

مطالعه تنوع ژن BuLA-DRB3 در گاو میش رودخانه‌ای خوزستان

محمد مهدی رنجبر^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^{۱*}، علیرضا قدردان مشهدی^۲، مهرا ن دباغیان^۳^۱ گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران^۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران، اهواز-ایران^۳ دانش آموخته دوره دکترای تخصصی ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ آذر ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۶ بهمن ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: مجتمع اصلی سازگاری نسجی (MHC) شامل گروهی از ژن‌ها است که نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی دارند. آگزون ۲ از ژن BuLA-DRB3 بخشی از MHC کلاس ۲ در گاو میش است که تنوع بسیار بالایی داشته و آلل‌های آن با مقاومت/حساسیت به بیماریها و همچنین با خصوصیات تولیدی مرتبط هستند. هدف: شناسایی تنوع ژن BuLA-DRB3 در گاو میش‌های خوزستان و مقایسه آن با سایر جمعیت‌های گاو میش ایران و جهان. روش کار: نمونه‌های خون از ۱۳۶ گاو میش رودخانه‌ای خوزستانی غیر خویشاوند تهیه گردید. پس از استخراج DNA، آگزون دو از ژن BuLA-DRB3 با روش seminested PCR افزوده سازی شد. سپس قطعات حاصل از افزوده‌سازی آگزون دو به وسیله آنزیم محدود کننده RsaI برش داده شدند. در ادامه، فراوانی آللی، فراوانی ژنوتیپی، هوموزیگوتی و هتروزیگوتی مورد انتظار و مشاهده شده محاسبه گردید. نتایج: در آنالیز قطعات برشی به ترتیب ۱۳ و ۲۴ الگوی آللی و ژنوتیپی برای آنزیم برشی RsaI شناسایی گردید. ۱۰ مورد از این آلل‌ها پیش از این گزارش شده بودند. فراوانترین ژنوتیپ OO (۰/۱۶۹۱) بوده که به دنبال آن ژنوتیپ‌های hh (۰/۱۵۴۴)، II (۰/۱۱۰۳)، lw (۰/۰۹۵۵)، lh (۰/۰۸۰۸)، ha (۰/۰۶۶۱) و lo (۰/۰۵۱۴) قرار داشتند. همچنین چهار آلل با فراوانی بالا به ترتیب آلل‌های O (۰/۳۷۳۱)، h (۰/۲۳۱۶)، I (۰/۲۳۱۶) و w (۰/۱۱۷۶) بودند. این هفت ژنوتیپ و چهار آلل به ترتیب ۷۶/۷۶٪ و ۷۴/۲۹٪ فراوانی ژنوتیپی و آللی جمعیت را در بر می‌گیرند. به علاوه، تخمین هتروزیگوتی/هوموزیگوتی و انحراف از تعادل جمعیت مربوطه حاکی از این مورد است که هوموزیگوتی مشاهده شده بیش از هتروزیگوتی مشاهده شده است و جمعیت از تعادل هاردی واینبرگ انحراف دارد. بحث: نتایج مطالعه حاضر حاکی از تنوع بالای آگزون دو از ژن BuLA-DRB3 در میان جمعیت گاو میش‌های خوزستان بوده و در عین تفاوت‌ها در تنوع ژنتیکی MHC گاو میش‌ها در نقاط مختلف دنیا، جمعیت گاو میش خوزستان با جمعیت مصر مشابهت بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: آلل، آگزون دو از BuLA-DRB3، فراوانی، گاو میش رودخانه‌ای خوزستانی، تنوع

مقدمه

پادگنی پاسخ ایمنی را آغاز می‌کنند. عملکرد مولکول‌های MHC به میزان زیادی به ساختمان مولکولی آنها وابسته است (۱۹). ژن‌های MHC از متنوع‌ترین ژن‌ها بوده، در هر فرد بصورت هم‌غالب بروز می‌کنند. بدین ترتیب، بر تعداد مولکول‌های MHC در دسترس برای اتصال به پادگن‌های پپتیدی و عرضه آنها به یاخته‌های T افزوده می‌شود (۱۹). سه کلاس اصلی I، II و III برای ژن‌های این مجتمع شناخته شده است (۱۹). به محصولات این ژن‌ها پادگن لکوسیتی بافتی نیز می‌گویند که در گاو میش با نام Bubu/ Buffalo Lymphocyte Antigen (BuLA) شناخته می‌شود (۴، ۱۹). مولکول‌های MHC کلاس II، پادگن‌های خارجی را به لmfوسیت‌های T یاریگر (Th) عرضه نموده تا این یاخته به نوبه خود، یاخته‌های لmfوسیتی B را جهت تولید پادتن تقویت و تشویق کند (۱۸، ۱۹). MHC کلاس IIa گاو و گاو میش شامل دو جایگاه ژنتیکی DR و DQ و IIb شامل DI و DY است (۲۱، ۱۵). مولکول‌های کلاس دو MHC از اتصال غیر کووالان زنجیرهای $\alpha 1$ و $\beta 1$ شکل می‌گیرند که به وسیله ژن‌های ویژه‌ای در MHC رمز می‌شوند. دامنه‌های $\alpha 1$ و $\beta 1$ جایگاه اتصال پادگن در مولکول MHC کلاس دو هستند و این ناحیه از تنوع ژنتیکی برخوردار است. به علاوه، ردیف‌های اسید آمینه (پاکت‌ها) که با زنجیره‌های اسید آمینه

