لینک های مفید

سرویس های ویژه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

فیلم های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی STRS

کارگاه های آموزشی

عضویت درخبرنامه

چهارمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
كرمان مردادماه ۱۳۸٤

مركز بين المللي علوم و تكنولوژي پيشرفته و علوم محيطي
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

ژن‌فراواني آللهاي‌بررسي BoLA-DRB3. 2 در گاوهاي نر هلشتاين

مريم پرنيان*[۱] ،عبدالرضا صالحي[۱] ،سيد علي قرشي[۲] ،محمد رضا ملاصالحي[۳] ،ناصر امام جمعه[۱], مرتضي پشمي[۱]

۱- مجتمع آموزش عالي ابوريحان،دانشگاه تهران
, تهران۲- پژوهشگاه ملي مهندسي ژنتيك و زيست فناوري
, كرج۳-مركز اصلاح نژاد دام كشور

:چكيده

در اين تحقيق فراواني آلل هاي ژن BoLA-DRB3.2 در ۵۰ راس گاو نر هلشتاين آزمون نتاج شده مورد بررسي قرار گرفت. استخراج DNA ژنومي از اسپرم منجمد به روش فنل كلروفرم انجام شد. چند شكلي جايگاه ژني BoLA-DRB3. 2 با استفاده از تكنيك PCR-RFLP مورد بررسي قرار گرفت. قطعه ۲۸٤ جفت بازي از اگزون ۲ اين جايگاه ژني با واكنش زنجيره اي پليمرازدو مرحله اي (Nested-PCR) تكثير شد. با برش آنزيمي قطعات تكثير شده با سه آنزيم RsaI, HaeIII و BstyI تنوع آلل ها در اين جايگاه ژني بررسي شد. محصولات حاصل از هضم آنزيمي بر روي ژل اكريلاميد ۸ % الكتروفورزشده و پس ازرنگ آميزي با نيترات نقره ژنوتيپ نمونه ها تعيين گرديد. ۱۷ آلل با فراواني بين ۱تا ۲۱ درصد شناسايي شد. ۷ آلل (۲۸, ۵۱, ۲٤, ۲۲, ۱۱, ۸, ۱۶) ،۸۰ درصد فراواني آللي جمعيت را تشكيل مي دهد. نتايج نشان مي دهد كه ژن مذكور در گاوهاي نر تحت مطالعه از چند شكلي بالايي برخوردار است.

واژه هاي كليدي: ژن BoLA-DRB3.2 ، PCR-RFLP، گاو هلشتاين نر

Abstract:

Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 Alleles in Holstein Bulls

Parnian [1*], M., Salehi [1], A.R., Ghorashi [2], S.A., Molla-Salehi [3], M. R., Emam Jomeh [1], N., Pashmi [1], M.

1- Abu-Reyhan Agricultural School, Tehran University
2- National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran
3- Animal Breeding Center, Karaj

In this study the polymorphism of BoLA-DRB3.2 gene in 50 Holstein bulls was investigated. Genomic DNA was extracted using a phenol-chloroform method. Target gene was amplified by a two step PCR and amplicons were digested by RsaI, HaeIII, and BstyI restriction enzymes. Results were electrophoresed on a %8 polyacrylamide gel and visualized after silver staining. Seventeen BoLA-DRB3.2 alleles were identified with frequencies ranging from 1 to %21. The seven most frequently isolated alleles (BoLA-DRB3.2 24*, 22*, 11*, 16*, 8*, 28*, 51*) occurred for %80 of the alleles in the investigated population. Results indicate that the BoLA-drb3.2 is highly polymorphic in tested animals.

Keywords: BoLA-DRB3.2 gene, PCR-RFLP, Holstein bull

مقدمه :

افزايش مقاومت به بيماري در گاوهاي پر توليد همواره مد نظر پرورش دهندگان گاو شيري و محققان اصلاح نژاد بوده است. پيشرفت تكنيك هاي ملكولي در تعيين ماركر هاي ژنتيكي براي معرفي ژن هاي مسوول صفات توليدي و ايمني ميزبان اين امكان را فراهم آورده است كه بتوان حيوانات حامل ژن هاي مقاوم به بيماري وتوليد مناسب را انتخاب كرد (Gilliespie, 1999). ژن هاي كمپلكس اصلي سازگاري بافتي (MHC) در گاو (BoLA) روي بازوي كوتاه كروموزم ۲۳ قرار دارد. نقش اصلي اين ژن ها تنظيم پاسخ ايمني مي باشد. در گاو اين ژن ها شامل سه دسته ژني (I, II, III)بوده كه دسته يك و دو پيوستگي بسيار نزديكي دارند. دردسته دوحداقل ۱۲ جايگاه ژني قرار دارد كه شامل زيردسته IIaوIIb مي باشدIIa شامل جايگاه هاي ژني(DQB, DQA, DRB, DRA) وIIb شامل جايگاه هاي ژني (DIB, DYB, DYA, DOB) است. درمكان DRB سه ژن (DRB1, DRB2, DRB3) كه ژن DRB3 ژن پلي مرفيك وعملكردي مي باشد (Gilliespie, 1999, Sharif, 1998). به طوري كه تاكنون در اگزون ۲ اين جايگاه ژني ۱۰۳ آلل شناسايي شده است (Takeshima, 2002). تحقيقات نشان داده كه آلل هاي اين ژن با بسياري بيماري ها (ورم پستان،لنفوسيتوسيس، سلول هاي سوماتيك)و صفات توليدي (شير، چربي، پروتئين) ارتباط دارد (Dietz, 1997, Sharif, 1998, Starkenborg, 1997). هدف از اين مطالعه بررسي بررسي تنوع و فراواني آلل ها در بين گاوهاي نر هلشتاين آزمون نتاج شده (مركز اصلاح نژاد كشور) مي باشد.

