Archive of SID

سومین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی
3rd National Conference on New Concepts in Agriculture
دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه
دانشکده کشاورزی
پنج شنبه ۲۶ آذر ماه ۱۳۹۴

بررسی ارتباط ژنتیکی ژن کد کننده FcRn با سطح ایمنوگلوبین آغوز در گاوهای شیری هلشتاین ایران

محمد غلام آزاد*، علی قاضی خانی شاد و جعفر یدی
* گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران
* Email: gholamazad.mohammad@yahoo.com

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی ارتباط ژنتیکی بین ژن کد کننده FcRn یا همان FCGRT با سطح ایمنوگلوبولین G در گاوهای شیری هلشتاین ایران صورت گرفت. بدین منظور از ٦٣ راس گاو شیری نژاد هلشتاین متعلق به یکی از گله های صنعتی نمونه خون و نمونه آغوز بلافاصله بعد از زایمان گرفته شد. به منظور انجام تست ایمونولوژیکی و تعیین میزان ایمونوگلوبولین جی، نمونه های آغوز با استفاده از کیت اختصاصی و روش الایزا آنالیز شدند. همچنین از نمونه های خون گرفته شده نیز DNA ژنومی استخراج و تکثیر قطعه ژن با کمک واکنش PCR مورد نظر صورت گرفت. نمونه های تکثیر شده با استفاده از تکنیک PCR-SSCP تعیین ژنوتیپ شدند. ارتباط ژنتیکی بین الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده و وضعیت ایمونوگلوبولین جی در کلستروم گاوها با کمک نرم افزار SAS و در قالب رویه GLM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین پلی مورفیسم مشاهده شده در ژن FCGRT و سطح ایمونوگلوبولین G موجود در کلستروم گاوهای شیری ارتباط معنی داری وجود دارد. از بین سه الگوی ژنوتیپی، گاوهای دارای الگوی ژنوتیپی B دارای ایمونوگلوبولین بالاتری نسبت به دو الگوی دیگر بودند.

مقدمه

پرورش گوساله مناسب بخش مهمی از سرمایه گذاری مفید در صنعت گاو شیری بوده و هنوز به عنوان یکی از سرمایه های عمده در صنعت گاو شیری مورد غفلت است . بررسی های انجام شده در کشور آمریکا نشان داده که مرگ و میر گوساله ها از زمان تولد تا از شیر گیری در سال ۱۹۹۱ حدود ۸/٤ درصد و در سال ۱۹۹۵، ۱۱ درصد بوده در حالی که مرگ و میر تلیسه ها بعد از شیر گیری در همان سال ها به ترتیب ۲/۲ و ۲/٤ درصد بوده است.(۱)

بنابراین درصد زیادی از مرگ و میر گوساله ها در دوره نسبتاً کوتاه قبل از شیرگیری رخ می دهد . مدیریت پرورش گوساله ها در فاصله زمانی بین تولد تا از شیرگیری تاثیر زیادی بر تعداد تلیسه های جایگزین و سودآوری گله های گاو شیری دارد . تولید انبوه تلیسه های سالم برای دستیابی به موفقیت اقتصادی و تامین آینده گله گاوهای شیری ضروری است .اغلب مدیران گله های گاو شیری سالیانه ۲۵ تا ۳۵ درصد گاوهای گله را به دلایل مختلف از قبیل تولید کم (۲۳درصد)، مشکلات تولید مثلی(۱۳ درصد)، ورم پستان (۸ درصد)، صدمه دیدن(۲۸ درصد)، مرگ و میر (۵ درصد)، فروش (۸ درصد)، ترکیب نامناسب بدن، کتوز و عوامل ناشناخته دیگر (۱۵ درصد)حذف می کنند، بنابراین باید تلیسه کافی برای جایگزین کردن وجود داشته باشد. محافظت به موقع و درست از گوساله های تازه متولد شده شانس زنده ماندن آنها را افزایش داده و بروز عفونت را به حداقل خواهد رساند. (۱)

