دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

"مقاله پژوهشی"

بیان افتراقی ژن‌های بافت خون مرتبط با کتوز قبل از زایمان در گاو هلشتاین با استفاده از داده‌های ترانسکریپتومیکس

میلاد غلامی طاحونه[1] و حسین مرادی شهربابک[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران، (نویسنده مسوول: gholami.milad@ut.ac.ir)
۲- استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۸/۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۱۷
صفحه: ۱۴۷ تا ۱۵۳

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: طی دهه‌های اخیر گاوهای شیری برای سطح بالایی از تولید شیر انتخاب شده‌اند، در نتیجه تقاضای گاو برای مواد مغذی بسیار افزایش می‌یابد که در صورت عدم تأمین مقدار انرژی مورد نیاز، بروز کتوز در گاو شیری افزایش می‌یابد، از این‌رو در این پژوهش هدف شناسایی ژن‌های شاخص متفاوت بیان‌شده بین دو گروه سالم و مبتلا به کتوز قبل از زایمان بود که در نهایت بتوان مسیرهای متابولیکی و فعالیت‌های مولکولی درگیر در زمان بروز کتوز را شناسایی نمود.

مواد و روش‌ها: ترانسکریپتوم (توالی کل mRNA) شش نمونه از بافت خون شامل سه تکرار از هر گروه از پایگاه اطلاعاتی NCBI استخراج و ذخیره شد. مراحل پیش پردازش خوانش‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Fastq-dump، FastQC و Trimmomatic و نیز مطالعه پروفایل بیان ژن با استفاده از نرم‌افزارهای Hisat2 و Samtools انجام شد. در نهایت آنالیز بیان افتراقی ژن‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری Cufflinks و آنالیز هستی‌شناسی ژن به‌وسیله پایگاه‌های اطلاعاتی DAVID و Ensembl صورت گرفت.

یافته‌ها: در نهایت ۳۵۳۴۲ ژن بر روی ترانسکریپتوم این نمونه‌ها مشخص شد و ۱۷۹ ژن با بیان متفاوت و معنی‌دار شناسایی شدند ($p<0.00055$)،که با در نظرگرفتن log2> 4 و log2< -4، هفت ژن با بیان متفاوت بین دو گروه، مورد مطالعه قرار گرفتند. بیشترین تفاوت بیان ژنی بین دو گروه، مربوط به ژن‌های، HBA و PTGS2 با log2(fold_change) به‌ترتیب ۴،۵۳ و ۴،۴۷ است. آنالیز هستی‌شناسی ژن (GO) و مسیرهایی که در آن‌ها درگیر هستند نشان داد که جزء غشای میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی، پاسخ التهابی و استرس اکسیداتیو، فرآیند کاهش اکسیداسیون و بیوسنتز هموگلوبین، پاسخ سلولی به هیپوکسی، اتصال یون فلزی، بیوسنتز و متابولیسم اسیدهای چرب و لیپیدها و نیز مسیرهای پیام‌رسانی شیمیوکین و TNF نقش دارند.

نتیجه‌گیری: هفت ژن شاخص با بیان متفاوت و معنی‌دار، بر روی ترانسکریپتوم نمونه‌ها مشخص شدند، که ژن‌های CXCL3 و GRO1 دارای بیشترین بیان در بین دو گروه و ژن HBA دارای بیشترین بیان افتراقی، با بیان بیش از ۲۳ برابری در گروه مبتلا به کتوز قبل زایمان نسبت به گروه سالم بود. آنالیز هستی‌شناسی ژن نشان داد، که ژن HBA به‌عنوان شاخص‌ترین ژن با بیان متفاوت، با بیان بیشتر در گروه مبتلا به کتوز قبل زایمان، عاملی بر افزایش انتقال اکسیژن، بیوسنتز هموگلوبین، اتصال اکسیژن و یون آهن است.

واژه‌های کلیدی: آنالیز هستی‌شناسی ژن، بیان افتراقی ژن، ترانسکریپتوم، کتوز، RNA-seq

مقدمه

طی دهه‌های اخیر گاوهای شیری برای سطح بالایی از تولید شیر انتخاب شده‌اند، در نتیجه تقاضای گاو برای مواد مغذی بسیار افزایش می‌یابد که در صورت عدم تأمین مقدار انرژی مورد نیاز، بروز بیماری‌های متابولیکی و تولیدی همچون کتوز در گاو شیری افزایش می‌یابد. کاهش سلامت گاوهای شیری یکی از دغدغه‌های مهم تولیدکنندگان است، زیرا بیماری‌های متابولیکی و تولیدی ضررهای اقتصادی مختلفی همچون افت شیر، افزایش هزینه درمان، افزایش هزینه جایگزینی، به تعویق افتادن رشد حیوان و... را بر گله‌های گاو شیری تحمیل می‌کنند. در یک مطالعه در هلند، ضررهای اقتصادی هر مورد کتوز تحت بالینی در سال در گاوهای شکم اول تا پنجم، در مجموع ۱۳۰ یورو برآورد گردید که ۲۵ درصد آن مربوط به افت تولید شیر است (۲۰). در تازه‌ترین مطالعه در ایران، برآورد گردیده‌است که بیماری متابولیکی کتوز موجب افت ۲۵۳ کیلوگرمی در تولید شیر می‌شود که معادل با ضرر اقتصادی ۵،۳۸ دلار آمریکا می‌باشد و نیز طبق نتایج، کتوز پس از جابه‌جایی شیردان، دومین بیماری متابولیکی و تولیدی آسیب‌رسان به تولید شیر و اقتصاد گله گاو شیری تعیین شد (۲۱).

