نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۹، تابستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۱۹۱~۲۰۸

ارتباط چندشکلی های تک نوکلئوتیدی ژن BRCA1 با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین

- **مریم کرمی** (نویسنده مسئول)
دانشجوی دکتری رشته ژنتیک اصلاح نژاد دام دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
- **سیدعباس رأفت**
عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز
- **غلامعلی مقدم**
عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز
- **جلیل شجاع غیاث**
عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز
- **آرش جوانمرد**
عضو هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : آذر ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۹۹۴۷۶۸۰
Email: PhD.karami@ramin.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22092/ asj.2017.109862.1417

چکیده

با استفاده از برنامه‌های اصلاح ژنتیکی می‌توان مقاومت نسبت به بیماری‌ها را در حیوانات افزایش داد. در انتخاب ژنتیکی علیه بیماری ورم پستان در گاوهای شیری از چندشکلی ژن کاندیدا استفاده می شود. چندشکلی ژن کاندیدا، برای یافتن ارتباط میان SNP با فنوتیپ حیوان و بویژه استفاده از آن در برنامه انتخاب به کمک نشانگر است. بدین منظور وجود چندشکلی اگزون ۹ ژن BRCA1 در ٦٠ نمونه از گاوهای هلشتاین ایرانی با استفاده از روش PCR-RFLP بررسی شد، که سه آلل مختلف در این بررسی شناسایی شدند. چندشکلی در جایگاه ٤٦١٢٦+ از ژن BRCA1 با جهش G-A آشکار شد. در جمعیت مورد نمونه برداری فراوانی‌های ژنوتیپی به ترتیب برای سه نوع ترکیب ژنی با نامگذاری KK، KL وLL معادل ۰/۲۷، ۰/٤۳ و۰/۳۰ و دو آللی K وL برابر ۰/٤۸ و۰/٥۲ بدست آمد. برای مطالعه ارتباط ژنوتیپ و رکوردهای حاصل از شمارش سلول‌های بدنی از رویه GLM و رگرسیون لجستیک استفاده شد. افراد دارای ژنوتیپ KK به طور معنی‌داری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر میزان سلول‌های بدنی کمتری داشتند. نتایج نشان داد که جایگاه مورد نظر در ژن BRCA1 به عنوان یک ژن مؤثر در مقاومت به ورم پستان می‌تواند در استراتژی‌های انتخاب به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. چنین به نظر می‌رسد که استفاده از تعداد نمونه بیشتر و بررسی ژن‌های کاندیدای دیگر می تواند برای دست یافتن به آزمونی با دقت بالاتر برای شناسایی حیوانات حساس و مقاوم به ورم پستان مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلل، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گاو هلشتاین، ورم پستان، ژن BRCA1

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 119 pp: 191-208

The association between single nucleotide polymorphisms of BRCA1 gene with mastitis in Holstein cattle

By: Maryam Karami[1*], Seyed Abbas Rafat[2], Gholamali Moghaddam[2], Jalil Shodja[2], Arash Javanmard[2]

1-PhD Student for Animal Breeding and Genetics Department of Animal Science, Khzestan Agricultural Science and Natural Resources University

2- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

Received: February 2017 **Accepted: November 2017**

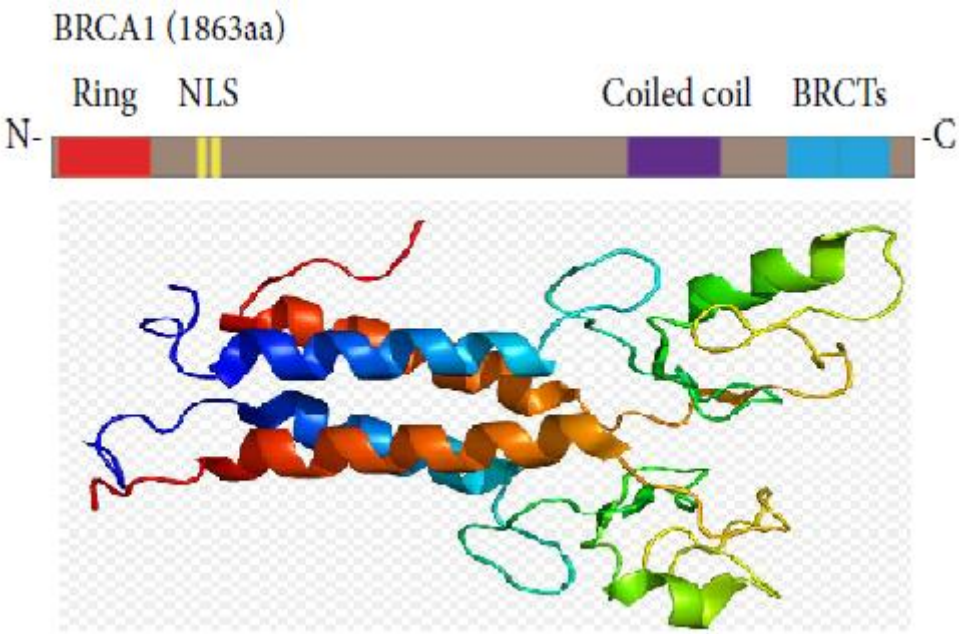
Enhancing disease resistance in animal production can be achieved by genetic improvement programs. Candidate gene polymorphism is one of the potential approaches for search of association between SNP within this gene phenotype of animals, particularly in Marker Assisted Selection (MAS) for mastitis of large dairy cattle populations. Polymorphism of exon 9 of the BRCA1 gene was investigated by the PCR-RFLP method in 60 Iranian Holstein cattle. In this study, 3 different alleles were recognized. Polymerase chain reaction-restricted fragment length polymorphism method was used to amplify, digestion and electrophoresis for a 219 base pair of bovine BRCA1 gene. A polymorphism was revealed by G-A single nucleotide polymorphism in +46126 position of BRCA1 gene. Observed genotype frequencies for KK, KL, LL were 0.27, 0.43 and 0.30 respectively, and allele frequencies for observed K and L allele were 0.48 and 0.52 accordingly. For analysis of variance, normality test and transformation of raw data for SSC records was performed based on previous main reports and literature reviews. GLM and logistic regression procedure was used for association study between genotype and collected phenotype. As a final message of the present report, KK genotype was showed significantly affect SCC data and has tendency for low SCC score than other two genotypes. The results of present study indicated BRCA1 gene as an effective candidate gene could be benefit for mastitis resistant in Marker Assisted Selection strategies in dairy cattle. Perhaps using high number of individuals and investigation of polymorphism on other candidate genes could help to reach high accuracy test for identification of resistant and susceptible animals for mastitis disease.

Key words: Allele, BRCA1 gene, Holstein cattle, mastitis, SNP

مقدمه

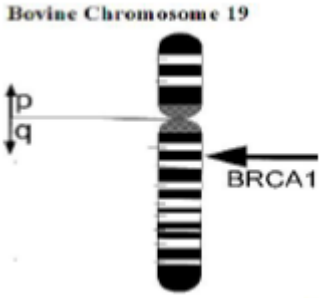
صنعت تولید شیر به منظور حفظ و بقای خود نیازمند آن است که بازدهی تولید شیر را افزایش دهد و این افزایش تولید موجب افزایش حساسیت دام به برخی بیماری‌ها نظیر ورم پستان می‌شود (Citek و همکاران، ۲۰۱۱؛ Prendiville و همکاران، ۲۰۱۰؛ Mostert و همکاران، ۲۰۰۴؛ Beaudeau و همکاران، ۲۰۰۰). گزینش به منظور افزایش مقاومت حیوانات در برابر بیماری‌ها به عنوان یک استراتژی جایگزین یا مکمل روش‌های رایج پیشنهاد می‌شود. ورم پستان یکی از بیماری‌های بسیار شایع در گاو شیری است که به وسیله ژن‌ها و عوامل محیطی زیادی کنترل می‌شود (Sorensen و همکاران، ۲۰۰۸). این بیماری می‌تواند زیان‌های اقتصادی قابل توجهی را به گله‌های صنعتی وارد نماید. از جمله ضررهای متعدد اقتصادی می‌توان به کاهش تولید شیر، حذف زودهنگام گاو از گله و هزینه‌های بالای درمان اشاره کرد (Citek و همکاران، ۲۰۱۱؛ Prendiville و همکاران، ۲۰۱۰؛ Mostert

و همکاران، ۲۰۰۴). پژوهشی که در گاوداری‌های صنعتی استان اصفهان انجام گرفت، نشان داد که به ازای افزایش هر ۱۰۰ هزار سلول بدنی در هر میلی‌لیتر نمونه شیر، تولید شیر حدود ۱/۵ لیتر کاهش می‌یابد. در صورتی که تعداد سلول‌های بدنی از ۹۰۰ هزار در هر میلی‌لیتر شیر بیشتر باشد، کاهشی در حدود ۵ کیلوگرم و یا بیشتر از ۶ کیلوگرم در تولید شیر روزانه را سبب می‌شود (زمانی و همکاران، ۲۰۰۹). به دلیل اهمیت اقتصادی ورم‌پستان، بررسی مبنای ژنتیکی مقاومت به این بیماری اهمیت دارد. اگر چه از نظر انتخاب ژنتیکی حذف گاوهایی که پیوسته به ورم‌پستان دچار می‌شوند اغلب بخش بزرگی از مشکلات ورم‌پستان در گله را برطرف می‌کند، ولی حذف تا اندازه‌ای مقاومت ژنتیکی در برابر ورم‌پستان در گله را می‌افزاید. نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد مقاومت به بیماری در نشخوارکنندگان دارای واریانس ژنتیکی است و در حال حاضر اکثر کشورها اهمیت زیادی به انتخاب صفات غیرتولیدی به ویژه مقاومت به ورم‌پستان می‌دهند (Carlen و همکاران، ۲۰۰۴). شیوع بیماری ورم‌پستان در اغلب کشورها حدود ۴۰ درصد است، که با استراتژی انتخاب ژنتیکی در بعضی از کشورها آن را تا ۲۵ درصد کاهش داده‌اند. با این وجود انتخاب حیوانات برای افزایش مقاومت به ورم‌پستان به دلیل عدم وجود تعریف واحد جهانی و همچنین پایین بودن توارث پذیری آن دارای محدودیت است. افزایش مقاومت ژنتیکی به بیماری ورم پستان می‌تواند در برنامه های اصلاح نژادی مدنظر قرار گیرد، که عمدتاً از روش‌های ژنتیک کمی و پارامترهای مربوط به فنوتیپ حیوان و یا خویشاوندان آن استفاده می‌شود. اما چون فنوتیپ نتیجه برآیند عامل ژنتیکی و محیطی است، لذا اگر انتخاب صرفاً بر اساس فنوتیپ صورت گیرد، میزان اشتباه آن بالا و سودمندی انتخاب کاهش می‌یابد (شهریاری، ۱۳۸۳؛ قره یاضی، ۱۳۷۵). علاوه بر این، برنامه‌های اصلاح نژادی که در قالب ژنتیک کمی صورت می‌گیرند، زمان‌بر می‌باشند. با توجه به اینکه پیشرفت ژنتیکی برای تولیدشیر مسائل سلامتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بنابراین باید در برنامه های اصلاح نژاد گاو شیری برای افزایش تولید شیر، بهبود مقاومت به ورم‌پستان نیز مورد توجه قرار گیرد. ولی همبستگی منفی بین تولید شیر و مقاومت به ورم پستان بهبود ژنتیکی همزمان این صفات را با مشکل روبرو می‌کند (Sahana و همکاران، ۲۰۰۸). در گذشته انتخاب طبیعی که در سیر تکاملی وجود داشته است و انتخاب فنوتیپی بر روی گزینش دام‌های اهلی مناسب، مؤثر بوده است. حالت ایده‌آل برای انتخاب فنوتیپی زمانی است که صفت وراثت پذیری بالایی داشته باشد و فنوتیپ برای همه حیوانات قبل از سن تولیدمثل قابل مشاهده باشد. این حالت ایده‌آل به ندرت پیش می‌آید بنابراین مؤثربودن انتخاب فنوتیپی را محدود می‌کند(Dekkers و Hospital ، ۲۰۰۲). در نتیجه به عنوان یک رویه جایگزین، شناسایی ژن‌های مؤثر بر مقاومت به ورم پستان و کاربرد رویه گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را به منظور بهبود وضعیت ورم‌پستان در صنعت گاوشیری فراهم کرده است (Lund و همکاران، ۲۰۰۷). بنابراین برای ایجاد مقاومت ژنتیکی، شناسایی ژن‌ها و آلل‌های مقاوم به ورم‌پستان ضروری می‌باشد (Citek و همکاران، ۲۰۱۱). یکی از راهکارهایی که برای افزایش پتانسیل ژنتیکی به کار گرفته می‌شود شناسایی ژن‌های کاندیدای مرتبط با مقاومت به بیماری است. چندشکلی یک ژن نشان دهنده آلل های مختلف بوده که هریک عملکرد متفاوت را به دنبال دارد. ژن Breast cancer A1 با علامت اختصاری BRCA1 به عنوان یکی از ژن‌های کاندیدا در ایجاد مقاومت به ورم‌پستان معرفی شده است (Yuan و همکاران، ۲۰۱۲). موقعیت کرموزومی آن در گاو کروموزوم ۱۹، در انسان کروموزوم ۱۷ و در موش کروموزوم ۱۱ می‌باشد. نقش این ژن در روند ترمیم آسیب‌های DNA، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم فرآیند رونویسی و دیگر مسیرهای مهم برای تعمیر و نگهداری از ثبات ژنوم است. این جایگاه ژنی شامل ۲۴ اگزون است که پروتئینی با ۱۸۶۳ اسیدآمینه (Protein id:"AAL76094.1") را کد می‌کند که این پروتئین نقش تنظیمی مهمی در جریان چرخه سلولی دارد (Miki و همکاران، ۱۹۹۴). اگزون ۱۱ بزرگترین اگزون بوده و بالغ بر ۶۰ ٪ از آمینواسیدها را کد می‌کند. اگرچه به صورت محدود با دیگر پروتئین‌های شناخته شده اشتراکاتی دارد، ولی اختصاصاً دارای دو Domain فانکشنال به صورت یکی حلقه انتهای N و دیگری انتهای C است(Donovan و Livingston، ۲۰۱۰) (شکل ۱).



شکل۱- ساختارشماتیک پروتئین ۱۸۶۳ آمینواسیدی BRCA1 با Domain های مختلف آن

انواع جهش‌ها در ژنBRCA1 وجود دارد که تعدادی از پروتئین‌های حاصل موتاسیون ژن گاهی خاصیت سرکوب‌گر تومور و گاهی به عنوان سنسور صدمات وارده به DNA سلول و گاهی به عنوان تبدیل کننده‌های پیام‌های سلولی به زیر واحدها و بخش‌های مختلف در کمپلکس‌های آنزیمی عمل می‌کنند. اگزون های ۱ تا۱۱ ژن گاوی پروتئین‌هایی که تولید می‌کنند به عنوان کمپلکس بزرگ ژنی نظارت کننده (BASC) به عنوان همراه و جز لاینفک ژنBRCA1 عمل می‌کنند و هرگونه جهش نتایج خاص خود را به همراه دارد و باعث تغییر محسوس در کد اسیدآمینه و شکل فضایی پروتئین و تغییر مسیر متابولیکی می شود. با توجه به اینکه BRCA1 جز ژن‌هایی است که در فرآیندهای تنظیم چرخه سلولی نقش داشته و در قسمت بازوی qکروموزوم ۱۹گاو واقع شده است (Krum و همکاران، ۲۰۰۲) (شکل۲) هرگونه تغییر در ساختار ژنBRCA1 در صورتی که از نوع جهش‌های بی معنی نباشد، اگر از نوع موتاسیون‌های حذف و اضافه یا تغییر مکان کوچک باشد باعث کوتاه‌شدگی mRNA و در نتیجه تولید پروتئین ناکارآمد و اختلال در کارکرد آن پروتئین و در نهایت اختلال در چرخه سلولی خواهد شد.



شکل۲- موقعیت کرموزومی جایگاه ژنی BRCA1 در کروموزوم‌های گاو

بیشترین ریسک ایجاد تومور متعاقب تغییر پروتئین سنتزی در نتیجه تغییر اسیدآمینه‌ای صورت می‌گیرد که به نظر می رسد ناشی از تغییر وضعیت Domainهای پروتئین باشد. حدود ۲۰۰۰ جهش مختلف در BRCA1 گاوی و اورتولوگ آن BRCA2 شناخته شده است که از انواع جهش‌های حذف و اضافه و بسیاری جهش‌های تک نوکلئوتیدی در نواحی کدکننده و غیرکدکننده هستند و اثرات مختلفی به جا می‌گذارند. در پژوهشی Krum و همکاران(۲۰۰۳) گزارش کردند که توالی BRCA1 در گاو پیش‌بینی کننده بهتری از آلل بیماری در مقایسه با موش و سگ است. در مطالعه حاضر از BRCA1 به عنوان یک ژن کاندیدا

(مارکر ژنی) در ارتباط با بیماری ورم‌پستان و صفات ایمنولوژیکی در گاوهای هلشتاین ایرانی استفاده شد. هدف این پژوهش مطالعه چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی ناحیه اگزون شماره ۹ ژن BRCA1 و بررسی تأثیر ژنوتیپ‌های آن روی مقاومت به ورم‌پستان است. تعداد سلول‌های بدنی شیر که مشخصه ورم‌پستان می‌باشد به عنوان متغیر وابسته مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه آشکار کردن مکانیسم‌های مولکولی پیچیده مسئول مقاومت به ورم‌پستان می‌تواند برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر مفید باشد، این مطالعه با هدف گامی به جلو برای افزایش مقاومت به ورم‌پستان در صنعت گاو شیری ایران انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

در این پژوهش ۶۰ نمونه خون با استفاده از لوله‌های حاوی EDTA ازگاوهای هلشتاین مولد مربوط به گاوداری صنعتی که بر اساس فایل اطلاعات بیماری و اطلاعات تولیدی و اطلاعات شجره‌ای که در این واحد وجود داشت از دوگروه هرکدام با تعداد ۳۰ رأس دام دارای سابقه ورم‌پستان به عنوان گروه حساس به بیماری و گروه بدون سابقه بیماری ورم‌پستان به عنوان شاهد جهت مطالعه انتخاب شده بودند، با استفاده ازخون‌گیری از ورید دمی جمع‌آوری و جهت مطالعه انتخاب شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. رکوردهای این گاوها برای تعداد سلول‌های بدنی شیر نیز در دسترس قرار گرفت. در جداسازی DNA ژنومی طبق پروتکل استاندارد، DNA از گلبول‌های سفید خون استخراج شد (صمدی شمس و همکاران،۲۰۱۰). از کیت استخراج DNA خون (شرکت آرمان تجهیز، شماره دستیابی ۶۹۷۸۶) برای خالص سازی DNA کروموزومی استخراج شده از نمونه‌های خون با بعضی تغییرات استفاده شد (آتش پز و همکاران،۲۰۰۸، ۲۰۱۰؛ برزگری و همکاران،۲۰۱۰).

بررسی کمی و کیفی نمونه‌های DNA

کیفیت و کمیت DNA در مراحل مختلف آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. برای سنجش میزان DNA استخراج شده و آلودگی آن به RNA و پروتئین از دستگاه نانودراپ ۱۰۰۰ (Nano Drop Technologies,Wilmington DE,USA) استفاده شد. با تزریق۲ میکرولیتر محلول DNA در صفحه چشمی مخصوص، اسپکتروفتومتری نمونه با اشعه UV انجام شد که دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و۲۳۰ (نشان دهنده میزان خلوص و آلودگی DNA) و در نهایت غلظت DNA را به ng/µl گزارش کرد.

افزوده‌سازی ژن از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

جهت افزوده‌سازی قطعه ۲۱۹ جفت بازی از اگزون شماره ۹ ژن BRCA1 گاوی از آغازگرهای اختصاصی به صورت جدول ۱ استفاده شد:

جدول۱- آغازگر رفت و برگشت جهت افزوده‌سازی قطعه هدف

مرجع	تعداد جفت باز تکثیر شده	توالی آغازگر(′۳ -′۵)	نوع آغازگر
(Madsen و همکاران، ۲۰۰۱)	۲۱۹	GAGAGTACCAATATTTCCTTGG	رفت
		AATGTCATGTCCCAGTAGATCC	برگشت

جفت آغازگر فوق از شرکت پیشگام به صورت لیوفیلیزه (غیرحساس به دما) خریداری شد. طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دوبار تقطیر مخلوط و در دمای ۲۰-درجه سانتی-گراد نگهداری شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۳۵ چرخه و تحت رژیم حرارتی به صورت: واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و در ادامه واسرشت‌سازی در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها ۵۸°C به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه در دمای ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و یک چرخه توسعه نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. بدین منظور دستگاه ترموسایکلر شرکت Biometra مدل 3.26 ساخت آلمان مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۵۰ میکرولیتری (PCR Master kit شرکت سیناژن به همراه ۱۰ میکرومول از هر آغازگر اختصاصی و ۵۰ نانوگرم DNA استخراج شده) صورت گرفت.

الکتروفورز فرآورده‌های PCR

جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر و عدم وجود باندهای غیراختصاصی، ۵ میکرولیتر از محصول PCR به همراه بافر رنگی و سنگین‌کننده در چاهک‌هایی با عرض ۵ میلی‌متر در ژل آگارز ۱/۵٪ (Invitrogen California, USA) الکتروفورز شد تا پس از رنگ‌آمیزی، کیفیت و طول قطعه تکثیر شده بررسی و به وسیله ژل‌داک (مدل Cyngene,Cambrige,Unied Kingdom) مورد ارزیابی قرار گیرد. قبل از انجام الکتروفورز محلول مورد نیاز (بافر ۱X و TAE ۵۰X) ، ژل آگارز و محلول اتیدیوم بروماید جهت رنگ‌آمیزی آماده گردید. پس از آماده سازی ژل آگارز ۱/۵٪، تانک الکتروفورز تا ارتفاع ۳-۲ میلی متر روی ژل به وسیله بافر TAE پر شد. فرآورده‌های PCR به نسبت ۵ به ۱ به همراه بافر بارگذاری ساخت شرکت فرمنتاز مخلوط شده و به داخل چاهک‌ها ریخته شد. در چاهک اول هر ژل نشانگر اندازه (Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder) شرکت فرمنتاز مورد استفاده قرارگرفت. در این تحقیق از ولتاژ ۱۰۰ ولت و جریان ۸۰ میلی آمپر برای الکتروفورز استفاده گردید. بعد از حدود ۴۰-۳۰ دقیقه و زمانی که رنگ مربوط به بافر بارگذاری دو سوم از طول ژل را پیمود، برق سیستم قطع شده و ژل برای رنگ‌آمیزی در داخل اتیدیوم بروماید (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه بسته به درصد ژل و کهنه و تازه بودن رنگ) قرار گرفت و پس از شستشو در آب، بر روی دستگاه ماورابنفش(UVidoc) قرار داده و بلافاصله توسط دوربین مخصوص و چاپگر عکس ژل تهیه شد و نتایج مورد ارزیابی قرارگرفت (Soumet و همکاران، ۱۹۹۹).

آزمون چندشکلی طول قطعات محدود شده (RFLP)

در بررسی چندشکلی قطعه مورد مطالعه از آنزیم برشی *Faq I (BSMFI)* شرکت فرمنتاز (شماره دستیابی ER:۱۱۸۱) با منشأ *Flavobacterium aquatile RF1* استفاده شد. توالی شناسایی آنزیم برشی *BSMFI* به صورت ۳´-GGGAC-۵´ می‌باشد که با توجه به توالی تکثیر شده، جایگاه موتانت ژن را در طول قطعه به صورت اختصاصی شناسایی کرده و برش می‌دهد. پس از اطمینان از انجام درست روند افزوده‌سازی، هضم آنزیمی بر اساس دستورالعمل: ۱ میکرولیتر محصول PCR، به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم برشی، ۲ میکرولیتر بافرآنزیم(Tango, ۱۰X Fermentas) و ۰/۱ میلی لیتر از(SAM ۵۰(X ۲/۵mM Solution و ۵ میلی‌لیترآب مقطر درون میکروتیوب به مدت ۱۳ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون بن ماری انجام گرفت. تعدادی از محصولات PCR برای ترادف یابی به خارج از کشور ارسال شد و نتایج حاصل از تعیین توالی با توالی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شدند (BLAST→Align→ NCBI).

آنالیز داده‌ها

تعداد ۶۰ رأس دام بر اساس روش PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شده و پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی، با بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه ها تجزیه و تحلیل شدند. محاسبه فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و چندشکلی‌های مشاهده شده با استفاده از نرم افزار PopGene32 انجام شد(Nei، ۱۹۷۷). رکوردهای فنوتیپی مورد استفاده داده‌های مربوط به شمارش سلول‌های بدنی شیر ۶۰گاو نمونه برداری شده بود. از آنجایی که توزیع واقعی SCC بشدت نامتقارن و اریب به راست می‌باشد

جهت آنالیز داده‌ها به طور معمول به نمره سلول‌های بدنی (SCS) تبدیل می‌شوند. قبل از انجام آنالیزواریانس داده‌های SCC بر اساس شرایط و وضعیت و نوع آن‌ها به روش لگاریتم‌گیری با فرمول $SCS=\ln(SCC/100000)+3$ نرمال شد (دادپسند و همکاران،۲۰۱۳؛ همتی دوست و همکاران، ۲۰۱۳؛ Ali وShook، ۱۹۸۰) و تجزیه آماری با داده‌های تبدیل شده انجام گرفت. با استفاده از نسخه ۹/۱ نرم افزار آماری SAS و رویه GLM اثر ژنوتیپ‌های بدست آمده در قالب یک مدل اثرات ثابت روی رکوردهای فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ij}=\mu + p_i+ b_j+(p\times b) + e_{ij}$$

در این مدل:Y_{ij}: نشان دهنده مشاهدات مربوط به تعداد سلول‌های بدنی شیر(SCC) jامین حیوان، μ= اثر میانگین جامعه، p_i = (i=1, 2) اثرشکم زایش(در دو سطح)، bj (j=1, 2, 3) = اثر ژنوتیپ(درسه سطح) و e_{ij}= اثرات باقی‌مانده یا عوامل ناشناخته(خطا). عوامل شناخته شده‌ای که در مدل وجود داشتند شامل شکم زایش و ژنوتیپ و اثر متقابل این دو بود لذا برای انجام آنالیز آماری باید تصحیحاتی صورت می‌گرفت. قبل از شروع آنالیز اثرات تعداد سطوح هر اثر تعیین شد. تعدادی از عوامل ثابت که تعداد مشاهده آن کمتر از دو تکرار بود (شکم های زایش۶ و۷) برای از بین بردن اثر ناهمگنی تکرارها در آنالیز نهایی با شکم‌های زایش ۴ و۵ همگی در یک سطح تحت عنوان "سطح دو" دسته‌بندی شدند. شکم‌های زایش ۱ و۲ و۳ نیز با هم تحت عنوان "سطح یک" دسته‌بندی شدند. جهت بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت مورد آزمایش از آزمون مربع کای استفاده شد. این آزمون با استفاده از نرم افزارSAS انجام گرفت.در ادامه آنالیزها برآورد متوسط اثر جایگزینی آللی یا متوسط اثر جایگزینی یک آلل با فراوانی زیاد با آللی با فراوانی کم در هر دو جایگاه ژنی به وسیله ضریب رگرسیونی صورت گرفت (Falconerو Mackay، ۱۹۹۶).

رویه رگرسیون لجستیک و آنالیزهای متعاقب آن

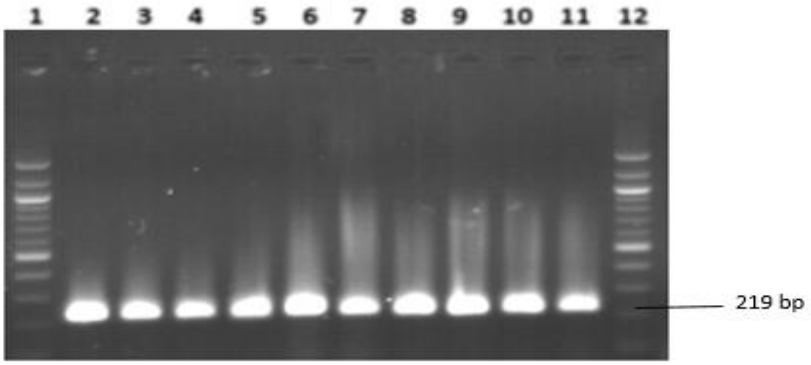
در این مطالعه صفت بیماری تنها دو نتیجه ممکن دارد (بیمار و سالم) که فقط یکی از دو ارزش ۱ یا ۲ را می پذیرد. که ارزش ۱ به معنای وقوع حادثه مورد نظر(تعداد سلول‌های بدنی مساوی و بیشتر از ۲۸۶ در میلی‌لیتر شیر) و ارزش ۲ به معنای عدم وقوع آن (تعداد سلول‌های بدنی شیر کمتر از ۲۸۶ در میلی‌لیتر شیر) یا بالعکس است. در اینجا برآورد وقوع بیماری و عدم آن در بین دام‌های مورد مطالعه به کمک چند متغیر مستقل(پیش بینی کننده) صورت گرفت. برای داده‌های دودویی مانند این تحقیق از رگرسیون لجستیک استفاده می‌شود. در اینجا در مدل رگرسیون لجستیک، عوامل به شرح زیر مورد آنالیز قرار گرفتند که P= سطح احتمال (احتمال وقوع) که متغیر وابسته بود و X= شکم زایش و ژنوتیپ که هر دو متغیرهای مستقل بودند. نحوه آنالیزها به ترتیب شامل تشخیص ماهیت داده خام، مشخص کردن عوامل مؤثر در مدل آماری ،آزمون نرمالیته تبدیل داده و سپس آنالیزها شامل آنالیز واریانس یا آزمون میانگین متعاقب آن و آنالیز رگرسیون لجستیک و برآورد اثر جایگزینی آللی و در انتها آزمون کای مربع برای مقایسه فراوانی ژنوتیپی بین دو گروه دام مورد آزمایش بود.

نتایج و بحث

نتیجه استخراج DNA و سنجش کمیت و کیفیت آن

استخراج خالص DNA ژنومی از نمونه‌های بیولوژیکی گام اولیه حیاتی برای موفقیت در تکنیک‌های مختلف مولکولی از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)، آنالیز آنزیم‌های محدودکننده، تشخیص جهش‌ها، ژنوتایپینگ و آنالیز پیوستگی است (Philipsو همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه - بر این، DNA استخراج شده از نمونه‌های خون از مهم‌ترین شرایط لازم برای تشخیص اختلالات ژنتیکی، مطالعات اپی ژنتیک و آزمایشات تشخیصی مختلف و تست های پیشگیرانه است (Angelini و همکاران، ۲۰۰۰؛ Lewis و همکاران، ۲۰۰۵؛ Philipsو همکاران، ۲۰۰۰؛ Wang و همکاران، ۲۰۰۳). در پژوهش حاضر DNAهای استخراج شده از خون از نظر کمیت و کیفیت یک‌دست نبودند به طوری که بعد از بارگذاری نمونه‌ها در ژل آگارز در بعضی از نمونه‌ها باند شارپ و بهتر و در بعضی از

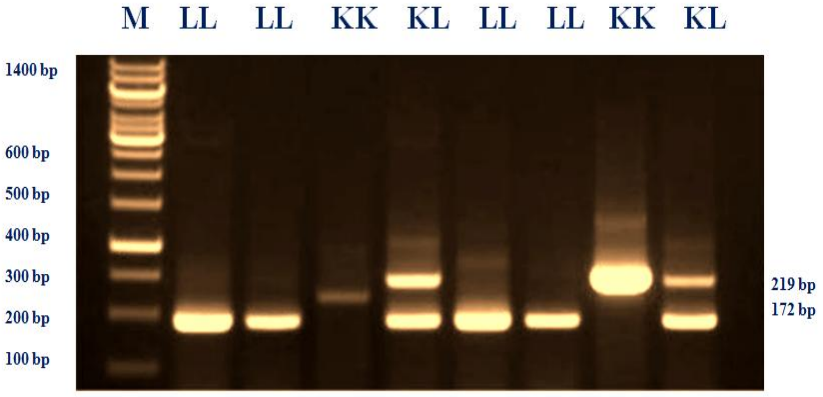
نمونه‌های دیگر باندهای ضعیف مشاهده شدند. نمونه‌هایی که باندهای خیلی ضعیف نشان می‌دادند مورد استخراج مجدد قرار گرفتند. پر رنگ بودن باندها دلیل بر غلظت بالای DNA استخراجی بود. تعیین خلوص DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ نتایج حاصل از ژل را تأیید کرد. نسبت OD_{280}/OD_{260} در نمونه‌های DNA استخراج شده در محدوده ۱/۸ تا ۲/۰ قرار داشتند و در نتیجه خلوص DNA در حد مطلوب بوده و فاقد RNA یا پروتئین بودند. مقدار DNA نیز با فرمول A_{260} ×۵۰ mg/µl= غلظت DNA(ng/µl) محاسبه گردید که بین ۵۰ تا ۹۵ ng/µ متغیر بود. مطالعات ژنتیک جمعیت به طور چشمگیری به صورت پذیرفتن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) وابسته است و ماده اولیه برای انجام این نوع از مطالعات، DNA استخراج شده با کیفیت مطلوب می باشد. از آنجا که برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به میزان اندکی DNA با کیفیت بالا نیاز می‌باشد (نصیری و همکاران، ۲۰۰۵) لذا مقادیر حاصل از روش استخراج در این مطالعه مطلوب می‌باشد. موفقیت‌های ناشی از استخراج بهینه DNA به خلوص و غلظت بالای DNA استخراج شده وابسته است. بیشترین مزیت این ابزار حاصل روش-های بهینه استخراج DNA با حذف مهارکننده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) است (Angelo و همکاران، ۲۰۰۷). اگر نسبت مقدار جذب محلول DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به مقدار جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۲-۱/۸ باشد نشان دهنده این است که جذب عمدتاً به علت اسیدنوکلئیک است و کیفیت و خلوص DNA مطلوب است. اعداد کمتر از ۱/۸ آلودگی پروتئین یا فنلی را نشان می‌دهد و اعداد بالاتر از ۲ نشان دهنده آلودگی RNA هستند(Wolfinger و Connell ،۱۹۹۳). داده‌های حاصل از نانودراپ و الکتروفورز نشان داد که DNAاستخراجی کارایی مطلوبی از لحاظ کیفیت و کمیت دارد. نتیجه افزوده‌سازی ژن مورد نظر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در طی PCR، قطعه ۲۱۹ جفت بازی ژنBRCA1 با استفاده از دوپرایمر اختصاصی تکثیر شد. نتایج مطالعه باندهای PCR روی ژل به این صورت است که قطعه مورد نظر به اندازه ۲۱۹ جفت باز به صورت باند واضحی دیده شد که اندازه آن از روی سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی مشخص شد. شکل۳ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ را نشان می‌دهد. برای ارزیابی دقیق‌تر قطعات تکثیر شده از یک نشانگر استاندارد وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی استفاده شد که در کنار محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ صحت تکثیر قطعه مورد نظر را تأیید می‌کند. محصولات PCR تمام نمونه های مورد بررسی مشابه هم بودند. در همین شکل وجود یک نوار مشخص بر روی آگارز مؤید این است که پرایمرهای به کار رفته تنها دارای یک قطعه هدف روی DNA بودند و شباهت توالی در مکان‌های دیگری از DNA وجود ندارد و نیز وجود باندهای روشن و بدون کشیدگی و با کیفیت زیاد مشخص کرد که عمل استخراج DNA به خوبی انجام شده است. قطعه اختصاصی ۲۱۹ جفت بازی مربوط به اگزون ۹ ژن BRCA1 به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در کلیه نمونه‌هایی که مورد آزمایش قرار گرفته بودند(۱۰۰درصد) مشاهده گردید.



شکل۳- الکتروفورز محصولات حاصل از تکثیر قطعه۲۱۹ جفت بازی اگزون ۹ ژن BRCA1 بارگذاری شده بر روی ژل آگارز۱/۵٪ : Lane۱ و Lane۱۲ نشانگر اندازه (Gene Ruler 100 bp Plus DNALadder)، Lane۲ الی Lane۱۱ شامل محصولات PCR (قطعه ۲۱۹ جفت بازی)

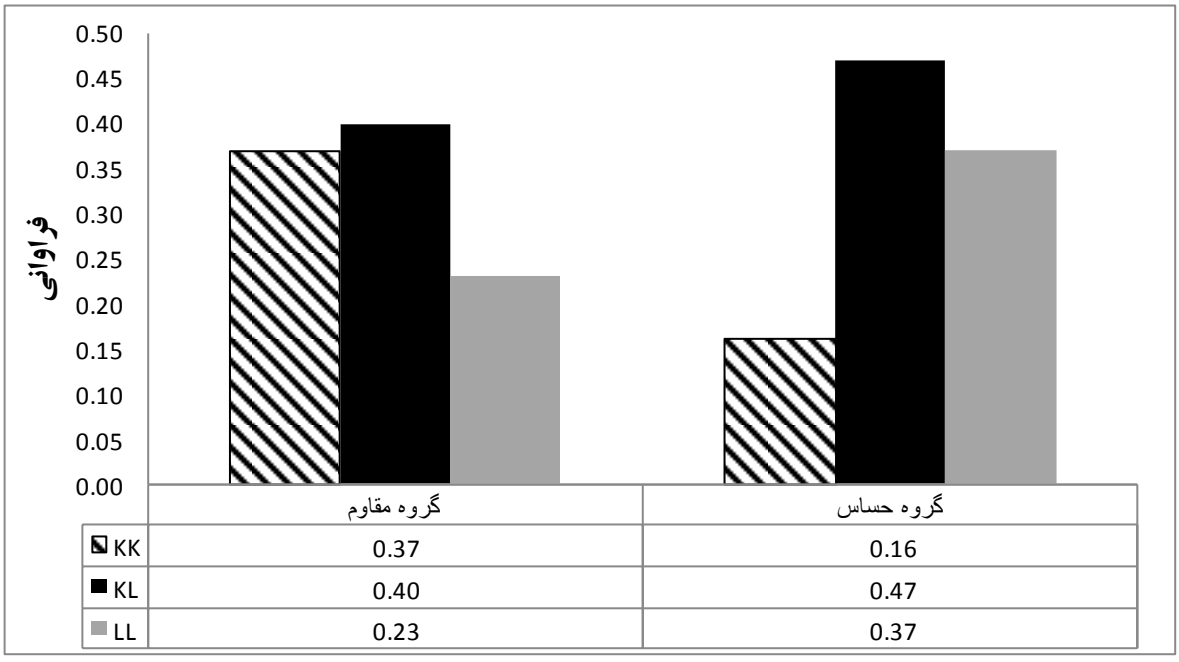
نتایج هضم آنزیمی

یکی از روش‌های استاندارد در شناسایی چندشکلی‌ها تکنیک PCR-RFLP است. در پژوهش حاضر ناحیه پالیندروم (دوسرخوانا) در روی محصول به خوبی شناسایی شد و وجود یا عدم وجود جهش در این ناحیه بررسی گردید. با داشتن این اطلاعات که در صورت ایجاد جهش در آلل‌های ناحیه ژنی مربوطه آنزیم‌های برشی قادر به برش ناحیه مورد نظر نخواهند بود این نتایج حاصل شد: الگو قطعات حاصل ازهضم آنزیمی با روش PCR-RFLP چند شکلی در موقعیت۴۶۱۲۶+ اگزون ۹ با جهش G>T را آشکار نمود. برای تأیید نتایج PCR-RFLP تعدادی از محصولات PCR تعیین توالی شدند که در آن چندشکلی در موقعیت مورد نظر تأیید شد (GenBank ID:NP_848668.1). پس از بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه‌ها، در نهایت سه الگوی متفاوت (متشکل از K وL) در برش آنزیم *BSMF I* به وسیله بارگذاری در ژل آگارز ۲/۵٪ مشاهده شد(شکل۴).



شکل۴ – ژنوتیپ‌های مشاهده شده برای قطعه ای از اگزون شماره ۹ ژن BRCA1 در گاوهای هلشتاین ایرانی. محصولات حاصل از هضم آنزیمی(RFLP بعد از PCR) بارگذاری شده در ژل آگارز ۲/۵ ٪ (InvitrogenCalifornia ,USA). در این تصویر باندهای متعدد حاصل از اثر آنزیم BSMF I روی محصول PCR دیده می شود. MLane: سایز مارکر ۱۰۰bp

با شناسایی چندشکلی‌های ژنتیکی افراد انتخابی در هر گروه، بر اساس نحوه برش آنزیم سه الگوی ژنوتیپی KK،KL و LL برای قطعه تکثیر شده آشکار گردید. در آلل K برش انجام نمی‌شود چون آنزیم محل برش ندارد اما در آلل جهش یافته (L) تغییر نوکلئوتیدی جایگاه جدید برش ایجاد می‌کند. ژنوتیپ KK دارای یک باند ۲۱۹ جفت بازی است، ژنوتیپ KL دارای یک باند ۲۱۹ و ۱۷۲ جفت بازی است (البته باند ۴۷ بازی هم وجود دارد که در شکل دیده نمی‌شود) و ژنوتیپ LL دارای باند ۱۷۲ و ۴۷ جفت بازی است. فراوانی‌های هریک از این الگوهای برش آنزیم در اساس نوع آنزیم با استفاده از نرم افزار PopGene32 مشخص شد. برای سه نوع ترکیب ژنی با نامگذاری KK، KL و LL در گروه مقاوم فراوانی‌های ۰/۳۷، ۰/۴ و ۰/۲۳محاسبه شد و همین فراوانی‌های ژنوتیپی در گروه حساس به ترتیب ۰/۱۶، ۰/۴۷و۰/۳۷ به دست آمد (نمودار ۱).



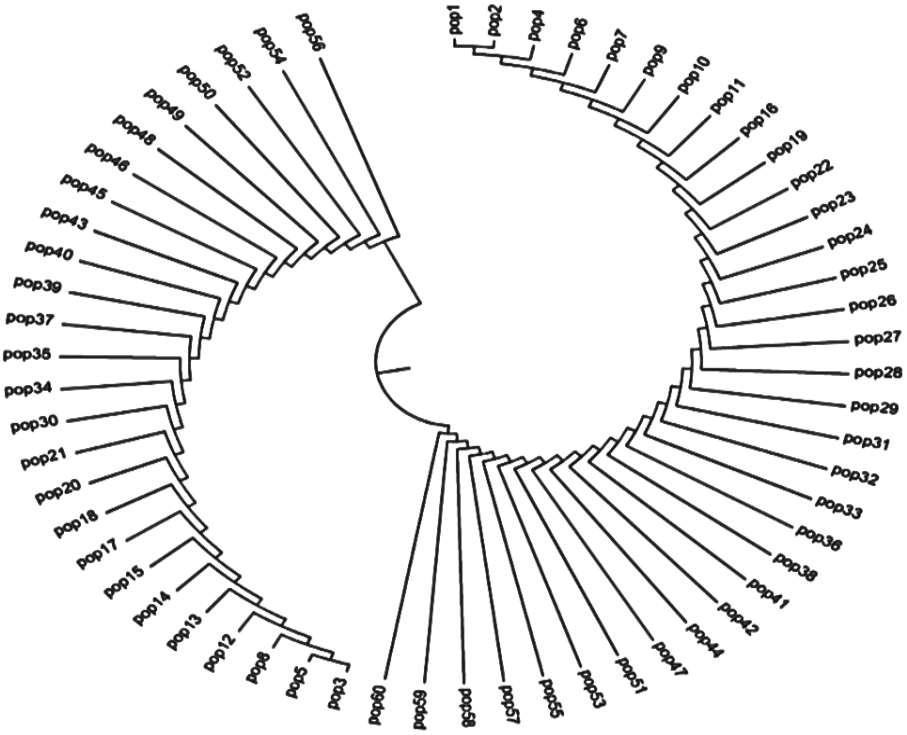
نمودار۱- فراوانی ژنوتیپی در حیوانات مقاوم و حساس به ورم پستان برای جایگاه اگزون ۹ ژن BRCA1

همانطور که از نتایج برمی‌آید، مقایسه فراوانی هر الگو در دوگروه نشان داد که در این مدل آنالیز ژنوتیپ معنی‌دار بوده و در مقایسه بین ژنوتیپ KK وKL، آلل L باعث بالا رفتن تعداد سلول‌های بدنی می‌شود. در جمعیت مورد مطالعه فراوانی آلل L در گروه حساس بالاتر بود در حالی که آلل K دارای فراوانی بالاتری در گروه مقاوم به ورم پستان بود. فراوانی‌های آللی به دست آمده در توافق با نتایج حاصل از پژوهش Yuan و همکاران (۲۰۱۲) می‌باشد که نشان دادند افراد با ژنوتیپ همبارز غالب به طور معنی‌داری تعداد سلول‌های بدنی کمتری نسبت به دو ژنوتیپ هتروزیگوت همبارز و هموزیگوت مغلوب همبارز درقسمتی از اگزون شماره ۹ جایگاه ژنی BRCA1 گاوی داشتند.

نتایج آنالیز واریانس

نتایج رویه GLM با داده‌های نرمال شده نشان داد که شکم زایش و ژنوتیپ اثر معناداری بر روی لگاریتم سلول‌های بدنی داشتند (P <۰/۰۱). نتیجه آنالیز واریانس نشان داد که وجود آلل L باعث بالارفتن تعداد سلول‌های بدنی می‌شود. با مقایسه ژنوتیپ KK با LL نشان داده شدکه تفاوت معناداری بین این دو ژنوتیپ وجود دارد به طوری که ژنوتیپKK، ۱/۲۵ واحد باعث بهبود نمره سلول‌های بدنی نسبت به ژنوتیپ LL شد. این در حالی است که تفاوت معناداری بین دو ژنوتیپ KL وLL مشاهده نشد. همچنین با مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید که ژنوتیپ KK در مقابل هردونوع ژنوتیپ KL وLL معنی‌دار است (P<۰ /۰۱). چون میزان SCC معیار ارزیابی مقاومت به ورم پستان است و از طریق آن می‌توان به طور غیرمستقیم میزان حساسیت به ورم پستان را تشخیص داد لذا از سه ژنوتیپ شناسایی شده تنها ژنوتیپ KK بامیزان کمتر خطر ابتلا به بیماری ورم پستان بالینی ارتباط معنی دار دارد (P<۰/۰۱).

نمودار ۲ خوشه‌بندی افراد بر اساس ژنوتیپ ژن مورد نظر را نشان می‌دهد وژنوتیپ مربوط به هر عضو جمعیت مشخص شده است. تعداد ۳۰ مشاهده اول مربوط به دام‌های مقاوم و۳۰ مشاهده بعدی از شماره ۳۱ تا شماره ۶۰ جزء گروه دام‌های با سابقه بیماری ورم پستان(حساس) بودند به نظر می‌رسد در دسته‌بندی تقریباً این ژن توانسته است افراد حساس و مقاوم را به‌طور نسبی از هم جدا کند. از این ژن شاید بتوان به عنوان یک روش غیر مستقیم و در عین حال دقیق جهت بررسی وضعیت بهداشت و سلامت دام، کیفیت شیر تولیدی و درنهایت پیشرفت ژنتیکی سریع‌تر در اتخاذ استراتژی‌های اصلاحی استفاده کرد.



نمودار۲–نحوه خوشه‌بندی ۶۰ دام مورد مطالعه بر اساس ژن مورد نظر در دوگروه فنوتیپی متفاوت

سابقه ابتلا به ورم پستان بالینی در دوگروه دام مورد بررسی باعث تظاهر ژنوتیپ‌های متفاوت در دو گروه نسبت به همدیگر شده است به طوری که در گروه حساس ژنوتیپ‌های LL وKL و در گروه مقاوم ژنوتیپ KK مشاهده شد.

نتایج رگرسیون لجستیک

آنالیز رگرسیون لجستیک بین عوامل ثابت با وضعیت بیماری نشان داد که بین شکم زایش واثرات ژنوتیپ با وضعیت بیماری ارتباط معنی‌دار وجود دارد (P<۰/۰۱). نتایج معنی‌داری اثرات ژنوتیپ و سطوح شکم زایش بر روی وضعیت بیماری به صورت جدول ۲ می‌باشد:

جدول۲- نتایج آنالیز رگرسیون لجستیک با داده‌های نرمال شده

عوامل مؤثر در مدل	درجه آزادی	χ^2	سطح معنی داری
ژنوتیپ	۲	۶/۰۶	۰/۰۵
شکم زایش(۲سطح)	۱	۵/۷۵	۰/۰۱
ژنوتیپ×شکم زایش	۲	۰/۷۹	۰/۶۷

جدول۳- نتایج حاصل از مقایسات مستقل و متعامد ژنوتیپ ها و سطوح شکم زایش در مدل رگرسیون لجستیک

فاکتورهای مورد آزمون	در مقابل	مقدار برآورد شده	نسبت بخت (odds ratio)	معنی‌داری
ژنوتیپ KL	LL	-۰/۹۴۵	۰/۳۸۸	<۰/۰۵۳ns
ژنوتیپ KK	LL	۱/۱۰۷	۳/۰۲۵	<۰/۰۲۵*
ژنوتیپ KK	KL	-۰/۱۶۱	۰/۸۵۱	<۰/۰۵۰*
ژنوتیپ KK	ترکیب KL وLL	۰/۸۸۷	۲/۴۲۷	<۰/۰۱۵*
شکم زایش سطح ۱	شکم زایش سطح۲	۰/۸۵۳	۲/۳۴۸	<۰/۰۱۶*

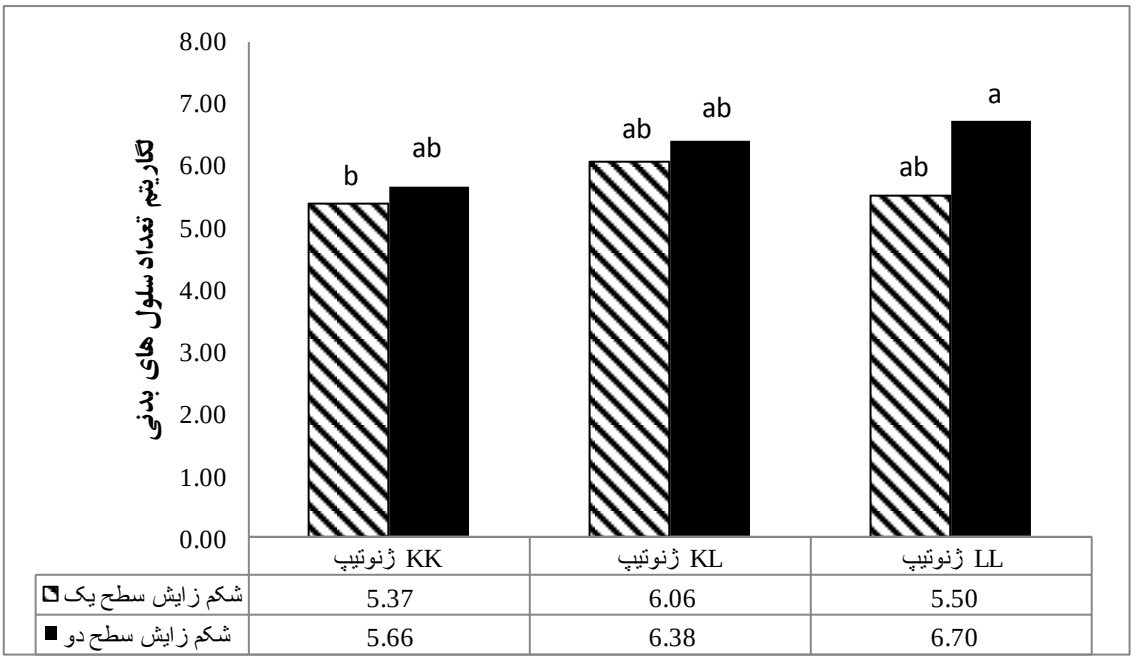
ns: عدم معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵

*: معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵

در آنالیز رگرسیون لجستیک مقایسات دو ژنوتیپ KK وKL نسبت به ژنوتیپ LL و همچنین شکم زایش سطح یک نسبت به شکم زایش سطح دو صورت گرفت. مقایسه سایر اثرات از طریق مقایسات متعامد (اورتوگونال) انجام شده است. نتایج تفاوت معناداری را بین ژنوتیپ KK با ترکیب دو ژنوتیپ KL وLL برای تعداد سلول‌های بدنی شیر نشان داد (P<۰/۰۵) و ژنوتیپKL در برابر LL معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵) (جدول۳) . بر اساس جدول ۳ نتایج مدل رگرسیون لجستیک از طریق تغییر متغیر مبنا نشان داد که تفاوت معناداری بین KK با KL وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین با توجه به سابقه ورم پستان بالینی، اثر شکم زایش بر تعداد سلول‌های بدنی شیر معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج حاکی از آن است که با افزایش شکم زایش از سطح یک به

سطح دو، تعداد سلول های بدنی شیرگاوهای هلشتاین با نسبت بخت ۲/۳ برابر افزایش یافت که متعاقب آن احتمال ورم پستان افزایش می یابد. دلیل پایین بودن تعداد سلول‌های بدنی در دوره-های اول شیردهی (شکم یک تا سوم) نسبت به سایر دوره‌ها می-تواند این باشد که با افزایش سن، حیوانات در طول حیات خود بیشتر در معرض میکروارگانیسم‌های مولد ورم پستان قرار می-گیرند و در نتیجه به ورم پستان مبتلا می‌شوند همچنین ضعیف‌تر بودن سیستم ایمنی گاوهای مسن‌تر نسبت به گاوهای جوان‌تر می-تواند یکی از دلایل دیگر باشد. نتایج جمالی و بابا احمدی(۱۳۹۱) بر روی گاوهای هلشتاین نشان داد گاوهای شکم زایش اول کمترین نمره سلول‌های بدنی را داشتند و بین دوره‌های بالاتر زایش تفاوت معنی‌داری برای نمره سلول‌های بدنی مشاهده نگردید. درتحقیقی که به وسیله میرزایی و همکاران (۱۳۹۰) روی عوامل مؤثر بر تعداد سلول‌های بدنی شیر گاو بر اساس سابقه ورم پستان بالینی انجام شد میانگین لگاریتم تعداد سلول‌های بدنی شیر گاوهای دارای سابقه ورم پستان بالینی به طور معنی‌داری بیشتر از گاوهای بدون سابقه ورم پستان بالینی بود، مهم‌ترین فاکتور تأثیرگذار بر سلول‌های بدنی شیر، کارتیه‌های انفرادی و در نهایت گاو و گله، وضعیت عفونت در کارتیه و پستان است. با توجه به بیشتر بودن تعداد سلول‌های بدنی شیرگاوهای دارای سابقه ورم پستان بالینی نسبت به گاوهای بدون سابقه بیماری، در نتیجه قدرمطلق ضریب همبستگی بین تعداد سلول‌ها و میزان تولید شیر در گاوهای بدون سابقه بیشتر از گاوهای با سابقه بیماری می‌باشد. از این نتایج چیزی که بسیار مشهود است اینکه در تفسیر داده‌های مربوط به سلول‌های بدنی در گاوداری ها باید سابقه ابتلای گاو به ورم پستان در نظر گرفته شود. چنین به نظر می‌رسد که در گاوهای با سابقه ورم پستان تعداد سلول‌های بدنی با افزایش روزهای پس از زایش(اواخر یا اوایل شیردهی گاو) تغییر معنی‌داری نمی‌کند، هرچند که میزان تولید شیر در مراحل مختلف شیردهی تغییر می-یابد؛ اما با افزایش دوره شیردهی گاو به طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. در گاوهای بدون سابقه ورم پستان بالینی ارتباط بین تعداد سلول‌های بدنی و دوره‌های شیردهی مختلف گاو معنی‌دار نیست، اما با افزایش روزهای پس از زایش، به طور معنی‌داری تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد. نتیجه اینکه همه عوامل تأثیرگذار بر تعداد سلول‌های بدنی شیر اهمیت دارند؛ اما بر اساس سابقه ابتلای گاو به بیماری ورم پستان، اثر متفاوتی خواهند داشت. در تفسیر تعداد سلول‌های بدنی مربوط به گاوهای با سابقه ابتلا به ورم پستان بالینی، دوره شیردهی(شکم زایش) دارای اهمیت است. Fleischerو همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند اثر نوبت زایش بر روی وقوع این بیماری معنی‌دار است. در مطالعه‌ای که توسط آهنگران رجبی (۱۳۹۰) روی گاو هلشتاین انجام شد اثر شکم زایش بر وقوع بیماری ورم پستان (که نمود آن افزایش تعداد سلول‌های بدنی است) معنی‌دار نبود ولی نتایج (Fleischer و همکاران، ۲۰۰۱؛ Grohn وهمکاران، ۱۹۹۵؛ Rajala و Grohn، ۱۹۹۸) اثر نوبت زایش را روی وقوع این بیماری معنی-دار نشان می‌دهد. متفاوت بودن تخمین‌های همبستگی فاکتورهای خطرساز در میان مطالعات، نشان دهنده وجود واریانس در بسیاری از فاکتورها مانند افراد عهده‌دار رکوردگیری (دامدار یا دامپزشک)، چگونگی تفسیر نشانه های بالینی،کامل نبودن داده-های رکوردگیری شده (از قبیل اینکه برای بعضی مشاهدات سطوح زیاد و برای بعضی سطوح خیلی کم در نظر گرفته شده است)، عوامل بیماری‌زا و محیط است که ممکن است تجلی همبستگی ژنوتیپی یک حیوان را تحت تأثیر قرار دهد (Berry و همکاران، ۲۰۱۱).

تفاوت بین سطوح زایش و سطوح اثرات ژنوتیپ های مختلف بر میزان سلول‌های بدنی شیر در نمودار ۳ نشان داده شده است. این نمودار معنی‌داری ژنوتیپ KK در مقابل هر دو نوع KL وLL و شکم زایش سطح۱ در مقابل شکم زایش سطح ۲ در کاهش تعداد سلول‌های بدنی شیر را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار درون هر ژنوتیپ تفاوت معناداری بین گاوهای شکم زایش سطح ۱ با گاوهای شکم زایش سطح ۲ مشاهده نشد. بیشترین میزان سلول-های بدنی برای ژنوتیپ LL در شکم زایش سطح ۲ وکمترین میزان سلول‌های بدنی برای ژنوتیپ KK درشکم زایش سطح۱ مشاهده شد که تفاوت معناداری را نشان داد.



نمودار۳- نمودار لگاریتم تعداد سلول‌های بدنی شیر برای اثرات متقابل شکم زایش و ژنوتیپ

در تحقیق حاضر با جمع‌بندی نتایج آنالیز واریانس و رگرسیون لجستیک نشان داده شد که اثرات ژنوتیپ و شکم زایش هردو بر روی تعداد سلول‌های بدنی معنی‌دار است.

بررسی جمعیت مورد مطالعه از نظر تعادل هاردی- واینبرگ جهت بررسی تعادل هاردی-واینبرگ، مقدارکای‌مربع برای هر دو گروه مقاوم و حساس محاسبه شد (جدول۴). نتایج آزمون کای مربع با توجه به سطح معنی‌داری در دوگروه حساس و مقاوم و همچنین کل جمعیت مورد نمونه برداری نشان داد فراوانی‌های مشاهده شده با فراوانی‌های مورد انتظار تفاوت معنی‌داری نداشته است و سطح احتمال درون دو گروه و درکل جمعیت بزرگتر از ۰/۰۵ درصد بود که مشخص شد در این جایگاه ژنی در جمعیت دام‌های مورد مطالعه تعادل هاردی-واینبرگ برقرار است.

جدول٤- بررسی تفاوت فراوانی ژنی و ژنوتیپی جایگاه اگزون ۹ ژن BRCA1 در دوگروه حیوانات مقاوم و حساس به ورم پستان بالینی

گروه	تعداد	فراوانی ژنی		فراوانی ژنوتیپی			مقدار χ^2	سطح معناداری
		L	K	LL	KL	KK		
مقاوم	۳۰	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۲۳	۰/۴	۰/۳۷	۱/۰۳۸	۰/۵۹۵ns
حساس	۳۰	۰/۶۰	۰/۴۰	۰/۳۷	۰/۴۷	۰/۱۶	۰/۰۲۳	۰/۹۸۸ns
کل	۶۰	۰/۵۲	۰/۴۸	۰/۳	۰/۴۳	۰/۲۷	۱/۰۵۸	۰/۵۸۹ns

ns : عدم معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵

رابطه بین فراوانی ژنی و ژنوتیپی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است چون بسیاری از نتیجه گیری‌های مربوط به ژنتیک جمعیت و ژنتیک کمی بر پایه آن استوار است.

نتایج محاسبه متوسط اثر جایگزینی آللی

در اینجا متوسط اثر جایگزینی آللی که به طور غیرمستقیم اثر معنی‌دار آلل ژن را نشان می‌دهد که به وسیله کد بندی ژنوتیپ‌ها مشخص شد به طوری که برای فراوانی ژنوتیپی هموزیگوت کد صفر و برای ژنوتیپ هتروزیگوت کد ۱ و برای بیشترین فراوانی ژنوتیپی کد ۲ انتخاب شد. اثر جایگزینی آللی یعنی به ازای تغییر آلل(K) که باعث کاهش سلول‌های بدنی می‌شود به آلل (L) ، سلول‌های بدنی به چه میزان زیاد می‌شوند. نتایج این پژوهش بر روی جمعیتی از گاوهای هلشتاین نشان داد که با تغییر آلل K به آلل L به مقدار۰/۰۳ لگاریتم سلول‌های بدنی بیشتر می‌شود که خود تأیید کننده این است که آلل K باعث کاهش ورم پستان می‌گردد.

نتیجه‌گیری

در گاوهای شیری از مهم‌ترین اهداف انتخاب، بالابردن بهره‌وری و بهبود انتخاب گاوهایی است که علاوه بر تولید شیر با کیفیت و کمیت مناسب، مشکلات مدیریتی بسیار اندکی داشته باشند. شناسایی ژن‌های مؤثر بر مقاومت به بیماری‌ها از جمله بیماری ورم پستان و کاربرد رویه گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را به منظور بهبود وضعیت ورم پستان در صنعت گاوشیری فراهم کرده است که می‌توان با استفاده از این ابزارکارایی برنامه‌های اصلاح نژاد را افزایش داد. مطالعه حاضر ازBRCA1 به عنوان یک ژن کاندیدا (مارکر ژنی) در ارتباط با بیماری ورم پستان و صفات ایمنولوژیکی در جمعیتی از گاوهای هلشتاین ایرانی استفاده شده است. نتیجه آن مشاهده وجود چندشکلی تک نوکلئوتیدی در این جایگاه ژنی بود. با مطالعه بر روی این چندشکلی‌ها و ترکیبات ژنی مختلفی که از آن ها حاصل شد و بررسی اثر ژنتیکی هر یک از این ترکیبات ژنی بر روی شمار سلول‌های بدنی شیر که به عنوان یک ابزار انتخاب غیرمستقیم برای کاهش ورم پستان در بسیاری از مطالعات پیشنهاد شده است، می‌توان در برنامه انتخاب به وسیله نشانگر بهره برد. با توجه به اینکه استفاده از روش‌های نوین ژنتیک مولکولی در اصلاح نژاد دام باعث پیشرفت ژنتیکی بیشتری در زمینه انتخاب برای یک صفت می‌شود و آشکار کردن مکانیسم‌های مولکولی پیچیده مسئول مقاومت به ورم پستان می‌تواند برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر سودمند باشد، کاربردی کردن نتایج این تحقیق در اتخاد استراتژی‌های اصلاح نژادی بسیار مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با استفاده از همکاری واحدگاوداری صنعتی آذرنگین و جهاد کشاورزی تبریز انجام شده است که بدین وسیله از همکاری پرسنل در انجام نمونه‌گیری و در اختیار گذاشتن اطلاعات فنوتیپی صمیمانه سپاسگزاری می‌شود همچنین از مساعدت‌ها و همکاری علمی جنابان آقایان دکتر صادق علیجانی و دکتر کریم حسنپور اعضای هیئت علمی گروه علوم دامی دانشگاه تبریز و مهندس رامین نعمت‌زاده صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

آهنگران رجبی، نسترن. (۱۳۹۰). برآورد پارامترهای ژنتیکی بیماری های شایع در گاو هلشتاین. پایانامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی. دانشگاه تبریز.

