

## ارتباط چندشکلی های تک نوکلئوتیدی ژن BRCA1

### با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین

- مریم کرمی (نویسنده مسئول)

دانشجوی دکتری رشته ژنتیک اصلاح نژاد دام دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

- سیدعباس رأفت

عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

- غلامعلی مقدم

عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

- جلیل شجاع غیاث

عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

- آرش جوانمرد

عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۹۹۴۷۶۸۰

Email: PhD.karami@ramin.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2017.109862.1417

#### چکیده

با استفاده از برنامه‌های اصلاح ژنتیکی می‌توان مقاومت نسبت به بیماری‌ها را در حیوانات افزایش داد. در انتخاب ژنتیکی علیه بیماری ورم پستان در گاوهای شیری از چندشکلی ژن کانیدیا استفاده می‌شود. چندشکلی ژن کانیدیا، برای یافتن ارتباط میان SNP با فنوتیپ حیوان و بویژه استفاده از آن در برنامه انتخاب به کمک نشانگر است. بدین منظور وجود چندشکلی اگزون ۹ ژن BRCA1 در ۶۰ نمونه از گاوهای هلشتاین ایرانی با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی شد، که سه آلل مختلف در این بررسی شناسایی شدند. چندشکلی در جایگاه +۶۱۲۶ از ژن BRCA1 با جهش G-A آشکار شد. در جمعیت مورد نمونه برداری فراوانی‌های ژنوتیپی به ترتیب برای سه نوع ترکیب ژنی با نامگذاری KK، KL و LL معادل ۰/۲۷، ۰/۴۳ و ۰/۳۰ و دو آللی K و L برابر ۰/۴۸ و ۰/۵۲ بدست آمد. برای مطالعه ارتباط ژنوتیپ و رکوردهای حاصل از شمارش سلول‌های بدنی از رویه GLM و رگرسیون لجستیک استفاده شد. افراد دارای ژنوتیپ KK به طور معنی‌داری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر میزان سلول‌های بدنی کمتری داشتند. نتایج نشان داد که جایگاه مورد نظر در ژن BRCA1 به عنوان یک ژن مؤثر در مقاومت به ورم پستان می‌تواند در استراتژی‌های انتخاب به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. چنین به نظر می‌رسد که استفاده از تعداد نمونه بیشتر و بررسی ژن‌های کانیدیا دیگر می‌تواند برای دست یافتن به آزمونی با دقت بالاتر برای شناسایی حیوانات حساس و مقاوم به ورم پستان مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلل، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گاو هلشتاین، ورم پستان، ژن BRCA1

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 119 pp: 191-208

### The association between single nucleotide polymorphisms of BRCA1 gene with mastitis in Holstein cattle

By: Maryam Karami<sup>1\*</sup>, Seyed Abbas Rafat<sup>2</sup>, Gholamali Moghaddam<sup>2</sup>, Jalil Shodja<sup>2</sup>, Arash Javanmard<sup>2</sup>

1-PhD Student for Animal Breeding and Genetics Department of Animal Science, Khzestan Agricultural Science and Natural Resources University

2- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

Received: February 2017

Accepted: November 2017

Enhancing disease resistance in animal production can be achieved by genetic improvement programs. Candidate gene polymorphism is one of the potential approaches for search of association between SNP within this gene phenotype of animals, particularly in Marker Assisted Selection (MAS) for mastitis of large dairy cattle populations. Polymorphism of exon 9 of the BRCA1 gene was investigated by the PCR-RFLP method in 60 Iranian Holstein cattle. In this study, 3 different alleles were recognized. Polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism method was used to amplify, digestion and electrophoresis for a 219 base pair of bovine BRCA1 gene. A polymorphism was revealed by G-A single nucleotide polymorphism in +46126 position of BRCA1 gene. Observed genotype frequencies for KK, KL, LL were 0.27, 0.43 and 0.30 respectively, and allele frequencies for observed K and L allele were 0.48 and 0.52 accordingly. For analysis of variance, normality test and transformation of raw data for SSC records was performed based on previous main reports and literature reviews. GLM and logistic regression procedure was used for association study between genotype and collected phenotype. As a final message of the present report, KK genotype was showed significantly affect SCC data and has tendency for low SCC score than other two genotypes. The results of present study indicated BRCA1 gene as an effective candidate gene could be benefit for mastitis resistant in Marker Assisted Selection strategies in dairy cattle. Perhaps using high number of individuals and investigation of polymorphism on other candidate genes could help to reach high accuracy test for identification of resistant and susceptible animals for mastitis disease.

**Key words:** Allele, BRCA1 gene, Holstein cattle, mastitis, SNP

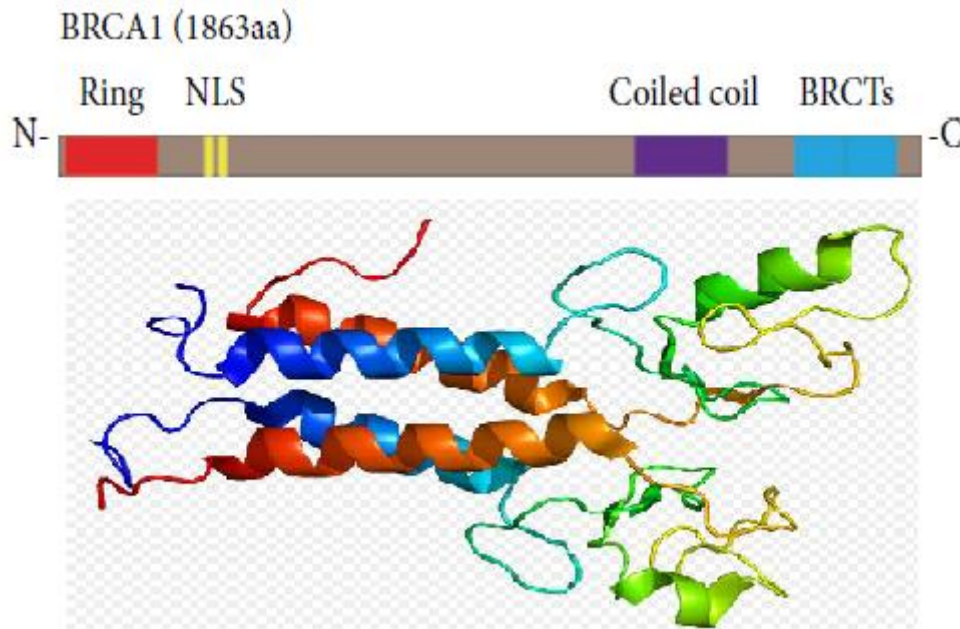
#### مقدمه

می شود. ورم پستان یکی از بیماری های بسیار شایع در گاو شیری است که به وسیله ژن ها و عوامل محیطی زیادی کنترل می شود (Sorensen و همکاران، ۲۰۰۸). این بیماری می تواند زیان های اقتصادی قابل توجهی را به گله های صنعتی وارد نماید. از جمله ضررهای متعدد اقتصادی می توان به کاهش تولید شیر، حذف زود هنگام گاو از گله و هزینه های بالای درمان اشاره کرد (Citek و همکاران، ۲۰۱۱؛ Prendiville و همکاران، ۲۰۱۰؛ Mostert

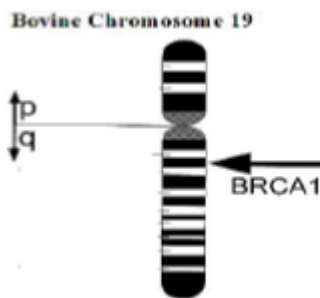
صنعت تولید شیر به منظور حفظ و بقای خود نیازمند آن است که بازدهی تولید شیر را افزایش دهد و این افزایش تولید موجب افزایش حساسیت دام به برخی بیماری ها نظیر ورم پستان می شود (Citek و همکاران، ۲۰۱۱؛ Prendiville و همکاران، ۲۰۱۰؛ Mostert و همکاران، ۲۰۰۴؛ Beaudeau و همکاران، ۲۰۰۰). گزینش به منظور افزایش مقاومت حیوانات در برابر بیماری ها به عنوان یک استراتژی جایگزین یا مکمل روش های رایج پیشنهاد

