دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشهای تولیدات دامی

شناسایی تنوع ژنتیکی در دو ژن کاندیدا TLR2، TNFα و ارتباط آن با بیماری ورم پستان در گاو هلشتاین

پروانه رئوفیان[۱]، جلیل شجاع غیاث[۲]، رضی الله جعفری[۳]، غلامعلی مقدم[٤] و آرش جوانمرد[٥]

۱، ۳، ۴ و ۵- دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز
۲- استاد گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، (نویسنده مسوول: J.Shodja@gmail.com)
تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۳

چکیده

ورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در پرورش گاو شیرده است که همواره هزینه‌های سنگین درمانی را به گاودار تحمیل کرده و مقادیر تولید شیر را بطور معنی‌دار کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر شناسایی چند شکلی‌های نوکلئوتیدی در ژن‌های عملکرد سیستم ایمنی و ارتباط این چندشکلی‌ها با مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی (SCS) به عنوان شاخص همبسته با بروز بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین بررسی شد. این ژن‌ها اگزون‌های ۱و ۲ ژن TLR2 و ۳و ٤ ژن TNFα بودند. بدین منظور، تعداد ۱۰۰ راس گاو شیری هلشتاین براساس ارزش‌های اصلاحی تخمین زده شده برای صفات تولید شیر، درصد چربی و رکوردهای SCS انتخاب شدند. سپس براساس مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی در دو گروه‌های مقاوم و حساس تقسیم شدند و از هر حیوان ۵ میلی‌لیتر خون جمع آوری شد. تعیین ژنوتیپ دو گروه هدف (حیوانات حساس و مقاوم به ورم پستان) با استفاده از نشانگرPCR-RFLP انجام شد. ارتباط آماری چند شکلی‌های شناسایی شده با رکوردهای تصحیح شده نمره سلول‌های بدنی (مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی) از طریق رویه GLM با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ بررسی شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی-کرامر انجام گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین چند شکلی‌های ژن‌های TLR2 و TNFα با مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی ارتباط آماری معنی‌دار وجود داشت (P<۰/۰۰۱). بطوری‌که برای ژن TNFα بیشترین فراوانی ژنوتیپی در گروه‌های مقاوم و حساس به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های AA و BB بودند. همچنین، برای ژن کاندیدای TLR2 فراوانی ژنوتیپ KK در گروه حساس بیشتر از گروه مقاوم بود. به‌عنوان یک نتیجه شاید بتوان از نتایج مشاهده شده برای طراحی برنامه‌های اصلاحی برای پیشگیری از ورم پستان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: نمره سلول‌های بدنی، فاکتور نکروز توموری، گیرنده شبه تول، ورم پستان

مقدمه

شیر گاو یکی از مهم‌ترین مایعات خوراکی طبیعی است که از دیرباز مورد توجه ویژه قرار داشته است و از آن بعنوان ماده غذایی کامل یاد می‌گردد (۱۰). بطوری که این ماده غذایی، غنی از کلسیم است و کمبود مصرف آن، سبب افزایش ابتلا به بیماری‌های مختلف از جمله پوکی استخوان می‌شود. (۱۵). از معضلات گاوهای شیرده پرتولید بروز بیماری‌های مختلف از جمله ورم پستان، کتوز و بیماری‌های تولید مثلی دیگر از جمله کیست‌های تخمدانی است (۱۴). بیماری ورم پستان نوعی التهاب غدد پستانی است که علاوه بر هزینه‌های درمان و دامپزشکی، سبب کاهش تولید و کیفیت شیر، تداوم شیردهی، حذف زود هنگام دام، افزایش هزینه‌های جایگزینی، هزینه‌های کارگری و کاهش رفاه دام می‌گردد (۱۴). ورم پستان در دو اشکال مختلف بالینی و تحت بالینی رخ می‌دهد که روی باروری اثر نامطلوب می‌گذارد. معمولا به‌ازای هر مورد ورم پستان بالینی ۲۰ تا ۵۰ مورد ورم پستان تحت بالینی دیده می‌شود (۲۹). بر اساس نتایج تحقیقات پیشین مشخص شده علاوه بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی بیرونی و درونی در وقوع ورم پستان موثرند (۲۰).