www.SID.ir

Archive of SID

از بین عوامل مدیریتی تعیین کننده سلامت و زنده مانی گوساله ها (بهداشت، تغذیه مناسب و کافی و ...) تغذیه به موقع و به مقدار کافی آغوز، مهم ترین آنهاست .آغوز اولین ترشحات پستان در ٢٤ ساعت اول بعد از زایش است و از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کاملاً با شیر متفاوت است، مواد جامد آن دو برابر، مواد معدنی آن سه برابر و پروتئین آن پنج برابر شیر است . آغوز اولین منبع غذایی گوساله تازه متولد شده و منبع غنی از ایمیونوگلوبولین هاست که برای حفظ سلامتی گوساله ضروری هستند . سیستم ایمنی گوساله در زمان تولد نا بالغ بوده و قادر به تولید ایمیونوگلوبولین کافی برای مقابله با عفونت ها نیست . جفت گاو از انتقال ایمیونوگلوبولین سرم مادری به گوساله جلوگیری می کند .در نتیجه گوساله بدون داشتن ایمنی اکتسابی کافی متولد می شود و بعد از تولد تقریبا به طور کامل وابسته به انتقال غیر فعال ایمیونوگلوبولین های مادری از آغوز می باشد .کمیت، کیفیت و زمان تغذیه آغوز مهم ترین عواملی هستند که سلامت و مرگ و میر گوساله را تحت تاثیر قرار می دهند. زمان تغذیه آغوز به جهت محدودیت زمانی در جذب ایمیونوگلوبولین ها به صورت دست نخورده از اهمیت ویژه ای برخوردار است .عوامل مختلفی از جمله سن گاو، طول دوره خشکی، مقدار اولین تولید، وضعیت ایمنی مادر، سابقه واکسیناسیون، ترشح شیر یا دوشش قبل از زایش، فصل سال و تغذیه گاو در قبل از زایش بر کیفیت آغوز تاثیر دارند. ایمنوگلوبولین G(IgG) ایمنوگلوبولین غالب در آغوز محسوب می شود زیرا نزدیک به ٩٠-٦٥ درصد از کل ایمنوگلوبولین آغوز را تشکیل می دهد. غلظت ایمنوگلوبولینهای M,A, G در آغوز گاو به ترتیب ٨٠-١٥،٧٠-١٥،١٠-١٠ درصد می باشد. انتقالIgG به درون آغوز قبل از زایمان کامل می گردد، بنابراین اگر گاو پیش از زایش دوشیده شود و یا آغوز از پستان تراوش کند آغوز بعد از زایمان دارای IgG ناچیزی خواهد بود. (٣)

هدف از انجام این تحقیق بررسی رابطه بین پلی مورفیسم ژن FCGRT و ارتباط آن با سطح ایمونوگلوبولین آغوز گاوهای شیری هلشتاین ایران است.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این تحقیق نمونه های خون (٨ سی سی) و نمونه های آغوز (٨ سی سی) از ٦٣ راس گاو شیری هلشتاین بلافاصله بعد از زایمان گرفته شد. نمونه آغوز برای اندازه گیری ایمونوگلوبولین به آزمایشگاه مبناواقع در کرج و نمونه های خون نیز برای استخراج DNA و تعیین ژنوتیپ حیوانات برای جایگاه ژنی FCGRT به آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشگاه تبریز منتقل شدند. برای تعیین غلظت اینموگلوبولین G نیز از روش ELIZA که اساسا این روش برای ردیابی هر جفت ماده ای که مثل آنتی ژن و آنتی بادی بهم گرایش داشته و قدرت اتصال مناسبی نسبت بهم دارند استفاده شد. این روش قادر به اندازه گیری هم ایمنوگلوبولین G و هم M است و در این تحقیق از کیتهای تجاری IgG/ELISA شرکت Genesis انگلستان استفاده شد. از سوی دیگر تکثیر جایگاه ٢٠٢ جفت بازی مورد نظر نیز به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای ٢٠ نوکلئوتیدی زیر انجام شد (Doleschall و همکاران، ٢٠٠٥):

www.SID.ir

Archive of SID

F: 5-GCGCGGATCAAATTAGTGGG-3
R: 5-AGCGAGCGATAGTTCTCTGC-3

تعیین ژنوتیپ نیز با تکنیک چند شکلی فضایی رشته منفرد (SSCP) صورت گرفت. جهت انجام SSCP محصولات PCR نمونه‌های مختلف در ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفوز و تعیین جهش گردیدند. محصولات PCR به منظور تک رشته‌ای شدن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵C̊ قرار گرفتند و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل گردیدند. برای انجام SSCP از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد در سیستم الکتروفورز عمودی استفاده گردید. رنگ آمیزی ژل ها نیز با روش نیترات نقره انجام گرفت.