اپی‌ژنوم شامل مکانیسم‌های مختلفی است، به‌عنوان مثال متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاح دم هیستون، microRNAهای کروماتین و RNAهای بلند غیرکدکننده با فاکتورهای محیطی-ذهنی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا، آب و هوا برهمکنش می‌کنند تا بر پروفایل بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص تأثیر بگذارند (۳،۱۲). تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل محیطی ممکن است رخ دهد؛ علاوه بر این، شواهد متعددی حاکی از تأثیر تنوع اپی‌ژنوم بر سلامت و تولید است (۳،۱۳،۱۸). بیان ژن‌های یوکاریوتی به‌طور موقت و چند بُعدی کنترل می‌شود (۱۶). تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله رشد بستگی دارد (۲۳). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها مختص هر بافت است (۱۴)، همچنین میزان فرآورده‌های ژنی که در همان بافت و همچنین سایر بافت‌های سازنده آن محصول ساخته می‌شود، بیان آن را تنظیم می‌کند (۱۵). یکی از فعالیت‌های اساسی در حیوانات اهلی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و بررسی آن‌ها در سطح سلولی با کرموزومی است (۱۷).

بیان ژن مکانیسمی حساب‌شده، پیچیده و تنظیم‌گر است که باعث می‌شود ژنوتیپ به‌صورت فنوتیپ ظاهر شود؛ در واقع کدهای ژنتیکی که در مولکول DNA ذخیره شده‌اند به‌وسیله بیان ژن‌ها تفسیر می‌شوند و خصوصیات و نحوه بیان ژن باعث به‌وجود آمدن فنوتیپ در ارگانیسم خواهد شد (۲،۴). مطالعات بیان ژن به تولید حجم زیادی از داده‌ها در این زمینه

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]

منجر شده‌است. در میان انواع متعدد داده‌های بیان ژن، داده‌های RNA-seq به سبب پُربروندادبودن و شامل شدن توالی نواحی رونویسی‌شده و پوشش دادن همه این نواحی دارای مزیت زیادی نسبت به سایر انواع داده‌ها هستند؛ در سال‌های اخیر امکانات رایانه‌ای، آنالیز این حجم از داده‌ها را در زمان و با هزینه کم امکان‌پذیر ساخته‌است. از مزایای استفاده از داده‌های RNA-seq شناسایی ژن‌های جدید می‌باشد (۷،۲۲). اساس این روش براساس برش کل ترانسکریپتوم (mRNA) به قطعات کوچک و سپس توالی‌یابی همه این قطعات می‌باشد (۸،۱۱). از این‌رو از روی تعداد خوانش‌های مکان‌یابی شده برای یک ناحیه خاص می‌توان به یک معیار دقیق از میزان رونویسی آن ناحیه رسید (۶،۲۵). شاخص بیان ژن یا به عبارت دیگر معیار بیان ژن در این روش، محاسبه تعداد خوانش یا قطعه در حد کیلو باز به‌ازای هر یک میلیون خوانش مکان‌یابی شده (FPKM) می‌باشد (۱۹). که این شاخص برای طول ژن و تعداد کل خوانش‌های مکان‌یابی شده در هر نمونه تصحیح شده و مقادیر برآوردشده برای ژن‌های مختلف با هر طول و تعداد خوانش قابل مقایسه و آزمون می‌باشد. یکی از روش‌های بهبود مقاومت به کتوز، از طریق انتخاب ژنتیکی است که شرط لازم برای اعمال چنین انتخابی، درک کامل ما از ساختار ژنتیکی این بیماری متابولیکی است. از این‌رو در این پژوهش هدف شناسایی ژن‌های شاخص متفاوت بیان‌شده بین دو گروه سالم و مبتلا به کتوز قبل از زایمان است که در نهایت با آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص، بتوان مسیرهای متابولیکی و فعالیت‌های مولکولی درگیر در زمان بروز کتوز را شناسایی نمود.

مواد و روش‌ها

داده‌های RNA-seq حاصل از ۲۴ نمونه خون کامل گاوهای ماده بالغ نژاد هلشتاین چین توسط دانشگاه کشاورزی چین با روش سانگر با استفاده از تکنیک Illumina Hiseq 2500 تهیه و توالی‌یابی شده و از تاریخ ۱۰ فوریه سال ۲۰۲۰ در پایگاه اطلاعاتی NCBI با فرمت SRA به‌صورت رایگان از طریق لینک زیر در دسترس است:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR11050974

از داده‌های خام موجود در پایگاه اطلاعاتی، شش داده خام RNA-seq شامل سه تکرار از هر گروه مبتلا به کتوز قبل زایمان و سالم قبل زایمان استخراج و ذخیره شدند، که خوانش‌های حاصل از توالی به‌صورت جفتی یا دوسویه با طول ۱۵۰ جفت باز بودند.

