بررسی بیماری ژنتیکی پیچیدگی ستون فقرات (CVM) به روش PCR-SSCP در گاوهای سرابی ایران

قوّتی شاهرخ*[۱]،طهمورث پور مجتبی[۱]، دوستی محمد[۱]، سلطانی مهدی[۱]، صادقی بلال[۱] و نصیری محمد رضا[۱]**
۱- قطب علمی علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فرودوسی مشهد، صندوق پستی ۱۱۶۳- ۹۱۷۷۵
Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir

چکیده

بررسی و تشخیص بیماریهای ژنتیکی در جوامع انسانی و حیوانی از اهمیت خاصی برخوردار است. بیماری پیچیدگی ستون فقرات یک بیماری مادرزادی کشنده در گاوهای هلشتاین بوده و به صورت نهفته اتوزومال بروز می‌کند. بیماری پیچیدگی ستون فقرات (CVM) بر اثر جهش در موقعیت ۵۵۹ اگزون ۴ ژن SLAC35A3 که روی کروموزوم شماره ۳ ژنوم گاوی واقع شده است اتفاق می‌افتد. بازگوانین در این موقعیت در اثر جهش تبدیل به تیمین شده و ۱۸۰ امین اسید آمینه که والین می باشد به فنیل‌آلانین تبدیل می‌شود. این بیماری عامل سقط، مرگ و میر زود رس جنین و زایمان گوساله به صورت مرده و زودتر از موئد می‌باشد. همچنین ناقلین به طور معنی‌دار بازگشت به فحلی و سرویس‌دهی مجدد را از خود نشان می‌دهند. هدف از این مطالعه، شناسایی حاملین بیماری پیچیدگی ستون فقرات در گاو های بومی سرابی ایران بود. خونگیری از ۱۶۲ گاو سرابی ایستگاه تحقیقاتی سراب (استان آذربایجان شرقی) انجام شد. استخراج DNA از نمونه ها به روش گوانیدین تیو سینات-سیلیکاژن صورت گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر قطعه ۱۷۷ جفت بازی از اگزون ۴ ژن SLC35A3 با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی به صورت استاندارد انجام شد. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز به شیوه SSCP برای بررسی تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد بر روی ژل اکریل آمید الکتروفورز شدند. نتایج این بررسی نشان دادند که جهش (G→T) در موقعیت ۵۵۹ اگزون ۴ ژن SLC35A3 در گاوهای سرابی موجود در این مرکز تا کنون صورت نگرفته و هیچ دام ناقلی مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: گاو سرابی، بیماری پیچیدگی ستون فقرات، PCR-SSCP.