همچنین برای بررسی ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپهای این جایگاه ژنی با میزان سطح ایمونوگلوبولین G از رویه GLM درنرم افزار SAS و در قالب مدل آماری زیر استفاده شد:

$$Y_{ijk}=\mu+P_i+G_j+e_{ijk}$$

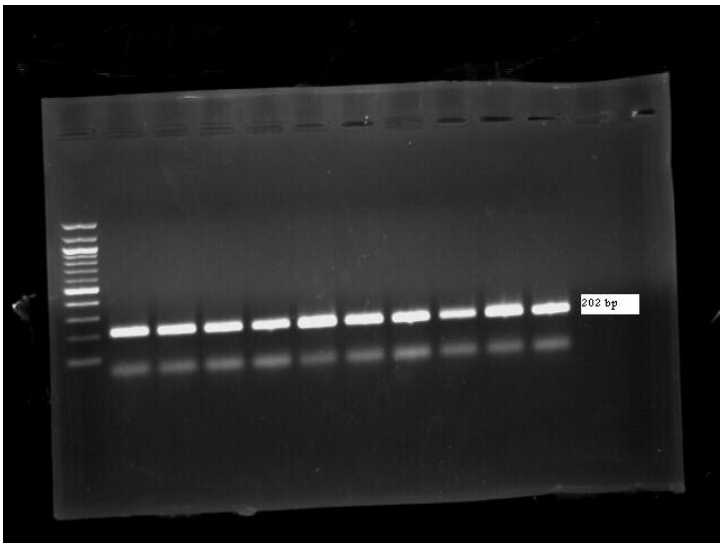
که در این مدل Y_{ijk} مقدار غلظت ایمونوگلوبولین آغوز، μ میانگین غلظت ایمونوگلوبولین آغوز در کل جمعیت، P_i دوره شیردهی حیوان، G_j ژنوتیپ جیوان در جایگاه مورد نظر و e_{ijk} اثرات باقیمانده (اشتباه آزمایشی) بود. مقایسه میانگین ژنوتیپها نیز با کمک آزمون چند دامنه ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

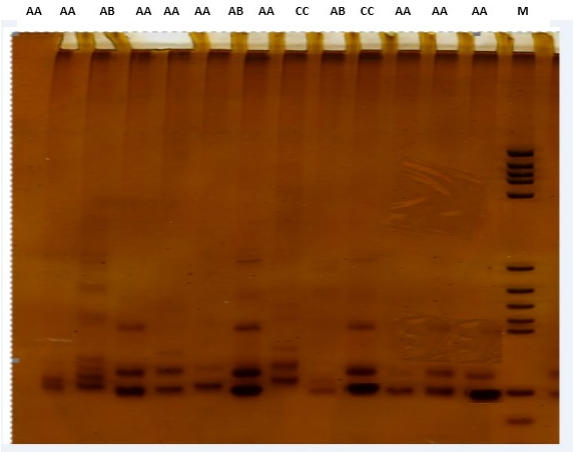
نمونه های DNA استخراج شده از ٦٣ دارای درخشندگی و وضوح بالا بر روی ژل بود که این امر غلظت بالای DNA ی استخراج شده و نیز عدم وجود آلودگی پروتئینی، RNA و عدم وجود باندهای غیر اختصاصی را نشان میداد. میانگین نسبت جذب در طول موج ٢٦٠ نانومتر به ٢٨٠ نانومتر در نمونه ها نیز حدود ٢ بود که بسیار مطلوب بود. قطعه تکثیر شده نیز در روی ژل دارای کیفیت مناسبی بود (شکل ١)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: قطعه تکثیر شده ۲۰۲ جفت بازی ژن FCGRT بر روی ژل



شکل ۲: پلی مورفیسم مشاهده شده در جایگاه ژنی FCGRT

از بین ٦٣ نمونه SSCP شده، همانگونه که در شکل ۲ آمده است، تعداد نمونه های مربوط به سه الگوی ژنوتیپی AB،AA و CC به ترتیب ۲۷، ۲۸ و ۸ راس با فراوانی ٤٣، ٤٤ و ١٣ درصد بود. نتایج آنالیز واریانس با کمک نرم افزار SAS نشان از وجود ارتباط معنی دار بین پلی مورفیسم مشاهده شده در این جایگاه با سطح ایمونوگلوبولین آغوز داشت. (p<۰/۰۱). میانگین غلظت ایمونوگلوبولین در سه الگوی مشاهده شده AA، B و C به ترتیب ٦١/٥٥، ٦٧/٣٥ و ٤٩/٢٥ نانوگرم در هر میلی لیتر بود. مقایسه این سه الگو حاکی از وجود تفاوت معنی دار در بین این سه الگو بود، بطوریکه گاوهای با الگوی B بالاترین سطح ایمونوگلوبین را در آغوز از خود نشان میدادند و گاوهای C نیز بطور معنی دار غلظت ایمونوگلوبولین G کمتری را در آغوز خود داشتند. ZHANG (۲۰۱۰) با کمک PCR-SSCP به مطالعه پروموتور ژن FCGRT در ۱۸۹ راس گاو شیری پرداختند. آنها به مطالعه ۳ بخش مختلف این ژن پرداختند و فراوانیهای ژنی مختلفی را برای این ۳ ناحیه گزارش نمودند. در ناحیه ۱ فراوانی AA، AB و BB به ترتیب ۲٥/٤٠٪، ٥٩/٢٦٪ و ١٥/٣٤٪ مشاهده کردند، در حالی که در ناحیه دوم فراوانی CC، CD و DD به ترتیب ٢٠/٦٣٪، ٥٦/٦١٪ و ٢٢/٧٥٪ بود. در ناحیه ۳ نیز فراوانی سه ژنوتیپ EE، EF و FF به ترتیب ١/٥٩٪، ١٢/١٧٪ و ٨٦/٢٤٪ بود. تجزیه تحلیل توالی نشان دهنده ۳