پس از اخذ داده‌ها، تمامی مراحل آماده‌سازی و تجزیه تحلیل آن‌ها در محیط گرافیکی (GNU) سیستم عامل Linux Ubuntu (v21.04) نسخه ۶۴ بیت بر روی کامپیوتر شخصی غیرمتصل به سرور به‌ترتیب مراحل زیر انجام شد:

تبدیل فرمت داده‌ها از sra به fastq با استفاده از نرم‌افزار sratoolkit (v2.10.2) انجام شد؛ سپس جهت سنجش کیفیت داده‌ها، از نرم‌افزار(v0.11.9) fastQC در محیط جاوا با کمک منوی اصلی، به‌طور جداگانه با ۱۰ آزمون مختلف انجام شد (۱) که آزمون‌های انجام‌شده عبارتند از: گزارش حاوی آماره‌های پایه، کیفیت توالی به‌ازای هر باز، امتیاز کیفیت به‌ازای توالی، محتوای نوکلئوتیدی توالی به‌ازای هر باز، محتوای GC به‌ازای توالی، محتوای باز خواننده نشده (N) به‌ازای هر باز، توزیع طول توالی‌ها، تکراری بودن توالی، توالی‌هایی که بیش از حد وجود دارند و محتوای آداپتوری. در نهایت براساس گزارش کیفیت توالی به‌ازای هر باز و محتوای آداپتوری، تصمیم‌گیری جهت ویرایش خوانش‌ها صورت گرفت. در صورتی که داده‌های جفتی نیاز به ویرایش داشته باشند، نرم‌افزار Trimmomatic (v0.39) برای داده‌های توالی‌یابی نسل جدید شرکت ایلومینا بهینه‌سازی شده است (۵). در این پژوهش با در نظر گرفتن حداقل طول خوانش‌ها ۵۰ جفت باز و نیز استفاده از فایل توالی آداپتوری از نوع Illumina Universal Adaptor ویرایش خوانش‌ها صورت گرفت. در انتهای این مرحله به‌منظور اطمینان از ویرایش درست و کامل، داده‌ها مورد کیفیت سنجی مجدد با نرم‌افزار fastQC قرار گرفتند. در ادامه به‌منظور هم‌ردیفی و مکان‌یابی خوانش‌ها علاوه بر خوانش‌های ویرایش شده، نیاز به داده‌های ژنوم مرجع و اطلاعات حاشیه‌نویسی است که آخرین نسخه به روز شده ژنوم مرجع گاو به‌همراه فایل حاشیه‌نویسی مربوطه، از بانک اطلاعاتی Ensemble به آدرس‌های زیر دریافت شد:

http://ftp.ensembl.org/pub/release-104/fasta/bos_taurus/dna/
http://ftp.ensembl.org/pub/release-104/gtf/bos_taurus/

توالی ژنوم مرجع گاو (ARS-UCD1.2)، توسط مرکز USDA ARS در آوریل ۲۰۱۸ ارائه شده است که اسمبلی و تجزیه تحلیل در سطح کروموزوم شامل ۲۵۹۷ قطعه توالی DNA است که در ۲۲۱۱ داربست جمع شده‌اند و از این توالی‌ها، ۳۰ کروموزوم ایجاد شده است. ژنوم مرجع گاو از ۲۷۱۵۸۵۳۷۹۲ جفت باز تشکیل شده است که دارای ۲۱۸۸۰ ژن کدکننده، ۵۲۳۵ ژن غیرکدکننده شامل ۳۳۷۵ ژن کوچک غیرکدکنند، ۱۴۸۸ ژن بزرگ غیرکدکننده و ۳۷۲ ژن متفرقه غیرکدکننده، ۴۳۲ ژن کاذب و ۴۳۹۸۴ رونوشت ژن می‌باشد (۹). در استراتژی مکان‌یابی و هم‌ردیفی خوانش‌ها، ابتدا لازم است ژنوم مرجع نمایه یا ایندکس شود، که به این منظور از نرم‌افزار Hisat2 (v2.2.1) استفاده شد. پس از ایندکس کردن ژنوم مرجع، هشت فایل تولید شد که به‌منظور افزایش میزان دقت و صحت نقشه‌یابی، علاوه بر این هشت فایل، از ژنوم مرجع و فایل حاشیه‌نویسی آن نیز برای هم‌ردیفی و نقشه‌یابی استفاده شد. هم‌ردیفی خوانش‌های کوتاه بر روی ژنوم مرجع نیز با استفاده از نرم‌افزار Hisat2 انجام شد (۱۰). برای انجام ادامه آنالیز لازم است که خروجی SAM مربوط به خوانش‌ها، به فرمت BAM تبدیل شده و نیز فایل‌های BAM تولید شده براساس کروموزوم‌ها مرتب و سپس ایندکس از آن‌ها تهیه شود که هر سه مرحله با استفاده از پکیج نرم‌افزاری samtools انجام شد. در قسمت آخر کار، به‌منظور هم‌ردیفی خوانش‌ها و سرهم کردن ترنسکریپتوم‌های موجود، از بسته نرم‌افزار Cufflinks (v2.2.1) استفاده شد و بعد از اتمام هم‌ردیفی و اسمبلی هر کدام از نمونه‌ها، ترانسکریپتوم‌های تشکیل شده از هر نمونه با استفاده از

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]

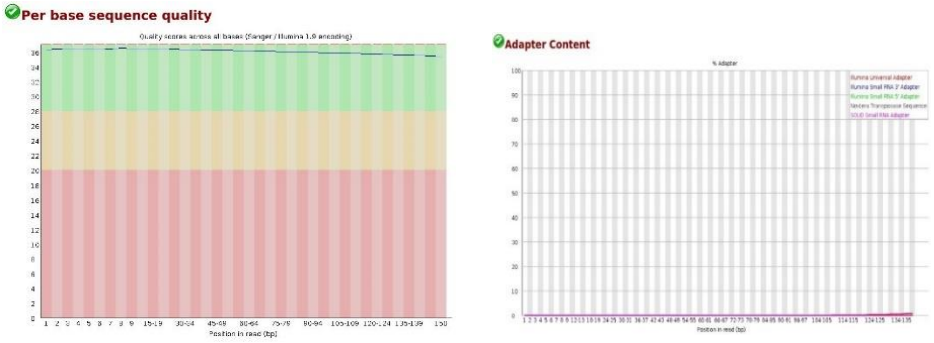
نرم‌افزار cuffmerge با یکدیگر ادغام و یک فایل ترانسکریپتوم جدید مرجع ادغام‌شده حاصل شد. در نهایت، برای تست آماری میزان بیان ژن بین دو نمونه، از نرم‌افزار cuffdiff استفاده شد؛ این نرم‌افزار ژن‌هایی که از نظر آماری هر گونه تفاوت معنی‌داری در بیان را نشان می‌دهند، شناسایی می‌کند. به‌منظور مصورسازی نتایج در قالب پلات و گراف‌های قابل فهم‌تر، از پکیج CummeRbund در محیط نرم‌افزار R استفاده شد و نیز آنالیز هستی‌شناسی و شناسایی مسیرهای درگیر در ژن‌های معنی‌دار با بیان متفاوت، به‌وسیله پایگاه‌های مربوط به هستی‌شناسی DAVID (https://david.ncifcrf.gov/)، Ensemble (https://www.ensembl.org/Cattle/) انجام شد.

نتایج و بحث

پس از تبدیل فرمت داده‌ها و انجام سنجش کنترل کیفیت، طبق گزارش حاوی آماره‌های پایه، توالی‌های بین ۲۸ تا ۳۳ میلیون خوانش کوتاه جفتی (از هر دو انتهای توالی‌یابی شده) با طول ۱۵۰ جفت باز برای نمونه‌ها به‌دست آمد. در آزمون کنترل کیفیت تک نوکلئوتیدی، محور افقی نمودار بیانگر موقعیت هر جفت باز بر روی خوانش و محور عمودی بیانگر نمره فِرِد (phred score) است که نمونه با نمره بالاتر از ۲۸ (منطقه سبز) به‌عنوان نمونه با کیفیت بالا تلقی می‌شود که طبق گراف مربوط به نمونه موردنظر، کیفیت نمونه بسیار عالی می‌باشد و نیز در آزمون محتوای آداپتوری، محور افقی نمودار بیانگر موقعیت هر جفت باز بر روی خوانش و محور عمودی بیانگر درصد محتوای آداپتوری در طول خوانش است که طبق راهنمای رنگ خطوط بر روی نمودار، در انتهای خوانش مقدار بسیار اندک (کمتر از ۵ درصد) آلودگی آداپتوری از نوع Illimina Universal Adaptor وجود دارد (شکل ۱). با در نظر گرفتن حداقل طول خوانش ۵۰ جفت باز، استفاده از توالی آداپتوری مربوطه در هنگام ویرایش، با سنجش کنترل کیفیت پس از ویرایش مشخص گردید که ۲۷ تا ۳۲ میلیون خوانش با کیفیت مناسب برای نمونه باقی‌ماند و کمتر از ۱۰ درصد از کل خوانش‌ها کنار گذاشته شد و نیز آلودگی آداپتوری پاکسازی شد و تنها خط افقی بنفش رنگ قابل رویت شد.

طبق اطلاعات خروجی در انتهای آنالیز هم‌ردیفی و مکان یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع، میانگین درصد مکان‌یابی خوانش‌ها بیش از ۹۰ درصد و خوانش‌های با محل هم‌ردیفی چندگانه کمتر از یک درصد بودند و با تشکیل پروفایل بیان ژن برای هر یک از گروه‌ها و نیز آنالیز بیان افتراقی بین دو گروه سالم و مبتلا به کتوز قبل از زایمان، در نهایت با تجزیه تحلیل نتایج خروجی حاصل در مقایسه بین دو گروه، ۳۵۳۴۲ ژن شناسایی شد که از این میان ۱۷۹ ژن با بیان متفاوت مشخص شد ($p<0.00055$). در ادامه به‌علت زیاد بودن تعداد ژن‌های با بیان متفاوت، برای رسیدن به ژن‌های شاخص‌تر، از معیار log2(fold_change) با مقادیر بیشتر از ۲+ و کمتر از ۲- استفاده شد که ۴۶ ژن با بیان متفاوت مشاهده شد؛ اما به‌منظور رسیدن به تصویر مناسبی از تغییرات بیان در مقایسه بین دو گروه، تنها ژن‌های با log2(fold_change) بیشتر از ۴+ و کمتر از ۴- برای مطالعه انتخاب شدند، که هفت ژن را شامل شد.

جدول ۱ فهرست این ژن‌ها به‌همراه شناسه ژن، نام اختصاری، موقعیت کروموزومی و نوکلئوتیدی و نیز ارزش p مربوطه را نشان‌می‌دهد.



شکل ۱- آزمون کنترل کیفیت تک‌نوکلئوتیدی (چپ) و آزمون محتوای اداپتوری (راست) مربوط به نمونه "SRR11050964".
Figure 1. Per base sequence quality (Lert) and Adapter content (Right) related to "SRR11050964" sample.

جدول ۱- شناسه، نام اختصاری، جایگاه و ارزش p ژن‌های شاخص متفاوت بیان‌شده بین دو گروه
Table 1. Identifier, abbreviated name, position and p-value of indicator genes differentially expressed between two groups

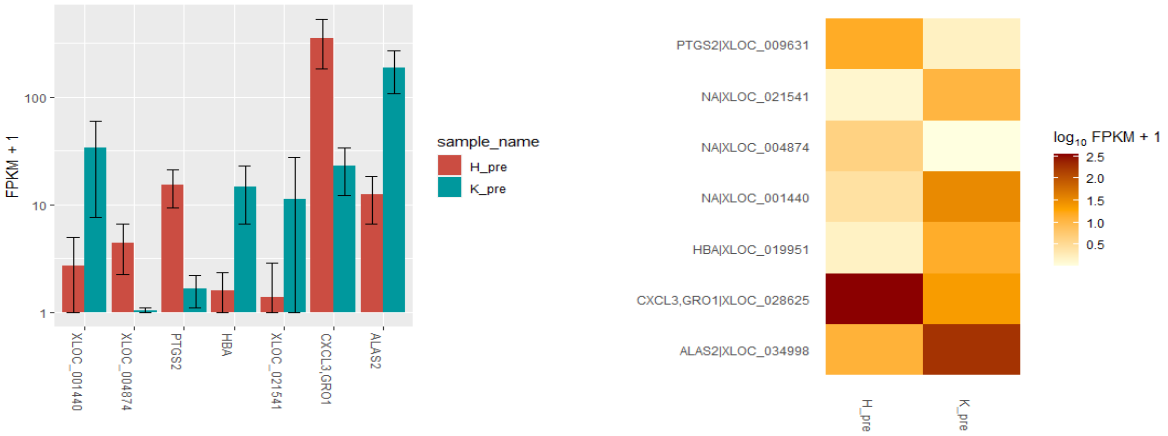
Gene_id	Gene name	Locus	p_value
XLOC_004874	-	12:72407994-72452356	0.00005
XLOC_009631	PTGS2	16:67728005-67735629	0.00005
XLOC_028625	CXCL3,GRO1	6:89061092-89075133	0.00005
XLOC_034998	ALAS2	X:92485199-92512358	0.00005
XLOC_001440	-	1:141506155-141506618	0.00005
XLOC_019951	HBA	25:216447-217264	0.00055
XLOC_021541	-	27:540774-1092322	0.00005

از میان این هفت ژن، تنها ژن XLOC_028625 دو ایزوفرم داشت که ژن CXCL3 بر روی کروموزوم ۶ از موقعیت نوکلئوتید ۸۹۰۶۱۳۳۰ تا ۸۹۰۶۳۳۵۵ با چهار اگزون و ژن GRO1 بر روی کروموزوم ۶ از موقعیت نوکلئوتید ۸۹۰۷۲۹۸۹ تا ۸۹۰۷۵۱۲۸ با چهار اگزون وجود دارد. به‌عبارت دیگر ژن ۱۰۶GRO1 نوکلئوتید نسبت به ایزومر خود طول بیشتری دارد. نمودار هیستوگرام و حرارتی ژن‌های شاخص مورد مطالعه ترسیم گردید (شکل۲). در نمودار هستوگرام،

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]

محور افقی شامل ژن‌های شاخص مورد مطالعه (log2>+4 & log2<-4) و محور عمودی بیانگر شاخص قطعات کیلوباز ترانسکریپت در هر میلیون خوانش مکان‌یابی شده (FPKM)، بیانگر میانگین میزان بیان هر ژن با مقایس واحد در هر یک از گروه‌ها است که به کمک این نمودار می‌توان هر ژن را هم‌زمان از نظر میزان بیان در هر یک از گروه‌ها مقایسه کرد. در نمودار حرارتی تفاوت بیان ژن‌های شاخص مورد مطالعه (log2>+4 & log2<-4) به‌صورت همزمان در هر دو گروه با تفاوت شدت رنگ نشان داده می‌شود. طبق پروفایل رنگ مندرج در سمت راست نمودار، هر چه شدت رنگ بیشتر باشد، میزان مقیاس لگاریتم FPKM بیشتر بوده و بیان آن ژن در آن گروه بیشتر خواهد بود و از طرفی معمولا ژن‌هایی که در نمونه‌ها تغییر رنگ زیادی را نشان می‌دهند، در دسته ژن‌های مهم در تفاوت بیان قرار می‌گیرند. با توجه به اطلاعات مورد نمایش در نمودار هیستوگرام می‌توان پی‌برد که بیشترین بیان در گروه سالم قبل از زایمان (ستون قرمز) مربوط به ژن‌های CXCL و GRO1 است و همچنین بیشترین بیان در گروه کتوز قبل از زایمان (ستون آبی) مربوط به ژن ALAS2 است. طبق طیف رنگی ترسیم شده در نمودار حرارتی، نتایج خروجی با نمودار هیستوگرام تطبیق داشته و نیز طبق تفاوت شدت رنگ مربوط به ژن HBA بین دو گروه، می‌توان نتیجه گرفت که این ژن بالاترین تفاوت بیان را بین دو گروه داشته و نیز در گروه کتوز قبل زایمان بیشتر بیان شده است. از میان هفت ژن، سه ژن XLOC_004874، XLOC_001440 و XLOC_021541 هنوز در گونه بز نام‌گذاری نشده‌اند، در نتیجه اطلاعاتی از آن‌ها در دسترس نیست.

آنالیز هستی‌شناسی برای چهار ژن دیگر بر اساس سه دسته‌بندی عمومی فرآیندهای زیستی، عملکرد مولکولی و اجزای سلولی انجام شد (جدول ۲).



شکل ۲- نمودار هیستوگرام (چپ) و نمودار حرارتی (راست) مقایسه تفاوت بیان ژن‌های شاخص بین دو گروه (سالم قبل از زایمان: H_pre، کتوز قبل از زایمان: K_pre)

Figure 2. Histogram plot (Left) and Heatmap plot (Right) of differential indicator genes expression between two groups (H_pre: Healthy pre-calving, K_pre: Ketosis pre-calving)

جدول ۲- آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص متفاوت بیان‌شده بین دو گروه

Table 2. GO analysis of indicator genes differentially expressed between two groups

	PTGS2	CXCL3,GRO1	ALAS2	HBA
فرایند های زیستی	پاسخ التهابی پاسخ به استرس اکسیداتیو فرآیند کاهش اکسیداسیون	پاسخ التهابی پاسخ به لیپوپلی ساکارید تنظیم کموتاکسی نوتروفیل	فرآیند بیوسنتزی هموگلوبین پاسخ به هیپوکسی	انتقال اکسیژن
اجزای زیستی	غشاء های هسته شبکه آندوپلاسمی	فضای خارج سلولی	غشاء داخلی میتوکندری ماتریس میتوکندری	مجموعه هموگلوبین
عملکرد مولکولی	فعالیت پراکسیداز اتصال یون فلزی فعالیت دیوکسیژناز	فعالیت کموکاین فعالیت سیتوکین	فعالیت کاتالیزوری فعالیت ترانسفراز	فعالیت حامل اکسیژن اتصال اکسیژن اتصال یون آهن

با توجه به آنالیز هستی‌شناسی و نیز اطلاعات حاصل از نمودارهای هیستوگرام، شاخص‌ترین ژن از نظر میزان بیان در بین هر دو گروه، ژن‌های CXCL3 و GRO1 هستند که با بیان کمتر خود در گروه مبتلا به کتوز، می‌توان استنباط کرد که افزایش بیان این دو ژن، عاملی مهاری بر پاسخ التهابی و فعالیت عوامل مقابله‌کننده با التهاب و تقویت سیستم ایمنی همچون کموکاین و سیتوکین است؛ پس کاهش بیان این دو ژن در گروه مبتلا به کتوز باعث افزایش پاسخ به التهاب و تقویت سیستم ایمنی می‌شود. بیشترین تفاوت بیان بین دو گروه، مربوط به ژن HBA بوده که با بیان بیشتر خود در گروه مبتلا به کتوز قبل زایمان، عاملی بر افزایش انتقال و اتصال اکسیژن و اتصال یون آهن می‌شود، که همگی در زمان کتوز به وجودشان نیاز بیشتری است. ژن PTGS2 با بیان کمتر خود در گروه مبتلا قبل از زایمان، بیانگر این است که کاهش

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]

کمتر این ژن، عاملی بر افزایش پاسخ به التهاب، پاسخ به استرس اکسیداتیو، فعالیت پراکسیداز و دیوکسیژناز است، که در مجموع با بیان کمتر خود باعث کنترل عارضه خواهد شد. ژن ALAS2 با بیان بیشتر در گروه مبتلا به کتوز قبل از زایمان، عاملی بر افزایش فرآیند بیوسنتز هموگلوبین و پاسخ به هیپوکسی و فعالیت کاتالیزوری است، که همگی کمکی هر چه بیشتر به سرکوب عارضه کتوز دارند.

آنالیز مسیر (Pathway analysis) نیز نشان داد، ژن‌های متفاوت بیان‌شده مورد مطالعه، بیشتر در مسیرهای مرتبط با بیوسنتز اسیدچرب و لیپید، متابولیسم اسیدچرب و لیپید، مسیر پیام‌رسانی شیمیوکین و TNF و نیز متابولیسم اسیدهای آمینه درگیر هستند. به‌عبارت دیگر، این ژن‌ها در مسیرهای منجر به ایجاد و متابولیسم مواد مغذی جایگزین، در زمان محدودیت مواد مغذی ضروری بدن، درگیر هستند.

در پژوهشی وو و همکاران (۲۶) آنالیز بیان افتراقی با استفاده از داده‌های RNA-seq حاصل از ۳۸ نمونه خون گاو هلشتاین شامل نه گاو کتوز قبل زایمان، نه گاو کتوز بعد زایمان، ۱۰ گاو کنترل قبل زایمان و ۱۰ گاو کتوز بعد زایمان انجام داده‌اند، که در مقایسه بین گاوهای کتوز قبل از زایمان با گروه کنترل قبل زایمان، چهار ژن STX1A، ENSBTAG00000053952، ENSBTAG000000516 و SPEG متفاوت بیان‌شده بودند و تجزیه‌تحلیل عملکردی عمدتاً در پاسخ به استرس بیولوژیکی، هموستاز یون، متابولیسم آمینواسید، پیام‌رسانی انرژی و مسیرهای مرتبط با بیماری نقش داشتند. در پژوهش حاضر ژن‌های متفاوتی نسبت به آن پژوهش شاخص شناسایی شده‌اند اما نتایج آنالیز هستی‌شناسی در راستای یکدیگر است.