بیماری ورم پستان که به التهاب غدد پستانی دام اطلاق می‌شود، به‌عنوان مهم‌ترین عامل افزایش سلول‌های بدنی شیر محسوب می‌گردد و شمارش این سلول‌ها اولین بار در سال ۱۹۶۷، به‌عنوان شاخص بیماری ورم پستان مطرح شد (۱۳). انتخاب حیوانات برای افزایش مقاومت به ورم پستان بدلیل عدم وجود معیار جهانی و همچنین پایین بودن توارث پذیری (۰/۰۵-۰/۰۲) آن دارای محدودیت است. به همین دلیل در اغلب مطالعات از معیار سلول‌های بدنی (SCS) با توجه به بالاتر بودن توارث پذیری آن نسبت به ورم پستان بالینی (۰/۱۵-۰/۷۰) بعنوان شاخصی برای ارزیابی مقاومت به ورم پستان استفاده می‌شود. دقت انتخاب ارزیابی ژنتیکی مقاومت به ورم پستان براساس رکوردهای فنوتیپی پایین می‌باشد (۲۸). علم ژنتیک مولکولی با پرده‌برداری از مکانیسم نسخه‌برداری و ترجمه در سطح ژنوم افق‌های تحقیقاتی جدیدی را باز کرده که از جمله دیدگاه ژن‌های کاندیدا برای کنترل صفات در تحقیقات مطرح می‌باشد. در این راستا، گیرنده‌های پاسخ ایمنی بعنوان کاندیدای کلیدی برای ایجاد مقاومت حیوان در برابر ورم پستان می‌باشند. ژن‌های کاندیدای متعددی در خصوص آلل‌های مطلوب یا نامطلوب مرتبط با مقاومت و حساسیت سیستم ایمنی گاو با ابتلا به ورم پستان شناسایی شده است از جمله می‌توان TLR2، Interleukins و TNFa اشاره کرد (۲۱،۸،۱). دو ژن کاندیدای TLR_2 و TNFα از جمله فاکتورهای پاسخ ایمنی هستند که خط مقدم دفاع از پستان در مقابل پاتوژن‌ها هستند (۱،۲۱،۲۸). گیرنده شبه تول $TLR_۲$ روی کروموزوم ۱۷ قرار دارد مسئول شناسایی اولیه پاتوژن‌های مهاجم، خط مقدم دفاع علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا را تشکیل می‌دهد (۲۴). TNFα روی کروموزوم ۲۲ قرار دارد (NCBI). TNFα همراه با عوامل دیگر سیستم ایمنی تکثیر، تمایز و فعالیت سلول‌های

سیستم ایمنی را تحریک می‌کند. هدف از مطالعه حاضر شناسایی تنوع ژنتیکی ژن‌های TLR2، TNFα و ارتباط آن با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها

رکوردهای فنوتیپی

در این تحقیق از رکوردهای سلول‌های بدنی گاو هلشتاین کشت و صنعت فکا متعلق به سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۸۱استفاده گردید. فایل شجره شامل ۸۰۰۰ حیوان و فایل رکوردها شامل ۹۵۰۰۰ رکورد روز آزمون مربوط به ۳۷۰۰ گاو شیرده بود. پس از ویرایش و آنالیز داده ها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL و SAS 9.2 گاوهای شکم اول تا ششم برای بررسی مولکولی انتخاب گردیدند. تجزیه و تحلیل فایل شجره با استفاده از نرم‌افزار سرگلزایی CFC (۲۳) صورت گرفت. در این راستا تصحیحات متعددی برای حذف واریانس عوامل ثابت بر روی داده‌ها صورت گرفت از جمله، رکوردهای شیر براساس ۳۰۵ روز در نظر گرفته شد. رکوردهای SCC بیشتر از ۳۰۰۰۰۰۰ سلول بر میلی لیتر و کمتر از ۶۰۰۰ سلول بر میلی لیتر حذف شدند (۱۹،۱۸). برای انتخاب مقاوم‌ترین و حساس‌ترین حیوانات و تصحیح اثر رقت (۶) میانگین‌های هندسی و حسابی براساس ۳ رکورد اولیه روز آزمون (رکوردهای مرحله اول شیرواری) بدلیل تولید شیر بالا و حساسیت بالای حیوان به ورم پستان (۱۹،۱۲،۱۱،۶) محاسبه گردید. میانگین حسابی و هندسی این رکوردها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$LSCS^{1} = \sum_{i=1}^{n=3} (m_i SCC) / \sum_{i=1}^{n=3} m_i \qquad (۱۷)$$

در این فرمول m_i تولید شیر مربوط به ماه رکوردگیری است، سپس از این میانگین لگاریتم بر پایه ۲ گرفته شد (۱۸). توزیع فراوانی صفت SCC دارای انحراف زیادی از حالت نرمال است در این تحقیق از فرمول زیر برای تبدیل لگاریتمی صفت SCC استفاده گردید.

$$SCS = \log_2(SCC/100) + 4 \qquad (۱۸)$$

برای محاسبه میانگین هندسی از روش Samore و همکاران استفاده گردید (۲۲). ارزش‌های اصلاحی برای صفات شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی که قبلا توسط مرکز بهبود شیر برای گاوهای فکا تخمین زده شده بود نیز در بین اطلاعات موجود ردیابی شد. از بین ۳۷۰۰ گاو دارای رکورد SCS با استفاده ازمدل آماری زیر و رویه PROC GLM از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲، ۱۰۰ رأس گاو در دو گروه حساس (۵۶ رأس) و مقاوم (۴۴ رأس) براساس بیشترین و کمترین توزیع عوامل باقیمانده معادله رگرسیون انتخاب گردیدند. اثرات سال زایش، فصل زایش، شکم شیرواری، به‌عنوان اثر ثابت و همچنین سن گوساله زایی و تولید شیر روز آزمون به عنوان کوواریت تست معنی‌داری شدند. با استفاده از مدل زیر رکوردهای SCS برای اثرات ثابت (شکم زایش، فصل زایش و سال زایش) تصحیح شدند سپس از بالاترین و پایین‌ترین مقادیر باقیمانده‌ها معادله رگرسیون، در دو حد آستانه‌ای منحنی توزیع نرمال برای انتخاب دو گروه حیوانات حساس و مقاوم استفاده شد. یعنی حیوانات براساس بالاترین و پایین ترین مقادیر باقیمانده‌های دو انتهای منحنی توزیع نرمال در دو گروه حساس و مقاوم انتخاب گردیدند. مدل آماری طرح به قرار ذیل بود.

