تولیدات دامی
دوره ۲۳ ■ شماره ۱ ■ بهار ۱۴۰۰
صفحه‌های ۱۱-۱
DOI: 10.22059/jap.2021.309975.623559

مقاله پژوهشی

شناسایی تنوع‌های آللی ژن‌های کمپلمان C4-A و لاکتوفرین با استفاده از فناوری iPLEX و ارتباط آن‌ها با تعداد سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین

مریم محمدنژاد[1*]، قدرت رحیمی میانجی[2]، ایوب فرهادی[3]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۳. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۱۱/۲۱

چکیده

هدف از پژوهش حاضر شناسایی تنوع‌های آللی ژن‌های C4-A و لاکتوفرین و بررسی ارتباط آن‌ها با تعداد سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین بود. بیماری ورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در گاوهای شیری است که تولید شیر را کاهش می‌دهد و هزینه‌های زیادی را به پرورش‌دهندگان تحمیل می‌کند. ژن‌های C4-A و لاکتوفرین از جمله ژن‌های تأثیرگذار در سیستم ایمنی برای مقابله با پاتوژن‌ها، عوامل میکروبی و بیماری ورم پستان محسوب می‌شوند. شمار ۳۸٤ نمونه خون از گاو هلشتاین تهیه و استخراج DNA با استفاده از روش نمکی بهینه‌یافته انجام شد. برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها از فناوری آیپلکس (iPLEX) استفاده شد. برای شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی، جایگاه‌های نشانگر C<G ;rs137485678-۱ و C<T ;rs132741478-۲ برای ژن کمپلمان C4-A و جایگاه‌های A<Grs384176726 ;-۱ و A<T ;rs445918028-۲ برای ژن لاکتوفرین انتخاب شدند. تعیین ژنوتیپ در جایگاه C<G ;rs137485678 از ژن C4-A دو آلل C و G با فراوانی‌های ۰/۵۸ و ۰/٤۲ و هم‌چنین سه ژنوتیپ CC، CG و GG به‌ترتیب با فراوانی‌های ۰/۳۱، ۰/۵۳ و ۰/۱٦ را نشان داد. در سایر جایگاه‌ها چندشکلی مشاهده نشد. تجزیه و تحلیل نشانگر- صفت وجود ارتباط معنی‌دار آماری (P<۰/۰۵) را نشان داد، به‌صورتی‌که گاوهای با ژنوتیپ CG کم‌ترین تعداد سلول‌های بدنی را داشتند. برای شناسایی هاپلوتایپ‌ها از نرم‌افزار فاز (Phase) استفاده شد. براساس نتایج این تحقیق، نشانگر C<G ;rs137485678-۱ از ژن C4-A می‌تواند به‌عنوان نشانگر ژنتیکی برای بهبود ورم پستان در گاوهای شیری مورداستفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: ژن کمپلمان C4-A، ژن لاکتوفرین، سلول‌های بدنی، فناوری آیپلکس، ورم پستان.

Identification of allelic variants of complement C4-A and Lactoferrin genes using iPLEX technique and its association with somatic cell count in Holstein cattle

Maryam Mohammadnezhad[1*], Ghodrat Rahimi Mianji[2], Ayoub Farhadi[3]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
Received: September 13, 2020 Accepted: February 9, 2021

Abstract

The aim of this study was to identify the allelic variants of C4-A and LF genes and to investigate their associations with the nunber of milk somatic cells in Holstein cows. Mastitis is one of the most common diseases in dairy cows, that reduces milk production and imposes high costs on breeders. C4-A and lactoferrin genes are amonge the genes that affect the immune system to fight pathogens, microbial agents and mastitis. 384 blood samples were prepared from Holstein cows and DNA extraction was performed using optimized salting out method. IPLEX technique was used to determine the genotype of the samples. To identify single nucleotide polymorphisms, the marker sites of 1-rs137485678; C<G and 2-rs132741478; C<T for C4-A complement gene and 1-rs384176726; A<G and 2-rs445918028; A<T were selected for the LF gene. Genotyping at 1-rs137485678; C<G locus of C4-A gene showed two C and G alleles with frequencies of 58 and 42 %, and also three genotypes CC, CG and GG with frequencies of 31, 53 and 16%, respectively. No polymorphisms were observed at the other sites. Marker-trait analysis showed a statistically significant association (P<0.05), so that cows with CG genotype had the lowest number of somatic cells. Phase software was used to identify haplotypes. Based on the results of this research, the marker rs137485678; C <G-1 of the C4-A gene can be used as a genetic marker to improve mastitis in dairy cows.

Keywords: C4A Gene, iPLEX Technique, Lactoferrin Gene, Mastitis, Somatic Cells.

* نویسنده مسئول
Email: m.mohammadnezhad69@gmail.com

۱. مقدمه

متخصصین اصلاح نژاد به پیشرفت ژنتیکی صفات مرتبط به تولید شیر اهتمام زیادی دارند، چرا که این صفات به‌طور مستقیم با سودآوری گله‌های گاو شیری ارتباط دارند [۲ و ١٤]. سوددهی گاوهای شیری علاوه بر تولید شیر، به عملکرد تولیدمثلی و سلامتی گاوها نیز بستگی دارد، بنابراین نقشه‌یابی و تعیین ویژگی‌های ژن‌های کنترل‌کننده این صفات در گاوهای شیری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد تأکید بر انتخاب براساس صفات تولیدی، باعث افزایش حساسیت گاوهای پر تولید به بیماری‌هایی چون ورم پستان می‌شود [۵]. ورم پستان یک بیماری بسیار پیچیده و شایع در گاوهای شیری است که باعث واردآمدن خسارت سنگین اقتصادی به صنعت گاو شیری می‌شود. عوامل زیادی از قبیل پاتوژن‌ها، ضعف شیوه‌های مدیریتی، عوامل ژنتیکی و وضعیت سلامت گاو شیری باعث بروز این بیماری می‌شوند [۱۷].