ژنتیکی همزمان این صفات را با مشکل روبرو می کند (Sahana و همکاران، ۲۰۰۸). در گذشته انتخاب طبیعی که در سیر تکاملی وجود داشته است و انتخاب فنوتیپی بر روی گزینش دام های اهلی مناسب، مؤثر بوده است. حالت ایده آل برای انتخاب فنوتیپی زمانی است که صفت وراثت پذیری بالایی داشته باشد و فنوتیپ برای همه حیوانات قبل از سن تولیدمثل قابل مشاهده باشد. این حالت ایده آل به ندرت پیش می آید بنابراین مؤثر بودن انتخاب فنوتیپی را محدود می کند (Dekkers و Hospital، ۲۰۰۲). در نتیجه به عنوان یک رویه جایگزین، شناسایی ژن های مؤثر بر مقاومت به ورم پستان و کاربرد رویه گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را به منظور بهبود وضعیت ورم پستان در صنعت گاو شیری فراهم کرده است (Lund و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین برای ایجاد مقاومت ژنتیکی، شناسایی ژن ها و آلل های مقاوم به ورم پستان ضروری می باشد (Citek و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از راهکارهایی که برای افزایش پتانسیل ژنتیکی به کار گرفته می شود شناسایی ژن های کاندیدای مرتبط با مقاومت به بیماری است. چندشکلی یک ژن نشان دهنده آلل های مختلف بوده که هر یک عملکرد متفاوت را به دنبال دارد. ژن Breast cancer A1 با علامت اختصاری BRCA1 به عنوان یکی از ژن های کاندیدا در ایجاد مقاومت به ورم پستان معرفی شده است (Yuan و همکاران، ۲۰۱۲). موقعیت کروموزومی آن در گاو کروموزوم ۱۹، در انسان کروموزوم ۱۷ و در موش کروموزوم ۱۱ می باشد. نقش این ژن در روند ترمیم آسیب های DNA، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم فرآیند رونویسی و دیگر مسیرهای مهم برای تعمیر و نگهداری از ثبات ژنوم است. این جایگاه ژنی شامل ۲۴ اگزون است که پروتئینی با ۱۸۶۳ اسید آمینه ("Protein id: AAL76094.1") را کد می - کند که این پروتئین نقش تنظیمی مهمی در جریان چرخه سلولی دارد (Miki و همکاران، ۱۹۹۴). اگزون ۱۱ بزرگترین اگزون بوده و بالغ بر ۶۰٪ از آمینواسیدها را کد می کند. اگرچه به صورت محدود با دیگر پروتئین های شناخته شده اشتراکاتی دارد، ولی اختصاصاً دارای دو Domain فانکشنال به صورت یکی حلقه انتهای N و دیگری انتهای C است (Donovan و Livingston، ۲۰۱۰) (شکل ۱).

و همکاران، ۲۰۰۴). پژوهشی که در گاو داری های صنعتی استان اصفهان انجام گرفت، نشان داد که به ازای افزایش هر ۱۰۰ هزار سلول بدنی در هر میلی لیتر نمونه شیر، تولید شیر حدود ۱/۵ لیتر کاهش می یابد. در صورتی که تعداد سلول های بدنی از ۹۰۰ هزار در هر میلی لیتر شیر بیشتر باشد، کاهش در حدود ۵ کیلوگرم و یا بیشتر از ۶ کیلوگرم در تولید شیر روزانه را سبب می شود (زمانی و همکاران، ۲۰۰۹). به دلیل اهمیت اقتصادی ورم پستان، بررسی مبنای ژنتیکی مقاومت به این بیماری اهمیت دارد. اگر چه از نظر انتخاب ژنتیکی حذف گاو هایی که پیوسته به ورم پستان دچار می - شوند اغلب بخش بزرگی از مشکلات ورم پستان در گله را برطرف می کند، ولی حذف تا اندازه ای مقاومت ژنتیکی در برابر ورم پستان در گله را می افزاید. نتایج تحقیقات اخیر نشان می دهد مقاومت به بیماری در نشخوارکنندگان دارای واریانس ژنتیکی است و در حال حاضر اکثر کشورها اهمیت زیادی به انتخاب صفات غیرتولیدی به ویژه مقاومت به ورم پستان می دهند (Carlen و همکاران، ۲۰۰۴). شیوع بیماری ورم پستان در اغلب کشورها حدود ۴۰ درصد است، که با استراتژی انتخاب ژنتیکی در بعضی از کشورها آن را تا ۲۵ درصد کاهش داده اند. با این وجود انتخاب حیوانات برای افزایش مقاومت به ورم پستان به دلیل عدم وجود تعریف واحد جهانی و همچنین پایین بودن توارث پذیری آن دارای محدودیت است. افزایش مقاومت ژنتیکی به بیماری ورم پستان می تواند در برنامه های اصلاح نژادی مدنظر قرار گیرد، که عمدتاً از روش های ژنتیک کمی و پارامترهای مربوط به فنوتیپ حیوان و یا خویشاوندان آن استفاده می شود. اما چون فنوتیپ نتیجه برآیند عامل ژنتیکی و محیطی است، لذا اگر انتخاب صرفاً بر اساس فنوتیپ صورت گیرد، میزان اشتباه آن بالا و سودمندی انتخاب کاهش می یابد (شهریاری، ۱۳۸۳؛ قره یاضی، ۱۳۷۵). علاوه بر این، برنامه های اصلاح نژادی که در قالب ژنتیک کمی صورت می گیرند، زمان بر می باشند. با توجه به اینکه پیشرفت ژنتیکی برای تولید شیر مسائل سلامتی را تحت تأثیر قرار می دهد، بنابراین باید در برنامه های اصلاح نژاد گاو شیری برای افزایش تولید شیر، بهبود مقاومت به ورم پستان نیز مورد توجه قرار گیرد. ولی همبستگی منفی بین تولید شیر و مقاومت به ورم پستان بهبود



شکل ۱- ساختار شماتیک پروتئین ۱۸۶۳ آمینو اسیدی BRCA1 با Domain های مختلف آن



شکل ۲- موقعیت کروموزومی جایگاه ژنی BRCA1 در کروموزوم های گاو

بیشترین ریسک ایجاد تومور متعاقب تغییر پروتئین سنتزی در نتیجه تغییر اسید آمینه‌ای صورت می‌گیرد که به نظر می‌رسد ناشی از تغییر وضعیت Domain های پروتئین باشد. حدود ۲۰۰۰ جهش مختلف در BRCA1 گاوی و اورتولوگ آن BRCA2 شناخته شده است که از انواع جهش‌های حذف و اضافه و بسیاری جهش‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی کدکننده و غیر کدکننده هستند و اثرات مختلفی به جا می‌گذارند. در پژوهشی Krum و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که توالی BRCA1 در گاو پیش‌بینی کننده بهتری از آلل بیماری در مقایسه با موش و سگ است. در مطالعه حاضر از BRCA1 به عنوان یک ژن کاندیدا

انواع جهش‌ها در ژن BRCA1 وجود دارد که تعدادی از پروتئین‌های حاصل موتاسیون ژن گاهی خاصیت سرکوب‌گر تومور و گاهی به عنوان سنسور صدمات وارده به DNA سلول و گاهی به عنوان تبدیل کننده‌های پیام‌های سلولی به زیر واحدها و بخش‌های مختلف در کمپلکس‌های آنزیمی عمل می‌کنند. اگزون های ۱ تا ۱۱ ژن گاوی پروتئین‌هایی که تولید می‌کنند به عنوان کمپلکس بزرگ ژنی نظارت کننده (BASC) به عنوان همراه و جز لاینفک ژن BRCA1 عمل می‌کنند و هرگونه جهش نتایج خاص خود را به همراه دارد و باعث تغییر محسوس در کد اسید آمینه و شکل فضایی پروتئین و تغییر مسیر متابولیکی می‌شود. با توجه به اینکه BRCA1 جز ژن‌هایی است که در فرآیندهای تنظیم چرخه سلولی نقش داشته و در قسمت بازوی q کروموزوم ۱۹ گاو واقع شده است (Krum و همکاران، ۲۰۰۲) (شکل ۲) هرگونه تغییر در ساختار ژن BRCA1 در صورتی که از نوع جهش‌های بی معنی نباشد، اگر از نوع موتاسیون‌های حذف و اضافه یا تغییر مکان کوچک باشد باعث کوتاه‌شدگی mRNA و در نتیجه تولید پروتئین ناکارآمد و اختلال در کارکرد آن پروتئین و در نهایت اختلال در چرخه سلولی خواهد شد.

استاندارد، DNA از گلوبول های سفید خون استخراج شد (صمدی شمس و همکاران، ۲۰۱۰). از کیت استخراج DNA خون ( شرکت آرمان تجهیز، شماره دستیابی ۶۹۷۸۶) برای خالص سازی DNA کروموزومی استخراج شده از نمونه های خون با بعضی تغییرات استفاده شد ( آتش پز و همکاران، ۲۰۰۸، ۲۰۱۰؛ برزگری و همکاران، ۲۰۱۰).