گاو میش‌ها (*Bubalus bubalis*) عموماً زندگی در کنار آب را ترجیح می‌دهند و پرورش دهندگان جهت بارکشی و تولید شیر گوشت و سایر فرآورده‌های جانبی نظیر پوست، جمجمه، سم‌ها و غیره از آنها استفاده می‌کنند. گاو میش عمر طولانی تری نسبت به گاو داشته (۲۰ سال)، مقاومت زیادی نسبت به تغییرات دما نشان می‌دهد و می‌تواند از مواد غذایی کم کیفیت تغذیه کند. این دام در طول زمان به سبب سازگاری با محیط زندگی نسبت به بیمارهای رایج در منطقه اطراف خود توان تحمل و پاسخ ایمنی مناسب تری کسب کرده است (۱۱، ۸). علاوه بر تولیدات دامی ذکر شده، گاو میش ایران جزء ذخایر ژنتیکی بومی محسوب می‌شود و حفاظت، حراست و شناخت بیشتر خصوصیات ژنتیکی آنها اهمیت زیادی دارد.

مجتمع عمدده پذیرش بافتی (Major Histocompatibility Complex-MHC) شامل ژن‌هایی است که در واکنش‌های ایمنی، خود ایمنی، رد پیوند و توفیق تولید مثل (reproductive success) نقش مهمی دارند. این مولکول‌ها مسئول اتصال به پپتیدهای پادگنی و عرضه آنها به لmfوسیت‌های T هستند. یاخته‌های اخیر پس از شناسایی پپتیدهای



Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ استفاده شد (۲۰). ژن مذکور با شرایط زیر به روش Semi nested-PCR افزوده سازی شد. مرحله اول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR در حجم نهایی ۲۵ μl شامل، ۲/۵ μl بافر ۱۰X PCR، ۰/۷۵ μl کلرید منیزیم ۵۰ mM، ۲ μl dNTP mM ۱۰، ۰/۲ μl آنزیم تک پلیمرز، آغازگرهای ۵۰۳۰ HL به توالی (۳'-ATCCTCTCT-3') و ۵۰۳۱ HL به توالی (۳'-TTTAAA-3') و ۵'-CTGCAGCACATTTCC (۵'-TTCGCGCTCACCTCGCCGCT-۵') هر کدام به میزان ۰/۴ μl، DNA به میزان ۳ μl و آب مقطر استریل ۱۵/۲۵ μl. مواد لازم جهت انجام PCR از شرکت سیناژن تهیه شدند. برنامه PCR دور اول عبارت بود از سه مرحله: مرحله اول واسرشت شدن اولیه، ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه. مرحله دوم، شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل سه گام؛ گام اول، واسرشت ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه. گام دوم، اتصال آغازگرها ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه. گام سوم، طولیل شدن ۷۳°C به مدت ۱ دقیقه. مرحله سوم طولیل شدن ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. در دور دوم مقادیر مواد PCR دو برابر مرحله اول (حجم نهایی ۵۰ μl) بود و ۲ μl از محصول دور اول به عنوان الگو استفاده شد. در این مرحله از آغازگرهای ۵۰۳۰ HL و ۳۲ HL (۳'-TCGCCGC-3') TGCACAGTGAACCTCTC (۵'-) استفاده شد. چرخه‌های حرارتی در این دور شامل سه مرحله بود: مرحله اول واسرشت شدن اولیه، ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه. مرحله دوم، شامل ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل سه گام: گام اول، واسرشت شدن ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه. گام دوم، اتصال آغازگرها ۶۱°C به مدت ۴۵ ثانیه. گام سوم، طولیل شدن ۷۳°C به مدت ۱ دقیقه. مرحله سوم طولیل شدن نهایی، ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف ساخت کشور آلمان انجام شد. در نهایت به منظور رویت نتایج حاصل از واکنش PCR و ارزیابی کیفیت و طول قطعه تکثیر شده، ۱۰ μl از محصول دور دوم به همراه ۲ μl بافر سنگین کننده X6 به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۹۰V روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. پس از آن ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و از قطعات افزوده سازی شده ۲۸۴ جفت باز به صورت باندهای فلورسنت در دستگاه UV ترانس ایلومیناتور عکسبرداری انجام شد.