جمالی، ج. و بابااحمدی، ا. (۱۳۹۱). مطالعه اثرات دوره زایش بر صفت نمره سلول های سوماتیکی شیر در دو گله گاو شیری هلشتاین در استان ایلام. پنجمین کنگره علوم دامی ایران. اصفهان. ص ۵۳۰-۵۲۷.

شهریاری، ذ. (۱۳۸۳). نشانگرهای مولکولی در مهندسی ژنتیک و اصلاح نباتات. دانشکده کشاورزی. دانشگاه شیراز.

قره یاضی، ب. (۱۳۷۵). کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات. مجموعه مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. دانشگاه صنعتی اصفهان. ص. ۲۰۰-۱۶۲.

میرزایی، ع. ، ایاره، م. ، روشن قصرالدشتی، ع. (۱۳۹۱). عوامل مؤثر بر تعداد سلول های سوماتیک شیر گاو بر اساس سابقه ورم پستان بالینی. پنجمین کنگره علوم دامی ایران. اصفهان. ص۶۶۵-۶۶۱.

Ali, A. K. A. and Shook, G. E. (1980). An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. *Journal of Dairy Scienc*. 63:48.

Angelini, A., Di Febbo, C., Rullo, A., Di Ilio, C., Cuccurullo, F. and Porreca, E. (2000). New method for the extraction of DNA from white blood cells for the detection of common genetic variants associated with Thrombophilia. *Journal Pathophysiology Of Haemostasis and Thrombosis*. 32(4): 180-183.

Angelo, F., Santillo, A., Sevi, A. and Albenzio, M. (2007). A simple salting-out method for extraction from milk somatic cells. Investigation into the Goat CS1S1 gene. *Journal of Dairy Science*. 90(7): 3550-3552.

Atashpaz, A., Barzegari, A. and Azarbaijani, R. (2008). General DNA extraction kit. Iranin Patent Office, No. 48024.

Atashpaz, S., Khani, S., Barzegari, A., Barar, J., Vahed, S. Z., Azarbaijani, R. and et al. (2010). A robust universal method for extraction of genomic DNA from bacterial species. *Journal of Microbiology*. 79(4): 538-542.

Barzegari, A., Vahed, S.Z., Atashpaz, S., Khani, S. and Omidi, Y. (2010). Rapid and simple methodology for isolation of high quality genomic DNA from coniferous tissues (Taxus Baccata). *Molecular biology reports Journal*. 37(2): 833-837.

Beaudeau, F., Seegers, H., Ducrocq, V., Fourichon, Ch. and Bareille, N. (2000). Effect of health disorders on culling in dairy cows: a review and critical discussion. *Jornal Annales de Zootech*nie (Animal Research). 49(4): 293-311.

Berry, D. P., Bermingham, M. L., Good, M. and More, S.J. (2011). Genetics of animal health and disease in cattle. *Irish Veterinary Journal* .64(1): 5.

Carlen, E., Strandberg, E. and Roth, A. (2004). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 87(9): 3062-3070.

Citek, J., Rehout, V., Hanusova, L., Mikova, A. and Jaskova, I. (2011). Polymorphisms in CGIL4, breeding value for somatic cell count and resistance to mastitis. *Czech Journal of Animal Science*. 56(7): 301–304.

Dadpasand, M., Zamiri, M. J. and Atashi, H. (2013). Genetic correlation of average somatic cell score at different stages of lactation with milk yield and composition in Holstein cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 14(3): 190-196.

Dekkers, J. C. and Hospital, F. (2002). The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*. 3(1): 22-32.

Donovan, P. J. and Livingston, D. M. (2010). BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*. 31(6): 961–967.

Falconer, D. S. and Mackay, T. F. C. (1996). Introduction to quantitative genetics. 4th Ed. Longman Harrow Essex.

Fleischer, F., Metzner, M., Beyerbach, M., Hoedemaker, M. and et al. (2001). The Relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84(9): 2025-2035.

Grohn, Y. T., Eicker, S. W. and Hertl, J. A. (1995). The association between previous 305-day milk yield and disease in New York state dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 78: 1693-1702.

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*. 15(1): 62-65.

Krum, S. A., Womack, J. E. and Lane,T. F. (2003). Bovine BRCA1 shows classic responses to genotoxic stress but low in vitro transcriptional activation activity. *Oncogene* .22 (38): 6032-6044.

Lewis, C. M., Cler, L. R., Bu, D. W., Zochbauer-Mnller, S., Milchgrub, S., Naftalis, E. Z. and et al. (2005). Promoter hypermethylation in benign breast epithelium in relation to predicted breast cancer risk. *Clinical Cancer Research*. 11(1): 166-172.

Lund, M. S., Sahana, G., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Schulman, N., Thomsen, B., Viitala, S., Williams, J. L., Sabry, A., Viinalass, H. and Vilkki, J. (2007). Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic sell score on five chromosomes in three nordic dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*. 90(11): 5282-5290.

Madsen, O., Scally, M., Douady, C. J., Kao, D. J., Debry, R.W., Adkins, R., Amrine, H. M., Stanhope, M. J., de Jong, W. W. and Springer, M. S. (2001). Parallel adaptive radiations in two major clades of placental mammals. *Nature*. 409 (6820): 610-614.

Miki, Y., Swensen, J., Shatluck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M., Ding, W. and et al. (1994). Astrong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266(5182): 66-71.

Mostert, B. E., Banga, C., Groeneveld, E. and Kanfe, F. H. J. (2004). Breeding value estimation for somatic cell score in South African dairy cattle. *South African Journal of Animal Science*. 34 (2): 32-34.

Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaee, M. J. and Rahbarizadeh, F. (2005). Modified salting-out method: high-yield, high quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 19(6): 229–232.

Nei, M. (1977). F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*. 41(2): 225-233.

Phillips, H. A., Howard, G. C. W. and Miller, W. R. (2000). P53 Mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. *British Journal of Cancer*. 82(1): 136-141.

Prendiville, R., Pierce, K. M. and Buckley, F. (2010). A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F1 cross with regard to milk yield, somatic cell score, mastitis, and milking characteristics under grazing conditions. *Jornal of Dairy Science*. 93(6): 2741–2750

Rajala, P. J. and Grohn, Y. T. (1998). Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 39(1): 1-13.

Sahana, G., Lund, M. S., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Iso-Touru, T., Thomsen, B., Viitala, S., Sorensen, P., Williams, J. L. and Vilkki, J. (2008). Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Journal of Animal Genetics*. 39(1): 354-362.

Samadi shams, S., Zununi, V., Soltanzad, F., Kafil, V., Barzegari, A., Atashpaz, S. and Barar, J. (2011). Highly effective DNA extraction method from fresh,frozen, dried and clotted blood samples. *Bio Impacts*. 1(3): 183-187.

Sorensen, L. P., Guldbrandtsen, B., Thomasen, J. R. and Lund, M. S. (2008). Pathogen-Specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish Holstein cattle. *Journal of Dairy Science.* 91(6): 2493-2500.

Soumet, C., Ermel, G., Rose, N., Rose, V., Drouin, P., Salvat, G. and Colin, P. (1999). Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of Salmonella sp., Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied microbiology.* 28 (2): 113- 117.

Wang, S. S., Thornton, K., Kuhn, A. M., Nadeau, J. G. and Hellyer, T.J. (2003). Homogeneous Real-Time Detection of Single- Nucleotide Polymorphisms by Strand Displacement Amplification on the BD ProbeTec ET System. *Clinical Chemistry.* 49(10): 1599-1607.

Wolfinger, R. and O'Connell, M. (1993). Generalized linear mixed models: A pseudo-likelihood approach. *Journal of Statistical Computation and Simulation*. 48: 233-243.

Yuan, Z., Chu, G., Dan, Y., Li, J., Zhang, L., Gao, X., Gao, H., Li, J., Xu, Sh. and Liu, Z. (2012). BRCA1: a new candidate gene for bovine mastitis and its association analysis between single nucleotide polymorphismsand milk somatic cell score. *Molecular Biology Reports*. 39(6): 6625–6631.

Zamani, F., Babaei, M., Fazeli, M. H., Sharif zadeh, A. and Mohaghegh pour, A. (2009). Economical characterization of sub clinical mastitis in dairy Holstein herds in Isfahan province. Proceedings of last national congress of poultry and livestock industrial. Iran, Golestan University. 223-227.