### بررسی کمی و کیفی نمونه های DNA

کیفیت و کمیت DNA در مراحل مختلف آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. برای سنجش میزان DNA استخراج شده و آلودگی آن به RNA و پروتئین از دستگاه نانودراپ (Nano ۱۰۰۰) (Drop Technologies, Wilmington DE, USA) استفاده شد. با تزریق ۲ میکرولیتر محلول DNA در صفحه چشمی مخصوص، اسپکتروفتومتری نمونه با اشعه UV انجام شد که دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۳۰ (نشان دهنده میزان خلوص و آلودگی DNA) و در نهایت غلظت DNA را به ng/μl گزارش کرد. افزوده سازی ژن از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت افزوده سازی قطعه ۲۱۹ جفت بازی از اگزون شماره ۹ ژن BRCA1 گاوی از آغازگرهای اختصاصی به صورت جدول ۱ استفاده شد:

(مارکر ژنی) در ارتباط با بیماری ورم پستان و صفات ایمنولوژیکی در گاوهای هلشتاین ایرانی استفاده شد. هدف این پژوهش مطالعه چندشکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه اگزون شماره ۹ ژن BRCA1 و بررسی تأثیر ژنوتیپ های آن روی مقاومت به ورم پستان است. تعداد سلول های بدنی شیر که مشخصه ورم پستان می باشد به عنوان متغیر وابسته مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه آشکار کردن مکانیسم های مولکولی پیچیده مسئول مقاومت به ورم پستان می تواند برای برنامه های انتخاب به کمک نشانگر مفید باشد، این مطالعه با هدف گامی به جلو برای افزایش مقاومت به ورم پستان در صنعت گاو شیری ایران انجام گرفته است.

### مواد و روش ها

#### نمونه گیری و استخراج DNA

در این پژوهش ۶۰ نمونه خون با استفاده از لوله های حاوی EDTA از گاوهای هلشتاین مولد مربوط به گاوداری صنعتی که بر اساس فایل اطلاعات بیماری و اطلاعات تولیدی و اطلاعات شجره ای که در این واحد وجود داشت از دو گروه هرکدام با تعداد ۳۰ رأس دام دارای سابقه ورم پستان به عنوان گروه حساس به بیماری و گروه بدون سابقه بیماری ورم پستان به عنوان شاهد جهت مطالعه انتخاب شده بودند، با استفاده از خون گیری از ورید دمی جمع آوری و جهت مطالعه انتخاب شد. نمونه ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. رکوردهای این گاوها برای تعداد سلول های بدنی شیر نیز در دسترس قرار گرفت. در جداسازی DNA ژنومی طبق پروتکل

#### جدول ۱- آغازگر رفت و برگشت جهت افزوده سازی قطعه هدف

مرجع	تعداد جفت باز تکثیر شده	توالی آغازگر (۳'-۵')	نوع آغازگر
( Madsen و همکاران، ۲۰۰۱)	۲۱۹	GAGAGTACCAATATTTTCCTTGG AATGTCATGTCCAGTAGATCC	رفت برگشت

بارگذاری دو سوم از طول ژل را پیمود، برق سیستم قطع شده و ژل برای رنگ‌آمیزی در داخل اتیدیوم بروماید (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه بسته به درصد ژل و کهنه و تازه بودن رنگ) قرار گرفت و پس از شستشو در آب، بر روی دستگاه ماورابنفش (UVIDOC) قرار داده و بلافاصله توسط دوربین مخصوص و چاپگر عکس ژل تهیه شد و نتایج مورد ارزیابی قرار گرفت (Soumet و همکاران، ۱۹۹۹).

### آزمون چندشکلی طول قطعات محدود شده (RFLP)

در بررسی چندشکلی قطعه مورد مطالعه از آنزیم برشی *Faq BSMFI* شرکت فرمتناز (شماره دستیابی ER:۱۱۸۱) با منشأ *Flavobacterium aquatile RFI* استفاده شد. توالی شناسایی آنزیم برشی *BSMFI* به صورت ۵'-GGGAC-۳' می‌باشد که با توجه به توالی تکثیر شده، جایگاه موتانت ژن را در طول قطعه به صورت اختصاصی شناسایی کرده و برش می‌دهد. پس از اطمینان از انجام درست روند افزوده‌سازی، هضم آنزیمی بر اساس دستورالعمل: ۱ میکرولیتر محصول PCR، به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم برشی، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم (Tango, ۱۰X)، SAM (Fermentas) و ۰/۱ میلی لیتر از (۲/۵mM) X ۵۰ Solution و ۵ میلی لیتر آب مقطر درون میکروتیوب به مدت ۱۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون بن ماری انجام گرفت. تعدادی از محصولات PCR برای ترادف یابی به خارج از کشور ارسال شد و نتایج حاصل از تعیین توالی با توالی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شدند (Align → BLAST → NCBI).

### آنالیز داده‌ها

تعداد ۶۰ رأس دام بر اساس روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شده و پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی، با بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه‌ها تجزیه و تحلیل شدند. محاسبه فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی و چندشکلی‌های مشاهده شده با استفاده از نرم افزار PopGene32 انجام شد (Nei, ۱۹۷۷). رکوردهای فنوتیپی مورد استفاده داده‌های مربوط به شمارش سلول‌های بدنی شیر ۶۰ گاو نمونه برداری شده بود. از آنجایی که توزیع واقعی SCC، بشدت نامتقارن و اریب به راست می‌باشد

جفت آغازگر فوق از شرکت پیشگام به صورت لیوفلیزه (غیرحساس به دما) خریداری شد. طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دوبار تقطیر مخلوط و در دمای ۲۰-درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ۳۵ چرخه و تحت رژیم حرارتی به صورت: واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه واسرشته‌سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه توسعه نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. بدین منظور دستگاه ترموسایکلر شرکت Biometra مدل 3.26 ساخت آلمان مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۵۰ میکرولیتری PCR Master kit شرکت سیناژن به همراه ۱۰ میکرومول از هر آغازگر اختصاصی و ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده) صورت گرفت.

### الکتروفورز فرآورده‌های PCR

جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و عدم وجود باندهای غیراختصاصی، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه بافر رنگی و سنگین کننده در چاهک‌هایی با عرض ۵ میلی متر در ژل آگارز ۱/۵٪ (Invitrogen California, USA) الکتروفورز شد تا پس از رنگ‌آمیزی، کیفیت و طول قطعه تکثیر شده بررسی و به وسیله ژل داک (مدل Cyngene, Cambrige, Unied Kingdom) مورد ارزیابی قرار گیرد. قبل از انجام الکتروفورز محلول مورد نیاز (بافر ۱X و TAE ۵۰X)، ژل آگارز و محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی آماده گردید. پس از آماده سازی ژل آگارز ۱/۵٪، تانک الکتروفورز تا ارتفاع ۳-۲ میلی متر روی ژل به وسیله بافر TAE پر شد. فرآورده‌های PCR به نسبت ۵ به ۱ به همراه بافر بارگذاری ساخت شرکت فرمتناز مخلوط شده و به داخل چاهک‌ها ریخته شد. در چاهک اول هر ژل نشانگر اندازه (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder) شرکت فرمتناز مورد استفاده قرار گرفت. در این تحقیق از ولتاژ ۱۰۰ ولت و جریان ۸۰ میلی آمپر برای الکتروفورز استفاده گردید. بعد از حدود ۴۰-۳۰ دقیقه و زمانی که رنگ مربوط به بافر

سالم) که فقط یکی از دو ارزش ۱ یا ۲ را می پذیرد. که ارزش ۱ به معنای وقوع حادثه مورد نظر (تعداد سلول های بدنی مساوی و بیشتر از ۲۸۶ در میلی لیتر شیر) و ارزش ۲ به معنای عدم وقوع آن (تعداد سلول های بدنی شیر کمتر از ۲۸۶ در میلی لیتر شیر) یا بالعکس است. در اینجا برآورد وقوع بیماری و عدم آن در بین دام های مورد مطالعه به کمک چند متغیر مستقل (پیش بینی کننده) صورت گرفت. برای داده های دودویی مانند این تحقیق از رگرسیون لجستیک استفاده می شود. در اینجا در مدل رگرسیون لجستیک، عوامل به شرح زیر مورد آنالیز قرار گرفتند که  $P =$  سطح احتمال (احتمال وقوع) که متغیر وابسته بود و  $X =$  شکم زایش و ژنوتیپ که هر دو متغیرهای مستقل بودند. نحوه آنالیزها به ترتیب شامل تشخیص ماهیت داده خام، مشخص کردن عوامل مؤثر در مدل آماری، آزمون نرمالیتیه تبدیل داده و سپس آنالیزها شامل آنالیز واریانس یا آزمون میانگین متعاقب آن و آنالیز رگرسیون لجستیک و برآورد اثر جایگزینی آللی و در انتها آزمون کای مربع برای مقایسه فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه دام مورد آزمایش بود.