مقدمه

بررسی و تشخیص بیماریهای ژنتیکی در جوامع انسانی و حیوانی از اهمیت خاصی برخوردار است. لذا یافتن روشهای دقیق تشخیصی در این راه، کمک شایانی به شناسایی، حذف ناقلین این بیماریها و حفظ ذخایر ژنتیکی مطلوب می نماید. اکثر نقص های ژنتیکی به صورت مغلوب به ارث می رسند. بنابراین تشخیص دقیق حیواناتی که از نظر ژن عامل بیماری، هتروزیگوت هستند بسیار مشکل است، زیرا این حیوانات اغلب بطور طبیعی به زندگی خود ادامه می دهند بنابراین می توانند این ژن را با تولید مثل در جمعیت پخش کنند و باعث افزایش فراوانی ژنی آلل مغلوب گردند (۱). تشخیص مولکولی ناهنجاری ژنتیکی پیچیدگی ستون فقرات (CVM)[1] نخستین بارتوسط آگرهام و همکاران در سال ۲۰۰۰ در جمعیت گاوهای هلشتاین دانمارک گزارش و تشخیص داده شد. پیچیدگی ستون فقرات یک بیماری مادرزادی کشنده در گاوهای هلشتاین است و به صورت آتوزوم نهفته بروز می‌کند. این بیماری عامل سقط، مرگ و میر جنین و زایمان گوساله مرده می‌باشد (۷). بعد از مدت کوتاهی ظهور (CVM) در امریکا، انگلستان، هلند و ژاپن نیزگزارش شد (۶). جهش G→T در موقعیت ۵۵۹ اگزون ۴ ژن (SLC35A3)[2] روی کروموزوم شماره ۳ عامل بیماری شناخته شده است. ژن (SLC35A3) مسئول عملکرد UDP-N-acetylglucosamine transporter می‌باشد که انتقال دهنده قندهای نوکلئوتیدی از سیتوزول به درون دستگاه گلژی می‌باشد (۳ و ۲). در این موضع قندهای نوکلئوتیدی به وسیله گلیکوزیل ترانسفرازها برای سنتز زنجیره قندی در گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و پلی‌کربوهیدرات‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که نهایتاً باعث رشد و توسعه قسمت محوری و مرکزی اسکلت بدن می‌شود. جهش در موقعیت ۵۵۹ ژن SLC35A3 سبب می شود که بازگوانین تبدیل به تیمین شده (نگاره ۱) و در نتیجه اسیدآمینه والین تبدیل به فنیل‌آلانین می‌شود (۴). این جایگزینی باعث اختلال در عملکرد ژن SLC35A3 و نهایتاً نقص در عمل U DP-N-acetylglucosamine transporter خواهد شد (۸ و ۵).

9795

AGTCACCGGGAGTCTAAGAGTTCTCGAATTAAGATTCCTTGAAAGTCGACCGAGTGTTA .....
TCAGTGGCCCTCAGATTCTCAAGAGCTTAATTCTAA GGAACTTTCAGCTGGCTCACAAT

AACATCCAGAGTA CCGTCAAGAGTGTCGTACAAAAAGGTCACCGAAACGACCCCAAAT
TTGTAGGTCTCATGGCAGTTCTCACAGCATGTTTTTCCAGTGGCTTTGCTGGGGTTTA
▲
GAAACTCTTTTAGAATTTTCTTTGGTT TGTTAGTCACACCTATTCTTTGTAAGTTGAACC
CTTTGAGAAAATCTTAAAAGAAACCAA ACAATCAGTGTGGATAAGAAACATTCAACTTGG....

9972

(نگاره ۱): جهش (G→T) مربوط به ژن SLC35A3 در موقعیت ۵۵۹ اگزون ۴ در کروموزوم شماره ۳ گاو

مواد و روش‌ها

خونگیری از تعداد ۱۶۲ راس گاو سرابی ایستگاه تحقیقاتی سراب صورت گرفت. استخراج DNA از ۱۰۰ میکرو لیتر نمونه خون به روش گوانیدین تیو سینات-سیلیکاژل با کیت دیاتوم محصول شرکت Isogene (مسکو) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش طیف سنجی[3] و روش مقایسه ای (ژل آگارز) تعیین شد، واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای

[1] Complex Vertebral Malformation
[2] Solute Carrier family 35, memberA3
[3] Spectrophotometric method

اختصاصی ژنSLC35A3 جهت تکثیر قطعه مورد نظر توسط دستگاه ترموسایکلر (T-Personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد (جدول- ۱). اجزای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود: (pH 8.8) ۱۰۰ mM Tris-HCl، ۱ U آنزیم Taq پلیمراز، ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر (BCA)[4] (۰/۲ mM از هر dNTP، ۱/۵ mM از MgCl2 و ۱۰۰ نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه حرارتی زیر و در ۳۵ سیکل تکثیر شدند: ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه.

