بررسی فراوانی ژنی عامل بیماری DUMPs در گله‌هاي گاو هلشتاین و بومی گیلان با استفاده از روشPCR-RFLP

- **حسین علائی:** گروه علوم‌دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: 1841
- **سیدضیاءالدین میرحسینی *:** گروه علوم‌دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق‌پستی: 1841

تاریخ دریافت: دی 1392 تاریخ پذیرش: فروردین 1393

چکیده

نقص سنتز آنزیم اوریدین مونو فسفات (DUMPs) یك بیماری ژنتیکي اتوزومی مغلوب در گاو است. جهش در این ژن باعث می‌شود که یك کدون خاتمه در پروتئین این آنزیم به‌وجود آید. امروزه با استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌توان ژن‌های مغلوب در افراد هتروزیگوت را شناسایی کرد. در این تحقیق از دو جمعیت گاو، شامل 100 راس هلشتاین پرورش یافته در شرکت سهامی دامپروری سپیدرود و 100 راس دام نگه‌داری شده در مرکز اصلاح نژاد بومی فومن واقع در استان گیلان به‌صورت تصادفی و انفرادی نمونه خون تهیه شد. DNA نمونه‌ها به‌روش نمکی بهینه یافته استخراج شده و از آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه 108 جفت بازی از اگزون5 ژن DUMPs استفاده شد. به‌منظور تشخیص و شناسایی حاملین، عمل هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی AvaI بر روی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گردید. تمامی نمونه‌ها دارای ژنوتیپ هموزیگوت غالب خالص بودند. عدم مشاهده هتروزیگوت‌ها ممکن است ناشی از برنامه‌هایی با شدت انتخاب بالا و یا کاهش بین‌المللی ژن‌های دارای نقص باشد. اما از آن‌جایی‌که شیوع دوباره نقص‌های وراثتی وجود دارد لذا ضرورت دارد که برنامه‌های غربالگری ژن‌های معیوب گسترش پیدا کند.

کلمات کلیدی: بیماری ژنتیکی، گاو بومی گیلان، DUMPs و PCR-RFLP

مقدمه

در گاو حداقل 20000 آنزیم متفاوت کشف شده است که فرآیندهایي نظیر رشد، شیردهي، تولیدمثل و غیره را امکان‌پذیر مي‌سازد. اختلال در هر یك از این آنزیم‌ها مشکلات زیادي را در پرورش گاوهاي شیرده به‌وجود می‌آورد. بیش از 200 اختلال آنزیمي در انسان منشاء ژنتیکي دارد که در این بین 7 نوع آن به‌طور شایع درگاو دیده شده است. بیماری ژنتیکی DUMPs که اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است نیز در اثر ایجاد اختلال آنزیمی به‌وجود می‌آید (Robinson و همکاران، 1993). این بیماری یك نقص ژنتیکي در گاوهاي هلشتاین بوده و در اثر ایجاد اختلال در سنتز آنزیم اوریدین مونو فسفات سنتتاز (UMPs) رخ مي‌دهد (Patel و همکاران، 2006). این آنزیم مسئول تبدیل اورتیك اسید به اوریدین مونوفسفات (UMP) مي‌باشد که براي تشکیل بازهاي پیریمیدن ضروری است (Robinson و همکاران، 1993). این نقص ژنتیکي به‌صورت یك صفت اتوزومي مغلوب انتقال مي‌یابد (Shanks و همکاران، 1984). جهش مرتبط با این بیماری در ژن UMPs شناخته شده است که باعث ایجاد یك کدون توقف در

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mirhosin@guilan.ac.ir

پروتئین ایجاد کننده این آنزیم می‌شود (Schwenger و همکاران، 1993). گوساله‌های مبتلا به DUMPs حدودا در روز چهلم بارداری دچار مرگ زودرس شده و به‌صورت نارس و مرده متولد می‌شوند (Agerholm و همکاران، 1997). از لحاظ تولید شیر گاوهای ناقل این نقص دارای تولید شیر طبیعی بوده اما از لحاظ ترکیبات شیر در گاوهای ناقل اسیداروتیک 5 تا10 برابر بیش‌تر از حد طبیعی است. آنزیم UMPs مسئول تبدیل اسیداروتیک به اوریدین مونوفسفات (UMP) می‌باشد که برای تشکیل بازهای پریمیدینی ضروری می‌باشد. از آن‌جاکه پریمیدین‌ها اجزاء ضروری و اساسی سنتز اسید نوکلئیک هستند، نقص در سنتز این آنزیم‌ها می‌تواند سنتز پریمیدین‌ها را متوقف سازد (Shanks و همکاران، 1984).

استفاده از اسپرم‌های گاو نر برتر (در صورتی‌که حامل ژن معیوب باشند) در برنامه‌های اصلاح نژادی در جمعیت‌های خالص و نیز دورگ گیری‌ها با گله‌های بومی می‌تواند فراوانی ژن مغلوب را افزایش دهد و در نتیجه عملکرد این دام‌ها را به‌دنبال داشته باشد. استفاده از روش‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی در تشخیص سریع و دقیق حامل‌ها نقش عمده‌ای دارد. در این تحقیق شناسایی ناقلین و برآورد فراوانی ژنی عامل این بیماری در جمعیت‌های گاو هلشتاین و بومی گیلان با استفاده از روشPCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

از 100 راس گاوهلشتاین پرورش یافته در شرکت سهامی دام پروری سپیدرود رشت و 100 راس گاو بومی گیلان نگه‌داری شده در ایستگاه اصلاح نژاد گاو بومی فومن واقع در استان گیلان به‌صورت تصادفی و انفرادی نمونه خون تهیه شد. با استفاده از روش نمکی بهینه یافته، از نمونه‌ها DNA - استخراج گردید (Javanrouh و همکاران، 2006). جهت تکثیر ژن UMPs از آغازگرهای رفت و برگشت با توالی زیر استفاده شد (Schwenger و همکاران، 1994):

F: 5'-GCA AAT GGC TGA AGA ACA TTC TG-3'
R: 5'-GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT-3'

اجزای مختلف واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) و غلظت‌های مختلف آن‌ها در جدول 1 مشخص شده‌اند.

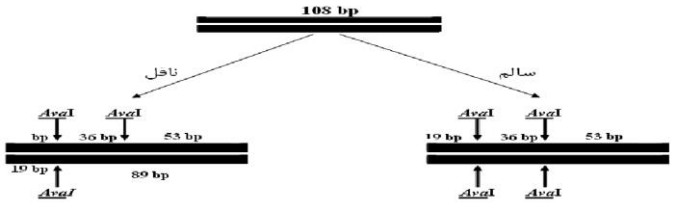
جدول 1: مخلوط واکنش PCR

مواد واکنش	غلظت نهایی
الگو DNA	50 نانوگرم/میکرولیتر
بافر PCR	1X
dNTPs	2/5 میلی‌مولار
آغازگر مستقیم	5 پیکومول/میلی‌لیتر
آغازگر معکوس	5 پیکومول/میلی‌لیتر
$MgCl_2$	1/5 میلی‌مولار
آنزیم تک پلیمراز Taq DNA polymerase	1U
آب دو بار تقطیر استریل	ــــــــ

برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز از دستگاه ترموسایکلر مدل Touchgene ساخت کمپانی Techne استفاده شد. برنامه حرارتی دستگاه به‌صورت 95 درجه سانتی‌گراد واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت 3 دقیقه، 35 سیکل (واسرشته‌سازی 94

درجه سانتی‌گراد به‌مدت30 ثانیه، اتصال آغازگر 53 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 30 ثانیه، بسط آنزیمی آغازگر 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت30 ثانیه) و بسط آنزیمی نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 7 دقیقه تنظیم گردید. با استفاده از ژل آگارز 1/5 درصد و با ولتاژ 90 ولت محصولات PCR الکتروفورز شدند. جهت هضم آنزیمی قطعه 108 جفت بازي به‌منظور تعیین ژنوتیپ-هاي ژن UMPs از آنزیم محدودگر *AvaI* استفاده گردید.

محصولات هضم آنزیمی، با استفاده از ژل آگارز 4 درصد با ولتاژ 100 ولت و زمان 1 ساعت الکتروفورز شدند. آنزیم *AvaI* داراي دو جایگاه برش بر روي ال سالم DUMPs و یک جایگاه برش بر روي ال ناقص این ژن می‌باشد، در نتیجه انتظار می‌رود که در افراد سالم با ژنوتیپ TD فقط 3 قطعه بر اثر هضم این آنزیم پدید آید (قطعات 53، 36 و 19 جفت بازي) و در افراد ناقل با ژنوتیپ DP (هتروزیگوت) نیز چهار قطعه (89، 53، 36 و 19 جفت بازي) حاصل خواهد شد. هر چند افراد بیمار در دوران جنینی می-میرند و در این مطالعه انتظار دیدن ژنوتیپ آن‌ها نبود، اما در صورت بررسی ژنوتیپ آن‌ها باید دو قطعه 89 و 19جفت بازي مشاهده گردد (شکل 1).



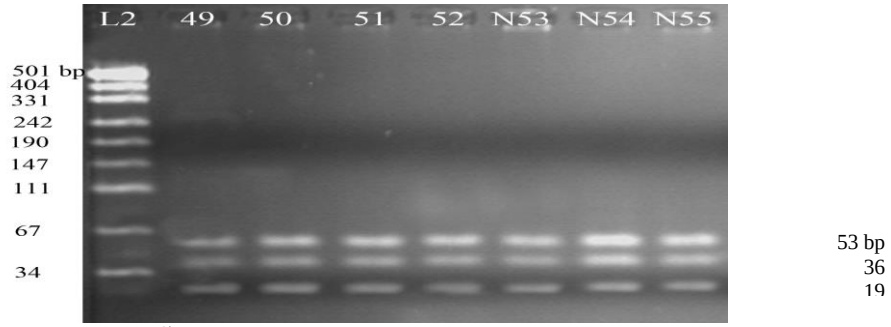
شکل1: تصویر شماتیک سایت برشی آنزیم *AvaI* روی ژن UMPs

نتایج

استخراج DNA نمونه‌ها به-خوبی انجام شد. الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز 1/5 درصد از جایگاه ژن UMPs نشان داد که قطعه 108 جفت بازی در نظر گرفته شده به‌خوبی و بدون هیچ باند غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تکثیر یافته است. صحت این مطلب با حضور نشانگر اندازه در کنار نمونه‌های الکتروفورز شده تایید گردید.

آنزیم *AvaI* دارای 2 جایگاه برش در محصولات تکثیر شده واکنش زنجیره پلیمراز است، که در نتیجه عمل هضم آنزیمی، اگر در هیچیک از 2 جایگاه جهش وجود نداشته باشد، انتظار می‌رود سه قطعه به‌طول 19، 36 و 53 نوکلئوتیدی روی ژل آگارز پس از الکتروفورز مشاهده شود (هموزیگوت غالب).

شکل2 تصویری از الکتروفورز محصولات هضم شده را نشان می‌دهد. هیچیک از دام‌های مورد بررسی در دو جمعیت ژنوتیپ هتروزیگوت (ناقل بیماری) را نشان ندادند. بر این اساس تنها یک نوع ژنوتیپ (هموزیگوت غالب) شناسایی شد.



شکل 2: الکتروفورز محصولات هضم شده توسط آنزیم *AvaI*

ستون اول از سمت چپ نشانگر اندازه، شماره‌های 52, 51, 50 و 49 نمونه‌های گاو هلشتاین و شماره‌های N55, N54 و N53 نمونه‌های گاو بومی گیلان هستند.

بحث

نتایج حاصل از بررسی فراوانی ژن UMPs نشان داد که در جمعیت‌های گاو هلشتاین و بومی مورد مطالعه در استان گیلان، ناقلی از این بیماری وجود ندارد که با نتایج به‌دست آمده توسط Oner و همکاران (2010)، Akyuz و Ertugrul (2008)، Patel و همکاران (2006) و Harlizius و همکاران (1996) مشابه است.

در هند نیز Rajesh و همکاران (2006) یک گله 642 راسی گاو هلشتاین هندی را برای شناسایی ناقلینDUMPs مورد مطالعه قرار دادند که ناقلی مشاهده نشد.

طی تحقیقی که Rahimi و همکاران (2006) در مورد 37 راس از گاوهای نر جوان نگه‌داری شده در مرکز ملی اصلاح نژاد دام ایران انجام دادند نیز موردی از وجود هتروزیگوت‌های ناقل این بیماری مشاهده نگردید.

Meydan و همکاران (2010) پژوهشی را روی 225 راس گاو هلشتاین واقع در آنکارا قسمت مرکزی آناتولی و 125 راس گاو نژاد هلشتاین شانلورفا قسمت جنوب‌شرقی آناتولی انجام دادند. در این پژوهش، نمونه‌ای از وجود ژن معیوب در جمعیت‌های مورد تحقیق مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، فراوانی الل مغلوب و هم‌چنین فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت صفر است. یک الل مغلوب کشنده از طریق انتخاب طبیعی حذف خواهد شد و حیوانات دارای ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب دیگر فرصت ادامه نسل را نخواهند داشت.

اما انتخاب طبیعی به تنهایی قادر به حذف الل‌های نهفته در جمعیت نیست. به‌همان نسبت که فراوانی الل مغلوب کم‌تر می‌شود، با مخفی شدن الل‌ها در هتروزیگوت‌ها، امکان بروز آن‌ها در افراد هموزیگوت کم‌تر شده و لذا انتخاب علیه آن‌ها مشکل‌تر خواهد شد. علاوه براین هرقدر فراوانی آلل غالب (وحشی) اضافه شود احتمال تبدیل آن به آلل مغلوب در اثر جهش افزایش می‌یابد و به‌همین جهت امکان محو کردن همبستگی آلل مغلوب وجود نخواهد داشت.

بنابراین برای کاهش الل‌های مغلوب (q) در مدت زمان قابل قبول نیاز به برنامه‌های اصلاح نژادی است. امروزه می‌توان با بهره‌مندی از روش‌های نوین تشخیص مولکولی و یا با ایجاد کیت‌های تشخیصی در زمانی کوتاه نقص‌های ژنتیکی که به‌طور مستقیم یا غیر‌مستقیم در ارتباط با صفات اقتصادی مهم بوده را تشخیص داده و دام‌های ناقل را جهت کاهش هزینه‌ها و افزایش بهره‌وری از جمعیت حذف نمود.

بررسی حاضر نشان داد که هیچ جهشی در ژن UMPs در دو جمعیت مورد مطالعه وجود ندارد. نتایج این تحقیق مشابه نتایج به‌دست آمده توسط Rajesh و همکاران (2006)

و Kaminski و همکاران (2005) بود.

در پژوهشی که Akyuz و همکاران (2008) روی گاوهای بومی و براون سوئیس ترکیه انجام دادند نیز ناقلی از این بیماری در گله‌های مورد بررسی یافت نشد. البته در برخی تحقیقات، وجود حیوانات ناقل در گله‌های هلشتاین گزارش شده است (Lin و همکاران، 2001؛ Fesus و همکاران، 1999؛ Poli و همکاران، 1996).

اکثر نتایج به‌دست آمده در این مطالعات، تایید کننده این فرضیه است که بیماری DUMPs محصولی ناخواسته از یک برنامه اصلاح نژادی بوده و منشا آن اسپرم گاوهایی مرتبط با Happy herd beautician است. در تحقیق حاضر و تحقیقات مشابه به‌خصوص روی نژادهای بومی دیگر مناطق دنیا این بیماری شناسایی نشده است. لذا نتیجه حاصل شده در این تحقیق می‌تواند صحت فرضیه فوق را تقویت نماید.

نتایج این تحقیق نشان داد که دام‌های هلشتاین پرورش یافته شرکت دام‌پروری سپیدرود استان گیلان حامل الل جهش یافته بیماری DUMPs نیستند و این خود مبین عدم استفاده از اسپرم‌های وارداتی ناقل این بیماری‌ها و یا حداقل ناموفق بودن تلقیحات انجام شده با اسپرم‌های حامل الل جهش یافته می‌باشد. هم‌چنین عدم مشاهده دام‌های حامل در گاوهای بومی تالشی نیز مبین عدم استفاده از اسپرم‌های خارجی دارای تولید بیشتر و یا عدم ورود ژن‌های ناقص به دام‌های این ایستگاه است.

از نظر آماری با قاطعیت نمی‌توان اظهار داشت که در این جمعیت‌ها الل مغلوب وجود ندارد. درصورتی‌که فراوانی الل مغلوب کم‌تر از 0/005 باشد، فراوانی هتروزیگوت‌ها که علیه آن‌ها انتخابی صورت نمی‌گیرد کم‌تر از 0/01 خواهد بود، در حالی‌که کل تعداد دام‌های آزمایش شده در هر جمعیت 100 راس بوده (یعنی کم‌تر از یک راس در 100 راس) پس امکان ظهور نداشته است. البته به‌دلیل عدم وجود گزارشی از سابقه این بیماری در جمعیت‌های گاو هلشتاین و بومی ایران می‌توان با ضریب اطمینان قابل قبولی عاری بودن این جمعیت‌ها از وجود ژن مغلوب را پذیرفت.

با توجه به روند ژنتیکی سال‌های اخیر در گاوهای بومی تقریباً تا چند سال آینده شاید نتوان گاوهای بومی خالص را به‌منظور انجام برنامه‌های اصلاح نژادی و اجرا نمودن استراتژی‌های به‌نژادی مشاهده کرد و در اثر دورگ‌گیری‌های ناخواسته و هم‌چنین برنامه‌های اصلاحی تلاقی نژادی، ژن‌های هلشتاین به این گاوها منتقل خواهد شد.

لزوم استفاده از تکنیک‌های مولکولی به‌منظور شناسایی ناقلین بیماری‌های ژنتیکی در سطح گله‌های پایه و تجاری و هم‌چنین در سطح اسپرم‌های وارداتی و تولیدی مراکز اصلاحی داخل کشور امری غیرقابل اجتناب است.

این روش‌ها به آسانی و با صرف هزینه و زمان کم‌تر توانایی بهینه شدن، تفکیک و شناسایی دام‌های حامل را دارند.

لذا باید گاوهای نر برتر انتخابی یا اسپرم‌های وارداتی و تولیدی مراکز اصلاحی داخل کشور نسبت به ناقل بودن بیماری آزمون شوند تا بتوان از آن‌ها برای اصلاح نژاد دام‌های منطقه و به اجرا درآوردن استراتژی‌های به‌نژادی بهره برد.

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه گروه پژوهشی کرم ابریشم دانشگاه گیلان به سبب فراهم نمودن امکانات پژوهشی و هم‌چنین مسئولین محترم ایستگاه تحقیقاتی اصلاح نژاد گاو بومی‌فومن، سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان و شرکت دام‌پروری سپیدرود صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. **Agerholm, J.S.; Willadsen, C.M.; Giese, T.K.; Holm, S.B.; Jensen, E.L. and Agger, J.F., 1997.** Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. Journal of

veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine. Vol. 44, pp: 551-558.

2. **Akyuz, B. and Ertugrul, O., 2008.** Detection of deficiency of Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) in Holstein and native cattle in turkey. Ankara University Faculty of Agriculture Journal of Agricultural Sciences. Vol. 55, pp: 57-60.
3. **Fesus, L.; Anton, I. and Zsolnai, A., 1999.** Marker assisted selection in livestock. DUMPS, Weaver-diseases and Citrullinaemia in cattle populations. Allatt. Es Takarm. Vol. 48, pp: 193-203.
4. **Freeman, A.R; Meghan, C.M; Machugh, D.E; Loftus, R.T. and Achukwi, M.D., 2004.** Admixture and diversity in West African cattle populations. Molec. Ecolo. Vol. 13, pp: 3477-3487.
5. **Harlizius, B.; Schober, S.; Tammen, I. and Simon, D., 1996.** Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics. Vol. 113, pp: 303-309.
6. **Javanrouh, A.; Banabazi, M.H.; Esmaeil khanian, S.; Amirinia, C.; Seyedabadi, H.R. and Emrani, H., 2006.** Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annu. Meet. Euro. Assoc. Anim. Prod. Antalya, Turkey.
7. **Kaminski, S.; Grzybowski, G.; Prusak, B. and Rusc, A., 2005.** No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. Journal of Applied Genetics. Vol. 46, No. 4, pp: 395-397.
8. **Lin, D.Y.; Huang, Y.C.; Chang, H.L.; Liaw, R.B.; Lee, S.C.; Chen, J.C.; Wu, S.C. and Wu, M.C., 2001.** DNA typing of in herited Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase in dairy cattle and beef cattle. Journal of the Chinese Society of Animal Science. Vol. 30, pp: 15-22.
9. **Meydan, H.; Yildiz, M.A. and Agerholm, J.S., 2010.** Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. Acta Veterinaria Scandinavica. pp: 52-56.
10. **Oner, Y.; Keskin, A. and Elmaci, C., 2010.** Identification of BLAD, DUMPS, Citrullinamia and factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. Vol. 5, No. 1, pp: 60-65.
11. **Patel, R.K.; Singh, K.M.; Soni, K.J.; Chauhan, J.B. and Sambasiva Rao, K.R.S., 2006.** Lack of carriers of citrullinaemia and Dumps in Indian Holstein cattle. Journal of Applied Genetics. Vol. 47, No. 3, pp: 239-242.
12. **Poli, M.A.; Dewey, R.; Semorile, L.; Lozano, M.E.; Albarino, C.G.; Romanowski, V. and Grau, O., 1996.** PCR screening for carriers of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) and uridine monophosphate synthase (DUMPS) in Argentine Holstein cattle. Zentralbl Vet. A. Vol. 43, pp: 163-168
13. **Rahimi, G.; Negate Javaremi, A. and Olek, K., 2006.** Genotyping BLAD, DUMPS and k-CSN Loci in Holstein young bulls of the national animal breeding center of Iran. Pakistan journal of biotechnological sciences. Vol. 9, No. 7, pp: 1389-1392.
14. **Rajesh Patel, K.; Krishna Singh, M.; Kalpesh Soni, J.; Jenabhai Chauhan, B. and Krothapalli Sambasiva, Rao R.S., 2006.** Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. Journal of Applied Genetics. Vol. 47, No. 3, pp: 239-242.
15. **Robinson, J.L.; Drabik, M.R.; Dombrowski, D.B. and Clark, J.H., 1983.** Consequences of UMP synthase deficiency in cattle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 80, pp: 321-323.
16. **Robinson, J.L.; Popp, R.G.; Shanks, R.D.; Oosterhof, A. and Veerkamp, J.H., 1993.** Testing for Deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein Friesian cattle of North America and Europe. Livestock Production Science. Vol. 36, No. 4, pp: 287-298.
17. **Schwenger, B.; Tammen, I. and Aurich, C., 1994.** Detection of homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. Journal of reproduction and infertility. Vol. 100, No. 2, pp: 511-514.
18. **Schwenger, B.; Schober, S. and Simon, D., 1993.** DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. Genomics. Vo1. 6, No. 1, pp: 241-244.
19. **Shanks, R.D.; Bragg, D.S.T.A. and Barton, E.P., 1989.** Uridine Monophosphate synthase of Jersey Bull. Journal of Dairy sciences. Vol. 72, No. 3, pp: 722-725.
20. **Shanks, R.D.; Dombrowski, D.B.; Harpestad, G.W. and Robinson, J.L., 1984.** Inheritance of UMP synthase in dairy cattle. Journal of heredity. Vol. 75, No. 5, pp: 337-340.