آزمون RFLP (بررسی تنوع قطعات برش خورده) و قرائت نتایج: استفاده از آنزیم‌های محدودالثر و مراحل کار بر اساس روش پیشنهادی Van Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ صورت گرفت (۲۰). آنزیم RsaI جهت برش محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و انجام آزمون RFLP استفاده شد. هضم آنزیمی بر روی ۵ μl از محصولات دور دوم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با طول ۲۸۴ جفت باز انجام گردید و محصولات برش یافته در کنار نشانگر MspI-digested pBR۳۲۲ (Fermentas, Co) روی ژل اکریلامید ۱۲٪ به مدت ۶۰ min با اختلاف پتانسیل ۱۲۰V و بافر (IX) TBE الکتروفورز و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. تصاویر ژل‌ها با دستگاه UV ترانس ایلومیناتور ثبت شد. تصاویر به دست آمده از

پادگن اتصال می‌یابند، در این شکاف قرار دارند (۱۹). ردیف اسیدآمینیه این جایگاه (موتیف) در مولکول MHC تعیین می‌کند که کدام پادگن پپتیدی به آن اتصال یابد. بنابراین پپتید پادگنی با توالی اسید آمینه‌ای خاص به یک آلل ویژه مولکول MHC اتصال می‌یابد. اگزون دوم DRB۳ که جایگاه اتصال به پروتئین را در مولکول‌های کلاس II رمز می‌کند از تنوع زیادی برخوردار است (۲۱). تعداد قابل توجهی آلل DRB۳ برای توالی دومین β۱ که شکاف اتصال پادگن را تشکیل می‌دهند، شناسایی شده‌اند (۲). این ژن DRB۳ (BuLA-)، همانند ژن مشابه خود در گاو (BoLA-DRB۳) نقش مهمی را در مقاومت و حساسیت به بیماریهای عفونی و غیر عفونی بر عهده داشته و روی صفات تولیدی نیز مؤثر است (۱۶، ۱۵، ۳).

در استان‌های خوزستان، آذربایجان شرقی/غربی و مازندران، جمعیت‌هایی از گاومیش محلی و بومی حضور دارند (۱۷، ۱۴، ۷). بر اساس مطالعات مرکز آمار ایران در سال ۱۳۹۰، در حال حاضر حدود ۱۵۹۶۰۹ راس گاومیش در ایران وجود دارد که ۹۹۹۱۳ رأس از آنها در خوزستان مستقر بوده، و از نوع گاومیش رودخانه‌ای (River buffaloes) هستند. در مقام مقایسه با دیگر گونه‌های نشخوارکنندگان، جایگاه ژنتیکی BuLA-DRB۳ کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است و اطلاعاتی کمی در مورد نوع و وسعت تنوع در این گونه در ایران و دنیا در دسترس است. فرضیه رایج که به راحتی به ذهن متبادر می‌شود این است که احتمالاً گاومیش‌های بومی خوزستان، در مقایسه با گاوها و دام‌هایی که از خارج از منطقه و کشور وارد می‌شوند، نسبت به بیماریهای عفونی مقاوم‌تر باشند (۷، ۳).

به سبب اهمیت ژن مذکور و نقش مهم آن در مقاوت/حساسیت به بیماریها و صفات تولیدی و از دگر سو اهمیت گاومیش‌های رودخانه‌ای خوزستان به عنوان ذخایر دامی کشور و عدم انجام بررسی دقیق و جامع بر روی آنها، ما در این مطالعه به بررسی تنوع ژن BuLA-DRB۳ پرداخته‌ایم.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها: ۱۳۶ نمونه خون کامل گاومیش رودخانه‌ای خوزستان از کشتارگاه شهر اهواز به صورت تصادفی تهیه و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) جمع‌آوری و ذخیره گردید. نمونه‌های خون تهیه شده تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

استخراج DNA: استخراج DNA از نمونه‌های خون به وسیله کیت تجاری Genomic Blood DNA Extraction Mini Kit شرکت Intron, Korea بر اساس دستورالعمل ارائه شده صورت گرفت. مقدار و کیفیت DNA بدست آمده از نمونه‌ها با روش الکتروفورز بر روی آگارز ارزیابی شد. نمونه‌های DNA استخراج شده در دمای ۲۰°C- تا زمان آزمایش نگهداری گردید.

افزوده سازی اگزون دوم BuLA-DRB۳ جهت آزمون RFLP: جهت بررسی تنوع اگزون دوم ژن BuLA-DRB۳ از روش پیشنهادی Van



جدول ۱. تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده در نمونه‌های گاو میش خوزستان با روش PCR-RFLP.

شماره	انواع الگوهای PCR-RFLP	تعداد	فراوانی
۱	o-o	۲۳	۰/۱۶۹۱
۲	h-h	۲۱	۰/۱۵۴۴
۳	l-l	۱۵	۰/۱۱۰۳
۴	l-w	۱۳	۰/۰۹۵۵
۵	l-h	۱۱	۰/۰۸۰۸
۶	h-a	۹	۰/۰۶۶۱
۷	l-o	۷	۰/۰۵۱۴
۸	w-o	۵	۰/۰۳۶۱
۹	w-w	۵	۰/۰۳۶۱
۱۰	N-N	۵	۰/۰۳۶۱
۱۱	n-o	۴	۰/۰۲۹۴
۱۲	u-o	۲	۰/۰۱۴۶
۱۳	n-w	۲	۰/۰۱۴۶
۱۴	n-A	۲	۰/۰۱۴۶
۱۵	t-t	۲	۰/۰۱۴۶
۱۶	l-k	۲	۰/۰۱۴۶
۱۷	a-a	۲	۰/۰۱۴۶
۱۸	h-w	۱	۰/۰۷۳
۱۹	m-m	۱	۰/۰۷۳
۲۱	u-u	۱	۰/۰۷۳
۲۲	o-A	۱	۰/۰۷۳
۲۳	n-n	۱	۰/۰۷۳
۲۴	w-Z	۱	۰/۰۷۳

ایران و جهان آورده شده است.