ناحیه ژنی	توالی آغازگر ها	قطعات تولیدی (جفت باز)
SLC35A3	F: 5'-TCA GTG GCC CTC AGA TTC TC-3' R: 5'-CCA AGT TGA ATG TTT CTT ATC CA-3'	۱۷۷

(جدول- ۱): آغازگرهای اختصاصی ناحیه ژنی SLC35A3

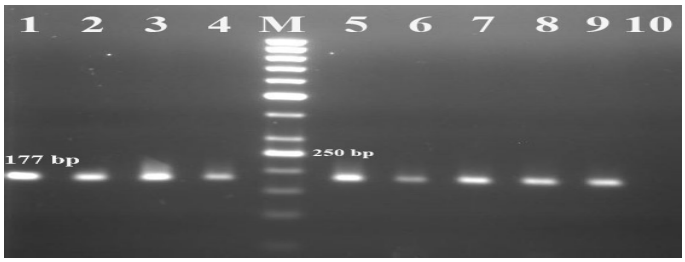
الکتروفورز محصولات PCR برای بررسی اختصاصیت و راندمان روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه انجام شد و ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و محصولات توسط اشعه ماورای بنفش بررسی شد. برای آنالیز محصولات PCR توسط روش (SSCP) [5] بسته به راندمان محصولات ۴ میکرو لیتر از محصولات PCR با ۱۲ میکرو لیتر از SSCP dye(۱۰ میکرولیتر بروموفنل ۱۰ درصد + ۲ میکرولیتر EDTA نیم مولار + ۱۹۰ میکرولیتر گلیسرول + ۸۰۰ میکرولیتر فرم آمید) مخلوط و پس از ورتکس و فیوژکردن به مدت ۵ دقیقه در دمای C °۹۵ در دستگاه PCR قرار داده شد. بلافاصله پس از این مرحله میکرو تیوب ها در داخل یخ قرار گرفتند. سپس نمونه ها بر روی ژل اکریل آمید ۱۰درصد وا سرشته با دمای ۷^{OC}، ولتاژ ۳۲۰ و مدت زمان ۱۵۰ دقیقه جهت مشاهده تفاوت های تک نوکلوئیدی الکتروفورز گردیدند. رنگ آمیزی ژل اکریل آمید به روش نیترات نقره صورت گرفت.

نتایج و بحث

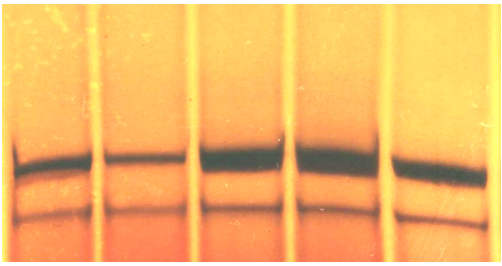
نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA های استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار بودند. نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز نشان دادند که االگوی باندی مربوط به تکثیر قطعه ۱۷۷ جفت بازی ژن SLC35A3 فاقد باند غیر اختصاصی، دایمر و اسمیر بود که موید اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده می باشد. از طرفی عدم مشاهده باند در کنترل منفی نشان دهنده دقت و صحت آزمایش است (نگاره-۲). نتایج بررسی الگوی تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) بر روی ژل اکریل آمید ۱۰ درصد واسرشته نشان داد که هیچ یک از دام های موجود در ایستگاه گاو سرابی حامل ژن جهش یافته نبودند و این بدین معنی است که در دامهای سرابی مورد بررسی هیچ ناقلی از بیماری CVM وجود ندارد (نگاره-۳). ناگاتا و همکاران در سال ۲۰۰۲ در ژاپن، ۴۰ گاو نر را مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش، بررسی‌های متعددی از قبیل توجه در علائم ماکروسکوپی، علائم کالبدشکافی و علائم رادیوگرافی در گوساله‌های مبتلا به CVM انجام شد که نهایتاً از این تعداد، ۱۳ مورد ناقل CVM از طریق تکنیک‌های مولکولی شناسایی شد (۶). همچنین در کشور لهستان برای تعیین فراوانی ناقلین CVM، Rusc و همکاران در سال ۲۰۰۷، تعداد ۲۰۲ گاو نر را که در سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۴ در تلقیح استفاده می‌شدند و ۴۰۳ گاو نری که تحت

