



بررسی چند شکلی ژنتیکی و فراوانی آللی جایگاه ژنی *BoLA-DRB3.2* در گاوهای سیستانی ایران

صادق بلال***، نصیری محمد رضا، حیدرپور مهیار، افتخاری شاهرودی فریدون،
جوادمناش علی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

به منظور مطالعه و بررسی چند شکلی (پلی مورفیسم) مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد گاو سیستانی از 150 رأس گاو خونگیری انجام شد. DNA ژنومی از 100 میکرولیتر خون استخراج و برای تعیین مقدار و خصوصیات آن از ژل آگارز 1 درصد و اسپکتروفتومتر استفاده شد. ناحیه چند شکل اگزون 2 مکان ژنی *BoLA-DRB3* به طول 284 جفت باز با روش Hemi-Nested PCR در دو مرحله تکثیر و برای برش آنزیمی قطعات DNA تکثیر شده، از سه آنزیم *Rsa I*، *Hae III* و *BstX2I* استفاده شد. محصولات هضم شده، توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید 8 درصد جدا و ژنوتیپ آنها پس از رنگ آمیزی با نیتراتنقره تعیین گردیدند. تعداد 23 آلل در این نژاد شناسایی شد. فراوانی آلل ها با استفاده از نرم افزار Alrequin Ver. 2.000 محاسبه گردیدند. آلل 34* دارای بیشترین فراوانی به مقدار 19/33% بود. آللهای 8*، 15*، 21* و 11* نیز بعد از آن قرار داشتند. این مطالعه نشان می دهد که اگزون 2 ژن *BoLA-DRB3* در گاوهای سیستانی ایرانی از پلی-مورفیسم بالایی برخوردار است.

واژه های کلیدی: *BoLA-DRB3.2*، آنتی ژن لنفوسیتی گاو، PCR-RFLP، گاو سیستانی ایرانی، پلی مورفیسم

مقدمه

امروزه با کمک روش های مولکولی از نشانگرهای DNA برای شناسایی ساختار اصلی سیستم های ژنی و تعیین تنوع موجود در جوامع در نواحی ویژه ای از سطح ژنوم و انتخاب بر اساس نشانگرهای مولکولی استفاده می شود. مکان ژنی مجموعه سازگاری بافتی (MHC)¹ کد کننده آنتی ژنها و پروتئینهای سطح لوکوسیتها می باشد که در واکنش های دفاعی بدن و شناسایی پروتئینهای خارجی نقش دارند. در گاو این مکان ژنی به نام *BoLA*² معروف می باشد و به سه گروه ژنی به نامهای Class I، Class II و Class III تقسیم و بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 23 گاو قرار گرفته اند (4، 3 و 5). هر یک از این گروه های ژنی دارای ژنهای متعددی هستند و هر ژن نیز ممکن است تا بیش از چند ده آلل را داشته باشد. ویژگی های دو گروه I و II این مجموعه تا کنون مورد بررسی قرار گرفته است اما نقش ژن های گروه III هنوز به خوبی شناخته نشده است. گروه II خود به دو زیر گروه تقسیم می شود که در یک سوم طول بازوی کوتاه کروموزوم از یکدیگر جدا شده اند. گروه IIa شامل مکان های ژنی *DRA*، *DRB1*، *DRB2*، *DRB3*، *DQA*، *DQA2*، *DQB1* و *DQB2* می باشد و در زیر گروه IIb نیز مکان های ژنی *DYA*، *DYB*، *DIB* و *DOB* وجود دارند. مکان ژنی *DRB3* بسیار پلی مورفیک بوده و مورد توجه خاص است به طوری که فقط در اگزون شماره 2 این مکان حدود 88 آلل مختلف شناسایی شده اند که بر روی بسیاری از صفات مرتبط با ایمنی در دامها، میزان سلول های سوماتیک شیر (SCS)، ورم پستان و صفات تولیدی (نظیر شیر، چربی و پروتئین) اثر دارند (4، 3 و 5). اولین

¹ - Major Histocompatibility Complex

² - Bovine Leucocyte Antigen



بار از روش PCR-RFLP برای تشخیص جهشها و آللهای مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* استفاده شده و کارایی این روش با تشخیص 30 آلل در این مکان ژنی نشان داده شده است (6). در تحقیق حاضر چندشکلی ژنتیکی مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در نژاد گاو سیستانی ایران بررسی می شود.