### نتایج و بحث

#### نتیجه استخراج DNA و سنجش کمیت و کیفیت آن

استخراج خالص DNA ژنومی از نمونه های بیولوژیکی گام اولیه حیاتی برای موفقیت در تکنیک های مختلف مولکولی از قبیل واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، آنالیز آنزیم های محدود کننده، تشخیص جهش ها، ژنوتایپینگ و آنالیز پیوستگی است (Philips و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه بر این، DNA استخراج شده از نمونه های خون از مهم ترین شرایط لازم برای تشخیص اختلالات ژنتیکی، مطالعات اپی ژنتیک و آزمایشات تشخیصی مختلف و تست های پیشگیرانه است (Angelini و همکاران، ۲۰۰۰؛ Lewis و همکاران، ۲۰۰۵؛ Philips و همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۳). در پژوهش حاضر DNA های استخراج شده از خون از نظر کمیت و کیفیت یک دست نبودند به طوری که بعد از بارگذاری نمونه ها در ژل آگارز در بعضی از نمونه ها باند شارپ و بهتر و در بعضی از

جهت آنالیز داده ها به طور معمول به نمره سلول های بدنی (SCS) تبدیل می شوند. قبل از انجام آنالیز واریانس داده های SCC بر اساس شرایط و وضعیت و نوع آن ها به روش لگاریتم گیری با فرمول  $SCS = \ln(SCC/100000) + 3$  نرمال شد (دادپسند و همکاران، ۲۰۱۳؛ همتی دوست و همکاران، ۲۰۱۳؛ Ali و Shook، ۱۹۸۰) و تجزیه آماری با داده های تبدیل شده انجام گرفت. با استفاده از نسخه ۹/۱ نرم افزار آماری SAS و رویه GLM اثر ژنوتیپ های بدست آمده در قالب یک مدل اثرات ثابت روی رکوردهای فوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + p_i + b_j + (p \times b) + e_{ij}$$

در این مدل:  $Y_{ij}$ : نشان دهنده مشاهدات مربوط به تعداد سلول های بدنی شیر (SCC) ژامین حیوان،  $\mu$  = اثر میانگین جامعه،  $p_i =$  اثر شکم زایش (i=1, 2) اثر شکم زایش (در دو سطح)،  $b_j =$  اثر ژنوتیپ (در سه سطح) و  $e_{ij} =$  اثرات باقی مانده یا عوامل ناشناخته (خطا). عوامل شناخته شده ای که در مدل وجود داشتند شامل شکم زایش و ژنوتیپ و اثر متقابل این دو بود لذا برای انجام آنالیز آماری باید تصحیحاتی صورت می گرفت. قبل از شروع آنالیز اثرات تعداد سطوح هر اثر تعیین شد. تعدادی از عوامل ثابت که تعداد مشاهده آن کمتر از دو تکرار بود (شکم های زایش ۶ و ۷) برای از بین بردن اثر ناهمگنی تکرارها در آنالیز نهایی با شکم های زایش ۴ و ۵ همگی در یک سطح تحت عنوان "سطح دو" دسته بندی شدند. شکم های زایش ۱ و ۲ و ۳ نیز با هم تحت عنوان "سطح یک" دسته بندی شدند. جهت بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت مورد آزمایش از آزمون مربع کای استفاده شد. این آزمون با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. در ادامه آنالیزها برآورد متوسط اثر جایگزینی آللی یا متوسط اثر جایگزینی یک آلل با فراوانی زیاد با آللی با فراوانی کم در هر دو جایگاه ژنی به وسیله ضریب رگرسیونی صورت گرفت (Mackay و Falconer، ۱۹۹۶).

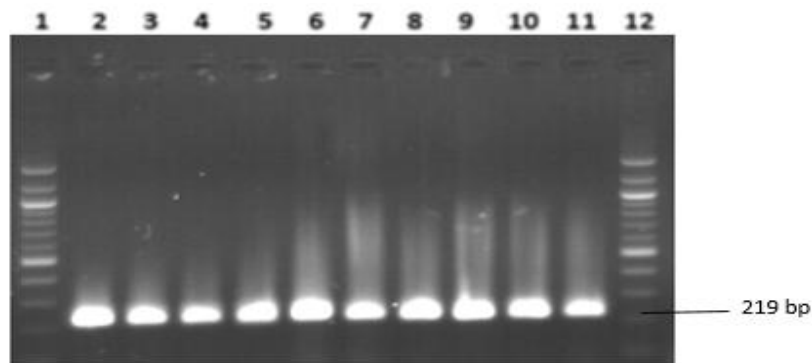
#### رویه رگرسیون لجستیک و آنالیزهای متعاقب آن

در این مطالعه صفت بیماری تنها دو نتیجه ممکن دارد (بیمار و

آلودگی پروتئین یا فنلی را نشان می‌دهد و اعداد بالاتر از ۲ نشان دهنده آلودگی RNA هستند (Connell و Wolfinger، ۱۹۹۳). داده‌های حاصل از نانودراپ و الکتروفورز نشان داد که DNA استخراجی کارایی مطلوبی از لحاظ کیفیت و کمیت دارد. نتیجه افزوده‌سازی ژن مورد نظر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در طی PCR، قطعه ۲۱۹ جفت بازی ژن BRCA1 با استفاده از دو پرایمر اختصاصی تکثیر شد. نتایج مطالعه باندهای PCR روی ژل به این صورت است که قطعه مورد نظر به اندازه ۲۱۹ جفت باز به صورت باند واضحی دیده شد که اندازه آن از روی سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی مشخص شد. شکل ۳ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ را نشان می‌دهد. برای ارزیابی دقیق‌تر قطعات تکثیر شده از یک نشانگر استاندارد وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد که در کنار محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تأیید می‌کند. محصولات PCR تمام نمونه‌های مورد بررسی مشابه هم بودند. در همین شکل وجود یک نوار مشخص بر روی آگارز مؤید این است که پرایمرهای به کار رفته تنها دارای یک قطعه هدف روی DNA بودند و شباهت توالی در مکان‌های دیگری از DNA وجود ندارد و نیز وجود باندهای روشن و بدون کشیدگی و با کیفیت زیاد مشخص کرد که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است. قطعه اختصاصی ۲۱۹ جفت بازی مربوط به اگزون ۹ ژن BRCA1 به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در کلیه نمونه‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفته بودند (۱۰۰ درصد) مشاهده گردید.

نمونه‌های دیگر باندهای ضعیف مشاهده شدند. نمونه‌هایی که باندهای خیلی ضعیف نشان می‌دادند مورد استخراج مجدد قرار گرفتند. پررنگ بودن باندها دلیل بر غلظت بالای DNA استخراجی بود. تعیین خلوص DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ نتایج حاصل از ژل را تأیید کرد. نسبت OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub> در نمونه‌های DNA استخراج شده در محدوده ۱/۸ تا ۲/۰ قرار داشتند و در نتیجه خلوص DNA در حد مطلوب بوده و فاقد RNA یا پروتئین بودند. مقدار DNA نیز با فرمول  $A_{260} \times 50 \text{ mg}/\mu\text{l} = \text{غلظت DNA (ng}/\mu\text{l})$  محاسبه گردید که بین ۵۰ تا ۹۵ ng/μl متغیر بود. مطالعات ژنتیک جمعیت به طور چشمگیری به صورت پذیرفتن واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) وابسته است و ماده اولیه برای انجام این نوع از مطالعات، DNA استخراج شده با کیفیت مطلوب می‌باشد. از آنجا که برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به میزان اندکی DNA با کیفیت بالا نیاز می‌باشد (نصیری و همکاران، ۲۰۰۵) لذا مقادیر حاصل از روش استخراج در این مطالعه مطلوب می‌باشد. موفقیت‌های ناشی از استخراج بهینه DNA به خلوص و غلظت بالای DNA استخراج شده وابسته است. بیشترین مزیت این ابزار حاصل روش-های بهینه استخراج DNA با حذف مهارکننده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) است (Angelo و همکاران، ۲۰۰۷). اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ باشد نشان دهنده این است که جذب عمدتاً به علت اسیدنوکلئیک است و کیفیت و خلوص DNA مطلوب است. اعداد کمتر از ۱/۸



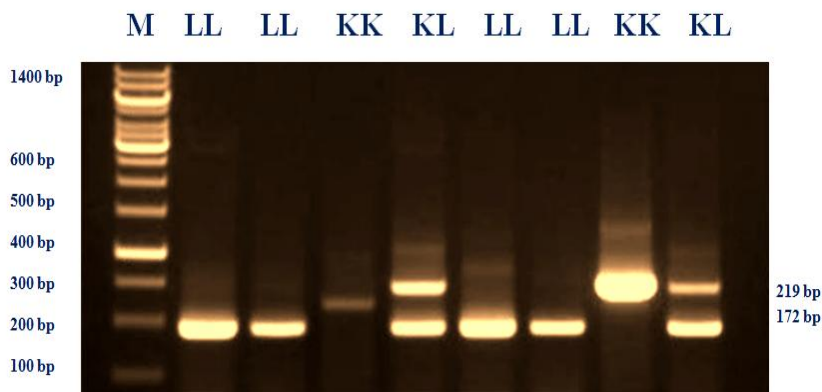


شکل ۳- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر قطعه ۲۱۹ جفت بازی اگزون ۹ ژن BRCA1 بارگذاری شده بر روی ژل آگارز ۱/۵٪: Lane ۱ و Lane ۱۲ نشانگر اندازه (Gene Ruler 100 bp Plus DNALadder)، Lane ۲ الی Lane ۱۱ شامل محصولات PCR (قطعه ۲۱۹ جفت بازی)