4 Bovine Serum Albumin
5 single strand conformation polymorphism

ارزیابی برای استفاده آینده در تلقیح بودند را آزمون نمودند که همگی از نژاد هلشتاین ـ فرزین لهستانی (لهستانی سیاه و سفید) بودند. از تعداد ۶۰۵ گاو نر ذکر شده، ۱۵۰ مورد ناقل CVM شناسایی شد (۷). عدم مشاهده دام های حامل در گاوهای بومی سرابی نیز عدم استفاه از اسپرم های خارجی پر تولید و اصیل بودن دامهای این ایستگاه را تایید می نماید که برای حفظ این خلوص ژنتیکی باید تمهیدات گسترده تری از سوی مسئولین صورت گیرد. زیرا خالص سازی این گله ها برای داشتن ذخایر ژنی خالص به منظور انجام کارهای اصلاحی و بهنژادی و اجرا نمودن استراتژی های اصلاحی هیچ مشکلی به لحاظ انتشار آلل مغلوب و همچنین کاهش راندمان اقتصادی بوجود نمی آورد و با اطمینان و ضریب دقت بالا می توان از اسپرم گاوهای برتر این نژاد برای اصلاح نژاد دام های منطقه و اجرا نمودن استراتژی های اصلاح نژادی استفاده نمود. نتایج این تحقیق نشان دادند که لزوم استفاده از تکنیک های مولکولی به منظور شناسایی ناقلین بیماری های ژنتیکی اتوزومال در سطح گله های پایه و تجاری و همچنین در سطح اسپرم های وارداتی و تولیدی مراکز اصلاحی داخل کشور امری غیر قابل انکار است و این روش ها به آسانی توانایی بهینه شدن و تفکیک و شناسایی دام های حامل را دارند.



نگاره-۲- الکتروفورز محصولات PCR. شماره ۹-۱ (قطعه ۱۷۷ جفت بازی)، شماره ۱۰ (کنترل منفی)، M نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (۱۰۰۰-۹۰۰-۸۰۰-۷۰۰-۶۰۰-۵۰۰-۴۰۰-۳۰۰-۲۵۰-۲۰۰-۱۵۰-۱۰۰-۵۰).



نگاره-۳- الکتروفورز اکریل آمید محصولات PCR. (ژنوتایپ با SSCP)

دو
همکاران مرکز اصلاح ایستگاه تحقیقاتی سراب (استان آذربایجان شرقی) و
و غرب ایران صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Herzog, A. 1992. Genetic defects in cattle and the possibilities of control. Wiener *Tierarztliche Monatsschrift. 79: 142-148*
2. Ishida, N., and Kawakita, M. 2004. Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). Pflugers Arch. 447: 768-775
3. Ishida, N., Kuba, T., Aoki, K., Miyatake, S., Kawakita, M., and Sanai, Y. 2005. Identification and characterization of human Golgi nucleotide sugar transporter SLC35D2, a novel member of the SLC35 nucleotide sugar transporter family. Genomics. 85: 106-116.
4. Kanae, Y., Endoh, D., Nagahata, H., and Hayashi, M. 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. J Vet Diagn Invest. 17: 258-262.
5. Muraoka, M., Kawakita, M., and Ishida, N. 2001. Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. FEBS Lett. 495: 87-93.
6. Nagahata, H., Oota, H., Nitanai, A., Oikawa, S., Higuchi, H., Nakade, T., Kurosawa, T., Morita, M., and Ogawa, H. 2002. Complex Vertebral Malformation in a Stillborn Holstein Calf in Japan. *J Vet Med Sci. 64(12): 1107-1112.*

7. Rusc, A., and Kaminski, S. 2007. Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet. 48(3): 247-252.*
8. Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A. H., and Holm, L. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N- acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Res. 16: 97-105.*