مواد و روشها

برای انجام این آزمایش از 150 رأس گاو خالص سیستانی ایستگاه تحقیقاتی گاوسیستانی واقع در شهرستان زهک در استان سیستان و بلوچستان استفاده شد. برای جلوگیری از انعقاد خون به میزان 0/1 حجم نمونه ها محلول EDTA (0/5 مولار با pH = 8) اضافه شد. استخراج DNA از 100 میکرولیتر خون با روش Boom و همکاران (1989) انجام شد (2). تکثیر ناحیه پلی مورفیک اگزون 2 جایگاه ژنی *BoLA-DRB3* به طول 284 جفت باز با روش Hemi-Nested PCR در طی دو مرحله صورت گرفت (6). در مرحله اول PCR از دو آغازگر HLO30 و HLO31 و در مرحله دوم از دو آغازگر HLO30 و HLO32 برای تکثیر استفاده شد. برای تشخیص محصولات PCR از ژل آگارز 1 درصد با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید استفاده شد. هضم آنزیمی با 3 آنزیم مختلف *Hae III*، *Rsa I* و *BstX2I* انجام گرفت (3). محصولات هضم شده واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی ژل پلی آکریل آمید 8 درصد الکتروفورز شده و با نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. فراوانی آللهای با استفاده از نرم افزار Alrequin Ver. 2.000 محاسبه شد. کلیه آزمایشات در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

نتایج و بحث

در این روش مقدار زیادی DNA ژنومی (حدود 50 u/μl) و با طول حدود 50 تا 60 هزار جفت باز حاصل شد. همانطور که مورد انتظار بود یک قطعه دارای 284 جفت باز از اگزون 2 ژن *BoLA-DRB3* تکثیر شده است که برای تشخیص از اندازه مارکر 50 جفت بازی استفاده شده است (شکل 1). مقایسه باندهای موجود در نمونه های هضم شده با سه آنزیم *HaeIII*، *RsaI* و *BstX2I* با اندازه مارکر PUC19 و اندازه مارکر 50 بر روی ژل پلی آکریل آمید صورت گرفت. بررسی الگوهای باندهای DNA بر روی ژل آکریل آمید به شناسایی 23 آلل منجر گردید. فراوانی های آللی در جمعیت گاوهای سیستانی بین 0/2 تا 19/33 درصد بدست آمد. 5 آلل *34، *8، *15، *21 و *BoLA-DRB3.2**11 به ترتیب با فراوانی 19/33، 17/33، 15/67، 11/33 و 7/33 درصد از بیشترین فراوانی در این جمعیت برخوردار بودند. آللهای *22، *13 و *BoLA-DRB3.2**obc کمترین فراوانی را در نژاد مورد بررسی داشتند (جدول 1). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که چندشکلی ژنتیکی مکان ژنی *BoLA-DRB3.2* در گاوهای سیستانی بالایی باشد. به علاوه نتایج به دست آمده در مورد گاوهای بومی هندوستان (*Bos indicus*) دارای مطابقت زیادی با گاوهای سیستانی ایران می باشد (1). این مطالعات نشان می دهند که در گاوهای *Bos indicus*



6. Van Eijk M J T., A Stewart-Hayaes, and A Lewin. (1992) Extensive polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim Genet* 23:483-496.

Analysis and Frequency of Bovine lymphocyte Antigen *BoLA-DRB3.2* Alleles in Iranian Sistani cattle

Sadeghi Balal, Nassiry Mohammad Reza, Heydarpour Mahyar, Eftekhari Shahroudi Freidoon, Javadmanesh Ali

Dept of Animal Science, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

Abstract

The bovine lymphocyte antigen (*BoLA*)-*DRB3* gene encodes cell surface glycoproteins that initiate immune responses by presenting processed antigenic peptides to CD4⁺ T helper cells. *DRB3* is the most polymorphic bovine MHC class II gene which encodes the peptide-binding groove. Since different alleles favour the binding of different peptides, *DRB3* has been extensively evaluated as a candidate marker for associations with various bovine diseases and immunological traits. For that reason, the genetic diversity of the bovine class II *DRB3* locus was investigated by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method (PCR-RFLP). This study describes genetic variability in the *BoLA-DRB3* in Iranian Sistani cattle. Iranian Sistani Cattle (n=150) were genotyped for bovine lymphocyte antigen (*BoLA*)-*DRB3.2* alleles by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism method. Bovine DNA was isolated from aliquots of whole blood. A two-step polymerase chain reaction followed by digestion with restriction endonucleases *RsaI*, *HaeIII* and *BstX2I* was conducted on the DNA of Iranian Sistani Cattle. In the studied herd, we identified 23 alleles. The allele *BoLA-DRB3.2**34 occurred at the highest frequency of 19.33%. In this study Five alleles (*BoLA-DRB3.2**34, *8, *15, *21, and *11) accounted for almost 71% of the total alleles observed to be present in the Sistani Cattle. The result obtained in the present study demonstrated that the *BoLA DRB3.2* locus is highly polymorphic in the Iranian Sistani Cattle.

Keywords: *BoLA-DRB3.2*, Bovine Lymphocyte Antigen, PCR- RFLP, Iranian Sistani Cattle, Polymorphism