هوموزیگوتی و هتروزیگوتی مشاهده شده برای آلل‌های BuLA-DRB3 به ترتیب ۰/۵۵۸۸ و ۰/۴۴۱۲ و مورد انتظار به ترتیب ۰/۱۹۵۸ و ۰/۸۰۴۲ محاسبه گردید. با احتمال بدست آمده (۰/۰۵) جمعیت در تعادل هاردی وینبرگ قرار ندارد. سایر جمعیت‌ها نیز در بررسی هاردی وینبرگ انحراف از تعادل را نشان دادند. ارزیابی دندوگرام (برای مطالعاتی که امکان آنالیز و رسم دندروگرام برایشان وجود داشته)، حاکی از ارتباط و شباهت ژنتیکی بیشتر جمعیت گاو میش‌های خوزستانی با گاو میش‌های مصری می‌باشد، و نژادهای گاو میش‌های هندی نیز نسبت به یکدیگر قرابت بیشتری داشته و در شاخه‌های خواهری قرار گرفته‌اند (تصویر ۲). از سوی دیگر طول فاصله ژنتیکی جد جمعیت گاو میش‌های خوزستانی و مصری به جدمشترک نزدیکتر است و لذا نسبت به گاو میش‌های هندی قدیمی‌تر به حساب می‌آیند.

بحث

این تحقیق به بررسی تنوع و خصوصیات ژنتیکی الل‌های MHC

ژل‌ها به کمک نرم افزار ۹۹/۰۳ Photo-capMw Ver. آنالیز و طول قطعات بریده شده بر اساس جدول ارائه شده توسط Van Eijik و همکاران در سال ۱۹۹۲ بررسی گردید (۲۰). همچنین آلل‌های جدید با حروف بزرگ انگلیسی (Capital) مشخص شدند.

آنالیز آماری نتایج: فراوانی آللی و ژنوتیپی با روش شمارش مستقیم صورت گرفت. همچنین هوموزیگوتی و هتروزیگوتی مورد انتظار با استفاده از فرمول Levene (۶) و Nei (۹) محاسبه گردید. انحراف از تعادل هاردی وینبرگ (Hardy-Weinberg equilibrium) و دندروگرام فاصله ژنتیکی با روش Unweighted Pair Group Method (UPGMA) در جمعیت هدف مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت محاسبه متغیرها و آنالیزهای ذکر شده از نرم افزار Pop Gene ۱/۳۲ استفاده گردید.

نتایج

آزمون PCR-RFLP - ژن BuLA-DRB3 گاو میش خوزستان: نمونه‌ای از تصاویر الگوهای حاصل از برش آنزیمی RsaI در تصویر ۱ ارائه شده است. آلل‌ها بر اساس جدول آلل‌های مشخص شده گاو توسط Van Eijik و همکاران در سال ۱۹۹۲ (۲۰) نامگذاری و آلل‌های جدید با حروف بزرگ مشخص گردیدند. پس از بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه‌ها در گاو میش، در نهایت ۲۴ الگوی ژنوتیپی شامل oo، hh، ll، lw، lh، ha، lo، wo، ww، NN، no، uo، nw، شامل RsaI در برش آنزیم Zw و An، tt، lk، aa، hw، mm، uu، Ao، nn مشاهده گردید (تصویر ۱ و جدول ۱). همچنین ۱۳ الگوی آللی شامل o، h، l، w، n، a، u، z، A، k، m، A، N آلل‌های Z و Z که با حرف بزرگ مشخص شده‌اند، آلل‌هایی جدید با الگوی گزارش نشده هستند.

تحلیل و بررسی ژنتیک جمعیت: از مجموع ۲۴ نوع ژنوتیپ فردی مشاهده شده بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ (oo) با ۰/۱۶۹۱ فراوانی و پس از آن به ترتیب hh (با ۰/۱۵۴۴)، ll (با ۰/۱۱۰۳)، lw (با ۰/۰۹۵۵)، lh (با ۰/۰۸۰۸)، ha (با ۰/۰۶۶۱) و lo (با ۰/۰۵۱۴) بوده است و سایر ژنوتیپ‌ها فراوانی کمتر از ۵٪ داشته‌اند (جدول ۱). این ۷ ژنوتیپ روی هم رفته حدود ۷۲/۷۶٪ از کل ژنوتیپ‌های جمعیت را در بر گرفته و ژنوتیپ‌های غالب در جمعیت محسوب می‌شوند.

در بررسی آلل‌ها به ترتیب آلل‌های o (۰/۲۷۲۱)، h (۰/۲۳۱۶)، l (۰/۲۳۱۶) و w (۰/۱۷۶) واجد بیشترین فراوانی و سایر آلل‌ها با فراوانی کمتر از ۵٪ مشاهده شدند (جدول ۲). این چهار آلل ۷۴/۳۹٪ از کل آلل‌های مشاهده شده در جمعیت را به خود اختصاص داده و آلل‌های شاخص در جمعیت می‌باشند. در جدول ۲، مقایسه‌ای نتایج مطالعه حاضر با گزارشات موجود در مورد حضور و فراوانی آلل‌ها در سایر جمعیت‌های گاو میش‌های



جدول ۲. فراوانی آلل‌های مشاهده شده در نمونه‌های گاومیش خوزستان در مقایسه با سایر آلل‌های گزارش شده در ایران و سایر نقاط جهان. (* حجم نمونه (n)).

