairy cattle. Anim .Biotech; 2009; 20: 87-95.

16- Pfaffl, M. W. and Horgan, G. W; (REST-2005©) Technical University of Munich and Corbett Research. 2005.

17- Ranjan, S; Bhushan, B; Panigrahi, M; Kumar, A; Deb, R; Kumar, P. and Sharma D; Association and Expression Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms of Partial Tumor Necrosis Factor Alpha Gene with Mastitis in Crossbred Cattle. Anim. Biotechn; 2015; 26:98-104.

18- Samadi Shams, S; Zununi Vahed, S; Soltanzad, F; Kafil, V; Barzegari, A; Atashpaz, S. and Barar, J; Highly Effective DNA Extraction Method from Fresh, Frozen, Dried and Clotted Blood Samples. BioImpacts; 2011; 1(3):183-187.

19- Shen, C; Sun, H; Sun, D; Xu, L; Zhang, X; Liu, A; Jia X; Bai, J; Chen, F; Yu, Y; Jin, Y; Yu, J. and Fu; Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and breast cancer risk: a meta-analysis . Breast Cancer Res. Treat.; 2011; 126 (3):763-70.

20- .Wickramasinghe, S; Hua, S; Rincon, G; Islas-Trejo, A; German, J. B; Lebrilla, C. and F. Medrano, J; Transcriptome Profiling of Bovine Milk Oligosaccharide Metabolism Genes Using RNA-Sequencing. Plos one; 2011; 6(4): 1-10.

21- Wojdak-Maksymiec, K; Szyda, J. and Strabel, T; Parity-dependent association between TNF-α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. BMC Vete. Res.; 2013; 9(114): 1-8.

22- Xu, A. J; Liu, X. L; Guo J. Z. and Xia.

www.SID.ir

Archive of SID

Association investigation and gene expression in genotypes TNFα with somatic cell score in Holstein Dairy cattle

Raoofian, P.[1]; Shoja, J.[2]; Moghadam, GH.[3]; Javanmard, A.[4]

1. PhD Student, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz- Iran.
2. Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz- Iran.
3. Associate Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz- Iran.
4. Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz- Iran.

Received: 16 December 2016 ***Accepted:*** 22 October 2017

Summary

Mastitis is a very important economic disease in dairy cattle. The TNFα gene as a key gene involved with mastitis and its polymorphisms and expression was evaluated as well as its correlation with somatic cell score (SCS). The gene expression of bovine TNFα profiling in Holstein cattle was also assessed. For this purpose, one hundred Holstein lactating cows were selected based on their breeding values for milk production, fat and somatic cell scores. Then cows based on their residual values for somatic cell scores were divided into two resistant and susceptible groups and 5 ml blood samples were collected from each animal. Selective genotyping of two target groups of susceptible and resistant animals to mastitis was done using PCR-RFLP approach, and then statistical association study was taken between identified genotypes and phenotypes records. Then, gene expression profiling between resistance and susceptible groups was evaluated using Real time PCR method. Results at this research showed significant correlation between TNFα gene polymorphism and values residuals of SCS ($P<0.01$). Gene expression was difference between the susceptible and resistance groups which, can be indirectly reflect relationships between screen mutations and gene expression pattern. So that the highest gene expression was belonged to BB genotype. As the final message of the present study, AA genotype may play a role and associated with relative resistance phenotype to mastitis in the studied population.

Keywords: Gene expression, Somatic Cell Count, Mastitis, Factor Necrosis Tumor.

* Corresponding Author E-mail: parvanehraufian@gmail.com

www.SID.ir