مواد و روش ها:

در اين مطالعه از ٥٠ گاو نر آزمون نتاج شده(مركز اصلاح نژاد كشور) به مقدار يك دز اسپرم تهيه شد. استخراج DNA از ١٠٠ ماكرو ليتر اسپرم مايع به روش تغيير يافته و بهينه شده فنل-كلروفرم انجام گرفت. تكثير ژن BoLA-DRB3.2 با PCR دو مرحله اي (Nested-PCR) با سه آغازگر اليگونكلوتيدي شامل (HLO30, HLO31, HLO32) انجام گرفت. در واكنش اول از دو آغازگر (HLO30, HLO31) استفاده شد وسپس محصولات واكنش اول با دو آغازگر(HLO30, HLO32) در واكنش شركت كردند. هضم آنزيمي قطعات تكثير شده با سه آنزيم RsaI, HaeIII وBstyI انجام گرفت (Gilliespie, 1999, Vaneijek, 1992). محصولات حاصل از هضم آنزيمي روي ژل پلي اكريلاميد ٨% الكتروفورز شده و با نيترات نقره رنگ آميزي شد.

نتايج :

نتايج انجام PCR :

با انجام آزمايش PCR دو مرحله اي (Nested-PCR) ، قطعه مورد نظر به طول ٢٨٤ جفت باز تكثير شد (شكل١). تاييد اختصاصي بودن محصول PCR با تعيين سكانس آن و مقايسه با بانك ژن انجام گرفت.

نتايج هضم آنزيمي:

با هضم آنزيمي قطعه اي به طول٢٨٤ جفت بازبا آنزيم RsaI ١١ الگوي آللي (g, m, f, I, j, n, o, b, d, l, h) با آنزيم HaeIII ٤ الگوي آللي(a, b, d, e) با آنزيم BstyI ٣ الگوي آللي(a, b, e) حاصل شد (شكل٢).

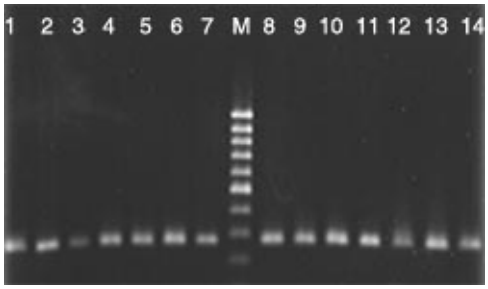
بحث:

از بين آلل هاي گوناگون اين ژن آلل ١٦و٢٣ با ورم پستان وسلول هاي سوماتيك شير، ٨ و٢٢ با توليد شير ٢٢ و ١٦ با كيست تخمداني وآلل٣ با جفت ماندگي ارتباط دارد (Sharif, 1998, Dietz, 1997). شريف و همكاران (١٩٩٨) با بررسي ژن BoLA-DRB3.2 و اثر اين ژن بر صفات مختلف در گاو هلشتاين ٢٧ آلل شناسايي كردند كه آلل هاي (٣, ٢٤, ٨, ١١, ٢٢, ١٦, ٢٣) ، ٨٠ درصد از آلل هاي جمعيت بود(Sharif, 1998). دايتز و همكاران (١٩٩٧) با بررسي ژن مذكوردر گاو هلشت‌اين ٢٤ آلل شناسايي كردندكه آلل هاي (٢٤, ٨, ٢٢, ١١, ١٦, ٢٣) ، ٨٨ درصد از آلل هاي جمعيت مورد مطالعه آنها را تشكيل مي دهد (Dietz, 1997). استاركن بورگ و همكاران (١٩٩٧) با بررسي ژن مذكور در دو لاين از گاو هلشتاين شامل (لاين كنترل و لاين انتخابي) نشان دادند كه آلل هاي (٢٤, ٢٢, ٢٧) ، ٦٨/٨ درصد آلل هاي لاين انتخابي را تشكيل مي دهد (Starkenborg, 1997). گليسپاي و همكاران (١٩٩٩) با بررسي اين جايگاه ژني در نژاد جرزي ٢٤ آلل شناسايي كردند كه آلل هاي (١٥, ٢١, ٣٦, ٣٢, ٨, ١٠, ibe) ٧٤ درصد از آلل هاي جمعيت مورد مطالعه آنها را تشكيل مي دهد (Gilliespie, 1999). تاكشيما و همكاران (٢٠٠٢) با بررسي ژن مذكور نشان دادند كه آلل هاي (٢٤, ٨, ١١, ١٦, ٢٣, ٢٢) ٧٠/٣ درصد از آلل هاي جمعيت مورد مطالعه آنهارا تشكيل مي دهد (Takeshima, 2002). در اين تحقيق فراواني آلل ها در جمعيت مورد بررسي در محدوده ١ ٠/٠تا ٠/٢١ قرار دارد. ٧ آلل (٥١, ٢٨, ٨, ١٦, ١١, ٢٢, ٢٤) به ترتيب با فراواني (٠/٠٦, ٠/٠٦, ٠/٠٩, ٠/١٤, ٠/١٤, ٠/٢١) بيشترين فراواني را در جمعيت مورد مطالعه داشتند. بررسي حاضر نشان مي دهد كه اين ژن در بين گاو هاي نر هلشتاين از چندشكلي بالايي برخوردار است به طوري كه از ٥٠ راس گاونر مورد بررسي تنها دو نمونه همو زيگوت بوده و بقيه نمونه ها هتروزيگوت با آلل هاي متفاوت مي باشند. با توجه به اين كه گاوهاي نر توزيع كننده هاي اصلي ژن ها در جمعيت مي باشند, تعيين ژنوتيپ گاوهاي نر براي اين ژن مي تواند دامداران را در انتخاب گاوهاي نر حامل ژن هاي مقاوم به بيماري و توليد مناسب هدايت كند.