الگوهای برش آنزیم RsaI	گاومیش خوزستان (n*=۱۳۶)	گاومیش خوزستانی (منبع ۱۴)	گاومیش مازندران (منبع ۷)	گاومیش مصری (منبع ۱۰)	گاومیش هندی Murrah (منبع ۵)	گاومیش هندی Nili-Ravi (منبع ۴)
a	۰/۰۱۴۷	-	-	-	۰/۰۸	n=۲۵
b	-	۰/۲	-	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۲۲
c	-	-	-	-	۰/۰۴	۰/۰۸
d	-	۰/۰۶۲۵	-	-	-	-
e	-	-	-	-	-	-
f	-	۰/۱۶۲۵	-	۰/۰۸	۰/۱۰	۰/۲۶
g	-	۰/۳	۰/۰۱۰۸	-	۰/۰۶	-
h	۰/۲۳۱۶	۰/۰۳۷۵	۰/۱۷۶۵	-	-	-
i	-	۰/۰۸۷۵	۰/۲۸۵۲	۰/۰۶	۰/۱۶	-
j	-	-	-	-	-	-
k	۰/۰۰۷۴	-	۰/۰۱۰۸	۰/۱۳	-	-
l	۰/۲۳۱۶	-	-	۰/۴	۰/۰۲	۰/۱۰
m	۰/۰۰۷۴	۰/۰۷۵	-	-	-	-
n	۰/۰۳۶۳	۰/۰۲۵	-	-	-	-
o	۰/۲۷۲۱	۰/۰۳۷۵	۰/۱۳۴۵	۰/۲۲	۰/۱۴	۰/۲۰
p	-	-	-	-	-	-
q	-	۰/۰۱۲۵	-	-	-	-
r	-	-	-	-	-	-
s	-	-	۰/۱۰۲۲	-	۰/۲۲	۰/۱۴
t	۰/۰۱۴۷	-	-	-	۰/۰۶	-
u	۰/۰۱۴۷	-	-	-	-	-
v	-	-	-	-	-	-
w	۰/۱۱۷۶	-	۰/۲۶۹۰	-	-	-
x	-	-	۰/۰۱۰۸	-	-	-
y	-	-	-	-	-	-
z	-	-	-	-	-	-
N (الگوی جدید)	۰/۰۳۶۸	-	-	-	-	-
A (الگوی جدید)	۰/۰۱۱	-	-	-	-	-
Z (الگوی جدید)	۰/۰۰۳۷	-	-	-	-	-

چشمگیری به چشم می‌خورد. در تحقیق Rahimnahal و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱۴) جمعیت در تعادل هاردی وینبرگ قرار داشته و آلل‌های b و g فراوانترین آلل‌های این جمعیت ذکر شده اند، حال آنکه این آلل‌ها در مطالعه ما مشاهده نشدند. با توجه به اینکه هیچ تصویری از آزمون RFLP با آنزیم RsaI در گزارش مذکور ارائه نشده است، امکان تطابق پروفایل‌ها وجود نداشت. از سوی دیگر نگارندگان داده‌های لازم برای آزمون هاردی وینبرگ را ارائه نکرده و مشخص نیست که براساس کدام داده‌ها (RsaI یا HaeIII) جمعیت در تعادل قرار دارد. لازم به ذکر است محاسبه این شاخص جمعیتی برای MHC که بیش از دو آلل برای یک لوکوس وجود دارد و نمونه‌ها هتروزیگوت هستند باید با آزمون نسبت درست‌نمایی (Likelihood ratio) و با آزمون‌های دقیق (Exact Tests) صورت گیرد

مربوط به ناحیه کد کننده $\beta 1$ (DRB3*2 exon2) در گاومیش‌های رودخانه‌ای ایران با روش PCR-RFLP پرداخته است. در نمونه‌های مربوط به این گاومیش ساکن خوزستان ۲۴ نوع الگوی ژنوتیپ (جدول ۱) و ۱۳ الگوی آللی (جدول ۲) متفاوت مشاهده شد. ژنوتیپ oo فراوانترین ژنوتیپ در جمعیت بود. چهار آلل I، h، o و w به طور چشمگیری واجد فراوانی بالایی نسبت به سایر آلل‌ها در جمعیت بودند و چهره غالب آللی جمعیت مورد مطالعه هستند. در تحقیق حاضر سه آلل جدید Z، A و N نیز مشاهده شدند که در نتایج سایر محققین گزارش نشده است. مطالعات انجام شده در خصوص تنوع Bula DRB3*2 در گاومیش‌های ایران بسیار محدود است (۱۷، ۱۴، ۱۳، ۷). در مقایسه نتایج تحقیق حاضر با آنچه تاکنون برای گاومیش‌های رودخانه‌ای خوزستان گزارش شده است (۱۴، ۱۳) تناقضات