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + S_j + L_k + e_{ijk}$$

Y_{ijk}=رکوردهای فنوتیپی نمره سلول‌های بدنی (SCS)، μ = میانگین، A_i= اثر سال زایش، S_j= فصل زایش، L_k= شکم شیرواری، e_{ijk}= باقیمانده‌ها.

آستانه‌ای که براساس آن حیوانات مقاوم انتخاب شدند رکوردهای SCC روز آزمون کمتر از۱۰۰۰۰۰ سلول بر میلی‌لیتر برای تمام شکم‌های زایش بود و حیوانات هیچ‌گونه سابقه بیماری ورم پستان در طول عمر خود نداشتند. رکوردهای SCC برای حیوانات حساس بیشتر از ۳۰۰۰۰۰ سلول بر میلی لیتر بود و حیوان سابقه حداقل یک ورم پستان در طول عمر خود داشتند (۵).

انجام مطالعه مولکولی تهیه نمونه خون و استخراج DNA

خونگیری حیوانات از ورید دمی، ورید پستان گاو با استفاده از لوله‌های ونوجکت حاوی ماده ضدانعقاد EDTA انجام شد. استخراج DNA با استفاده از دستورالعمل بافر نمکی صورت گرفت (۲). تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل1000 ND) انجام شد و OD نمونه‌ها در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ اندازه‌گیری شد. در جدول ۱، توالی پرایمرها و جایگاه‌های انتخابی و سایر مشخصات پرایمرهای ژن‌های مورد مطالعه آورده شده است.

واکنش‌های زنجیره پلیمراز

واکنش تکثیر DNA برای بررسی ژن‌های TNFα و TLR2 با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل: ۱میکرولیتر DNA، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۱۰ میکرولیتر مستر میکس و ۷ میکرولیتر آب استریل عاری از RNAs –DNAs انجام شد. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول به‌دست آمده روی ژل آگارز الکتروفورز شد تا کیفیت و طول قطعات تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گیرد.

جدول ۱- توالی پرایمرها، اندازه و موقعیت جایگاه‌های انتخاب شده از ژن‌های مورد مطالعه

Table 1. Primers sequence, PCR size, and amplified region of studied genes

ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp)	موقعیت جایگاه	منبع
TNFα	F:5´AGAGTAGAACTGACAGGGTCG 3' R: 5' CTCGGCATAGTCCAGGTAG 3'	۴۴۵	انتهای اگزون ۳ و بخشی از اگزون ۴	A –Juan و همکاران (۱)
TLR2	F:5' AGGTCAAATCACTGGACAATG 3' R:5'GAGATGTTTCCCCAAGTGTTT 3'	۴۴۸	اگزون ۱و۲	Zhang و همکاران (۲۸)

1- Lactation somatic cell score

چرخه دمایی برای ژن TNFα شامل دمای واسرشت‌سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه، تکثیر نهایی دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و در نهایت دمای سرد کردن ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه تنظیم شد. چرخه گرمایی برای ژن TLR2 بجز دمای اتصال آغازگر (دمای اتصال۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه) شبیه به چرخه گرمایی ژن TNFα بود. تعیین کمیت و کیفیت محصولات حاصل از تکثیر روی ژل آگارز ۱/۵٪، ۱/۵ گرم تریس (Tris base) و ۱۰۰سی سی بافر (TAE 1X) با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد.

تکنیک شناسایی چند شکلی نوکلئوتیدی در محصولات حاصل از تکثیر

برای هضم آنزیمی محصولات تکثیر شده ژن TNFα، ۷ میکرولیتر محصولات تکثیر شده با ۱۰ واحد (۱ میکرولیتر) از آنزیم RsaI، ۵ میکرولیتر بافر 10X Universal Buffer (UB) و ۳۷ میکرولیتر آب عاری از DNAse و RNAse مخلوط شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۴ ساعت انکوبه و هضم گردیدند. محصولات حاصل از هضم در ژل آگارز۱٪ رنگ آمیز شده با DNA safe شناسایی شدند. برای هضم آنزیمی ژن TLR2، ۵ میکرولیتر محصولات افزوده سازی با ۲ میکرولیتر بافر R، ۱۲ میکرولیتر آب عاری از DNAse و RNAse و ۱ میکرولیتر آنزیم EcoRV مخلوط شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ ساعت انکوبه و هضم گردیدند. محصولات هضم روی ژل ۲٪ جدا شده و با نور UV مشاهده گردیدند.