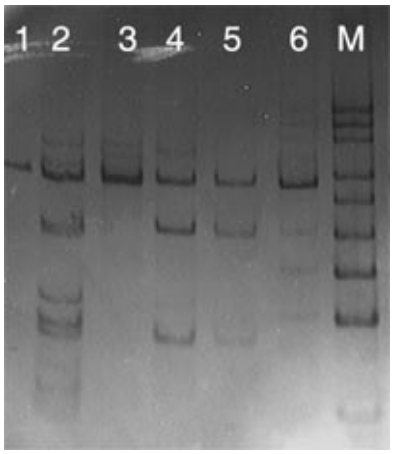
منابع:

1. Dietz. A, B. , N. D. Cohen, L. Timms, M. E. Kehrli. (1997). Bovine Lymphocyte Antigen Class11 Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in Milk of Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 80:406-412
2. Gilliespie, B. E. , B. M. Jayarao, H. H. Dowlen, S. P. Oliver. (1999). Analysis and Frequency of Bovine Lymphocyte Antigen DRB3. 2 Alleles in Jersey Cows. J. Dairy Sci. 82:2049-2053
3. Sharif, S. , B. A. Mallard, B. N. Wilkie, J. M. Sargent, h. m. Scott, J. C. M. Dekkers, K. E. Leslie. (1998). Associations ofth Bovine Major Histocompatibility Complex DRB3(BoLA-DRB3) Alleles With Occurrence of Disease and Milk Somatic CellScore in Canadia Dairy Cattle. International Society for Animal Genetics. 29:1915-1930
4. Sharif, S. , B. A. Mallard, B. N. Wilkie, J. M. Sargeant, H. M. Scott, J. C. M. Dekkers . (1998). Associations of the Bovine Major Histocompatibility Complex DRB3. 2(BoLAA -DRB3) With Production Traits in Canadian Dairy Cattle . J. Animal Sci 30:157-160
5. Starkenborg, R. G, l. B. Hansen, JR. Kehril, H. Chester-Jones. (1997). Frequencies and Effects of Alternative DRB3. 2 Alleles of the Bovine Lymphocyte Antigen for Holsteins in Milk Selection and Control Line. J Dairy Sci. 80:3411-3419
6. Takeshima. S. , Y. Nakai, M. Ohta, Y. Aida. (2002). ShortCommunication:characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese Shorthorn cattle by polymerase chain reaction –sequence-based typing. J. Dairy Sci. 85:1630-1632

7. -Van Eijek , M. J. T. , A. Stewart –Hayanes and A. Lewin. (1992). Extensive Polymorphisme of the BoLA-DRB3 Gene Distinguished by PCR-RFLP . Animal Genetics. 23:483-496



شکل۱ - محصولات PCR دو مرحله ای روی ژل آگارز ۱%
ستون M: ماركر مولكولي, (DNA Ladder100 bp)
ستون هاي ۱ الي ۱۴: قطعه DNA تكثير شده در نمونه هاي مختلف به طولbp ۲۸۴



شكل۲ - الگوي هضم انزيمي DNA با استفاده از انزيم BstyI
ستون ۱- DNA هضم نشده
ستون ۲ الي ۶- قطعات مختلف DNA در اثر هضم آنزيم
ستون M: ماركر مولكولي, Ladder 50

لینک های مفید

سرویس های ویژه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

فیلم های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی STRS

کارگاه های آموزشی

عضویت درخبرنامه