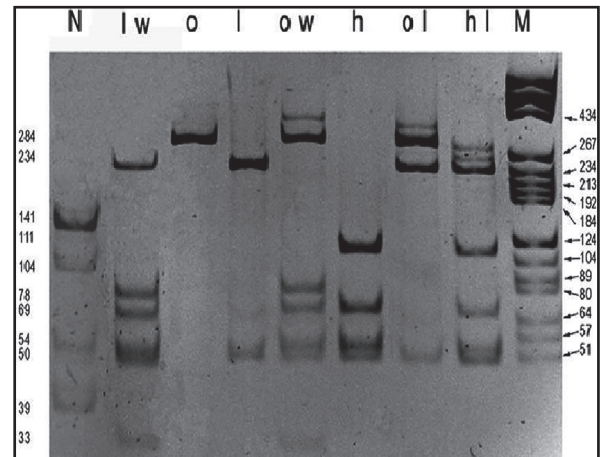
که شرح آن در جدول ۲ آمده است. البته آلل‌های O (۲۲٪) و I (۴۰٪) که فراوان‌ترین آلل‌های جمعیت گاومیش مصر هستند در نمونه‌های ایرانی نیز جزء ۴ آلل غالب و فراوانترین ژنوتیپ‌های (O (۸۰٪)، II (۱۸٪) و Io (۱۲٪)) مطالعه آنها نیز جز ژنوتیپ‌های فراوان در میان گاومیش‌های خوزستان هستند.

Acharya و همکاران در سال ۲۰۰۲، با برش با آنزیم RsaI، آنها الگوهای برشی متنوع تر و پیچیده تری را مشاهده کرده‌اند (۱). در تفسیر قطعات برشی ۱۰ الگوی متفاوت برشی (آلل) با ۱۵ ژنوتیپ در نژاد جعفرآبادی و ۷ الگوی برشی متفاوت (آلل) با ۱۲ ژنوتیپ در ترکیب آلی در نژاد مهسانی مشاهده شده است (۱). نتایج این تحقیقات نیز موید فروانی بالای چند آلل به خصوص در جمعیت گاومیش‌های مورد بررسی است. همچنین بالا بودن هوموزیگوتی نسبت به هتروزیگوتی نیز مشابه با تحقیق حاضر است. لازم به تأکید است که هیچیک از جمعیت‌های ذکر شده مصری یا هندی در تعادل هاردی وینبرگ قرار نداشته‌اند.

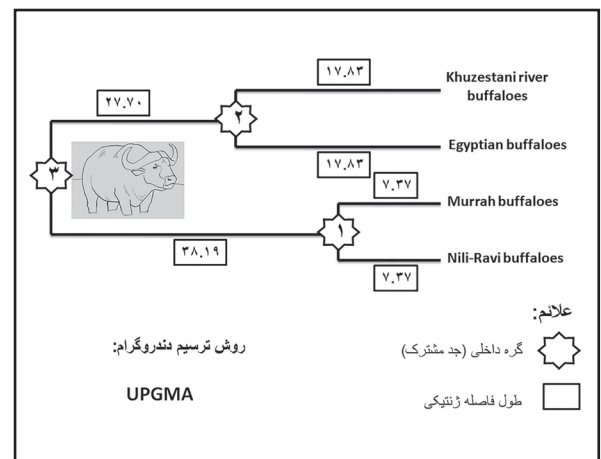
البته در مقام مقایسه و با توجه به نتایج دندروگرام و جدول ۲، قرابت ژنتیکی گاومیش‌های خوزستانی به گاومیش‌های مصری بیشتر از گاومیش‌های هندی است. در این میان می‌بایست به آلل O و ژنوتیپ آن (OO) که در تمامی جمعیت‌های گاومیش گزارش شده است، توجه نمود و بویژه جهت ارزیابی ارتباط آن با حساسیت/مقاوت به بیماریها، صفات تولیدی و طراحی واکسن‌های کارای وسیع الطیف برای گاومیش مد نظر قرار داد.

در مجموع خاطر نشان می‌گردد که اگزون دوم ژن BuLA-DRB3 در جمعیت گاومیش رودخانه‌ای ایران از تنوع بالایی برخوردار بوده و تنوع، فراوانی آلی و ژنوتیپی جمعیت گاومیش‌ها با منطقه جغرافیایی مرتبط است. این نتایج مطابق با خصوصیتی است از تنوع MHC در حیوانات در گذشته ذکر شده است (۱۷، ۷). تنوع در ژن MHC بواسطه جهش‌های نقطه‌ای و تغییرات ژنی که سبب به هم آمیختگی توالی‌های کوتاه DNA بین آلل‌ها و جایگاه ژن‌ها به وجود می‌آید (۱۷). همانگونه که ذکر گردید بررسی تنوع آلل‌های MHC کلاس دو از جنبه‌های مختلف مورد توجه است. این بخش از MHC تنوع قابل ملاحظه‌ای دارد تا عرضه پادگن‌های مختلف امکان‌پذیر گردد و در همین حال ارتباط آلل‌های آن با حساسیت/مقاوت به بیماریهای مختلف و خصوصیات تولیدی شناسایی شده است (۳، ۱۲، ۲۱).