آنالیز آماری

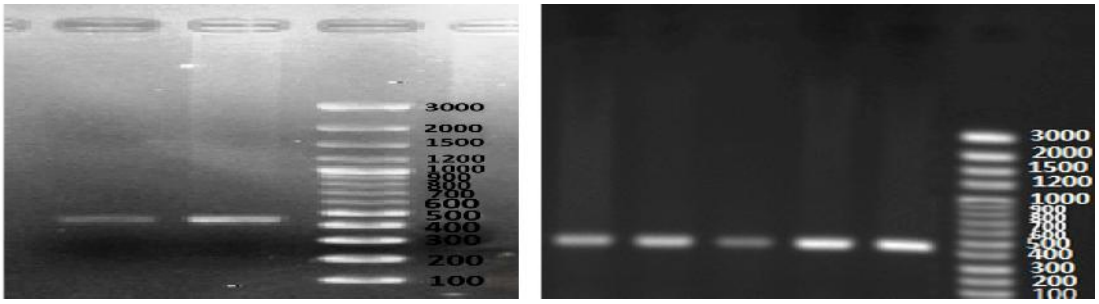
برای تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی و بررسی وضعیت تعادل هاردی واینبرگ از نرم‌افزار Popgen نسخه ۱/۳۱ (۲۷) استفاده شد. تعیین ارتباط ژنوتیپ‌های هر ژن با ارزش‌های اصلاحی تولید شیر، ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر و مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی با استفاده ازمدل آماری زیر وPROC GLM از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ صورت گرفت.

$$Y_i = \mu + M_i + e_i$$

Y_i = مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی (SCS)، ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر، μ = میانگین، M_i = ژنوتیپ، e_i= باقیمانده‌ها، برای مقایسه میانگین‌های مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی بین ژنوتیپ‌های مختلف در بین گروه‌های مقاوم و حساس از آزمون توکی استفاده گردید.

نتایج و بحث

نتایج استخراج DNA کیفیت و کمیت مناسبی را نشان داد که امکان ادامه آزمایش را برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز هموار کرد. محصولات حاصل از تکثیر برای ژن‌های TNFα و TLR2 در شکل ۱ آمده است.

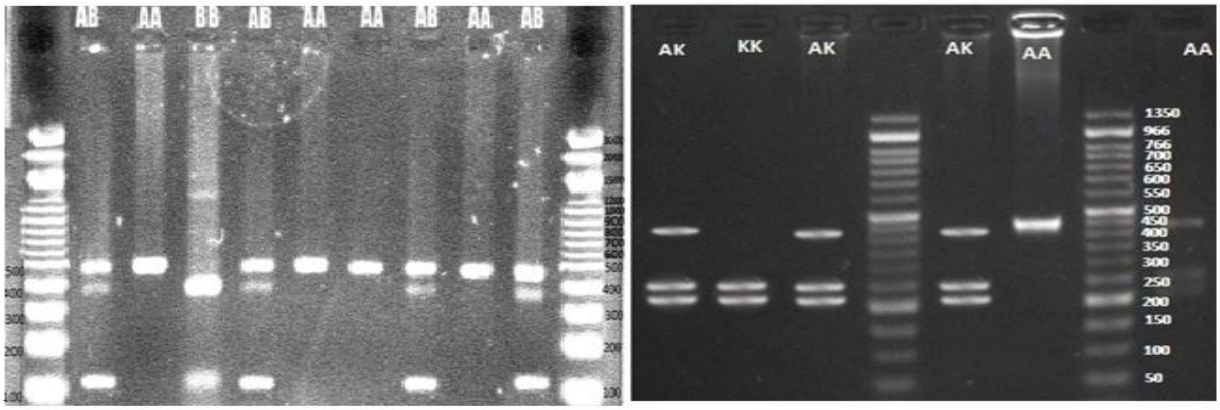


(ب) (الف)

شکل ۱- الگوهای محصولات تکثیر ژن‌هایTLR2 (۴۴۸ جفت باز شکل الف) ژن TNFα (۴۴۵ جفت باز شکل ب)

Figure 1. Pattern of amplified PCR products of TLR2 gene (448 bp Figure A) and TNFα gene (445 bp Figure B)

نتایج هضم آنزیمی برای ژن‌های TLR2 وTNFα در شکل ۱ به ترتیب الف و ب آمده است. نتایج هضم آنزیمی ژن TNFα وجود سه ژنوتیپ AA، AB و BB را نشان داد که در واقع این چند شکلی مشاهده شده حاصل جهش در نوکلئوتید (۳۵۲ جفت بازی) تغییر نوکلئوتیدی T-C بود. بطوری که ژنوتیپ AA دارای یک باند ۴۴۵ جفت باز روی ژل، ژنوتیپ BB دارای دو باند ۳۵۰ جفت‌بازی و ۹۵ جفت‌بازی و در نهایت ژنوتیپ AB دارای سه باند ۴۴۵، ۳۵۰ و ۹۵ جفت باز روی ژل آگارز ۱٪ بودند (شکل ۳). برای ژن TLR2 نتایج هضم آنزیمی نیز سه ژنوتیپ را مشخص کرد. ژنوتیپ AA دارای یک باند ۴۴۸ جفت باز روی ژل، ژنوتیپ KK دارای دو باند ۲۰۷ جفت‌بازی و ۲۴۱ جفت بازی و ژنوتیپ AK دارای سه باند ۴۴۸، ۲۰۷ و ۲۴۱ جفت باز روی ژل آگارز ۲٪ بودند. (شکل ۲).