ورم پستان (Mastitis) یک واژه یونانی می‌باشد که از کلمه ماستوس (Mastos) به معنی پستان و ایتیس (Itis) به معنی التهاب گرفته شده است. این التهاب ممکن است بر اثر ضربه یا صدمه فیزیکی به پستان، تحریک‌های شیمیایی و عفونت‌های ایجادشده توسط میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها (متداول‌ترین نوع ورم پستان) ایجاد شود [۳]. این بیماری یک عفونت مربوط به غدد پستانی است که به‌طور عمده توسط عوامل باکتریایی ایجاد و باعث حذف گاوهای شیری پرتولید از گله می‌شود و روی کمیت و کیفیت شیر اثر نامطلوب می‌گذارد. ابتلا به ورم پستان در گاوهای شیری سبب کاهش تولید و تغییر در ترکیب شیمیایی شیر می‌شود و هم‌چنین تهدیدی برای سلامت مصرف‌کنندگان است. عفونت باکتریایی در گاو، صدمه‌دیدگی به بافت‌ها یا سایر عوامل مؤثر بر التهاب و تورم در پستان، سبب افزایش انتقال گلبول‌های سفید خون به غدد پستانی و در نتیجه بالارفتن تعداد سلول‌های بدنی (SCC: somatic cell count) در شیر می‌شوند. تعداد این سلول ها که متأثر از بیماری ورم پستان می‌باشند، بیانگر سلامت دام و کیفیت شیر تولیدی گاوها بوده و یکی از شاخص‌های مهم ارزیابی کیفیت و سلامت شیر است [۱۲ و ۱۹]. امروزه در صنعت گاو شیری، اهداف اصلاح نژاد در جهت تلاش برای بهبود عملکرد کلی صفات تولید شیر، صفات سلامتی و عملکردی گاو شیری وسیع‌تر شده است. برنامه‌های به‌نژادی مرتبط با افزایش صفات تولیدی باعث کاهش مقاومت دام به بیماری‌ها از جمله ورم پستان شده است، بنابراین انتخاب مستقیم برای مقاومت به ورم پستان از طریق کاهش تعداد سلول‌های بدنی هدف بسیار مهمی است که باید برای بهبود تولید و کیفیت شیر در نظر گرفته شود [۱۸].

بهبود صفات تولید شیر و کاهش تعداد سلول‌های بدنی (افزایش مقاومت به ورم پستان) می‌تواند از طریق شناسایی جایگاه‌های ژنی صفات کمی و مهم اقتصادی و شناخت چندشکلی ژن‌های مرتبط با صفات سلامتی و تولیدی در گاو میسر شود [٤ و ۱۳]. عواملی هم‌چون فاصله نسلی زیاد، همبستگی ژنتیکی منفی بین ورم پستان و صفات تولیدی، کندی روند ژنتیکی برای افزایش مقاومت به ورم پستان، هزینه‌های بالای نگهداری دام، هم‌چنین افزایش مقاومت پاتوژن‌ها و باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی را به‌منظور انتخاب دام‌های مقاوم به ورم پستان ضروری می‌کند [۱۷].

پژوهش‌گران زیادی نواحی مختلف ژنی و گیرنده‌های ژن‌های مؤثر بر صفات مهم اقتصادی در گاوهای شیری مثل مقاومت به ورم پستان را موردبررسی قرار داده‌اند. از ژن‌های مؤثر بر سلامت گاوهای شیری می‌توان به ژن‌های کمپلمان C4-A و لاکتوفرین اشاره کرد. ژن کمپلمان C4-A برای فعال‌سازی مسیرهای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا ضروری است. این ژن اثرات ضد باکتریایی، ضد

قارچی و آنافیلاکتیک داشته است [۲٤] و ارتباط معنی‌داری با حساسیت به ورم پستان و عفونت‌های داخل پستانی مربوط به پاتوژن‌ها دارد. نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی از جمله ویژگی‌های ایمنی و ضد میکروبی را به لاکتوفرین نسبت داده‌اند [۱۰ و ۱٦]. بنابراین استدلال می‌شود لاکتوفرین نقش مهمی در سلامت غدد پستانی داشته و می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندیدای مناسب در انتخاب برای مقاومت به ورم پستان گاو شیری درنظر گرفته شود [۱۱]. هم‌چنین این ژن نقش مهمی در پیشگیری از ورم پستان ایجادشده از طریق عفونت داخل پستانی دارد. غلظت ژن لاکتوفرین در شیر سالم کم بوده و با تعداد سلول‌های بدنی و ورم پستان ارتباط معنی‌دار مثبتی دارد [۹ و ۲۳].

در پژوهشی که به‌منظور ارتباط بین چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن کمپلمان C4-A با صفات عملکردی و سلول‌های بدنی شیر انجام گرفت سه جهش تک‌نوکلئوتیدی (1.rs 132741478: g.2994 A>G, 2.rs 134006517: g.3508 A>G, 3.rs 137485678: g.3649 G>C) از طریق توالی‌یابی DNA و PCR-RFLP در ۱۱۸۲ گاو هلشتاین چینی نشان داده شد (P<۰/۰۱) [۲۲]. در پژوهشی دیگر، پس از توالی‌یابی ژن لاکتوفرین گاو هلشتاین چینی به‌منظور شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی، در نهایت سه چندشکلی مرتبط با تعداد سلول‌های بدنی شیر با استفاده از فناوری آیپلکس (iPLEX) شناسایی شدند. هم‌چنین ارتباط بین چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی و هاپلوتایپ‌ها با تعداد سلول‌های بدنی شیر و صفات تولیدی تجزیه و تحلیل شد. نتایج تجزیه و تحلیل ارتباطی هاپلوتیپ‌ها در این پژوهش نشان داد که هاپلوتایپ‌های لاکتوفرین اثرات معنی‌داری روی همه صفات تولیدی شیر و تعداد سلول‌های بدنی داشتند [۱۱].