### نتایج هضم آنزیمی

یکی از روش‌های استاندارد در شناسایی چندشکلی‌ها تکنیک PCR-RFLP است. در پژوهش حاضر ناحیه پالیندروم (دوسرخوانا) در روی محصول به خوبی شناسایی شد و وجود یا عدم وجود جهش در این ناحیه بررسی گردید. با داشتن این اطلاعات که در صورت ایجاد جهش در آلل‌های ناحیه ژنی مربوطه آنزیم‌های برشی قادر به برش ناحیه مورد نظر نخواهند بود این نتایج حاصل شد: الگو قطعات حاصل از هضم آنزیمی با روش PCR-RFLP چند شکلی در موقعیت ۴۶۱۲۶+ اگزون ۹ با

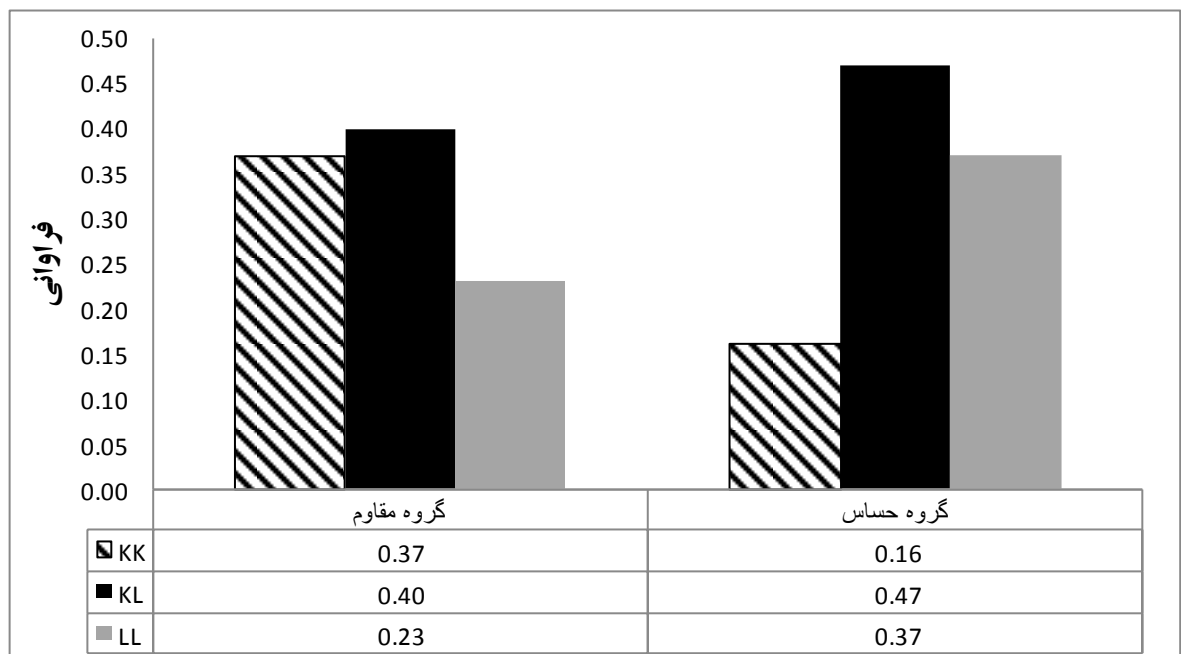
جهش G>T را آشکار نمود. برای تأیید نتایج PCR-RFLP تعدادی از محصولات PCR تعیین توالی شدند که در آن چندشکلی در موقعیت مورد نظر تأیید شد ( GenBank ID:NP\_848668.1). پس از بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه‌ها، در نهایت سه الگوی متفاوت (متشکل از K و L) در برش آنزیم *BSMF I* به وسیله بارگذاری در ژل آگارز ۲/۵٪ مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای قطعه ای از اگزون شماره ۹ ژن BRCA1 در گاوهای هلشتاین ایرانی. محصولات حاصل از هضم آنزیمی (RFLP بعد از PCR) بارگذاری شده در ژل آگارز ۲/۵٪ (Invitrogen California, USA). در این تصویر باندهای متعدد حاصل از اثر آنزیم *BSMF I* روی محصول PCR دیده می شود. Lane M: سایز مارکر ۱۰۰ bp

دارد که در شکل دیده نمی‌شود) و ژنوتیپ LL دارای باند ۱۷۲ و ۴۷ جفت بازی است. فراوانی‌های هریک از این الگوهای برش آنزیم در اساس نوع آنزیم با استفاده از نرم افزار PopGene32 مشخص شد. برای سه نوع ترکیب ژنی با نامگذاری KK، KL و LL در گروه مقاوم فراوانی‌های ۰/۳۷، ۰/۴ و ۰/۲۳ محاسبه شد و همین فراوانی‌های ژنوتیپی در گروه حساس به ترتیب ۰/۱۶، ۰/۴۷ و ۰/۳۷ به دست آمد (نمودار ۱).

با شناسایی چندشکلی‌های ژنتیکی افراد انتخابی در هر گروه، بر اساس نحوه برش آنزیم سه الگوی ژنوتیپی KK، KL و LL برای قطعه تکثیر شده آشکار گردید. در آلل K برش انجام نمی‌شود چون آنزیم محل برش ندارد اما در آلل جهش یافته (L) تغییر نوکلئوتیدی جایگاه جدید برش ایجاد می‌کند. ژنوتیپ KK دارای یک باند ۲۱۹ جفت بازی است، ژنوتیپ KL دارای یک باند ۲۱۹ و ۱۷۲ جفت بازی است (البته باند ۴۷ بازی هم وجود



نمودار ۱- فراوانی ژنوتیپی در حیوانات مقاوم و حساس به ورم پستان برای جایگاه اگزون ۹ ژن BRCA1

توافق با نتایج حاصل از پژوهش Yuan و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد که نشان دادند افراد با ژنوتیپ همباز غالب به طور معنی‌داری تعداد سلول‌های بدنی کمتری نسبت به دو ژنوتیپ هتروزیگوت همباز و هموزیگوت مغلوب همباز در قسمتی از اگزون شماره ۹ جایگاه ژنی BRCA1 گاوی داشتند.

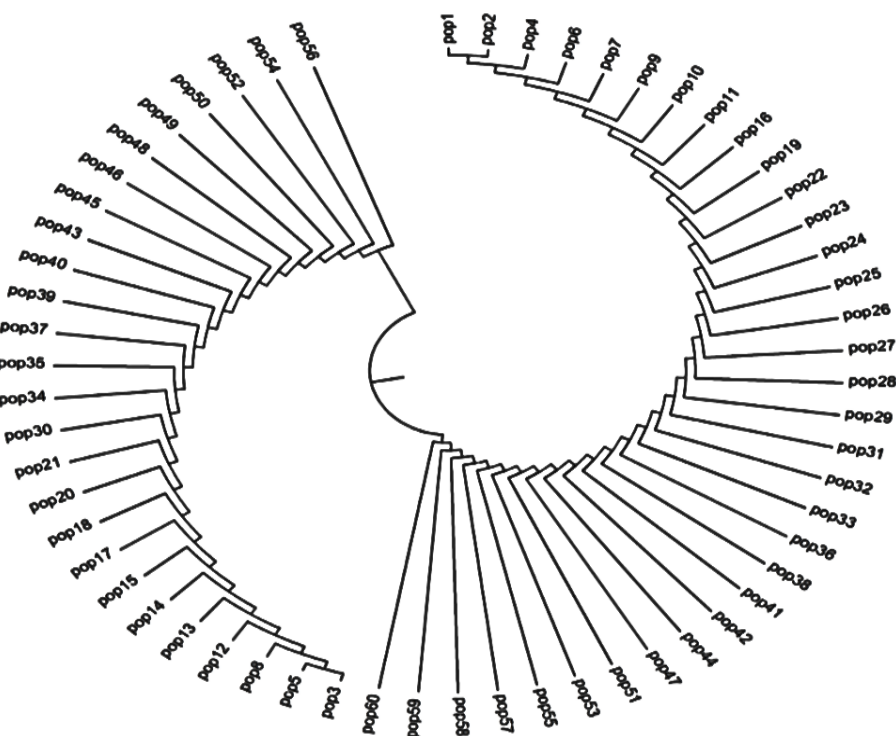
همانطور که از نتایج برمی‌آید، مقایسه فراوانی هر الگو در دو گروه نشان داد که در این مدل آنالیز ژنوتیپ معنی‌دار بوده و در مقایسه بین ژنوتیپ KK و KL، آلل L باعث بالا رفتن تعداد سلول‌های بدنی می‌شود. در جمعیت مورد مطالعه فراوانی آلل L در گروه حساس بالاتر بود در حالی که آلل K دارای فراوانی بالاتری در گروه مقاوم به ورم پستان بود. فراوانی‌های آلی به دست آمده در

## نتایج آنالیز واریانس

بامیزان کمتر خطر ابتلا به بیماری ورم پستان بالینی ارتباط معنی دار دارد ( $P < 0/01$ ).