www.SID.ir

Archive of SID

جهش نقطه ای منفرد در نقاط تکثیر شده بود. همچنین به غیر از نقطه اول، دو نقطه دیگر در تعادل هاردی وینبرگ قرار داشتند.

Ishii-Watabe و همکاران (۲۰۱۰) تمامی مناطق اگزونی و اینترونی ژن FCGRT را در ۱۲۶ فرد ژاپنی مطالعه کردند. آنها ۳۳ ژنوتیپ مختلف را گزارش نمودند که ۱۷ تای آنها ژنوتیپهای جدید بودند. آنها ارتباط معنی داری بین پلی مورفیسم این ژن و سطح این آنتی بادی در خون این افراد پیدا نمودند.

Zhang و همکاران (۲۰۰۹) نیز هاپلوتیپهای FCGRT (کد کننده زنجیره سنگین) و ارتباط آن را با سطح ایمنوگلوبین کلستروم گاوی مورد مطالعه قرار دادند. آنها ٤ نوع SNP که در ۵ گروه هاپلوتیپی قرار داشتند را در مجموعا ٤۹ راس گاو شیری ارزیابی کردند.آنها ارتباط ژنتیکی بالایی بین هاپلوتیپ پنجم و سطح بالای ایمنوگلوبین کلستروم گزارش نمودند.

نتایج این تحقیق با نتایج Zhang و همکاران (۲۰۰۹)، که ارتباط ژنتیکی بالایی بین یکی از ۵ هاپلوتیپ مشاهده شده و سطح بالای ایمنوگلوبولین کلستروم گزارش نمودند، مطابقت دارد. همچنین ZHANG (۲۰۱۰) نیز با تحقیق به کمک PCR-SSCP بر روی پروموتور ژن FCGRT در گاو شیری فراوانیهای ژنی مختلفی را برای ۳ ناحیه مورد بررسی گزارش نمودند و در هر یک از سه ناحیه ۳ ژنوتیپ گزارش نمودند که با تحقیق حاضر همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری کلی

۵- بین پلی مورفیسم مشاهده شده در ژن FCGRT و سطح ایمونوگلوبولین G موجود در کلستروم گاوهای شیری ارتباط معنی داری بدست آمد.

٦- گاوهای دارای الگوی ژنوتیپی B دارای ایمونوگلوبولین بالاتری نسبت به دو الگوی دیگر بودند.

منابع

۱- شهسوار. ا. ۱۳۸۷. اثر جیره های دارای دانه گندم یا ذرت در قبل از زایش گاوهای شیری بر کیفیت آغوز و سلامت گوساله ها. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه ایلام.

2- Burton JL, Kennedy BW, Burnside EB, Wilkie BN, Burton JH. Variation in serum concentrations of immunoglobulins G, A, and M in Canadian Holstein-Friesian calves. J Dairy Sci 1989; 72:135–149.

3- Doleschall M, Zhao Y, Mayer B, Hammarstrom L, Kacskovics I. 2005. Isolation of the gene encoding the bovine neonatal Fc receptor. Vet Immunol Immunopathol; 108:145–150

4 -Freiberger T, B. Ravčuková , L. Grodecká. 2010. No association of FCRN promoter VNTR polymorphism with the rate of maternal–fetal IgG transfer. Volume 85, Issue 2, Pages 193–197,

5 -Gouilleux-Gruart V, H. Chapel, S. Chevret, M. Lucas, M. Malphettes, C. Fieschi. 2013. Efficiency of immunoglobulin G replacement therapy in common variable immunodeficiency: correlations with clinical phenotype and polymorphism of the neonatal Fc receptor. Clinical & Experimental Immunology. 171: 186–194.

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop