تشخیص بیماری ژنتیکی نقص چسبندگی گلبولهای سفید(BLAD) در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران به کمک روش PCR- RFLP

مهدوی مرتضی*[۱]، طهمورث پور مجتبی[۱]، اسلمی نژاد علی اصغر[۱]، قوّتی شاهرخ[۱]، نصیری محمد رضا[۱]**

[۱] قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فرودوسی مشهد، صندوق پستی ۱۱۶۳- ۹۱۷۷۵

Alonefarmer@Gmail.com

چکیده

هدف از این مطالعه شناسایی حاملین بیماری BLAD و تعیین فراوانی ژنوتیپ های مختلف این بیماری در بین گاو های بومی نژاد سرابی بود. نقص چسبندگی گلبولهای سفید (BLAD) یک بیماری ژنتیکی مادرزادی است که به صورت اتوزومال مغلوب به ارث می رسد و تا کنون تنها در نژاد هلشتاین گزارش شده است. علت این بیماری، نقص پروتئینهای اینتگرین β_2 است که امکان اتصال نوتروفیل را با مولکولهای چسبان بین سلولی (ICAM-1) در روی اندوتلیوم عروق فراهم می آورد ، این عمل برای مهاجرت نوتروفیل ها به جایگاه های التهاب خارج از رگ ضروری می باشد. مشکل مذکور به علت جهشی که در ژن CD18 رخ می دهد پدید می آید. جهت پیشگیری از انتشار بیماری می توان هتروزیگوتهای حامل را بوسیلهٔ PCR-RFLP شناسائی کرد. در این راستا نمونه های خون از ۱۶۰ راس گاو بومی نژاد سرابی جمع آوری گردید و سپس DNA ژنومی با روش گوانیدین تیوسیونات سیلیکاژل استخراج شد. در مرحله بعد تکثیر ناحیه پلی مورفیک ژنCD18 به طول ۱۰۱ جفت باز با آغاز گرهای Ivan2 و Ivan3 صورت گرفت. سپس به منظور برش آنزیمی بر روی قطعات DNA تکثیر شده ، از آنزیم *Taq*I و *Hae*III استفاده گردید. محصولات هضم شده، توسط الکتروفورز برروی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ و رنگ آمیزی با نیترات نقره تعیین ژنوتیپ گردیدند. در این مطالعه ژنوتیپ حامل مشاهده نشد و تمام نمونه های مورد بررسی از لحاظ این بیماری سالم بودند.

واژه‌های کلیدی: ناهنجاری ژنتیکی اتوزومی، گاو سرابی ، BLAD ، PCR-RFLP

مقدمه

بررسی و شناسایی بیماریهای ژنتیکی در جوامع انسانی و دامی از اهمیت ویژه ای برخوردار است و در این راستا استفاده از روش های نوین مولکولی در تشخیص ژن های مغلوب نهفته و اتوزومال در افراد هتروزیگوت ما را در جلوگیری از انتشار ژن های مغلوب در اجتماع یاری می کند. چندین ژن مغلوب اتوزومال در نژاد های مختلف گاو شناسایی شده اند که باعث مرگ و میر گوساله های تازه متولد شده و یا جنین آنها می گردند. نقص در چسبندگی گلبول های سفید (BLAD) یکی از این بیماریهای اتوزومال مغلوب می باشد که در نتیجه نقص در پروتئین های Integrins β_2 پدید می آید(۶). بتا اینتگرین ها خانواده ای از گلایکوپروتئین ها می باشند که توسط گلبول های سفید ترشح می شوند و اصطلاحا تحت عنوان مولکول های چسبندگی CD11/CD18 از آنها یاد می شود. این پروتئین ها برای اتصال نوتروفیل ها به دیواره رگها, ورود آنها به بافت ها و نابودسازی عوامل بیماریزا ضروری هستند(۵). با توالی یابی ژن کد کننده CD18 گاوی توسط شوستر و همکاران (۱۹۹۲) وجود دو جهش نقطه ای در گاوهای هلشتاین مبتلا به آن مشخص شده است (۱۰). یک جهش آدنین را در نوکلئوتید ۳۸۳ با گوانین جایگزین می کند جهش دوم در نوکلئوتید ۷۷۵ رخ داده و خاموش می باشد. دام های حامل هیچ گونه علائم کلینیکی از خود نشان نمی دهند اما گوساله های مبتلا معمولا در سال اول زندگی می میرند هرچند که برخی از آنها می توانند تا پس از دو سالگی زنده بمانند (۳). علائم رایج بیماری عبارتند از عفونت و نکروزه شدن مداوم بافت های نرم مانند غشاهای مخاطی و دستگاه گوارشی (۶). تب, بی اشتهایی, ذات الریه مزمن و اسهال. همچنین زخم های شدید روی غشاهای مخاطی دهان, زخم های معده ای, ورم لثه و التهاب شدید در آنها, ریختن دندان و توقف رشد در گوساله های مبتلا دیده می شود(۵ و ۷). ضعف در بهبود زخم ها, آماس پوستی, ابتلای مکرر به بیماری های عفونی از دیگر علائم بیماری می باشند(۷). این بیماری برای اولین بار در اوایل دهه نود میلادی در گاو های هلشتاین مشاهده شد و تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر مشاهده آن در نژادهای دیگر ارائه نشده است (۲). BLAD از لحاظ ژنتیکی دقیقا مشابه نقص در چسبندگی گلبولهای سفید انسانی است. مطالعات شجره ای نشان می دهد که این بیماری از یک جد مشترک به نام Ivanhoe Osborndale منشا گرفته است که از لحاظ این بیماری هتروزیگوت بوده است. جهشی که در نوکلئوتید ۳۸۳ ژن CD18 گاوی ایجاد شده منجر به ایجاد یک جایگاه برش برای آنزیم برشی *Hae* III شده و در عین حال یک جایگاه برش آنزیم *Taq* I را در این ژن حذف نموده است . بر همین اساس یک تست بر اساس روش PCR-RFLP توسعه پیدا کرده است که به منظور شناسایی ناقلین این بیماری به کار می رود (۱۰). هدف از این مطالعه شناسایی حاملین بیماری BLAD و تعیین فراوانی ژنوتیپ های مختلف این بیماری در بین گله گاو های بومی نژاد سرابی بود.

مواد و روشها

حیوانات و نمونه گیری: تعداد ۱۶۰ نمونه خون از ورید وداجی گاوهای نر و ماده نژاد سرابی واقع در ایستگاه تحقیقات گاو سرابی (شهرستان سراب, استان آذربایجان شرقی, ایران) جمع آوری گردید. به منظور جلوگیری از انعقاد خون به میزان ۰,۵ میلی لیتر به نمونه ها EDTA ۱۰٪ اضافه شد.

استخراج DNA: استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر خون با روش گوانیدین تیوسیونات سیلیکاژل (۱) با پاره ای از تغییرات و با استفاده از کیت Diatom ساخت شرکت Isogene مسکو انجام گرفت. جهت بررسی کیفیت وکمیتDNA استخراج شده از روش مقایسه با λDNA و اسپکتروفتومتری به کمک دستگاه Shimadzu U160a استفاده شد.

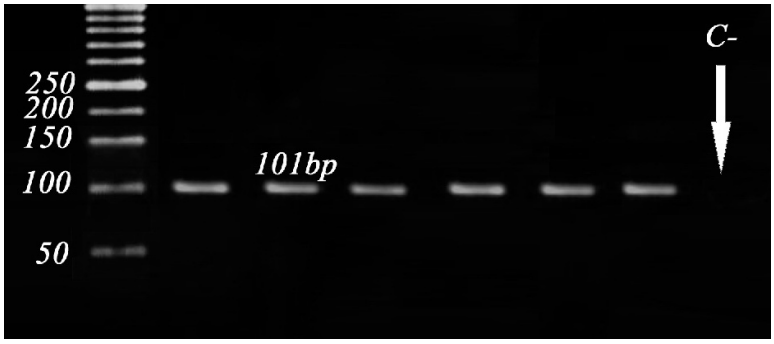
واکنش PCR: به منظور تکثیر بخشی از ژنCD18 از آغازگرهای Ivan3: 5'-GTC AGGCAG TTG CGT TCA A-3' , Ivan2: 5'-GAG GTC ATC CAC CAT CGA GT-3" استفاده شد (۱۱). واکنش زنجیره ای پلیمراز با ۳۵ چرخه (واسرشته کردن: ۹۴درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال: ۵۸ در جه سانتیگراد به مدت ۶۰ ثانیه و تکثیر: ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه) در دستگاه ترموسایکلر PRIMUS25 شرکتMWG و در تیوبهای ۰,۵ میکرولیتری با استفاده از کیت آمادهٔ PCR Universal (Moscow) صورت گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر یک قطعهٔ ۱۰۱ جفت بازی طراحی شده

بودند. جهت تشخیص محصولات PCR از ژل آگاروز ۲٪ با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده گردید.

واکنش هضم (RFLP): برای تعیین ژنوتیپ های بیماری از آنزیم محدودگر *Taq*I استفاده گردید. هضم در دمای ۶۵ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۴ ساعت انجام شد. به منظور تایید نتایج حاصل از آنزیم *Taq*I از آنزیم دیگری به نام *Hae*III استفاده گردید. زمان انکوباسیون برای این آنزیم ۴ ساعت و دمای آن ۳۷ درجه سانتیگراد بود . محصولات هضم شده واکنش زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ الکتروفورز شده و با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

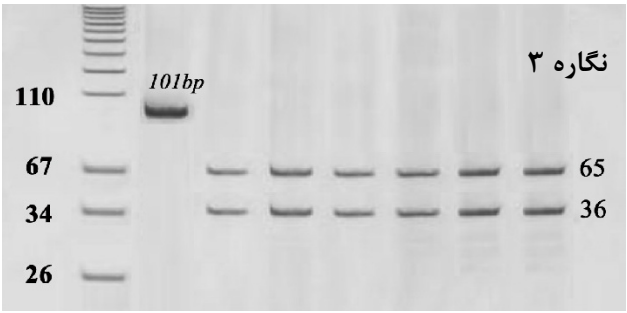
نتایج و بحث

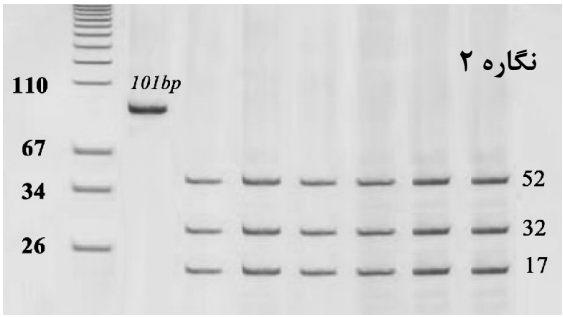
نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمراز در نگاره ۱ آمده است. همانطور که ملاحظه می شود، قطعهٔ ۱۰۱ جفت بازی مورد نظر از ژن CD18 همانند یافته های تامن و همکاران (۱۹۹۶) به خوبی تکثیر شده است و فاقد هرگونه دایمر و اسمیر و باند های غیر اختصاصی می باشد که این موضوع استفاده از پرایمر های پیشنهادی آنها را به عنوان جایگزین پرایمر های پیشنهادی شوستر و همکاران (۱۹۹۲) که باعث تولید دایمر شده (۱۲) و نتایج نهایی واکنش هضم را تحت تاثیر قرار می دهد تایید می نماید(۴). جهت شناسائی قطعه تکثیر شده از سایز مارکر M50 استفاده شده است. بر طبق آنچه که از توالی DNA ژن CD18 برای ژنوتیپ های مختلف از پیش تعیین شده، انتظار می رود در نتیجه هضم با آنزیم *Taq*I برای ژنوتیپ سالم (TL/TL) سه باند



نگاره ۱ : الکتروفورز محصولات PCR حاصل از ژن CD18 به طول ۱۰۱ جفت باز بر روی ژل آگارز ۱,۵ ٪ .

به طول۱۷،۳۲و ۵۲ جفت باز و برای ژنوتیپ حامل(BL/TL)، چهار باند به طول ۱۷، ۳۲، ۵۲ و ۸۴ جفت باز ملاحظه شود. مقایسهٔ باندهای موجود در نمونه های هضم شده بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸٪ نشان داد در تمام نمونه های نژاد سرابی مورد بررسی الگوی سه باندی (۵۲-۳۲-۱۷ جفت بازی) حاصل شده است که بر این اساس می توان گفت تمام نمونه های مورد بررسی از لحاظ این بیماری سالم می باشند و هیچ ژنوتیپ حاملی در بین آنها وجود ندارد(نگاره ۲). در مورد هضم با آنزیم *Hae*III که به منظور تایید نتایج هضم با آنزیم *Taq*I صورت گرفت انتظار می رود در افراد سالم دو باند ۶۵ و ۳۵ و در افراد حامل چهار باند ۶۵، ۴۶، ۳۶ و ۱۹ جفت بازی مشاهده گردد. اما در تمام نمونه ها در تایید نتایج حاصله از آنزیم *Taq*I الگوی دو باندی مشاهده گردید که می توان گفت در نتیجه در این آزمایش هم هیچ ناقلی مشاهده نشد(نگاره ۳).





نگاره ۲: الکتروفورز محصولات هضمی با آنزیم *Taq I* بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ , برای ژنوتیپ سالم سه باند ۱۷، ۳۲ و ۵۲ جفت بازی قابل ملاحظه می باشد. (سایز مارکر pUC19)

نگاره ۳: الکتروفورز محصولات هضمی با آنزیم *Hae* III بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ , برای ژنوتیپ سالم دو باند ۶۵ و۳۶ جفت بازی قابل ملاحظه می باشد. (سایز مارکر pUC19)

II

بود. عدم شناسایی ناقل در این بررسی نیز موید انحصاری بودن بیماری BLAD در گاوهای هلشتاین می باشد، چرا که محققان دیگر کشورها نیز در نژادهای غیر هلشتاین این بیماری را مشاهده نکردند، به شکلی که راجش و همکاران (۲۰۰۷) در گاوهای جرسی و گاو میش های آبی این بیماری را مشاهده نکردند، همچنین نوروزی و همکاران در سال ۲۰۰۵ نیز در گاو براون سویس این بیماری را مشاهده نکردند. با این وجود بررسی چنین بیماری هایی که احتمال بروز آنها بیشتر است ضروری به نظر می رسد و باید تمامی دام ها اعم از بومی و یا غیر بومی برای چنین بیماری هایی مورد آزمون قرار بگیرند.

منابع

1. Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans., M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-Van Dillen, P. M. E. and Van Der Noordaa, J.,. Rapid and simple method for purification nucleic acid. J. of Clinical Microbiology. 1990, 28(3):495-503.
2. Fesus, L., Zsolnai, A., Anton, I., Barany, I. and Bozo, S.,. BLAD genotypes and cow production traits in Hungarian Holsteins. J. Anim. Breed. Genet. 1999, 116: 169–174.
3. Garcia, J.F., Gurgel, A.S.A., Visintin, J.A., Lunge, V.R. and Hoetzel, I.,. Use of DNA markers for genomic diagnosis of domestical animals: 1. Detection of point mutation causing bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Brazilian Holstein cattle. Braz. J. Vet. Res.Anim. Sci. 1996, 33: 133-135.
4. Jorgensen, C. B., Agerholm, J. S., Pedersen, J., Thomsen, P.D., . Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Holstein–Friesian cattle. Acta Vet. Scand. 1993, 34: 231–236.
5. Kishimoto, T. K., Larson, R. S., Corbi, A. L., Dustin, M. L., Staunton, D. E. and Springer, T. A., . The leukocyte integrins. Adv. Immunol. 1989, 46: 149–182.
6. Nagahata, H., Kehrli, M. E. Jr., Murata, H., Okada, H., Noda, H. and Kociba, G. J., . Neutrophil function and pathologic findings in Holstein calves with leukocyte adhesion deficiency. Am. J. Vet. Res. 1994a, 55: 40–48.
7. Nagahata, H., Tanaka, S., Oba, M., Minami, S. and Noda, H., . Serum biochemical changes and chemiluminescent responses of whole blood in Holstein cattle with leukocyte adhesion deficiency. J. Vet. Med. Sci. 1994, 657–660.
8. Norouzy, A., Nassiry, M. R., Eftekhari Shahroudi, F., Javadmanesh, A., Mohammad Abadi, M., and Sulimova, G., . Identification of Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) Carriers in Holstein and Brown Swiss AI Bulls in Iran. Russian Journal of Genetics. 2005, 41(12): 1409-1413.
9. Rajesh K. Pate, Krishna M. Singh, Kalpesh J. Soni, Jenabhai B. Chauhan, Krothapalli R.S. Sambasiva Rao,. Low incidence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Indian cattle and buffalo breeds, J Appl Genet 2007, 48(2):153–155.

10. Shuster, D. E., Kehrli, M. E. Jr., Ackermann, M. R. and Gilbert, R. O., . Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1992b, 89: 9225–9229.
11. Tammen, I., Klippert, H., Kuczka, A., Treviranus, A., Pohlenz, J., Stober, M., Simon D., Harlizus, B., . An improved DNA test for bovine leukocyte adhesion deficiency. Res. Vet. Sci. 1996, 60: 218–221.
12. Watson, R., . The formation of primer artifacts in polymerase chain reaction. Amplifications 1989, 2:5-6.