نمودار ۲ خوشه‌بندی افراد بر اساس ژنوتیپ ژن مورد نظر را نشان می‌دهد و ژنوتیپ مربوط به هر عضو جمعیت مشخص شده است. تعداد ۳۰ مشاهده اول مربوط به دام‌های مقاوم و ۳۰ مشاهده بعدی از شماره ۳۱ تا شماره ۶۰ جزء گروه دام‌های با سابقه بیماری ورم پستان (حساس) بودند به نظر می‌رسد در دسته‌بندی تقریباً این ژن توانسته است افراد حساس و مقاوم را به‌طور نسبی از هم جدا کند. از این ژن شاید بتوان به عنوان یک روش غیر مستقیم و در عین حال دقیق جهت بررسی وضعیت بهداشت و سلامت دام، کیفیت شیر تولیدی و در نهایت پیشرفت ژنتیکی سریع‌تر در اتخاذ استراتژی‌های اصلاحی استفاده کرد.

نتایج رویه GLM با داده‌های نرمال شده نشان داد که شکم زایش و ژنوتیپ اثر معناداری بر روی لگاریتم سلول‌های بدنی داشتند ( $P < 0/01$ ). نتیجه آنالیز واریانس نشان داد که وجود آلل L باعث بالارفتن تعداد سلول‌های بدنی می‌شود. با مقایسه ژنوتیپ KK با LL نشان داده شد که تفاوت معناداری بین این دو ژنوتیپ وجود دارد به طوری که ژنوتیپ KK،  $1/25$  واحد باعث بهبود نمره سلول‌های بدنی نسبت به ژنوتیپ LL شد. این در حالی است که تفاوت معناداری بین دو ژنوتیپ KL و LL مشاهده نشد. همچنین با مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید که ژنوتیپ KK در مقابل هر دو نوع ژنوتیپ KL و LL معنی دار است ( $P < 0/01$ ). چون میزان SCC معیار ارزیابی مقاومت به ورم پستان است و از طریق آن می‌توان به طور غیرمستقیم میزان حساسیت به ورم پستان را تشخیص داد لذا از سه ژنوتیپ شناسایی شده تنها ژنوتیپ KK



نمودار ۲-نحوه خوشه‌بندی ۶۰ دام مورد مطالعه بر اساس ژن مورد نظر در دو گروه فنوتیپی متفاوت

## نتایج رگرسیون لجستیک

آنالیز رگرسیون لجستیک بین عوامل ثابت با وضعیت بیماری نشان داد که بین شکم زایش و اثرات ژنوتیپ با وضعیت بیماری ارتباط معنی دار وجود دارد ( $P < 0.01$ ). نتایج معنی داری اثرات ژنوتیپ و سطوح شکم زایش بر روی وضعیت بیماری به صورت جدول ۲ می باشد:

سابقه ابتلا به ورم پستان بالینی در دو گروه دام مورد بررسی باعث تظاهر ژنوتیپ‌های متفاوت در دو گروه نسبت به همدیگر شده است به طوری که در گروه حساس ژنوتیپ‌های LL و KL و در گروه مقاوم ژنوتیپ KK مشاهده شد.

جدول ۲- نتایج آنالیز رگرسیون لجستیک با داده‌های نرمال شده

عوامل مؤثر در مدل	درجه آزادی	$\chi^2$	سطح معنی داری
ژنوتیپ	۲	۶/۰۶	۰/۰۵
شکم زایش (۲ سطح)	۱	۵/۷۵	۰/۰۱
ژنوتیپ × شکم زایش	۲	۰/۷۹	۰/۶۷

جدول ۳- نتایج حاصل از مقایسات مستقل و متعامد ژنوتیپ‌ها و سطوح شکم زایش در مدل رگرسیون لجستیک

فاکتورهای مورد آزمون	در مقابل	مقدار برآورد شده	نسبت بخت (odds ratio)	معنی داری
ژنوتیپ KL	LL	-۰/۹۴۵	۰/۳۸۸	$< 0.05^{NS}$
ژنوتیپ KK	LL	۱/۱۰۷	۳/۰۲۵	$< 0.05^*$
ژنوتیپ KK	KL	-۰/۱۶۱	۰/۸۵۱	$< 0.05^*$
ژنوتیپ KK	ترکیب LL و KL	۰/۸۸۷	۲/۴۲۷	$< 0.05^*$
شکم زایش سطح ۱	شکم زایش سطح ۲	۰/۸۵۳	۲/۳۴۸	$< 0.05^*$

NS: عدم معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵

\*: معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵

ژنوتیپ KL در برابر LL معنی دار نشد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۳). بر اساس جدول ۳ نتایج مدل رگرسیون لجستیک از طریق تغییر متغیر مبنا نشان داد که تفاوت معناداری بین KK با KL وجود دارد ( $P < 0.05$ ). همچنین با توجه به سابقه ورم پستان بالینی، اثر شکم زایش بر تعداد سلول‌های بدنی شیر معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). نتایج حاکی از آن است که با افزایش شکم زایش از سطح یک به

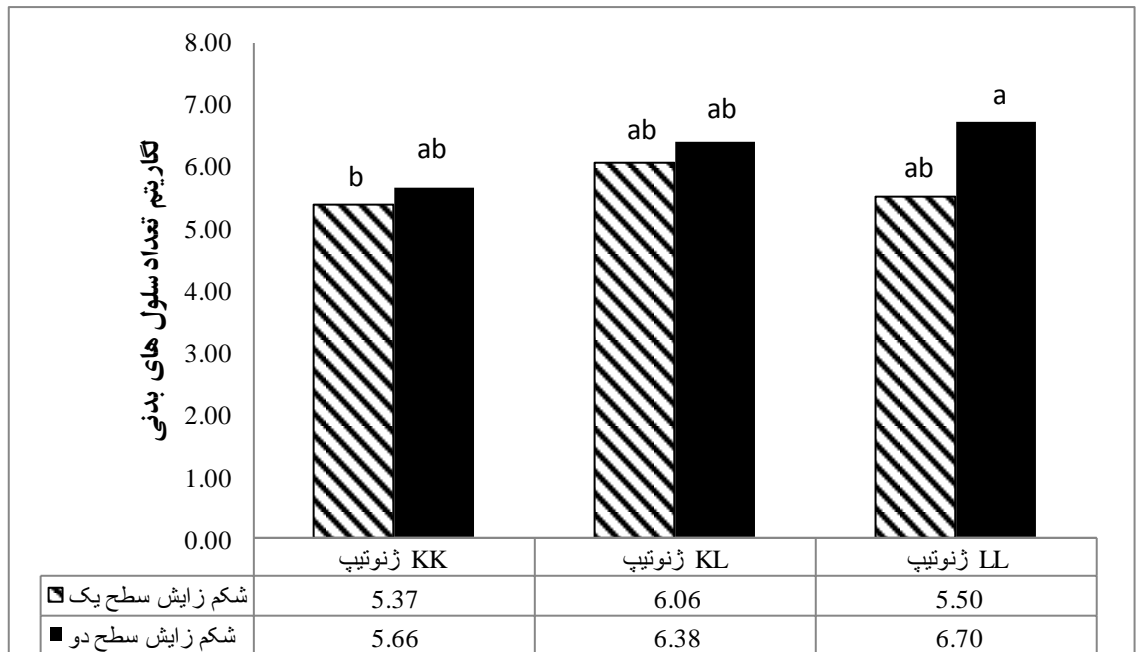
در آنالیز رگرسیون لجستیک مقایسات دو ژنوتیپ KK و LL نسبت به ژنوتیپ LL و همچنین شکم زایش سطح یک نسبت به شکم زایش سطح دو صورت گرفت. مقایسه سایر اثرات از طریق مقایسات متعامد (اورتوگونال) انجام شده است. نتایج تفاوت معناداری را بین ژنوتیپ KK با ترکیب دو ژنوتیپ LL و KL برای تعداد سلول‌های بدنی شیر نشان داد ( $P < 0.05$ ) و

نیست، اما با افزایش روزهای پس از زایش، به طور معنی داری تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد. نتیجه اینکه همه عوامل تأثیرگذار بر تعداد سلول‌های بدنی شیر اهمیت دارند؛ اما بر اساس سابقه ابتلای گاو به بیماری ورم پستان، اثر متفاوتی خواهند داشت. در تفسیر تعداد سلول‌های بدنی مربوط به گاوهای با سابقه ابتلا به ورم پستان بالینی، دوره شیردهی (شکم زایش) دارای اهمیت است.

