بررسی نقص چسبندگی گلبولهای سفید خون در جمعیتی از گاوهای هلشتاین ایرانی

میثم رنجبی[1]، بهزاد همتی[1*]و ابوالقاسم لواف[1]

تاریخ دریافت: ۹۲۱۳/۰۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۹۲۱۳/۰۵/۱۹

چکیده

در تحقیق حاضر، بررسی مولکولی نقص ژنتیکی چسبندگی گلبولهای سفید خون در جمعیتی از گاوهای هلشتاین ایرانی با استفاده از روش PCR-RFLP[2] انجام گردید. این بیماری، یک بیماری اتوزومال مغلوب است که موجب کاهش گلیکوپروتئین‌های واقع در سطح گلبول‌های سفید به نام بتا دو اینتگرین می‌شود. این گلیکوپروتئین‌ها مسئول ایجاد اثرات متقابل بین سلول‌ها هستند که جهت چسبیدن سلول به غشاء اندوتلیوم عروق، ورود به بافت‌ها و تخریب عوامل بیماری زا ضروری می‌باشند. علت ایجاد این نقص ژنتیکی، یک جهش نقطه‌ای در اگزون ۵ از ژن CD18 می‌باشد که باعث جابجایی آدنین با گوانین در موقعیت ۳۸۳ می‌شود و منجر به جابجایی اسید آمینه گلایسین با اسید آسپارتیک در موقعیت D128G می‌شود. این جهش موجب حذف ناحیه برش برای آنزیم Taq I و ایجاد یک ناحیه جدید برش برای آنزیم Hae III می‌شود که تشخیص دام‌های مبتلا و ناقل این نقص ژنتیکی را امکان پذیر می‌سازد. در این تحقیق از ۱۰۳ راس گاو هلشتاین ماده در استان‌های تهران و البرز نمونه خون گرفته شد. DNA نمونه‌ها به روش Salting-out استخراج گردید و تعیین کمیت و کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای قطعه‌ای از ژن CD18 به طول ۱۳۶ جفت باز انجام گردید و محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱٫۵% بارگذاری شد. سپس محصولات تکثیر شده با استفاده از آنزیم برشی Taq I هضم و فراورده‌های برش داده شده بر روی ژل آگارز ۲% الکتروفورز شدند. با توجه به الگوهای باندی تولید شده، هیچ دام ناقل و یا مبتلا به بیماری BLAD در دام‌های مورد بررسی مشاهده نگردید و کلیه گاوهای مورد بررسی هموزیگوت غالب (عاری از بیماری نقص چسبندگی گلبولهای سفید خون) تشخیص داده شدند. اگر چه هیچیک از دام‌های مورد بررسی در این تحقیق ناقل و یا مبتلا به این نقص نبودند ولی انجام تحقیقات گسترده در زمینه شناسایی نقص‌های ژنتیکی شناخته شده و جلوگیری از آمیزش بین دام‌های ناقل ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: هلشتاین، نقص چسبندگی گلبولهای سفیدخون، آنزیم PCR-RFLP, Taq I

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحدکرج، گروه علوم دامی، کرج، ایران
* مولف مسئول: (bzdhmt@gmail.com)

2- Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism

مقدمه

نقص چسبندگی گلبولهای سفید خون (BLAD) یک نقص ژنتیکی اتوزومال مغلوب و کشنده می‌باشد که تا کنون تنها در نژاد هلشتاین یافت شده است. علت این نقص ژنتیکی، جهشی می‌باشد که در اگزون ۵ از ژن CD18 اتفاق می‌افتد. در این نقص ژنتیکی دو جهش اتفاق می‌افتد که اولین جهش، جهشی نقطه‌ای است که بین دو نوکلئوتید A و G در موقعیت ۳۸۳ ژن CD18 اتفاق می‌افتد و نتیجه آن جایگزینی اشتباه اسید امینه گلایسین به جای اسپارتیک اسید در موقعیت ۱۲۸ خواهد بود که منجر به کاهش تولید نوعی گلیکوپروتئین مسئول چسبندگی در سطح گلبولهای سفید به نام بتا دو اینتگرین می‌شود. جهش دیگر یک جهش نقطه‌ای خاموش است که موجب جابجایی سیتوزین و تیمین در موقعیت ۷۷۵ می‌شود و هیچگونه تغییری را ایجاد نمی‌کند. (Vatasesu-Balcan *et al*., 2007)

از لحاظ مولکولی هنگامی که بدن مورد تهاجم عوامل بیگانه قرار می‌گیرد، برخی از سلولهای دفاعی بدن تحت تاثیر عوامل مهاجم، سایتوکین‌ها[1] را ساخته و در خون ترشح می‌کنند که موجب آگاه شدن گلبول‌های سفید خون از وجود عفونت در بدن ودر نتیجه بروز علایم التهاب می‌گردند که مربوط به عملکرد سیستم دفاعی ذاتی می‌باشد. پس از دریافت این علایم، نوتروفیل‌ها به سمت مویرگ‌های خونی موضع التهاب حرکت کرده و پس از عبور از بافت‌های مجاور به محل عفونت می‌رسند، پس از رسیدن نوتروفیل‌ها به دیواره رگ، از طریق رسپتورهای خود به سلول‌های اندوتلیال متصل می‌شوند تا از منفذهای ایجاد شده عبور کرده و عوامل مهاجم را از بین ببرند. رسپتور نوتروفیل‌ها حاوی گلیکوپروتئینی به نام بتا دو اینتگرین است که در بخش پروتئینی آن نوعی پروتئین به نام CD18 وجود دارد که توسط زیر واحدی از ژنی با همین نام بیان می‌شود. (Citek *et al*., 2004)

در افراد مبتلا به نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون یک جهش نقطه‌ای در ژنی موسوم به CD18 موجب می‌گردد تا پروتئینی با همان نام ساخته نشده و در نتیجه گلبول‌های سفید خون نتوانند به سلول‌های اندوتلیال متصل شوند و در نتیجه عمل دیاپدز انجام نگیرد. این جهش باعث می‌شود که نوتروفیل‌ها به جای اتصال به اندوتلیال به یکدیگر چسبیده و در نتیجه سیستم ایمنی دام دچار اختلال و ضعف عملکرد می‌گردد. نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون بر اساس نحوه حضور بتا دو اینتگرین‌ها به دو گروه شدید و متوسط طبقه بندی می‌شود که نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون در گاوهای هلشتاین در نوع شدید قرار دارد. علائم فنوتیپی قابل مشاهده در این بیماری عبارتنداز: عفونت‌های باکتریال پوستی، دهانی، دستگاه تنفس، تاخیر در افتادن بند ناف. اگر چه ممکن است گوساله‌های‌های مبتلا به این نقص ژنتیکی بتوانند زنده متولد شوند اما گوساله‌های مبتلا معمولا در سال اول زندگی می‌میرند هر چند که برخی از آنها می‌توانند تا پس از دو سالگی زنده بمانند. ناقلین این ژن، علایم فنوتیپی مشخصی ندارند ولی به دلیل سقط یا دفع جنین، نرخ بازگشت به فحلی در ناقلین افزایش می‌یابد. ژن CD18 دارای ۱۵ اگزون می‌باشد و جهش اتفاق افتاده در اگزون شماره ۵ قرار دارد که باعث ایجاد این

1- cytokins

اشتباه جایگزینی خواهد شد.(Vatasesu-Balcan *et al*., 2007)

هدف از اجرای این تحقیق شناسایی دام‌های ناقل به‌منظور جلوگیری از ایجاد گوساله‌های مبتلا به این نقص ژنتیکی می‌باشد.

مواد و روش ها

در این تحقیق از تعداد ۱۰۳ تلیسه و گاو هلشتاین شکم اول تا سوم در مناطق استان البرز و شهرستان‌های اطراف کرج به ویژه شهرستان شهریار خون گیری صورت گرفت. بعد از نمونه برداری، نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انتقال داده شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. استخراج DNA به روش بهینه شده Salting-out انجام گردید و جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA ژنومی نمونه‌ها، از دستگاه نانودراپ استفاده گردید. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر زیر واحدی از ژن CD18 به شرح جدول شماره ۳ انجام شد و برنامه زمانی، چرخه دمایی و غلظت اجزای واکنش نیز طبق جداول ۱ و ۲ انجام گردید. سپس محصولات واکنش با استفاده از DNA Safe stain نشان گذاری و جهت بررسی اندازه قطعات تکثیر شده، بر روی ژل آگارز ۲% بارگذاری شدند. نظر به اینکه جهش مذکور موجب حذف ناحیه برش برای آنزیم Taq I می‌شود تشخیص آلل‌های تیپ وحشی در این نقص ژنتیکی امکان پذیر می‌شود لذا اگر آلل‌های تیپ وحشی در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت در تماس با آنزیم Taq I قرار گیرند توسط آنزیم مذکور برش داده شده و به دو قطعه ۲۸ و۱۰۸ جفت بازی شکسته می‌شوند در حالی که آلل‌های جهش یافته تحت تاثیر آنزیم مذکور قرار نمی‌گیرند. به عبارت دیگر قطعه ۱۳۶ جفت بازی مربوط به آلل‌های تیپ وحشی توسط آنزیم مذکور برش داده می‌شود و به دو قطعه ۲۸ و۱۰۸ جفت بازی شکسته می‌شود ولی آنزیم مذکور بر روی آلل‌های جهش یافته تاثیری ندارد. غلظت اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و برنامه زمان و چرخه حرارتی که در این تحقیق برای دستگاه ترموسایکلر استفاده شد به شرح جدول شماره ۲ می‌باشد.

جدول ۱ - غلظت اجزای واکنش PCR

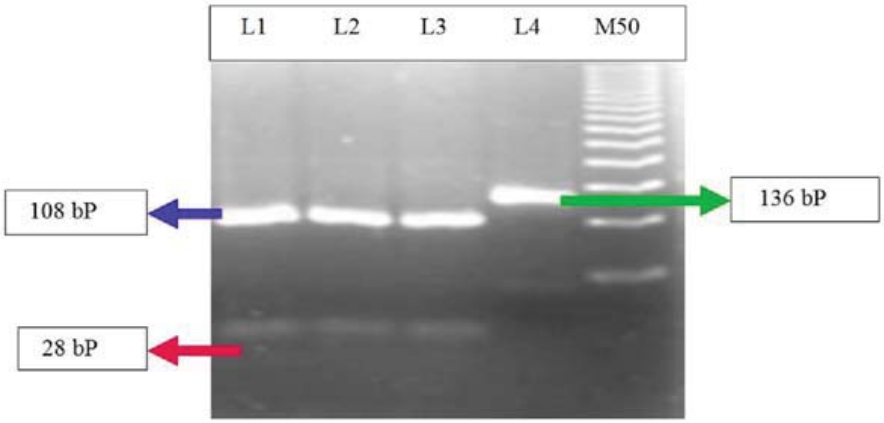
غلظت نهایی	اجزای واکنش
1X	بافرPCR
4mM	$Mgcl_2$
5µM	آغازگرها
200µM	dNTPs
5 unit/µl	آنزیمTaq پلیمراز
100ng/µl	DNA الگو
متغیر	ddH_2O

جدول ۲ – دما و زمان چرخه‌های حرارتیPCR

مراحل PCR	درجه حرارت(C^0)	زمان
واسرشته سازی اولیه	۹۵°C	۱۰دقیقه
واسرشته سازی	۹۵°C	۳۰ ثانیه
اتصال آغازگر	۵۷°C	۳۰ ثانیه
بسط آغازگر	۷۲°C	۱ دقیقه
تکرار مرحله۲ الی ۴ (۳۵ مرتبه)	–	–
بسط نهایی آغازگر	۷۲°C	۳۰ دقیقه
نگهداری محصول در دستگاه ترموسایکلر	۴°C	حداکثر ۳۰ دقیقه

جدول ۳ – پرایمرهای رفت و برگشت و شماره دسترسی آنها در سایت NCBI در این تحقیق به شرح زیر می‌باشد:

	Sequences 5'-3'	Oligo number
Sense primer	CCT TCC GGA GGG CCA AGG GCT	20724B3-9655CO2
Antisense primer	CCT GGT GAT GCC ATT GAG GGC	20724B3-9655DO2



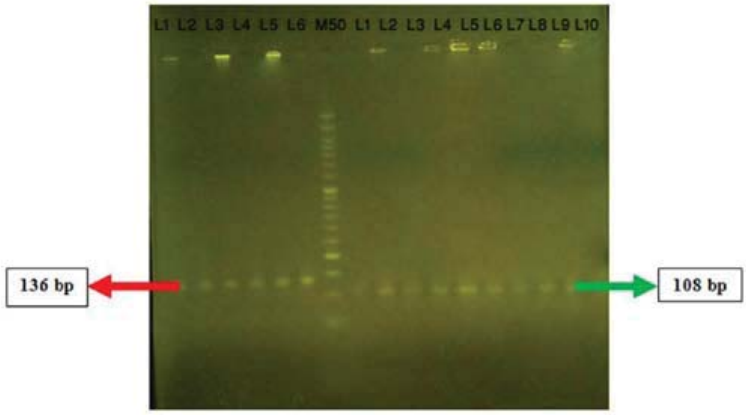
تصویر شماره ۱: الگوی الکتروفورز از جایگاه BLAD بعد از هضم با آنزیم Taq I

Lane 1-3 : دام‌های نرمال هموزیگوت

Lane 4: محصولات PCR قبل از هضم با آنزیم Taq I

M50 : اندازه مارکرها (50 bp Step Ladder)

(Vatasescu-Balcan *et al*., 2007)



تصویر شماره ۲: الگوی الکتروفورز از جایگاه BLAD بعد از هضم با آنزیم Taq I و محصولات PCR.

Lane 1-6: محصولات PCR قبل از هضم با آنزیم Taq I

M50: اندازه مارکرها (50 bp Step Ladder)

Lane 1-10: دام‌های نرمال هموزیگوت

نتایج و بحث

استخراج DNA به روش بهینه شده Salting-out انجام گردید و جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA ژنومی نمونه‌ها، از دستگاه نانودراپ استفاده گردید. اگزون ۵ از ژن CD18 دارای الگوی باندی ۱۳۶ جفت بازی می‌باشد، زمانی که آلل‌های تیپ وحشی در واکنش با آنزیم Taq I قرار گیرند توسط آنزیم مذکور برش داده شده و به دو قطعه ۲۸ و۱۰۸ جفت بازی شکسته می‌شوند. به عبارت دیگر اگر قطعه ۱۳۶ جفت بازی مربوط به آلل‌های تیپ وحشی توسط آنزیم مذکور برش داده شود به دو قطعه ۲۸ و۱۰۸ جفت بازی شکسته می‌شود ولی آنزیم مذکور بر آلل‌های جهش یافته تاثیری ندارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ۱۰۳ نمونه با موفقیت انجام گردید و قطعه ۱۳۶ جفت بازی به خوبی تکثیر گردید (تصویر شماره ۲). سپس توسط آنزیم مذکور در تمام نمونه‌ها شکسته شد. بررسی الگوهای باندی ایجاد شده در مرحله هضم آنزیمی نشان داد که محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تمام نمونه‌ها به وسیله آنزیم مذکور به قطعات ۲۸ و ۱۰۸ جفت بازی شکسته شدند لذا هیچیک از دام‌های مورد بررسی دارای آلل جهش یافته برای این نقص ژنتیکی نبودند. ناقلین بیماری هر سه باند ۱۳۶،۲۸و۱۰۸ را نشان می‌دهند که در تحقیق حاضر هیچیک از نمونه‌ها الگوی سه باندی را نشان نداد. با توجه به اینکه اغلب مبتلایان به این نقص ژنتیکی قبل از بلوغ از بین می‌روند، شناسایی ناقلین بیماری BLAD به ویژه در گاوهای نر با استفاده از روش PCR-RFLP و جلوگیری از آمیزش بین ناقلین راهی بسیار موثر در پیشگیری از بروز این نقص ژنتیکی و کاهش خسارت‌های ناشی از تولد گوساله‌های مرده، سقط جنین، مرگ گوساله‌ها و افزایش نرخ بازگشت به فحلی می‌باشد.

منابع

1- Akyüz, B. and Ertugrul, O. 2006. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Turkish native and Holstein cattle. Acta vet Hung, 54:173-178

2- Akyuz, B., Cubuk, B. and Ertugrul, O. 2004. Detection of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein cattle by Restriction fragment length polymorphism (RFLP). Tubitak-VHAG-project NO.1918.

3- Anderson, D.C., Ackerman, M.R., Brown, G.B., Hughes, BJ., Kehrli, M.E., Stevens, MG., Schmalstieg, F.C., Wilhelmsen, C.L.,Whestone, C.A. and VanDerMaaten, M.J. 1990. Molecular definition of the bovine granulocytopathy syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1(CD11b/ CD18) glycoprotein. AM . j.vet.Res.51:1826-1836

4- Albarino, C.G., Dewey, R., Grauo, O., Lozano, M.E., Poli, MA., Romanowski,V. and Semorile, L. 1996. PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and Uri dine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle. Zentralbl vet 43:163-168

5- Ackermann, M.R., Gilbert, O., Kehrli, M.E. and Shuster, D.E. 1999. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle, 89:9225-9226

6- Brenig, B., Baumgartner, B.G., Jansen, s. and Kriegesmann, B. 1997. Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and the refinement of test for bovine leukocyte adhesion deficiency. J Dairy Sci., 80: 2547-2549

7- Baron, E.E., Martinez, M.L. and Riberio, A.L. 2000. PCR screening and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. Gent and Mol. Biol., 23:831-834

8- Costache, M., Dinischiotu, A., Georgescu, S.E., Manea, M.A., Tesio, C.D. and Vatasescu-Balcan, R. A. 2007. Evidence of Single point mutation inducing BLAD disease in Romanian Holstein- derived cattle breed. Biotechnology in animal husbandry 23(5-6), P 375-381

9- Dykes, D.D., miller, S.A. and Polesk, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl. Acids Res, 16:1215-1221

10- keskin, A., Oner, y., ELMACI, A. 2010. Identification of BLAD, DUMPS, Citrullinemia, facor XI deficiency in Holstein cattle in turkey. Asian journal of animal and veterinary advance. 5(1): 60-65

11- Meydan, H., Ozdil, F. and yildiz, M.A. 2006. Identification of BLAD and DUMPS as a genetic disorders using PCR-RFLP in Holstein bulls reared in turkey. Proceeding of the 57th Annual meeting of the Europen Association for Animal production: 17-20; Antalya, Turkey.

12- Nagahata, H. 2004. Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD). Vet. Med. Sci., 66: 1475-1482

Survey of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in a Population of Iranian Holstein Cows

M. Ranji[1], B. Hemati[1]*and A. Lavvaf [1]

Received date: 12/05/2013

Accepted date: 10/08/2013

Abstract

In present research, molecular detection of Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein cows has been done using PCR- RFLP. BLAD is a recessive autosomal disease that is caused by a deficiency in leukocyte surface glycoprotein known as β2 integrins. These glycoproteins are responsible for the cell-cell interactions necessary for neutrophils to adhere vascular endothelium, enter the tissues and destroy invading pathogens. The molecular cause of BLAD is a single point mutation with substitution of Adenin by Guanine at position 383 in the exon 5 of CD18 gene which substitutes glycine by aspartic acid at amino acid 128. This mutation eliminates a Taq I restriction site and creates a Hae III site, which allows the identification of normal carrier and affected animals. Blood samples were collected from 103 cows in the provinces of Tehran and Alborz. DNA for each sample was extracted using salting out method, quality and quantity for extracted DNA were analyzed by Nanodrop. PCR was amplified using specific primers for 136bp DNA, (CD18 gene) and PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose. Then Taq I restriction enzyme was used to identify both BLAD alleles of the CD18 gene by digestion of PCR products. Restricted products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose. The results of our research demonstrated no affected or carrier of BLAD in these animals and all tested animals were dominant homozygote. Although we did not find any carrier but wide spread research program seems to be necessary for detection of all known genetic disorders.

Keywords: Bovine leukocyte adhesion deficiency, Holstein, PCR-RFLP, Taq I enzyme

1- Department of Animal Science, Islamic Azad university, Karaj Branch, Karaj, Iran

*Corresponding author: (bzdhmt@gmail.com)