Examination of Iranian Sarabi Cows for CVM Genetic Disorder Using PCR-SSCP

S. Ghovvati*[1], M. Tahmoorespour[1], M. Doosti[1], M. Soltani[1], B. Sadeghi[1], M. R. Nassiry[1]**
1- Center of Excellence for Animal Science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
Ghovvati@stu-mail.um.ac.ir

Abstract
Examining and detection of genetic disorders is very important in both human and animal communities. CVM is a lethal congenital disorder in Holstein cows which advent as autosomal latent. It is occurred because of a point mutation on base 559 from exon 4 in SLAC35A3 gene that resides on bovine chromosome 3. Due to this mutation, G is replaced with T and subsequently 180th amino acid is changed from valine to phenylalanine. This disorder is in charge for abortion, premature mortality, stillborn and early birth. Carriers of this abnormality significantly show returned estrous and need for repeated services. Goal of this study was to identify the CVM carriers in Sarabi native cow of Iran. Blood samples were prepared from 162 cows from Sarabi cows' research station in Sarab, East Azerbaijan province, Iran. DNA extraction was done based on guanidine thiocyanate – silica gel method. Standard polymerase chain reaction was applied to amplify a 177 bp fragment from exon 4 in SLAC35A3 gene using specific primer pair. PCR products were analyzed using single stranded conformation polymorphism (SSCP) to reveal their mutations. Results showed no G→T mutation in examined cows thus no carrier was identified.

Keywords: Sarabi cow, CVM, Single stranded conformation polymorphism

	گاو با استفاده از دستگاه Time PCR Real و رنگ SYBR Green	خزائلی -فروزنده محجوبی - بهروز شمسی	دام و آبزیان	
۸۸۴	بررسی تنوع ژنتیکی نشانگرهای AFLP در اسبچه خزر	سعید اسماعیل خانیان -فضل ا.. افراز -حسین عمرانی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B8
۱۰۱۱	Colocalisation of metastin and immediate early gene in the brain of the sheep	محمد رضا جعفرزاده شیرازی -اسماعیل ابراهیمی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B9
۳۱	انتشار گروههای فیلوژنتیکی در جدایه های اشریشیاکلی از مدفوع سگ های خانگی سالم	رضا قنبرپور -اکرم پاک سرشت -شیرین رضایی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B10
۱۰۴۵	بررسی اثر بازدارندگی لاکتیک اسید باکتریهای ایزوله شده از روده ماهی شیر بندر در کنترل رشد لیستریا اینوکوآ	مرضیه موسوی نسب -الهه عابدی -سحر سادات موسوی نصب	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B11
۱۲۲۷	بررسی بیماری ژنتیکی پیچیدگی ستون فقرات (CVM) به روش PCR-SSCP در گاوهای سرابی ایران	شاهرخ قوّتی -مجتبی طهمورث پور -محمد دوستی -مهدی سلطانی -بلال صادقی -محمد رضا نصیری	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B12
۶۷	چندشکلی ژن GoLA-DRB3 بز سرخ جبالبارز با استفاده از PCR-RFLP	محمدرضا محمدآبادی -کبری دست افکن -مسعود اسدی فوزی -علی اسمعیلی زاده کشکوئیه -امین باقی زاده - محمد سفلایی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B13
۷۷۵	معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تشخیص همزمان باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم، سالمونلا و اشریشیا کلی در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی	علیرضا صیداوی -ضیاءالدین میرحسینی -محمود شیوازاد -محمد چمنی -علی اصغر صادقی -رضا پورسیفی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B14
۱۷۷	بررسی ژنوتیپی سروتیپ های اشریشیاکلی جدا شده از موارد درماتیت طیور گوشتی	رضا قنبرپور	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B15
۲۱۸	مکان یابی فاصله ای QTLهای کنترل کننده صفات اقتصادی پیله کرم ابریشم	سید بنیامین دلیرصفت -سید ضیاءالدین میر حسینی -بابک ربیعی -پیام پتکی	بیوتکنولوژی دام و آبزیان	B16