شکل ۲- ژنوتیپ‌های مختلف مشاهده شده برای ژن TLR2 (شکل الف)و ژن TNFα (شکل ب) در ژل آگارز
Figure 2. Observed difference genotypes TLR2 gene (Fig. A) TNFα gene (Fig B) on agarose gel

آماره کای دو برای ژن TNFα نشان داد جمعیت کامل و گروه حساس در تعادل هاردی واینبرگ نبودند (P≤۰/۰۵). ولی گروه مقاوم در تعادل هاردی واینبرگ بود (P>۰/۰۵) فراوانی ژنوتیپ AA در جمعیت مقاوم بالاتر از فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت حساس بود و فراوانی ژنوتیپ BB در جمعیت حساس بالاتر از فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت مقاوم بود (P<۰/۰۰۱). بنابراین آلل A بعنوان آلل مطلوب برای مقاومت در مقابل ورم پستان در گاو هلشتاین معرفی شد. برای ژن TLR2 جمعیت کامل، گروه مقاوم و گروه حساس در تعادل هاردی واینبرگ نبودند (P≤۰/۰۵). فراوانی ژنوتیپ AK در جمعیت مقاوم بالاتر از فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت حساس بود و فراوانی ژنوتیپ KK در جمعیت حساس بالاتر از فراوانی این ژنوتیپ در جمعیت مقاوم بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

آزمون معنی‌داری اثرات ثابت

در این مطالعه اثرات ثابت شکم زایش سال زایش و فصل زایش در سطح ۱٪ معنی‌دار شدند. اما تولید شیر روز آزمون و سن زایش به‌عنوان کواریت در سطح ۵٪ معنی‌دار نشدند (جدول ۳).

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن‌های TNFα و TLR2 بین حیوانات حساس و مقاوم
Tabel 2. Genotype and allele frequency of TNFα and TLR2 genes among resistance and susceptible animals

اسامی ژن‌ها	گروه	فراوانی ژنوتیپی			فراوانی آللی		χ۲
		AA	BB	AB	A	B	
TNFα	مقاوم	۰/۵ (۲۲)	۰/۱۶ (۷)	۰/۳۴ (۱۵)	۰/۶۷	۰/۳۳	۳/۳۹*
	حساس	۰/۱۳ (۷)	۰/۷۱ (۴۰)	۰/۱۶ (۹)	۰/۲۱	۰/۷۹	۱۲/۲۷
	کل جمعیت	۰/۲۹	۰/۴۷	۰/۲۴	۰/۴	۰/۵۹	۳۱
		AA	KK	AK	A	K	
TLR2	مقاوم	۰/۰۲۵ (۱)	۰/۰۲۵ (۱)	۰/۹۵ (۴۲)	۰/۵	/۵	۳۵
	حساس	۰	۰/۲۹ (۱۶)	۰/۷۱ (۴۰)	۰/۳۶	۰/۶۴	۱۷
	جمعیت کل	۰/۰۱	۰/۱۷	۰/۸۲	۰/۴۲	۰/۵۸	۵۶/۷۹

*: تعادل هاردی واینبرگ (P>۰/۰۵).

جدول ۳- میانگین مربعات شکم زایش، سال زایش، فصل زایش، سن زایش و تولید شیر روز آزمون
Tabel 3. Squares means of parity, year calving, calving season, calving age, test day and milk production

اثر	میانگین مربعات
شکم زایش	۸/۸۷**
سال زایش	۱۲/۶۷**
فصل زایش	۱۵/۲**
سن زایش	۰/۱۵ns
تولید شیر روز آزمون (کیلوگرم)	۰/۱۶ns

**: معنی‌داری (P<۰/۰۱) ns: غیرمعنی‌داری

بررسی ارتباط ژن TNFα با مقادیر باقیمانده SCC ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و درصدچربی شیر

نتایج نشان داد که بین ژن TNFα با مقادیر باقیمانده SCC و ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و درصد چربی شیر ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). ژنوتیپ AA کمترین مقادیر باقیمانده نمره سلول‌های بدنی داشت. بالاترین میزان ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر مربوط به ژنوتیپ BB و کمترین میزان ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر مربوط به ژنوتیپ AA بود (جدول ۴). به

نظر می‌رسد ژنوتیپ AA نشانگر مولکولی مناسبی برای مقاومت به ورم پستان است ماکسیمیک ووکا و همکاران (۲۵) گزارش کردند که بین چندشکلی‌های ژن TNFα و ورم پستان بالینی در شکم‌های مختلف زایش ارتباط معنی‌داری وجود داشت. آلل T مرتبط بود با تعداد ورم پستان بالینی کمتر در شکم‌های زایش پایین‌تر و تعداد ورم پستان بالینی بیشتر در شکم‌های زایش بالاتر. بیان ژن برای ژنوتیپ‌های TC و CC نسبت به ژنوتیپ TT بالاتر بود. درمطالعه‌ای گزارش شد وقوع اولین تخمک‌گذاری بعد از زایش در ژنوتیپ‌های AG و GG ناحیه پروموتور TNFα نسبت به گروه AA در گاو شیری بالاتر بود (۱۶). رانجان و همکاران (۲۱) گزارش کردند بین چندشکلی‌های ژن TNFα و ورم پستان بالینی در جمعیت گاو هلشتاین هند رابطه معنی‌داری وجود داشت. نشانگر SSCP نشان داد فراوانی ورم پستان در ژنوتیپ جهش یافته بیشتر بود. بیان ژن برای ژنوتیپ AA (ژنوتیپ جهش یافته) با پاتوژن‌های LPS در مقایسه با ژنوتیپ‌های BB و AB بیشتر بود. یوان و همکاران (۱) گزارش نمودند ارتباط معنی‌داری بین جهش در موقعیت T→C۲۹۳ اگزون چهارم ژن TNFα با SCC در گاوهای هلشتاین وجود داشت. در مطالعه‌ای گزارش شد جهش در ناحیه ژن TNF-857 در انسان موجب ایجاد حساسیت به بیماری توبرکلوزیس می‌شود (۳). محققین گزارش کردند TNFα در شیر پستان‌های آلوده با باکتری گرم منفی اشرشیاکلی، پنومونیا کلبسیلا و پزودوموناس آئروجینوسا وجود دارند و این بیانگر ارتباط TNFα با ورم پستان بود (۸، ۹). این گزارشات نتایج تحقیق ما را تایید کردند.