Fleischer و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند اثر نوبت زایش بر روی وقوع این بیماری معنی دار است. در مطالعه‌ای که توسط آهنگران رجی (۱۳۹۰) روی گاو هلشتاین انجام شد اثر شکم زایش بر وقوع بیماری ورم پستان (که نمود آن افزایش تعداد سلول‌های بدنی است) معنی دار نبود ولی نتایج (Fleischer و همکاران، ۲۰۰۱؛ Grohn و همکاران، ۱۹۹۵؛ Rajala و Grohn، ۱۹۹۸) اثر نوبت زایش را روی وقوع این بیماری معنی دار نشان می‌دهد. متفاوت بودن تخمین‌های همبستگی فاکتورهای خطر ساز در میان مطالعات، نشان دهنده وجود واریانس در بسیاری از فاکتورها مانند افراد عهده‌دار رکوردگیری (دامدار یا دامپزشک)، چگونگی تفسیر نشانه‌های بالینی، کامل نبودن داده‌های رکوردگیری شده (از قبیل اینکه برای بعضی مشاهدات سطوح زیاد و برای بعضی سطوح خیلی کم در نظر گرفته شده است)، عوامل بیماری‌زا و محیط است که ممکن است تجلی همبستگی ژنوتیپی یک حیوان را تحت تأثیر قرار دهد (Berry و همکاران، ۲۰۱۱).

تفاوت بین سطوح زایش و سطوح اثرات ژنوتیپ‌های مختلف بر میزان سلول‌های بدنی شیر در نمودار ۳ نشان داده شده است. این نمودار معنی داری ژنوتیپ KK در مقابل هر دو نوع LL و KL و شکم زایش سطح ۱ در مقابل شکم زایش سطح ۲ در کاهش تعداد سلول‌های بدنی شیر را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار درون هر ژنوتیپ تفاوت معناداری بین گاوهای شکم زایش سطح ۱ با گاوهای شکم زایش سطح ۲ مشاهده نشد. بیشترین میزان سلول‌های بدنی برای ژنوتیپ LL در شکم زایش سطح ۲ و کمترین میزان سلول‌های بدنی برای ژنوتیپ KK در شکم زایش سطح ۱ مشاهده شد که تفاوت معناداری را نشان داد.

سطح دو، تعداد سلول‌های بدنی شیر گاوهای هلشتاین با نسبت بخت ۲/۳ برابر افزایش یافت که متعاقب آن احتمال ورم پستان افزایش می‌یابد. دلیل پایین بودن تعداد سلول‌های بدنی در دوره‌های اول شیردهی (شکم یک تا سوم) نسبت به سایر دوره‌ها می‌تواند این باشد که با افزایش سن، حیوانات در طول حیات خود بیشتر در معرض میکروارگانیزم‌های مولد ورم پستان قرار می‌گیرند و در نتیجه به ورم پستان مبتلا می‌شوند همچنین ضعیف‌تر بودن سیستم ایمنی گاوهای مسن‌تر نسبت به گاوهای جوان‌تر می‌تواند یکی از دلایل دیگر باشد. نتایج جمالی و بابا احمدی (۱۳۹۱) بر روی گاوهای هلشتاین نشان داد گاوهای شکم زایش اول کمترین نمره سلول‌های بدنی را داشتند و بین دوره‌های بالاتر زایش تفاوت معنی داری برای نمره سلول‌های بدنی مشاهده نگردید. در تحقیقی که به وسیله میرزایی و همکاران (۱۳۹۰) روی عوامل مؤثر بر تعداد سلول‌های بدنی شیر گاو بر اساس سابقه ورم پستان بالینی انجام شد میانگین لگاریتم تعداد سلول‌های بدنی شیر گاوهای دارای سابقه ورم پستان بالینی به طور معنی داری بیشتر از گاوهای بدون سابقه ورم پستان بالینی بود، مهم‌ترین فاکتور تأثیرگذار بر سلول‌های بدنی شیر، کارتی‌های انفرادی و در نهایت گاو و گله، وضعیت عفونت در کارتی‌ه و پستان است. با توجه به بیشتر بودن تعداد سلول‌های بدنی شیر گاوهای دارای سابقه ورم پستان بالینی نسبت به گاوهای بدون سابقه بیماری، در نتیجه قدم‌مطلق ضریب همبستگی بین تعداد سلول‌ها و میزان تولید شیر در گاوهای بدون سابقه بیشتر از گاوهای با سابقه بیماری می‌باشد. از این نتایج چیزی که بسیار مشهود است اینکه در تفسیر داده‌های مربوط به سلول‌های بدنی در گاو‌داری‌ها باید سابقه ابتلای گاو به ورم پستان در نظر گرفته شود. چنین به نظر می‌رسد که در گاوهای با سابقه ورم پستان تعداد سلول‌های بدنی با افزایش روزهای پس از زایش (اواخر یا اوایل شیردهی گاو) تغییر معنی داری نمی‌کند، هرچند که میزان تولید شیر در مراحل مختلف شیردهی تغییر می‌یابد؛ اما با افزایش دوره شیردهی گاو به طور معنی داری افزایش پیدا می‌کند. در گاوهای بدون سابقه ورم پستان بالینی ارتباط بین تعداد سلول‌های بدنی و دوره‌های شیردهی مختلف گاو معنی دار



نمودار ۳- نمودار لگاریتم تعداد سلول‌های بدنی شیر برای اثرات متقابل شکم زایش و ژنوتیپ

توجه به سطح معنی‌داری در دو گروه حساس و مقاوم و همچنین کل جمعیت مورد نمونه برداری نشان داد فراوانی‌های مشاهده شده با فراوانی‌های مورد انتظار تفاوت معنی‌داری نداشته است و سطح احتمال درون دو گروه و در کل جمعیت بزرگتر از ۰/۰۵ درصد بود که مشخص شد در این جایگاه ژنی در جمعیت دام‌های مورد مطالعه تعادل هاردی-واینبرگ برقرار است.

در تحقیق حاضر با جمع‌بندی نتایج آنالیز واریانس و رگرسیون لجستیک نشان داده شد که اثرات ژنوتیپ و شکم زایش هر دو بر روی تعداد سلول‌های بدنی معنی‌دار است.

بررسی جمعیت مورد مطالعه از نظر تعادل هاردی-واینبرگ جهت بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، مقدار کای مربع برای هر دو گروه مقاوم و حساس محاسبه شد (جدول ۴). نتایج آزمون کای مربع با

#### جدول ۴- بررسی تفاوت فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه اگزون ۹ ژن BRCA1 در دو گروه حیوانات مقاوم و حساس به ورم پستان بالینی

سطح معناداری	مقدار $\chi^2$	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی ژنی		تعداد	گروه
		KK	KL	LL	K	L		
۰/۵۹۵ <sup>ns</sup>	۱/۰۳۸	۰/۳۷	۰/۴	۰/۲۳	۰/۵۶	۰/۴۴	۳۰	مقاوم
۰/۹۸۸ <sup>ns</sup>	۰/۰۲۳	۰/۱۶	۰/۴۷	۰/۳۷	۰/۴۰	۰/۶۰	۳۰	حساس
۰/۵۸۹ <sup>ns</sup>	۱/۰۵۸	۰/۲۷	۰/۴۳	۰/۳	۰/۴۸	۰/۵۲	۶۰	کل

ns: عدم معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵

صفات ایمنولوژیکی در جمعیتی از گاوهای هلشتاین ایرانی استفاده شده است. نتیجه آن مشاهده وجود چندشکلی تک نوکلئوتیدی در این جایگاه ژنی بود. با مطالعه بر روی این چندشکلی ها و ترکیبات ژنی مختلفی که از آن ها حاصل شد و بررسی اثر ژنتیکی هر یک از این ترکیبات ژنی بر روی شمار سلول های بدنی شیر که به عنوان یک ابزار انتخاب غیرمستقیم برای کاهش ورم پستان در بسیاری از مطالعات پیشنهاد شده است، می توان در برنامه انتخاب به وسیله نشانگر بهره برد. با توجه به اینکه استفاده از روش های نوین ژنتیک مولکولی در اصلاح نژاد دام باعث پیشرفت ژنتیکی بیشتری در زمینه انتخاب برای یک صفت می شود و آشکار کردن مکانیسم های مولکولی پیچیده مسئول مقاومت به ورم پستان می تواند برای برنامه های انتخاب به کمک نشانگر سودمند باشد، کاربردی کردن نتایج این تحقیق در اتخاذ استراتژی های اصلاح نژادی بسیار مفید خواهد بود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از همکاری واحد گاو داری صنعتی آذرنگین و جهاد کشاورزی تبریز انجام شده است که بدین وسیله از همکاری پرسنل در انجام نمونه گیری و در اختیار گذاشتن اطلاعات فنوتیپی صمیمانه سپاسگزاری می شود همچنین از مساعدت ها و همکاری علمی جنابان آقایان دکتر صادق علیجانی و دکتر کریم حسنیور اعضای هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز و مهندس رامین نعمت زاده صمیمانه تشکر و قدردانی می گردد.