در پژوهشی دیگر یان و همکاران (۲۴) در مجموع ۲۴ نمونه خون از ۱۲ گاو هلشتاین شامل چهار گاو سالم و هشت گاو کتوزیس قبل و بعد از زایمان را جمع‌آوری کرده و سپس داده‌های RNA-seq و هفت شاخص بیوشیمیایی خون را به‌ترتیب از لکوسیت‌ها و پلاسما در هریک از نمونه‌ها تولید کرده‌اند؛ در نهایت با درنظرگرفتن FDR<0.05، پنج ژن شاخص مرتبط با کتوز شامل MAFA، MAF1، GRINA، C14H8ORF82 و RECQ14 شناسایی کردند؛ در پژوهش حاضر با درنظرگرفتن معیار log2>4 و log2<-4 و همچنین p<0.00055، هفت ژن شاخص متفاوت مرتبط با کتوز قبل از زایمان شناسایی شد و آنالیز هستی‌شناسی ژن‌های شاخص نیز انجام شد.

در نتیجه‌کلی، هفت ژن شاخص با بیان متفاوت و معنی‌دار، بر روی ترانسکریپتوم نمونه‌ها مشخص شدند؛ که ژن‌های CXCL3 و GRO1 دارای بیشترین بیان در بین دو گروه و ژن HBA دارای بیشترین بیان افتراقی، با بیان بیش از ۲۳ برابری در گروه مبتلا به کتوز قبل زایمان نسبت به گروه سالم بود. آنالیز هستی‌شناسی ژن نشان داد، که ژن HBA به عنوان شاخص‌ترین ژن با بیان متفاوت، با بیان بیشتر در گروه مبتلا به کتوز قبل زایمان، عاملی بر افزایش انتقال اکسیژن، بیوسنتز هموگلوبین، اتصال اکسیژن و یون آهن است.

در انتها پیشنهاد می‌شود، آنالیز شناسایی واریانت بر روی توالی ترانسکریپتوم مورد استفاده و نیز ژن‌های شاخص شناسایی شده در این پژوهش، انجام شود؛ تا در نهایت بتوان ساختار ژنتیکی کامل‌تری را برای این بیماری متابولیکی شایع تعیین نمود.

منابع

1. Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. From:http://www.bioinformatics. babraham.ac.uk/projects/fastqc.
2. Banabazi, M.H., M. Naserkheil and S.R. Miraei-Ashtiani. 2012. Network regulatory geneexpreesion of cerevisiae cell cycle with correlation weight method. The Third National Conference on Agricultural Biotechnology Iran. Ferdowsi University of Mashhad (In Persian).
3. Barazandeh, A., M.R. Mohammadabadi, M. Ghaderi-Zefrehei, F. Rafeied and I.G. Imumorin. 2019. Whole genome comparative analysis of CpG islands in cameild and other mammalian genomes. Mammalian Biology, 98: 73-79.
4. Banabazi, M.H., M. Naserkheil and S.R. Miraei-Ashtiani. 2012. Algorithm to identify genes expressed differently in the yeast Saccharomyces cerevisiae microarray data using software packages R. The Third National Conference on Agricultural Biotechnology Iran. Ferdowsi University of Mashhad (In Persian).
5. Bolger, A.M., M. Lohse and B. Usadel. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illuminasequence data. Bioinformatics, 30(15): 2114-2120.
6. Ekblom, R. and J. Galindo. 2010. Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. Heredity, 107(1): 1-15.
7. Gan, Q., I. Chepelev, G. Wei, L. Tarayrah, K. Cui, K. Zhao and X. Chen. 2010. Dynamic regulation of alternative splicing and chromatin structure in drosophila gonads revealed by RNA-seq. Cell Research, 20(7): 763-783.
8. Haas, B.J. and M.C. Zody. 2010. Advancing RNA-seq analysis. Nature Biotechnology, 28(5), 421. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002263795.1/?utm_source=gquery&utm_medium=referral&utm_campaign=KnownItemSensor:taxname
9. Kim, D., B. Langmead and S.L. Salzbberg. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nature Methods, 12(4): 357-360
10. Marguerat, S. and J. Bähler. 2010. RNA-seq: from technology to biology. Cellular and Molecular Life Sciences, 67(4): 569-579.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]