ارتباط ژن TLR2 با مقادیر باقیمانده SCC ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و درصدچربی شیر

نتایج نشان داد بین چندشکلی‌های ژن TLR2 با مقادیر باقیمانده SCS و ارزش‌های اصلاحی تولید شیر ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱). ژنوتیپ AA کمترین مقادیر باقیمانده SCC داشت. بالاترین میزان ارزش‌های اصلاحی تولید شیر مربوط به ژنوتیپ AA بود کمترین میزان ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و ارزش‌های اصلاحی درصد چربی شیر مربوط به ژنوتیپ KK بود. بنابراین ژنوتیپ AA نشانگر مولکولی مناسبی برای افزایش تولید شیر و کاهش ورم پستان بود (جدول ۴).

جدول ۴- میانگین حداقل مربعات مقادیر باقیمانده SCS، ارزش‌های اصلاحی تولید شیر و درصدچربی شیر ژن‌های TNFα و TLR2 در ژنوتیپ‌های مختلف

Tabel 4. Least squer means of SCS residual values, breeding values of milk production and milk fat%. TNFα and TLR2 genes in different genotypes

ژن	ژنوتیپ	مقادیر باقیمانده سلول‌های بدنی	ارزش‌های اصلاحی درصد چربی	ارزش‌های اصلاحی تولید شیر
TNFα	AA	-۰/۵±۰/۰۸**	۲۲/۰۳±۰/۰۳**	۶۶۷/۳±۵۹/۱**
	AB	–۰/۲۶± ۰/۰۹**	۲۲/۴۵±۰/۰۵**	۷۵۴±۳۰/۹**
	BB	۲/۰۸±۰/۰۴**	۲۳/۷±۰/۱**	۷۶۲/۱۷±۵/۳**
TLR2	AA	-۰/۳±۰/۱**	۲۵/۸۴±۰/۰۱ ^{ns}	۸۳۰/۴۳±۰/۷ **
	AK	۰/۷۵±۰/۰۶**	۲۲/۵±۳/۲۴ ^{ns}	۷۱۶/۷۲±۷/۲ **
	KK	۱/۳±۰/۰۸**	۲۰/۸۳±۱۱/۵ ^{ns}	۶۹۸/۸۲±۹/۲ **

**: معنی‌داری (P<۰/۰۱)

جدول ۵ مقایسه میانگین‌های مقادیر باقیمانده SCC بین گروه‌ها برای ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد مقایسه میانگین‌ها بین بیشتر گروه‌های ژنوتیپی معنی‌دار بود برای ژن TNFα کمترین مقادیر باقیمانده SCS مربوط به ژنوتیپ AA در گروه مقاوم و بیشترین مقادیر باقیمانده SCS مربوط به ژنوتیپ BB در گروه حساس بود (P< ۰/۰۵).

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های مقادیر باقیمانده SCS بین گروه‌های حساس و مقاوم

Table 5. The comparison of SCS residual values means between susceptible and resistance groups باقیمانده SCS

ژن	ژنوتیپ	گروه مقاوم	گروه حساس
TNFα	AA	-۰/۳±۰/۰۷^{a}	-۰/۲±۰/۰۷^{a}
	AB	–۰/۲± ۰/۰۸^{a}	۰/۰۶± ۰/۰۸^{c}
	BB	۰/۹±۰/۰۵^{b}	۱/۱۸±۰/۰۵^{b}
TLR2	AA	-۰/۲±۰/۲۰^{a}	-۰/۱±۰/۲^{a}
	AK	۰/۱۵±۰/۰۷^{D}	۰/۶±۰/۰۶^{D}
	KK	۰/۳±۰/۰۹^{b}	۱±۰/۰۸^{c}