گاو هلشتاین یکی از برترین نژادهای گاو در مزارع پرورشی گاو شیری است که به‌دلیل تولید بالای شیر روزانه، به‌شدت در معرض ابتلا به ورم پستان است. با توجه به اثبات ارتباط ژن‌های کاندیدا با سلول‌های بدنی و مقاومت به ورم پستان، بررسی این ژن‌ها برای احتمال وجود ارتباط تنوع‌های آن‌ها با این صفات حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، شناسایی تنوع های آللی ژن‌های کمپلمان C4-A و لاکتوفرین با استفاده از روش آیپلکس و ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی از جمله تعداد سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین بود.

۲. مواد و روش‌ها

هدف از انجام این پژوهش، شناسایی تنوع‌های آللی ژن‌های کمپلمان C4-A و لاکتوفرین با استفاده از فناوری آیپلکس و بررسی ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی و سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین بود. به این منظور تعداد ٤۵۰ رأس گاو هلشتاین از مرکز شیر و گوشت مهدشت واقع در استان مازندران، شهرستان ساری به‌منظور تهیه نمونه‌های خون به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. همه گاوها حداقل یک دوره شیردهی کامل و یک شکم زایش در زمان نمونه‌گیری داشتند.

خون‌گیری از طریق ورید زیر دم و ورید پستانی، به‌مقدار هشت میلی‌لیتر از هر گاو و در لوله‌های خلأ حاوی EDTA صورت گرفت. نمونه‌ها تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در فریزر نگه‌داری شدند.

استخراج DNA از ۳۸٤ نمونه و با استفاده از روش نمکی بهینه‌شده انجام شد [۱۲]. به‌منظور تعیین کمیت DNA از روش اسپکتروفتومتری و دستگاه نانودراپ (مدل UV-1800/SHIMMADZU/، ژاپن)، هم‌چنین برای تعیین کیفیت DNA استخراج‌شده از الکتروفورز و ژل آگارز ۰/۱

درصد استفاده شد. تعیین ژنوتیپ نمونه‌های DNA با استفاده از فناوری آیپلکس در دانشگاه اوپسالا سوئد انجام شد (شکل ۱) (Aus Molan, http://www.researchgate.net/ figure/Typical-MassArray-Assay).

آیپلکس (iPLEX) فناوری پیشرو در ژنوتیپ اسنیپ است. این سیستم روشی برای تجزیه و تحلیل ژنوتیپ است که از زمان معرفی آن در سال ۱۳۷۸، به‌طور گسترده برای نقشه‌برداری دقیق، پژوهش‌های لینکاژی، مطالعات ژنومی و آزمایش‌های ژنتیکی مرتبط با اسنیپ‌های موردنظر مورداستفاده قرار می‌گیرد. Mass Array برای نقشه‌برداری خوب و پژوهش‌های تعیین ژنوتیپی با استفاده از ده‌ها تا هزاران اسنیپ بالای صدها تا هزاران نمونه ایده‌آل و مناسب است.

از دیگر مزایای این روش می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: توان عملیاتی از متوسط به بالا، توزیع منظم و ساده در سطح پلکس، دامنه‌های وسیع عملیاتی از چند صد تا ۱۰۰ هزار ژنوتیپ در هر روز، مناسب برای نقشه‌برداری ژن‌ها در مطالعات GWAS و Microarray، کیفیت بالای داده‌ها، دقت بیش از ۹۹/۷ درصد، عملکرد قابل تغییر اسپکتروچیپ (SpectroCHIP) تا بالای ۳۸٤ نمونه با یک آزمون چندگانه آیپلکس یا بالای ۳۸٤ آزمون مختلف چندگانه برای یک نمونه، شرایط واکنش واحد، جامع و یکسان برای تمام اسنیپ‌ها (www.sequenom.com/contact, 2010).

مراحل تعیین ژنوتیپ در این روش شامل انتخاب نشانگر، طراحی آزمون، طراحی پرایمر، جداسازی DNA، PCR و بسط پایه، آماده‌سازی چاهک‌ها یا اسپکتروچیپ‌ها (SpectroCHIP)، آنالیز و تجزیه و تحلیل با دستگاه MASS ARRAY با استفاده از دستگاه اسپکترومتری حجمی- نوری و یونیزاسیون لیزری می‌باشد. طراحی پرایمرها برای انجام PCR و بسط تک‌رشته‌ای به‌عنوان بخشی از مراحل تعیین ژنوتیپ، از روی توالی‌های چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) موردنظر و شماره دسترسی ژن‌ها (C4A; NC_037350.1 و LF; NC_37349.1) در NCBI با فرمت FASTA با استفاده از نرم‌افزار ADS (نسخه ۲۰) (http://agenabio.com/assay-design-suite-20- software) انجام گرفت (جدول‌های ۱، ۲ و ۳).

شکل ۱. مراحل تعیین ژنوتیپ با فناوری آیپلکس

جدول ۱. توالی ناحیه انتخابی در برگیرنده SNP برای تعیین ژنوتیپ با روش آیپلکس

ژن	شماره و نام SNP	توالی (۳'-۵')
C4-A	۱-rs137485678	TTGAGACCCTCCCACCCTGTCCCCCCTGTGGCCCCTCATGCGCACCATGTAGTAGAAGTA[C/G]GAGAA GCTCCCACTGATGCCCACGGCTTGCAGGTTTAGCTTAAGGGTCTCTCCGACTTTA
	۲-rs132741478	GGACCCCAGGTATAAGCTGCTGCTTGGTTTTGCTTAGATCCAGGGAGAAGGGAGATGACA[C/T]GAAA CGCCAGGACGTGAGCTCTGCCTCCTCCATCTCTCCTCCTGCAAGATACAGGATGGA
لاکتوفرین	۱-rs384176726	CAGAACGAGCGCAGGTGGCAGAGCCTTCGTTCCGGAGTCGCCCCAGGACCCCAGCCATGA[A/G]GCTC TTCGTCCCCGCCCTGCTGTCCCTTGGAGCCCTTGGTGAGTGCAGGTATGAGTGGGG
	۲-rs445918028	TGGACCAGCTGCAAGGCCGGAAGTCCTGCCATACGGGCCTTGGCAGGTCCGCTGGGTGGA[A/T]CATC CCTATGGGAATCCTTCGCCCGTACTTGAGCTGGACAGAGTCACTCGAGCCCCTCCA

جدول ۲. توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای شناسایی SNP در جایگاه کمپلمان C4-A

ژن	شماره و نام SNP	توالی پرایمر (۳'-۵')	دمای TM (درجه سانتی‌گراد)	اندازه پرایمرها (نوکلئوتید)
C4-A	۱-rs137485678; C<G	F: ACGTTGGATGCTCATGCGCACCATGTAGTA R:ACGTTGGATGTAAGCTAAACCTGCAAGCCG	۵۲/۲	۸۹
	۲- rs132741478; C<T	F:ACGTTGGATGTGCTTAGATCCAGGGAGAAG R:ACGTTGGATGATCTTGCAGGAGGAGAGATG	٤۷/۵	۱۰۱

جدول ۳. توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای شناسایی SNP در جایگاه لاکتوفرین

ژن	شماره و نام SNP	توالی پرایمر (۳'-۵')	دمای TM (درجه سانتی‌گراد)	اندازه پرایمرها (نوکلئوتید)
لاکتوفرین	۱- ; A<Grs384176726	F:ACGTTGGATGAGAGCCTTCGTTCCGGAGTC R:ACGTTGGATGTCATACCTGCACTCACCAAG	۵۹/۷	۱۱٦
	۲- rs445918028; A<T	F:ACGTTGGATGTCTGTCCAGCTCAAGTACGG R:ACGTTGGATGAGTCCTGCCATACGGGCCTT	٤۵/۹	۱۰۲

برای محاسبه فراوانی آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها و دیگر شاخص‌های ژنتیکی شامل، تعداد آلل‌های مشاهده‌شده (na)، شاخص نئی (Nei)، شاخص اطلاعات شانون (I)، میانگین هتروزیگوسیتی (H) و تعداد آلل‌های مؤثر (ne) از نرم‌افزار Popgene (نسخه ۳/۲) و برای شناسایی هاپلوتایپ‌ها از نرم‌افزار Phase استفاده شد. قبل از آنالیز داده‌ها تعداد سلول‌های بدنی با استفاده از رابطه (۱) نرمال و به اسکور سلول‌های بدنی (SCS) تبدیل شدند.

رابطه (۱) $SCS = 3 + \log2(n)$

در این رابطه، n، تعداد سلول‌های بدنی؛ سه عدد ثابت بدنی شیر می‌باشد. از لگاریتم در پایه دو برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) و رویه مختلط برای رابطه (۲) تجزیه شدند.

رابطه (۲) $Y_{ijk} = \mu + SNP_i + animal_j + S_k + e_{ijkl}$

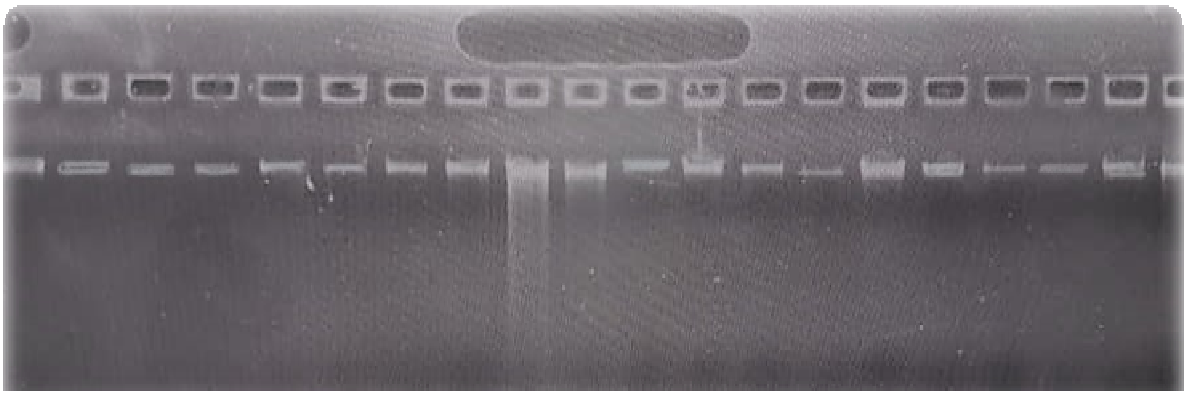
در این رابطه، Y_{ijk}، مقدار فنوتیپ مشاهده‌شده برای هر صفت؛ μ، میانگین صفت موردنظر در جامعه؛ SNP_i، اثر iامین SNP می‌باشد. هم‌چنین $animal_j$، اثر jامین حیوان؛ S_k، اثرات ثابت که با توجه به رکوردها وارد مدل شده است (فصل زایش، شکم زایش، سن زایش) و e_{ijkl}، اثر خطا می‌باشد.

۳. نتایج و بحث

استخراج DNA از ۳۸٤ نمونه خون گاو هلشتاین با استفاده از روش نمکی بهینه‌یافته انجام شد (شکل ۲). نمونه‌ها با استفاده از فناوری آیپلکس در دو جایگاه rs137485678; C<G و rs132741478; C<T از اگزون ٤۱ ژن کمپلمان C4-A و دو جایگاه A/Grs384176726 و

rs445918028; A<T از اگزون ۱۷ ژن لاکتوفرین تعیین ژنوتیپ شدند. در ویرایش داده‌ها، ۱۳٦ نمونه به‌دلیل عدم تعیین ژنوتیپ حذف و تجزیه و تحلیل داده‌ها بر مبنای ۲۱۲ نمونه انجام گرفت (جدول ٤). با توجه به این‌که در جایگاه rs137485678; C<G ژن کمپلمان C4-A چندشکلی مشاهده شد، محاسبه شاخصه‌های ژنتیکی تنها برای این جایگاه انجام گرفت.

در جایگاه rs137485678; C<G از ژن C4-A دو آلل C و G به‌ترتیب با فراوانی ۰/۵۸ و ۰/٤۲ و سه ژنوتیپ CC، CG و GG به‌ترتیب با فراوانی ۰/۳۱، ۰/۵۳ و ۰/۱٦ شناسایی شدند. بیش‌ترین فراوانی آللی و ژنوتیپی در این جایگاه به‌ترتیب مربوط به آلل C و ژنوتیپ هتروزیگوت CG بود. شاخص نئی (Nei) و شاخص اطلاعات شانون (I) برای این SNP به‌ترتیب ۰/٤۹ و ۰/٦۸ و میانگین هتروزیگوسیتی برابر با ۰/٤۹ برآورد شد. شاخص شانون که معیاری از تنوع ژنتیکی است در این جایگاه نسبتا بالا بود. تعداد آلل‌های مؤثر و مشاهده‌شده در این جایگاه به‌ترتیب برابر با ۱/۹٦ و ۲/۰۰ برآورد شدند (جدول ۵).



شکل ۲. نمونه DNA استخراج‌شده به روش نمکی بهینه‌یافته

جدول ٤. داده‌های توصیفی مربوط به صفات تولید شیر و سلول‌های بدنی در گاو هلشتاین

پارامترها	شیر کل (کیلوگرم)	چربی (درصد)	پروتئین (درصد)	سلول‌های بدنی (تعداد در هر کیلوگرم شیر)
تعداد	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲	۲۱۲
میانگین	۳۲	۲/۹۰	۳/۲۸	۸۵۸
حداقل	۲۰	۲/۷۳	۲/۷۱	۲٤
حداکثر	٤۸/۷۵	۵/۲۷	۳/٦۷	۳۱۷۸

جدول ۵. برآورد شاخصه‌های ژنتیکی در جایگاه rs137485678; C<G از ژن کمپلمان C4-A

نام جایگاه	وفور آللی (درصد)		وفور ژنوتیپی (درصد)			na (تعداد)	ne (تعداد)	I (درصد)	Nei (درصد)	H (درصد)
rs137485678; C<G	C	G	GG	CG	CC	-	-	-	-	-
	۰/۵۸	۰/٤۲	۰/۱٦	۰/۵۳	۰/۳۱	۲	۲	۰/٦۸	۰/٤۹	۰/٤۹

na: تعداد آلل‌های مشاهده‌شده. na: تعداد آلل‌های مؤثر. I: شاخص اطلاعات شانون. Nei: شاخص نئی. H: هتروزیگوسیتی.

جدول ٦. مقایسه صفات مرتبط با تولید شیر و سلول‌های بدنی بین ژنوتیپ‌های مختلف

ژن	جایگاه	ژنوتیپ (تعداد)	میانگین تولید شیر (کیلوگرم± خطای معیار)	چربی شیر (درصد± خطای معیار)	پروتئین شیر (درصد± خطای معیار)	سلول‌های بدنی (تعداد در هر کیلوگرم شیر± خطای معیار)
C4-A	rs137485678; C<G	CC ٦٤	٣٠/٨٦±٢/٦١	٤/٤٠±٠/١٧	٣/٢٤±٠/٠٦	٣٠٣/١٣±١٤٢/٥٤ab
		CG ١٠٨	٢٩/٩٨±٠/٥٧	٣/٩٥±٠/٠٣	٣/١٩±٠/٠١	٢٦٦/٨٩±٣١/٥٢a
		GG ٣٣	٣٣/٤٣±٢/٢٦	٤/٠٠±٠/١٥	٣/١٣±٠/٠٥	٧٥٤/٠٠±١٢٣/٤٤b
سطح‌معنی‌داری			٠/٥٠٧٧	٠/٠٩٥٧	٠/١٧٢١	٠/٠٠٢٥

a-b: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌دار است (P<٠/٠٥).

تجزیه و تحلیل ارتباط بین نشانگر- صفت برای نشانگر rs137485678; C<G از ژن C4-A، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها با تعداد سلول‌های بدنی مشاهده شد (P<٠/٠٥)، به‌طوری‌که ژنوتیپ CG کم‌ترین و ژنوتیپ GG بیش‌ترین تعداد سلول‌های بدنی را نشان دادند (جدول ٦). نتایج حاصل از این پژوهش با گزارش‌های دیگر [٢٢] مطابقت داشت.

برای شناسایی هاپلوتایپ‌های مربوط به نشانگر rs137485678; C<G از ژن C4-A از نرم‌افزار فاز (Phase) استفاده شد. در مجموع سه هاپلوژنوتیپ CC/CC، CC/CG و CG/CG مشاهده شد. اثر هاپلوتایپ‌ها بر تعداد سلول‌های بدنی و صفات تولیدی (مقدار تولید شیر، پروتئین و چربی شیر) بررسی شد. اثر جایگاه‌های هاپلوئیدی بر صفات تولید و تعداد سلول‌های بدنی شیر معنی‌دار نبود، اما روی صفات چربی و پروتئین شیر تأثیر معنی‌دار داشت. به‌طوری‌که گاوهای با هاپلوژنوتیپ CC/CC بیش‌ترین میزان چربی و پروتئین و گاوهای با هاپلوژنوتیپ CG/CG کم‌ترین میزان پروتئین و چربی شیر را در برداشتند (جدول ٧).

پروتئین مکمل C4 (complement component 4) یک جزو غیرآنزیمی C3 و C5 می‌باشد که برای مسیرهای فعال‌سازی لکتین ضروری است و نقش مهمی در دفاع میزبان دارد. اتصال C4 به ایمونوگلوبولین‌ها و ساختارهای ایمنی باعث افزایش فعالیت سیستم ایمنی می‌شود. C4 جزء ضروری فعال‌سازی پاسخ ایمنی هومورال است که کمبود یا میزان بیش از حد آن می‌تواند روی سیستم ایمنی فرد تأثیر بگذارد. کمبود C4 ممکن است باعث نقص در عملکرد سیستم ایمنی، اختلال در حافظه سلول‌های بنیادی و کاهش مقاومت در برابر عفونت‌های باکتریایی و ویروسی شود.

وجود C4 موجب فعال‌سازی مسیرهای ایمنی و تشدید پاسخ به التهاب در بافت‌ها می‌گردد. این ژن در انسان دو ایزوتایپ C4A و C4B دارد، درحالی‌که در گاو تنها ژن C4A گزارش شده است. ژن C4A گاوی ارتباط معنی‌داری با عفونت‌های داخل پستانی مربوط به پاتوژن‌ها دارد. کبد منبع اصلی C4 و عضو ویژه‌ای است که سنتز و ترشح C4A و C4B را به گردش می‌اندازد اما در بسیاری از محل‌های خارج از کبد نیز مقادیر متوسطی C4 برای دفاع وجود دارد.

مطالعات نشان داده است که ژن C4A گاوی، در قلب، کبد، طحال، ریه، کلیه، عضله، زبان و غده پستان گاو شیری بیان می‌شود، به‌علاوه بیان ژن C4A در بافت غده پستانی سالم و آلوده به ورم پستان متفاوت است. در زمان ابتلا به ورم پستان بیان ژن C4A افزایش می‌یابد [٢٠].

جدول ۷. مقایسه صفات مرتبط با تولید شیر و سلول‌های بدنی بین هاپلوتیپ‌های مختلف

ژن	جایگاه	هاپلوتیپ (تعداد)		میانگین تولید شیر (کیلوگرم ± خطای معیار)	چربی شیر (درصد ± خطای معیار)	پروتئین شیر (درصد ± خطای معیار)	سلول‌های بدنی (تعداد در هر کیلوگرم شیر ± خطای معیار)
C4-A	rs137485678; C<G	٦٥	CC/CC	۲۹/۳۳±۰/۹۷	۳/۹۹±۰/۰٦	۳/۲٤±۰/۰۲	۲٦۸/۲۰±٥٤/٦٤
		۱۱۳	CC/CG	۳۰/۳٥±۰/۷٤	۳/۹۷±۰/۰٥	۳/۱۸±۰/۰۱	۲۸۹/۷۰±٤۲/۰۰
		۳۳	CG/CG	۳۱/٤۷±۱/۳۸	۳/۹۰±۰/۰۹	۳/۱۳±۰/۰۳	۳۹٤/٤۳±۷۷/۸۸
سطح‌معنی‌داری				۰/٦۳۷۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/٦۱۱۲

در گاوها رسوب C4 در شیر آلوده و عفونی نسبت به شیر غده پستانی سالم افزایش می‌یابد. ورم پستان فراوانی ژن C4A را در پستان آلوده به اشریشیاکلای تغییر می‌دهد که به رابطه بین ژن C4A و مقاومت در برابر ورم پستان در گاوهای شیری اشاره دارد. این بیماری باعث افزایش بیان mRNA ژن C4A در پستان‌های آلوده می‌شود. C4A به‌طور مؤثر یک پیوند کووالانسی با آمینواسیدهای حاوی آنتی‌ژن‌ها ایجاد می‌کند. این نتایج اثر معنی‌دار C4A را در دفاع سیستمیک و ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن‌های باکتریایی مختلف و ارتباط بین ژن C4A و مقاومت به ورم پستان را بیان می‌کند [٦].

در پژوهش حاضر در جایگاه rs132741478; C<T از ژن کمپلمان C4-A چندشکلی مشاهده نشد که با گزارش‌های دیگر [۲۲] مطابقت نداشت. نتایج حاصل از تجزیه تحلیل آماری نشان داد که چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی موردمطالعه از ژن C4-A به‌جز سلول‌های بدنی شیر (P<۰/۰٥)، تأثیر معنی‌داری بر صفات مقدار تولید شیر، درصد چربی و درصد پروتئین شیر نداشت. علت معنی‌دارنشدن این جایگاه از لحاظ آماری با سایر صفات تولیدی می‌تواند احتمالاً به‌دلیل کم‌بودن تعداد نمونه باشد یا این‌که صفات تولیدی موردمطالعه ممکن است متأثر از ژن‌های دیگری از سیستم ایمنی علاوه بر ژن C4-A باشند. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که گاوهای دارای ژنوتیپ‌های CG و GG به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تعداد سلول بدنی در شیر تولیدی را داشتند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که آلل‌های موجود در جایگاه rs137485678; C<G ممکن است با مقاومت به ورم پستان در گاوهای هلشتاین همبستگی داشته باشند. در نتیجه با انجام پژوهش‌های بیش‌تر و با استفاده از نمونه‌های با اندازه بزرگ‌تر در این جایگاه می‌توان ضمن دست‌یابی به نتایج قابل‌قبول، نسبت به استفاده از این جایگاه نشانگری برای انتخاب دام‌های با مقاومت بیش‌تر در مقابل بیماری ورم پستان اقدام نمود.

نتایج حاصل از آنالیز هاپلوتیپ‌ها نشان داد که مقدار تولید شیر و تعداد سلول‌های بدنی از لحاظ آماری هیچ تفاوت معنی‌داری با هم ندارند. در پژوهش حاضر مقدار چربی شیر در بین هاپلوتایپ‌های مختلف از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری داشتند. این یافته‌ها با نتایج پژوهش‌های [۲۲] و [۱٥] مطابقت نداشت. در مقدار درصد پروتئین شیر بین هاپلوتیپ‌های مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده شد که با نتایج پژوهش [۲۲] مطابقت دارد. گاوهای دارای هاپلوتیپ CC/CC مقدار درصد پروتئین بیش‌تری در شیر نسبت به سایر گاوها داشتند.

در پژوهشی دیگر [۲۱]، در دو جایگاه rs137485678; C>G-۱ و rs132741478; C<T-۲ از ژن کمپلمان C4-A

چندشکلی مشاهده گردید، که این نتیجه برای پژوهش حاضر مشاهده چندشکلی در جایگاه اول موردبررسی و عدم مشاهده چندشکلی برای جایگاه دوم از این ژن بود. در پژوهش [۲۱] در جایگاه rs137485678; C<G-۱ گاوهای حاوی ژنوتیپ هموزیگوت CG دارای کم‌ترین تعداد سلول‌های بدنی بودند که با پژوهش حاضر مطابقت دارد. هم‌چنین گاوهای دارای ژنوتیپ‌های CG و CC به‌ترتیب دارای بیش‌ترین میزان پروتئین و تولید شیر بودند، ولی در پژوهش حاضر ژنوتیپ‌های CC و GG به‌ترتیب بیش‌ترین میزان پروتئین و تولید شیر را دارا می‌باشند که با نتایج پژوهش [۲۱] مطابقت ندارد. هم‌چنین براساس نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش [۷] در جایگاه rs132741478; C<T-۲ از ژن کمپلمان C4-A گاوی می‌تواند فعال‌سازی مسیر مقاومت علیه عوامل بیماری‌زا را تنظیم کند و با مقاومت به ورم پستان مرتبط است که با نتایج پژوهش حاضر (مبنی بر عدم مشاهده چندشکلی در این جایگاه) هم‌خوانی ندارد.

هم‌چنین هر دو جایگاه A<Grs384176726 و rs445918028; A<T از ژن لاکتوفرین در جمعیت موردمطالعه در پژوهش حاضر، دارای آلل‌های یکسان بوده و هیچ‌گونه چندشکلی در آن‌ها مشاهده نشد.

اگرچه نمی‌توان به‌طور قاطع نتیجه‌گیری نمود که این جایگاه در سایر نژادهای گاو و یا در گاوهای نژاد هلشتاین با تعداد نمونه‌های بیش‌تر نتیجه مشابه با پژوهش حاضر به‌دست آید. بنابراین تأیید این نتیجه نیاز به بررسی بیش‌تری دارد.

در پژوهشی ارتباط چندشکلی‌ها در اینترون شش ژن لاکتوفرین با تعداد سلول‌های بدنی شیر و ورم پستان در ۱۲۱ رأس گاو هلشتاین در ایران موردبررسی قرار گرفت. آنالیز ارتباط بین نشانگر- صفات، نشان داد که جایگاه نشانگر EcoRI در این ژن به‌طور معنی‌داری با تعداد سلول‌های بدنی در ارتباط است [۸]. در پژوهشی دیگر چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن لاکتوفرین و ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی و تولیدمثلی در ٤٠٤ رأس گاو هلشتاین ایرانی دو آلل A و B و دو ژنوتیپ AA و AB در اینترون شش ژن لاکتوفرین شناسایی کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که گاوهای دارای ژنوتیپ AB در مقایسه با ژنوتیپ AA به‌طور معنی‌داری دارای چربی و تعداد سلول بدنی بالاتری بودند [۱]. هم‌چنین در پژوهشی دیگر پروموتر ژن لاکتوفرین در گاو هلشتاین چینی به‌منظور شناسایی SNPها در ٨٦٦ رأس گاو با استفاده از فناوری آیپلکس تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج حاصل از این پژوهش، ارتباط بین SNPها و هاپلوتایپ‌ها با تعداد سلول‌های بدنی شیر و صفات تولیدی را نشان داد [۱۱].

یکی از راه‌کارهای افزایش مقاومت در برابر بیماری ورم پستان و بهبود در ترکیبات شیر در گاوهای شیری، انتخاب گاوهایی است که تعداد سلول‌های بدنی کم‌تری دارند. نقش بارز و اثر مفید آلل‌های ژن کمپلمان C4-A در فعال‌سازی مسیرهای مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، امکان استفاده از این ژن را در برنامه‌های اصلاحی مقاومت به عفونت و بیماری ورم پستان در گله گاوهای شیری به‌ویژه نژاد هلشتاین میسر خواهد کرد. در مجموع، انجام مطالعاتی از این دست با تعداد نمونه‌های بیش‌تر و جمع‌آوری اطلاعات اساسی به‌منظور طراحی برنامه‌های اصلاحی، می‌تواند به بالابردن بهره‌وری و درنهایت بهبود تولیدات گاوهای شیری و سلامتی آن منجر شود. هم‌چنین بررسی نواحی و جایگاه‌های دیگر ژن‌های موردمطالعه در این پژوهش و یا ژن‌های دیگر شناسایی‌شده مرتبط با مقاومت به ورم پستان و صفات تولیدی با استفاده از فناوری آیپلکس می‌تواند به یک نتیجه‌گیری قاطع و منسجم در این زمینه منجر شود.

٤. تشکر و قدر دانی

از مدیریت محترم مجموعه شیر و گوشت مهدشت ساری، به‌خاطر حمایت‌های ارزنده ایشان در جمع‌آوری داده‌ها و تهیه نمونه‌های این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

٥. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

٦. منابع مورداستفاده

1. Asadollahpour Nanaei H, Ansari Mahyari S and Edriss MA (2016) Single nucleotide polymorphism of the lactoferrin gene and its association with milk production and reproduction traits in Iranian Holstein cattle. Journal of Livestock Science and Technologies, 4 (1): 71-76. (In Persian)
2. Avanus K and Altinel A (2017) Comparison of allele-specific PCR, created restriction-site PCR, and PCR with primer-introduced restriction analysis methods used for screening complex vertebral malformation carriers in Holstein cattle. Journal of Veterinary Science, 18 (4): 465-470.
3. Barlow J (2011) Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. Journal of Mammary Gland Biology, 16 (4): 383-407.
4. Cecchinato A, Chessa S, Ribeca C, Cipolat-Gotet C, Bobbo T, Casellas J and Bittante G (2015) Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. Journal of Animal Science, 9(7): 1104-1112.
5. Cho CI, Alam TJ, Choy JG, Choi SS and Cho KH (2015) Models for estimating genetic parameters of milk production traits using random regression models in Korean Holstein cattle. Asian-Australas Journal of Animal Science, 29 (5): 607-614.
6. Gunther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Gunther J, Koczan D, Yang W, Nurnberg G, Repsilber D, Schuberth H-J, Park Z, Maqbool N, Molenaar A and Seyfert S (2009). Assessment of the immune capacity of mammary epithelial cells: comparison with mammary tissue after challenge with Escherichia coli. Veterinary Research. 40(4): 31.
7. Guerra-Junior G, Grumach AS, de Lemos-Marini SHV, Kirschfink M, Neto AC, de Araujo M and Mello MPD (2008) Complement 4 phenotypes and genotypes in Brazilian patients with classical 21- hydroxylase deficiency. Clinical and Experimental Immunology, 155(2): 182-188.
8. Hemati Doust V, Rahimi Mianji G and Farhadi A (2013) Association between bovine lactoferrin gene variant and somatic cell count in milk based on EcoRI restriction site. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 46: 62-65. (In Persian)
9. Huang J, Wang H, Wang C, Li J, Li Q, Hou M and Zhong J (2010) Single nucleotide polymorphisms, haplotypes and combined genotypes of lactoferrin gene and their associations with mastitis in Chinese Holstein cattle. Molecular Biology Reports, 37: 477-483.
10. Legrand D and Mazurier J (2010) A critical review of the roles of host lactoferrin in immunity. Biometals, 23: 365-376.
11. Mao Y, Zhu X, Xing Sh, Zhang M, Zhang H, Wang X, Karrow N, Yang l and Yang Zh (2015) Polymorphisms in the promoter region of the bovine lactoferrin gene influence milk somatic cell score and milk production traits in Chinese Holstein cows. Research in Veterinary Science, 103: 107-112.
12. Miller SA, Dykeys DD and Plesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acid Research, 16: 1215-1220.
13. Musayeva K, Sederevicius A, Zelvyte R, Monkeviciene I, Beliavska AD and Garbenyte Z (2018) Lactoferrin and immunogl obulin content in cow milk in relation to somatic cell count and number of lactations. Veterinarija IR Zootechnika, 76 (98).
14. Naserkheil M, Miraie-Ashtiani SR, Nejati-Javaremi A, Son J and Lee D (2016) Random regression models using Legendre polynomials to estimate genetic parameters for Test-day milk protein yields in Iranian Holstein dairy cattle. Asian-Australas Journal Animal Science, 29(12): 1682-1687. (In Persian)
15. Needs EC and Anderson M(1984) Lipid composition of milks from cows with experimentally induced mastitis. Journal of Dairy Science Researche, 51: 239-249.
16. Ujita A, Alberto Negrao J, Vercesi Filho AE, Rabelo Fernandes A and El Faro L (2019) Milk lactoferrin and milk constituents in dairy Gyr heifers. Livestock Science, 226: 78-92.

17. Verbreke J, Poucke MV, Peelman L, Piepers S and Vliegher SD (2014) Associations between CXCR1 polymorphisms and pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis, test-day somatic cell count, and test-day milk yield. Journal of Dairy Science, 97(79): 27-39.
18. Viale E, Tiezzi F, Maretto M, De Marchi M, Penasa M and Cassandro M (2017) Association of candidate gene polymorphisms with milk technological traits, yield, composition, and somatic cell score in Italian Holstein-Friesian sires. Journal of Dairy Science, 100(9): 7271-17281.
19. Wang X, Zhong j, Gao Y, Ju Z and Huang J (2014) A SNP in intron 8 of CD46 causes a novel transcript associated with mastitis in Holsteins. BMC Genomics, 630(15): 1-11.
20. Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M, Jones KN, Shu Y, Kitzmiller K, Blanchong CA, McBride KL, Higgins GC, Rennebohm RM, Rice RR, Hackshaw KV, Roubey RA, Grossman JM, Tsao BP, Birmingham DJ, Rovin BH, Hebert LA, and Yu CY (2007). Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. American Journal of Human Genetics, 80: 1037-1054.
21. Yanga BY, Li AQ, Jua Z, Huanga J, Zhoua L, Li AR, Li AJ, Shib F, Zhonga J and Wanga CH (2011) Three novel single-nucleotide polymorphisms of complement component 4 gene (C4A) in Chinese Holstein cattle and their associations with milk performance traits and CH50. G Model Veterinary Immunology and Immunopathology, 145(1-2): 223-232
22. Yang YY, Huang JM, Ju1 ZH, Li1 QL, Zhou1 L, Li1 JB (2012) Increased expression of a novel splice variant of the complement component 4 (C4A) gene in mastitis-infected dairy cattle. Genetics and Molecular Research, 11(3): 2909-2916.
23. Zabolewicz T, Brym P, Olenski K, Suchocki T, Malewski T, Szydam J and Kaminski S (2012) Polymorphism within TATA box of bovine lactoferrin gene and its association with performance traits in Holstein cattle. Journal of Livestock Science, 149(3): 267-274.
24. Zipfel PF and Reuter M (2009) Complement activation products C3a and C4a as endogenous antimicrobial peptides. International Journal of Peptide Research and Therapeutic, 15(2): 87-95.