11. Masoudzadeh, S.H., M.R. Mohammadabadi, A. Khezri, O.A. Kochuj-Yashchenko, D.M. Kucher, O. I. Babenko, M.V. Bushtruk, S.V. Tkachenko, R.V. Stavetska, N.I. Klopenko, V.P. Oleshko, M.V. Tkachenko and I.V. Titarenko. 2020a. DIL1 gene expression in different tissues of lamb. Iranian Journal of Applied Animal Science, 10: 669-677.
12. Masoudzadeh, S.H., M. mohammadabadi, A. Khezri, R.V. Stavetska, V.P. Oleshko, O.I. Babenko, Z. Yemets and O.M. Kalashnik. 2020b. Effects of diets with different levels of fennel (Foeniculum vulgare) seed powder on DLJ1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Keramni lambs. Small Ruminant Research, 193.
13. Mohammadabadi, M.R. 2019a. DLK1 gene expression in Raini Cashmere goat using Real-Time PCR. Agricultural Biotechnology Journal, 11: 191-205.
14. Mohammadabadi, M.R. 2019b. Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real-Time PCR. Agricultural Biotechnology Journal, 11: 219-235.
15. Mohammadabadi, M.R. 2021. Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agricultural Biotechnology Journal, 12: 169-184 (In Persian).
16. Mohamadabadi, M.R. and H. Asadollahpour-Nanaei. 2021. Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real-Time PCR. Agricultural Biotechnology Journal, 13: 197-214.
17. Moradian, H., A.K. Esmailizadeh, M. Asadi and M.R. Mohammadabadi. 2019. Whole genome detection of recent selection signatures in Sarabi cattle: a unique Iranian taurine breed. Genes & Genomics, 9(11): 1-13.
18. Mortazavi, A., B. Williams, K. McCue, L. Schaeffer and B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. Nature Methods, 5(7): 621-628.
19. Mostert, P.F., E.A.M. Bokkers, C.E. Van Middelaar, H. Hogeveen and I.J.M. de Boer. 2017. Estimating the economic impact of subclinical ketosis in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. Animal January, 2018: 145-154.
20. Nikkhah, A., A. RezaGholivand and M.H. Khabbazan. 2021. Milk yield depression and its economic loss due to production diseases: Iran's large dairy herds. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University.
21. Sultan, M., M.H. Schulz, H. Richard, A. Magen, A. Klingenhoff, M. Scherf and D. Schmidt. 2008. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. Science, 321(5891): 956-960.
22. Tohidi-nezhad, F., M.R. Mohammadabadi, A.K. Esmailizadeh and A. Najmi-Noori. 2015. Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmere goat. Agricultural Biotechnology Journal, 6: 35-50.
23. Yan, Z., H. Huang, E. Freebern, D.J.A. Santos, D. Dai, J. Si, C. Ma, J. Cao, G. Guo, G.E. Liu, L. Ma, L. Fang and Y. Zhang. 2020. Integrating RNA-seq with GWAS reveals novel insights into the molecular mechanism underpinning ketosis in cattle. BMC Genomics, 21: 489-501.
24. Wilhelm, B.T. and J.R. Landry. 2009. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-Sequencing. Methods, 48: 249-257.
25. Wu, Z., S. Chen, C. Qin, X. Jia, F. Deng, J. Wang and S. Lai. 2020. Clinical ketosis-associated alteration of gene expression in Holstein cows. Genes 2020, 11(2): 219.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]

Differential Genes Expression of Blood Tissue Related to Pre-Calving ketosis in Holstein Cow Using Transcriptomics Data

Milad Gholami Tahoone[1] and Hossein Moradi SharBabak[2]

1- M.Sc. Student, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran,
(Corresponding author: gholami.milad@ut.ac.ir)
2- Assistant Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
Received: 27 October, 2021 Accepted: 8 December, 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: In recent decades, dairy cows have been selected for high levels of milk production; As a result, the cow's demand for nutrients increases so much that if the required amount of energy is not provided, the incidence of ketosis in dairy cows will increase; Therefore, in this study, the aim is to identify different index genes expressed between healthy and pre-calving ketosis groups that ultimately identify the metabolic pathways and molecular activities involved during ketosis.

Material and Methods: Transcript (total mRNA sequence) of six blood tissue samples containing three replicates from each group was prepared. The preprocessing steps of the readings were performed using Fastq-dump, FastQC and Trimmomatic software and also the study of gene expression profile was performed using Hisat2 and Samtools software. Finally, the differential expression analysis of genes was performed using Cufflinks software package and gene ontology analysis was performed using DAVID and Ensembl databases.

Results: Finally, 35342 genes and 107722 isoforms were identified on the transcript of these samples and finally 179 genes with different and significant expression were identified ($p<0.00055$) which, considering log2> 4 and log2 <-4, Seven genes with different expression between the two groups were studied. The largest differences in gene expression between the two groups were related to the genes, HBA and PTGS2 with log2 (fold_change), 4.53 and 4.47, respectively. Gene ontology (GO) analysis and the pathways involved in it showed that the mitochondrial membrane and endoplasmic reticulum component, inflammatory response and oxidative stress, hemoglobin redox process and biosynthesis, cellular response to hypoxia, metal ion binding, biosynthesis and metabolism Fatty acids and lipids are also involved in the chemokine and TNF signaling pathways.

Conclusion: Seven index genes with different and significant expression were identified on the transcript of the samples; The CXCL3 and GRO1 genes had the highest expression between the two groups and the HBA gene had the highest differential expression, with more than 23-fold expression in the pre-calving ketosis group compared to the healthy group. Gene ontology analysis showed that HBA gene as the most significant gene with different expression, with more expression in the group with pre-calving ketosis, is a factor in increasing oxygen transfer, hemoglobin biosynthesis, oxygen binding and iron ions**.**

Keywords: Differential gene expression, Gene ontology analysis, Ketosis, RNA-seq, Transcriptum

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2026-10-17]
[DOR: 20.1001.1.22518622.1401.13.36.15.3]
[DOI: 10.52547/rap.13.36.147]