رابطه بین فراوانی ژنی و ژنوتیپی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است چون بسیاری از نتیجه گیری های مربوط به ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی بر پایه آن استوار است.

### نتایج محاسبه متوسط اثر جایگزینی آللی

در اینجا متوسط اثر جایگزینی آللی که به طور غیرمستقیم اثر معنی دار آلل ژن را نشان می دهد که به وسیله کد بندی ژنوتیپ ها مشخص شد به طوری که برای فراوانی ژنوتیپی هموزیگوت کد صفر و برای ژنوتیپ هتروزیگوت کد ۱ و برای بیشترین فراوانی ژنوتیپی کد ۲ انتخاب شد. اثر جایگزینی آللی یعنی به ازای تغییر آلل (K) که باعث کاهش سلول های بدنی می شود به آلل (L)، سلول های بدنی به چه میزان زیاد می شوند. نتایج این پژوهش بر روی جمعیتی از گاوهای هلشتاین نشان داد که با تغییر آلل K به آلل L به مقدار ۰/۰۳ لگاریتم سلول های بدنی بیشتر می شود که خود تأیید کننده این است که آلل K باعث کاهش ورم پستان می گردد.

### نتیجه گیری

در گاوهای شیری از مهم ترین اهداف انتخاب، بالابردن بهره وری و بهبود انتخاب گاوهایی است که علاوه بر تولید شیر با کیفیت و کمیت مناسب، مشکلات مدیریتی بسیار اندکی داشته باشند. شناسایی ژن های مؤثر بر مقاومت به بیماری ها از جمله بیماری ورم پستان و کاربرد رویه گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را به منظور بهبود وضعیت ورم پستان در صنعت گاو شیری فراهم کرده است که می توان با استفاده از این ابزار کارایی برنامه های اصلاح نژاد را افزایش داد. مطالعه حاضر از BRCA1 به عنوان یک ژن کاندیدا (مارکر ژنی) در ارتباط با بیماری ورم پستان و

## منابع

- Patent Office, No. 48024.
- Atashpaz, S., Khani, S., Barzegari, A., Barar, J., Vahed, S. Z., Azarbaijani, R. and et al. (2010). A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. *Journal of Microbiology*. 79(4): 538-542.
- Barzegari, A., Vahed, S.Z., Atashpaz, S., Khani, S. and Omid, Y. (2010). Rapid and simple methodology for isolation of high quality genomic DNA from coniferous tissues (*Taxus Baccata*). *Molecular biology reports Journal*. 37(2): 833-837.
- Beaudeau, F., Seegers, H., Ducrocq, V., Fourichon, Ch. and Bareille, N. (2000). Effect of health disorders on culling in dairy cows: a review and critical discussion. *Jornal Annales de Zootechnie (Animal Research)*. 49(4): 293-311.
- Berry, D. P., Bermingham, M. L., Good, M. and More, S.J. (2011). Genetics of animal health and disease in cattle. *Irish Veterinary Journal*. 64(1): 5.
- Carlen, E., Strandberg, E. and Roth, A. (2004). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 87(9): 3062-3070.
- Citek, J., Rehout, V., Hanusova, L., Mikova, A. and Jaskova, I. (2011). Polymorphisms in *CGIL4*, breeding value for somatic cell count and resistance to mastitis. *Czech Journal of Animal Science*. 56(7): 301-304.
- Dadpasand, M., Zamiri, M. J. and Atashi, H. (2013). Genetic correlation of average somatic cell score at different stages of lactation with milk yield and composition in Holstein cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 14(3): 190-196.
- Dekkers, J. C. and Hospital, F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*. 3(1): 22-32.
- آهنگران رجبی، نسترن. (۱۳۹۰). برآورد پارامترهای ژنتیکی بیماری های شایع در گاو هلستاین. پایانامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی. دانشگاه تبریز.
- جمالی، ج. و باباحمدی، ا. (۱۳۹۱). مطالعه اثرات دوره زایش بر صفت نمره سلول های سوماتیکی شیر در دو گله گاو شیری هلستاین در استان ایلام. پنجمین کنگره علوم دامی ایران. اصفهان. ص ۵۳۰-۵۲۷.
- شهریاری، ذ. (۱۳۸۳). نشانگرهای مولکولی در مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی. دانشگاه شیراز.
- قره یاضی، ب. (۱۳۷۵). کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مجموعه مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. دانشگاه صنعتی اصفهان. ص ۲۰۰-۱۶۲.
- میرزایی، ع. ، ایاره، م. ، روشن قصرالدشتی، ع. (۱۳۹۱). عوامل مؤثر بر تعداد سلول های سوماتیک شیر گاو بر اساس سابقه ورم پستان بالینی. پنجمین کنگره علوم دامی ایران. اصفهان. ص ۶۶۵-۶۶۱.
- Ali, A. K. A. and Shook, G. E. (1980). An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Scienc*. 63:48.
- Angelini, A., Di Febbo, C., Rullo, A., Di Ilio, C., Cuccurullo, F. and Porreca, E. (2000). New method for the extraction of DNA from white blood cells for the detection of common genetic variants associated with Thrombophilia. *Journal Pathophysiology Of Haemostasis and Thrombosis*. 32(4): 180-183.
- Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A. and Albenzio, M. (2007). A simple salting-out method for extraction from milk somatic cells. Investigation into the Goat CS1S1 gene. *Journal of Dairy Science*. 90(7): 3550-3552.
- Atashpaz, A., Barzegari, A. and Azarbaijani, R. (2008). General DNA extraction kit. Iranin



- Donovan, P. J. and Livingston, D. M. (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*. 31(6): 961-967.
- Falconer, D. S. and Mackay, T. F. C. (1996). Introduction to quantitative genetics. 4th Ed. Longman Harrow Essex.
- Fleischer, F., Metzner, M., Beyerbach, M., Hoedemaker, M. and et al. (2001). The Relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84(9): 2025-2035.
- Grohn, Y. T., Eicker, S. W. and Hertl, J. A. (1995). The association between previous 305-day milk yield and disease in New York state dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 78: 1693-1702.
- Hemati Doust, V., Rahimi-Mianji, G. and Farhadi, A. (2013). Association between bovine lactoferrin gene variant and somatic cell count in milk based on Ecori restriction site. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 15(1): 62-65.
- Krum, S. A., Womack, J. E. and Lane, T. F. (2003). Bovine BRCA1 shows classic responses to genotoxic stress but low in vitro transcriptional activation activity. *Oncogene*. 22 (38): 6032-6044.
- Lewis, C. M., Cler, L. R., Bu, D. W., Zochbauer-Muller, S., Milchgrub, S., Naftalis, E. Z. and et al. (2005). Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 11(1): 166-172.
- Lund, M. S., Sahana, G., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Schulman, N., Thomsen, B., Viitala, S., Williams, J. L., Sabry, A., Viinalass, H. and Vilkki, J. (2007). Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic cell score on five chromosomes in three nordic dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*. 90(11): 5282-5290.
- Madsen, O., Scally, M., Douady, C. J., Kao, D. J., Debry, R. W., Adkins, R., Amrine, H. M., Stanhope, M. J., de Jong, W. W. and Springer, M. S. (2001). Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature*. 409 (6820): 610-614.
- Miki, Y., Swensen, J., Shatluck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266(5182): 66-71.
- Mostert, B. E., Banga, C., Groeneveld, E. and Kanfe, F. H. J. (2004). Breeding value estimation for somatic cell score in South African dairy cattle. *South African Journal of Animal Science*. 34 (2): 32-34.
- Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J. and Rahbarizadeh, F. (2005). Modified salting-out method: high-yield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 19(6): 229-232.
- Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*. 41(2): 225-233.
- Phillips, H. A., Howard, G. C. W. and Miller, W. R. (2000). P53 Mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. *British Journal of Cancer*. 82(1): 136-141.
- Prendiville, R., Pierce, K. M. and Buckley, F. (2010). A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F1 cross with regard to milk yield, somatic cell score, mastitis, and milking characteristics under grazing conditions. *Journal of Dairy Science*. 93(6): 2741-2750
- Rajala, P. J. and Grohn, Y. T. (1998). Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 39(1): 1-13.
- Sahana, G., Lund, M. S., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Iso-Touru, T., Thomsen, B., Viitala, S., Sorensen, P., Williams, J. L. and Vilkki, J. (2008). Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Journal of Animal Genetics*. 39(1): 354-362.