همچنین وجود آلل‌های متنوع و آلل‌های با فراوانی پائین و جدید در جمعیت‌های گاومیش‌های رودخانه‌ای ایران حاکی از غنی بودن ذخیره ژنتیکی آنها است که این امر در برنامه‌های اصلاح نژادی و حساسیت و مقاومت به بیماریها و خصوصیات تولیدی بسیار حائز اهمیت است. حیوانات بومی نظیر گاومیش به عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک کشور محسوب می‌شوند و حفظ و تکثیر آنها از ارزش و اهمیت بسیاری برخوردار



تصویر ۱. نتایج آزمون PCR-RFLP با استفاده از آنزیم RsaI. شماره‌ها نمایانگر اندازه قطعات DNA بر مبنای جفت باز است. M: مارکر pBR322DNA



تصویر ۲. رسم دندروگرام فاصله ژنتیکی برای آلل‌های BuLA-DRB3 با روش UPGMA.

و نه تخمین مربع کای. با این وجود نتایج سایر جمعیت‌های گاومیش ایران و جهان تا کنون تعادل هاردی وینبرگ را نشان نداده است.

در نتایج بدست آمده از گاومیش مازندران تنوع آلی کمتری (۸ آلل RsaI) در مقایسه با گاومیش خوزستان مشاهده می‌شود و آلل‌های g، i، s و x در گاومیش خوزستان مشاهده نشدند (۷). البته Sheikhmohammadi و همکاران در سال ۲۰۱۰ در گاومیش شمال غربی ایران با روش PCR-SSCP، تعداد ۱۱ الگوی متفاوت SSCP را شناسایی کرده‌اند (۱۷). این یافته نشان دهنده میزان تنوع در جمعیت بوده و قابل مقایسه با نتایج RFLP نیست.

در واقع ترکیب فراوانی آلل‌های MHC در هر جمعیت به اثرات موسس جمعیت (Founder effects)، فرایندهای فشار انتخابی (Selective pressure) بر مبنای حضور پاتوژن‌ها و مقاومت به بیماریها در هر منطقه و همچنین درون آمیزی و ارتباط ناچیز با سایر جمعیت‌ها بستگی دارد.

تحقیقاتی که بر روی گاومیش در سایر نقاط دنیا انجام شده است تنوع آلی کمتری را نشان می‌دهد (مصر ۶ آلل، هند ۶ تا ۱۰ آلل) (۵، ۴، ۱۰)



References

1. Acharya, C.P., Pipalia, D.L., Rank, D.N., Joshi, C.G., Brahmkshtri, B.P., Solanki, J.V., Shah, R.R. (2002) BOLA-DRB3 gene polymorphism in Jafarabadi and Mehsani buffaloes as revealed by PCR-RFLP. *Ind Vet J.* 79: 652-656.
2. Behl, J.D., Verma, N.K., Behl, R., Mukesh, M., Ahlawat, S.P.S. (2007) Characterization of genetic polymorphism of the bovine lymphocyte antigen DRB3.2 locus in Kankrej cattle (*Bos indicus*). *J Dairy Sci.* 90: 2997-3001.
3. De, S., Singh, R.K., Butchaiah, G. (2002) MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Genet.* 33: 215-219.
4. Kumar, S., Sangwan, M.L., Rupender, A. (2008) Polymorphism in DRB3 exon 2 by PCR-RFLP and its association with mastitis in Nili-Ravi breed. *Indian J Biotech.* 7: 398-400.
5. Kumar, S., Sangwan, M.L., Ahlawat, S., Barwar, A. (2011) Polymorphism in DRB3 exon 2 by PCR-RFLP and its association with mastitis in Murrah buffaloes. *Indian J Biotech.* 10: 232-234.
6. Levene, H. (1949) On a matching problem arising in genetics. *Ann Math Stat.* 20: 91-94.
7. Mosafer, J., Heydarpour, M., Manshad, E., Russell, G., Sulimova, G.E. (2012) Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of Two New Alleles in Iranian Buffalo Breed. *Sci World J.* 12: 22-28.
8. Nanda, A.S., Nakao, T. (2003) Role of buffalo in the socioeconomic development of rural Asia: Current status and future prospectus. *Anim Sci J.* 74: 443-455.
9. Nei, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci.* 70: 3321-3323.
10. Othman, O.E., Ahmed, S.S. (2010) Genetic polymorphism of BoLA-DRB3 exon 2 in egyptian buffalo. *Genes Genomes Genomics.* 4: 70-73.
11. Pasha, T.N., Hayat, Z. (2012) Present situation and future perspective of buffalo production in Asia. *J Anim and Plant Sci.* 22: 250-256.
12. Pipalia, D.L., Joshi, C.G., Rank, D.N., Brahmshktri, B.P., Solanki, J.V. (2004) PCR-SSCP typing

است. در حوزه ژنتیک و اصلاح نژاد، اصلاح ساختار ژنتیک جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه ریزی جهت طرح‌های اصلاح نژادی، به منظور حصول به حیوانات با تولید بالاتر و مقاوم تر به بیماریها باشد (۱۱). اگرچه این تدابیر در برخی کشورها به صورت محدود اعمال می‌شود، اما همچنان نیازها به یک برنامه و استراتژی قدرتمند همچون گاو، در گاومیش‌های ایران و سایر نقاط دنیا حس می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با مساعدت صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و طرح پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به شماره ۷۵۰۲۰۱۵/۶/۲۴ انجام شده است.

of MHC in cattle and buffaloes. *Ind J Anim Sci.* 74: 637-639.