**: معنی‌داری (P<۰/۰۱)

در یک مطالعه گزارش شد بین ژن TLR2 و SCC در گاو شیری ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۱)، در آن مطالعه که روی سه جمعیت گاوهای هلشتاین، سانه و سمینتال صورت گرفت بیشترین نمره سلول‌های بدنی مربوط به ژنوتیپ جهش یافته بود (۴/۰۱) و کمترین نمره سلول‌های بدنی مربوط به ژنوتیپ وحشی بود این یافته‌ها نتایج تحقیق ما را تایید کرد (۲۸). محققین در یک مطالعه گزارش کردند آلل‌های TLR2 ارتباط معنی‌داری با ورم پستان داشتند گاوهای هلشتاین با آلل TLR2 2 تعداد سلول‌های بدنی کمتری نسبت به گاوهایی با آلل TLR2 1 را داشتند (۲۴). مطالعات متعدد نشان دادند TNFα و TLR2 در زمان بروز ورم پستان افزایش یافت (۷). ژو و همکاران (۲۶) گزارش کردند که جهش در ناحیه پروموتور، اگزون ۱ و ۴ ژن TNFα ارتباط معنی‌داری با ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاوهای هلشتاین چین داشتند. ژنوتیپ BB در اگزون اول و AA در اگزون چهارم با SCC بالاتر ارتباط داشتند و ژنوتیپ AB در ناحیه پروموتور مرتبط بودند با SCC کمتر ژنوتیپ BB در اگزون اول، AA در اگزون چهارم و AB در ناحیه پروموتور به‌عنوان نشانگرهای مناسب برای انتخاب مقاومت به ورم پستان در گاو شیری بودند (۲۶). مطالعات متعدد نشان دادند بیان ژن‌های TNFα و TLR2 در گاوهای آلوده به عفونت ورم پستان بیشتر از گاوهای غیرعفونی بود (۴). تحقیق ما نشان داد که بین چندشکلی‌های ژن TLR2 و TNFα با صفات SCC، ارزش‌های اصلاحی برآورد شده تولید شیر ارتباط معنی‌داری وجود داشت و این نشانگرها می‌توانند برای اصلاح مقاومت به ورم پستان در گاو شیری بکار گرفته شوند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حسن استقبال و همکاری بسیار سازنده‌ی شرکت کشت و صنعت فکا و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز که موجبات انجام این پژوهش را ممکن و میسر ساختند نهایت تقدیر و تشکر را ابراز می‌دارد.

منابع

1. A-Juan, X.U., L.I. U. Xiao-Lin, G.U.O. Jia-Zhong and X.I.A. Zhi. 2009. Polymorphism of bovine TNF- gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. Hereditas (Beijing), 32(9): 929-934.
2. Atashpaz, A., A. Barzegari and R. Azarbaijani. 2008. General and DNA extraction kit. Iranian patent office. No. 48024.
3. Anoosheh, S., P. Farnia and M. Kargar. 2010. Association between TNF-Alpha (-857) gene polymorphism and susceptibility to tuberculosis. Iran Red Crescent Med J., 13(4): 243-248.
4. Beecher, C., D. Mairead, C. Stuart, B. Donagh, A. Magee David, V. McCarthy Tommie and L. Giblin. 2010. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. BMC Genet, 11(99): 1-9.
5. Carvajal, A.M., P. Huircan and A. Lepori. 2013. Single nucleotide polymorphisms in immunity-related genes and their association with mastitis in Chilean dairy cattle. Genetics and Molecular Research, 12(3): 2702-2711.
6. Dadpasand, M., M.J. Zamiri, H. Atashi and A. Akhlaghi. 2012. Genetic relationship of conformation traits with average somatic cell score at 150 and 305 days in milk in Holstein cows of Iran. Journal Dairy Science, 95: 7340-7345.
7. Bhatt, D., P.S. Khade, S.B. Tarate, A.K. Tripathi, D.S. Nauriyal, D.N. Rank, A.P. Kunjadia and C.G. Joshi. 2012. Cytokine expression pattern in milk somatic cells of subclinical mastitis-affected cattle analyzed by real time PCR. Korean Journal Veterinary, 52(4): 231-238.
8. Fonseca, G.R., D.S. Antunes, C. Paiva, S. Lange, F. Guimarães and M.F. Martins. 2011. Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbreeds dairy cows. Genetic Molecular Research, 10(3): 1295-1303.
9. Fonseca, V., C. Silva, M. Lange, C. Guimaraes, A.K. Weller, P. Sousa, S. Lopes and S. Guimaraes. 2009. Expression profile of genes associated with mastitis in dairy cattle. Genetics and molecular biology, 32(4): 776-781.
10. Ghazanfari Kherabadi, M.R. 2011. Polymorphisms TLR4 gen and association with somatic cell score in Holestein and Brown Swiss in khorasan. Master's thesis, University Birjand, pp: 5-7 (In Persian).
11. Hand, K.J., A. Godkin and D.F. Kelton. 2012. Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. Journal of Dairy Science, 95: 1358-1362.
12. Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, B. Berglund and E. Strandberg. 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. Journal Dairy Science, 92: 3124-3133.
13. Hillerton, J.E. 1999. Balancing mastitis and quality. The Proceeding of the British Mastitis Conference, 31-36.
14. Jamali, N., A. Sadeghi Sefid Mazgi and M.M. Moeini. 2013. Evaluation of milk somatic cell count in dairy farms of industrial and traditional in Tehran. Livestock production, 14(1): 29-21 (In Persian).
15. Katsafadou, A.I. and G.C. Fthenakis. 2013. Breeding for mastitis resistance in sheep and goats. Journal Veterinary Science Technology, 4(4): 71 pp.
16. Kawasaki, Y., A. Yuka, F. Magata, A. Miyamoto, C. Kawashima, T. Hojo, K. Okuda, S. Koumei and T. Shimizu. 2014. The Effect of Single Nucleotide Polymorphisms in the Tumor necrosis factor on mastitis in dairy cattle. Journal of Dairy Science, 96: 1359-1363.
17. Lievaart. J., W. Kremer and H. Barkema. 2007. Short Communication: Comparison of Bulk Milk, Yield-Corrected, and Average Somatic Cell Counts as Parameters to Summarize the Subclinical Mastitis Situation in a Dairy Herd. Journal of Dairy Science, 90: 4145-4148.