Identification of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) Carriers in Iranian Sarabi Cattles by PCR-RFLP Method

M. Mahdavi*[1], A. A. Aslami Nejhad[1], M. Tahmoorespour[1], S. Ghovvati[1], M. R. Nassiry[1]**

[1]Center of Excellence for Animal Science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,

P.O. Box: 91775-1163 Mashhad, Iran.

Alonefarmer@Gmail.com

Abstract

The objective of this study was to describe the BLAD carrier prevalence and related gene frequency among Sarabi cattles of Iran. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) is a autosomal genetic disorder affecting Holstein cattle. The autosomal recessive condition is caused by a mutation of the β-subunit (CD18) of a glycoprotein family. Two point mutations have been identified in CD18 Gene in cattle affected with BLAD. The mutation at nucleotide 383 eliminates a *Taq*I restriction site and creates a *Hae*III site. Based of These a PCR-RFLP test has developed for rapid screening of carrier and affected animals. The region of CD18 is amplified by PCR and digested with the restriction enzyme *Taq*I or *Hae*III , which results in an obvious difference in banding pattern when subjected to gel. In this study 160 blood samples were prepared from Sarabi Cattles from Research center of Sarabi cattles (Eastern Azerbaijan, Iran). Genomic DNA was extracted from 100 µl of blood according to Guanidine Silicagel method. Gel monitoring and spectrophotometric methods were used for measuring the quantity and quality of DNA. A 101 bp fragment from CD18 gene was amplified by PCR with Ivan 2 and Ivan 3 Primers. PCR amplicons were recognized by electrophoresis on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Restriction enzymes *Taq*I and *Hae*III were used to identification of genotypes. Digestion products were screened by electrophoresis on 8% non-denaturing polyacrylamid gel and visualized by Silver nitrate staining. At the result in this study no BLAD carrier genotype were detected for Sarabi Cattles.

Key Words: BLAD, PCR-RFLP, Autosomal Genetic Disorder, Sarabi Cattle.

۲۶۰	شناسایی پلی مورفیسم ژن pit-1 و ارتباط آن با تولید شیر در گاو نژاد مونبلیارد با استفاده از نشانگر PBR	مریم قاسم زاده	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B17
۳۶۲	بررسی روند ژنتیکی برخی صفات اقتصادی در گوسفندان قره‌گل	سید اکبر شیری -کاظم کرباس فروش طوسی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B18
۸۱۱	غربالگری ، جدا سازی و بهینه سازی تولید آنزیم کیتیناز از باکتری بومی ایران	ماندانا زارعی -سعید امین زاده -حسین ذوالقرنین - علیرضا صفاهیه -احمد غرقی -مرتضی دلیری -عباس صاحبقدم لطفی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B19
۴۰۸	بررسی الگوی پروتئنی Artemia Urmiana در جهت شناسایی مقاومت به عوامل محیطی	[illegible] -عبدالخالق دیزجی -مهوش خدابنده	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B20
۶۲۶	مروری بر تاثیر تولیدات فناوری زیستی(پروبیوتیک ها) در تغذیه طیور	جواد عظیمی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B21
۵۴	بررسی تنوع ژنتیکی و احتمال وقوع Bottleneck در جمعیت اسبچه خزر با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ای	حمیدرضا سیدآبادی - سیروس امیری نیا -محمد حسین بنابازی -بهاره طاهری دزفولی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B22
۱۲۳۷	تشخیص بیماری ژنتیکی نقص چسبندگی گلبولهای سفید(BLAD) در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران به کمک روش PCR-RFLP	مرتضی مهدوی -مجتبی طهمورث پور -علی اصغر اسلمی نژاد -شاهرخ قوّتی - محمدرضا نصیری	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B23
۱۲۱۵	تشخیص توکسوپلاسموز ناشی از آیمریا تنلا در مرغان بومی مشکوک به این بیماری در اهواز با دو روش اندازه گیری آُسیست انگل و PCR	منصور میاحی -عباس جلودار -حسین حمیدی نجات - مسعود رضا صیفی شاپورآبادی -صفورا خندان	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B24
۱۸	اثر باکتری های حل کننده فسفات به عنوان پروبیوتیک بر مواد معدنی استخوان، فسفر و آلکالین فسفاتاز سرم در جوجه های گوشتی	مهدی قادری جویباری - محمد علی ملبوبی -مهرداد ایرانی -شهاب الدین قره	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B25