13. Rahimnahal, S., Fayazi, J., Mirzadeh, K., Nasiry, M.T., Roshanfekar, H. (2010a) Detection of allelic polymorphism in a gene of the major histocompatibility complex of Iranian buffalo. *J Anim Vet Adv.* 9: 1902-1904.
14. Rahimnahal, S., Fayazi, J., Mirzadeh, K., Nasiry, M.T., Roshanfekar, H. (2010b) Determining BoLA-DRB3 exon 2 polymorphism in buffalo population in Khuzestan province by PCR-RFLP method. *Gen Eng Biosafety J.* 2: 121-128.
15. Rupp, R., Hernandez, A., Mallard, B.A. (2007) Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis and production and type traits. *Dairy Sci.* 90: 1029-1039.
16. Sena, L., Schneider, M.P.C., Brenig, B., Honeycutt, R.L., Womack, J.E., Skow L.C. (2003) Polymorphisms in MHC-DRA and -DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Anim Genet.* 34: 1-10.
17. Sheikmohammadi, R., Hashemi, A., Mardani, K. (2010) Analysis of polymorphism of MHC class II BuLA DRB3 exon 2 gene in North West Iranian populations of the Water buffalo (*Bubalus bubalis*) through PCR-SSCP. *Int J Vet Res.* 4:



- 265-268.
18. Takeshima, S.N., Ikegami, M., Morita, M., Nakaim, Y., Aida, Y. (2001) Identification of new cattle BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *J Immunogenet.* 53: 74-81.
 19. Tizard, I.R. (2009) Acquired immunity: Antigen-presenting receptors. In: *Veterinary Immunology.*, Saunders (7th ed.) Philadelphia. USA. p. 67-76.
 20. Van Eijk, M.J., Stewart-Haynes, J.A., Lewin, H.A. (1992) Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet.* 23: 483-496.
 21. Wenink, P.W., Groen, A.F., Roelke-Parker, M.E., Prins, H.H. (1998) African buffalo maintain high genetic diversity in the major histocompatibility complex in spite of historically known population bottlenecks. *Mol Ecol.* 7: 1315-132.



Study of BuLA-DRB3 polymorphism in Khuzestan river buffaloes

Ranjbar, M.M.¹, Nikbakht, G.^{2*}, Ghadrdan Mashhadi, A.R.³, Dabbaghyan, M.⁴

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

²Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Chamran, Ahvaz-Iran

³Graduated PhD Student at Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 15 December 2015, Accepted 26 January 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Major histocompatibility complex (MHC) comprises a group of genes, which plays a central role in immune response. The exon 2 of BuLA-DRB3 is part of the MHC class II in buffalo that highly polymorphic, found to be associated with resistance/susceptibility to infections and also with production parameters. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study is to identify BuLA-DRB3 polymorphism in Khuzestan buffaloes and compare this population with other Iranian and world buffalo populations. **METHODS:** Blood samples were taken from 136 unrelated Khuzestan river buffaloes. After DNA extraction, second exon of BuLA-DRB3 was amplified by the seminested PCR method. Then, the fragments produced by amplifying second exon were cut by RsaI restriction enzyme according to van Eijik method. In the following, allelic frequencies, genotype frequencies, expected and observed homozygosity and heterozygosity were calculated. **RESULTS:** In restriction fragment analysis 13 and 24 different allelic and genotype patterns were identified for RsaI restriction enzyme, respectively. 10 out of 13 alleles were previously reported. The most frequent genotype was oo(0.1691) and then followed by hh (0.1544), ll(0.1103), lw (0.0955), lh (0.0808), ha (0.0661) and lo (0.0514). Also four most frequent alleles were o (0.2721), h (0.2316), l (0.2316) and w (0.1176), respectively. These seven genotypes and four alleles form 72.76% and 74.29% overall genotype and allele frequency of population. In addition, estimation of heterozygosity/homozygosity and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of corresponding population revealed observed homozygosity is more than heterozygosity and departure of population from Hardy-Weinberg equilibrium. **CONCLUSIONS:** The results indicated that exon 2 of the BuLA-DRB3 gene is highly polymorphic among Khuzestan buffaloes and although, there is differences between buffalo's genetic polymorphism of distinct world regions, Khuzestan buffaloes' population is similar to Egyptian buffaloes' population.

Keyword: allele, BuLA-DRB3 exon 2, frequency, Khuzestan river buffaloes, polymorphism

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Number and frequency of observed genotypes in buffalo samples by PCR-RFLP.

Table 2. Representation of observed allelic frequency in Khuzestan buffaloes samples in comparison with other reported alleles in Iranian buffaloes and other world regions.

Figure 1. The PCR-RFLP analysis using RsaI enzyme. Numbers indicate the sizes of DNA fragments in base pairs. M: pBR322DNA marker.

Figure 2. Dendrogram of genetic distance for BuLA-DRB3.2 alleles by UPGMA method.

*Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117000, Fax: 021-66933222

J. Vet. Res. 71, 1, 2016