18. Martins, A.M., A.M. Silvestre, M.F. Petim-Batista and J.A. Colaco. 2011. Somatic cell score genetic parameter estimates of dairy cattle in Portugal using fractional polynomials Journal of Animal Science, 89: 1281-1285.
19. Miller, R.H., H.D. Norman, G.R. Wiggans and J.R. Wright. 2004. Relationship of test-day somatic cell score with test-day and lactation milk yields. Journal of Dairy Science, 87: 2299-2306.
20. Naghshineh, S. 2011. Evaluation of inbreeding and its effect on milk production and subclinical mastitis in dairy cows. Master's thesis. University of Tabriz, pp: 4-5 (In Persian).
21. Ranjan, S., B. Bhushan, M. Panigrahi, A. Kumar, R. Deb, P. Kumar and D. Sharma. 2015. Association and Expression Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms of Partial Tumor Necrosis Factor Alpha Gene with Mastitis in Crossbred Cattle. Animal Biotechnology, 26: 98-104, 2015.
22. Samore, A. and A. Groen. 2006. Proposal of an udder health genetic index for the Italian Holstein Friesian based on first lactation data. Italian Journal Animal Science, 5: 359-370.
23. Sargolzaei, M. 2006. CFC, A software package for pedigree analysis and monitoring genetic diversity. Course of Environmental Management Science, Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Niigata 950-2181, Japan.
24. Swiderek, W.P., M.R. Bhide, J. Gruszczynska, K. Soltis, D. Witkowska and I. Mkula. 2006. Toll like receptor gene polymorphism and its relationship with somatic cell concentration and natural bacterial infections of the mammary gland in sheep. Folial microbial, 51(6): 647-652.
25. Wojdak-Maksymiec, K., J. Szyda and T. Strabel. 2013. Parity-dependent association between TNF-α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. BMC Veterinary Research, 9(114):1-8.
26. Xu, A.J., X.L. Liu, J.Z. Guo and Xia. Z. 2010. Polymorphism of bovine TNF-a gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. Yi Chuan, 32(9): 929-34.
27. Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
28. Zhang, L.P., Q.F. Gan, T.H. Ma, H.D. Li, X.P. Wang, J.Y. Li, X. Gao, J.B. Chen, H.Y. Ren and S.Z. Xu. 2009. Toll-like receptor 2 gene polymorphism and its relationship with SCC in dairy cattle. Animal Biotechnology, 20: 87-95.
29. Zamiri, M.J. 2006. Trining of dairy cattle. 6nd edn, Shiraz University Press, pp: 75-85 (In Persian).

Identification of Genetic Variation in two Candidate Genes of TLR2 and TNFα and its Association with Mastitis in Holstain Cattle

Parvaneh Raufian[1], Jalil Shodja Ghyas[2], Raziallah Jafari[3], Gholamali Moghaddam[4] and Arash Javanmard[5]

1, 3, 4 and 5- PhD Student, Associate Professor, Department of Animal Science, Professor and Assistant Professor, University of Tabriz
2- Professor, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz (Corresponding author: J.Shodja@gmail.com)
Received: September 28, 2016 Accepted: Jun 13, 2017

Abstract

Mastitis is one of the most common diseases in dairy cattle, which has imposed therapy heavy costs to farmers through significant reduction in total milk production. Identification of nucleotide polymorphism of two candidate immunity response genes and its effects on SCS as a mastitis incidence indicator was carried out in this research. The genes were exons 1 and 2 of TLR2 and 3 and 4 of TNFα. For this purpose, a hundred Holstein lactating cows were selected based on their breeding values for milk production, fat and somatic cell scores. Then cows based on their residual values for somatic cell scores were divided into two resistant and susceptible groups and 5 ml blood samples were collected from each animal. Selective genotyping of two target groups of susceptible and resistant animals to mastitis was done using PCR-RFLP approach. The association between genetic polymorphisms with corrected records of somatic cell scores (residual values for somatic cell score) were analyzed using the Generalized Linear Model (GLM) procedure of SAS statistical package (version 9.2) followed by means comparison with Tukey-Kramer test. There was a significant direct relationship between TLR2 and TNFα gene polymorphisms and somatic cell score residual values ($P<0.001$). Furthermore, For TNFα gene the most genotypic frequencies in resistant and susceptible groups were related to genotypes AA and BB, respectively. Also, KK genotype frequency within TLR2 candidate gene showed a higher frequency within susceptible group versus the resistant group. As a conclusion, the obtained results may be used to monitor and design breeding strategy to prevent mastitis.

Keywords: Factor necrosis tumor, Mastitis, Somatic cell score, Toll Like receptor