

## بررسی فراوانی ژنی عامل بیماری DUMPs در گله‌های گاو هلشتاین و بومی گیلان با استفاده از روش PCR-RFLP

- حسین علایی: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱
- سیدضیاءالدین میرحسینی\*: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۳

### چکیده

نقص سنتز آنزیم اوریدین مونو فسفات (DUMPs) یک بیماری ژنتیکی اتوزومی مغلوب در گاو است. جهش در این ژن باعث می‌شود که یک کدون خاتمه در پروتئین این آنزیم به وجود آید. امروزه با استفاده از تکنیک‌های مولکولی می‌توان ژن‌های مغلوب در افراد هتروزیگوت را شناسایی کرد. در این تحقیق از دو جمعیت گاو، شامل ۱۰۰ راس هلشتاین پرورش یافته در شرکت سهامی دامپروری سپیدرود و ۱۰۰ راس دام نگهداری شده در مرکز اصلاح نژاد بومی فومن واقع در استان گیلان به صورت تصادفی و انفرادی نمونه خون تهیه شد. DNA نمونه‌ها به روش نمکی بهینه یافته استخراج شده و از آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ۱۰۸ جفت بازی از اگزون ۵ ژن DUMPs استفاده شد. به منظور تشخیص و شناسایی حاملین، عمل هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی *AvaI* بر روی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 آنجایی که 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

ضروری و اساسی سنتز اسید نوکلئیک هستند، نقص در سنتز این آنزیم‌ها می‌تواند سنتز پریمیدین‌ها را متوقف سازد (Shanks و همکاران، ۱۹۸۴).

استفاده از اسپرم‌های گاو نر برتر (در صورتی که حامل ژن معیوب باشند) در برنامه‌های اصلاح نژادی در جمعیت‌های خالص و نیز دورگ‌گیری‌ها با گله‌های بومی می‌تواند فراوانی ژن مغلوب را افزایش دهد و در نتیجه عملکرد این دام‌ها را به دنبال 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 روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

از ۱۰۰ راس گاو هلشتاین پرورش یافته در شرکت سهامی دام‌پروری سپیدرود رشت و ۱۰۰ راس گاو بومی گیلان نگهداری شده در ایستگاه اصلاح نژاد گاو بومی فومن واقع در استان گیلان به صورت تصادفی و انفرادی نمونه خون تهیه شد. با استفاده از روش نمکی بهینه یافته، از نمونه‌ها DNA استخراج گردید (Javanrouh و همکاران، ۲۰۰۶). جهت تکثیر ژن UMPs از آغازگرهای رفت و برگشت با توالی زیر استفاده شد (Schwenger و همکاران، ۱۹۹۴):

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 زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و غلظت‌های

مختلف آن‌ها در جدول ۱ مشخص شده‌اند.

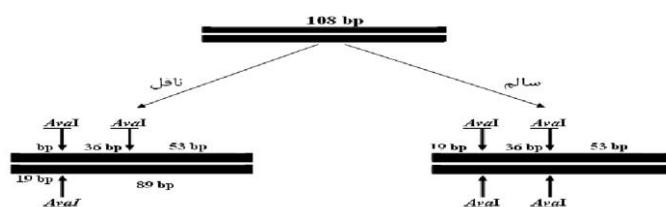
در گاو حداقل ۲۰۰۰۰ آنزیم متفاوت کشف شده است که فرآیندهایی نظیر رشد، شیردهی، تولیدمثل و غیره را امکان‌پذیر می‌سازد. اختلال در هر یک از این آنزیم‌ها مشکلات زیادی را در پرورش گاوهای شیرده به وجود می‌آورد. بیش از ۲۰۰ اختلال آنزیمی در انسان منشاء ژنتیکی دارد که در این بین ۷ نوع آن به طور شایع در گاو دیده شده است. بیماری ژنتیکی DUMPs که اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است نیز در اثر ایجاد اختلال آنزیمی به وجود می‌آید (Robinson و همکاران، ۱۹۹۳). این بیماری یک نقص ژنتیکی در گاوهای هلشتاین بوده و در اثر ایجاد اختلال در سنتز آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتتاز (UMPs) رخ می‌دهد (Patel و همکاران، ۲۰۰۶). این آنزیم مسئول تبدیل اورتیک اسید به اوریدین مونوفسفات (UMP) می‌باشد که برای تشکیل بازهای پریمیدین ضروری است (Robinson و همکاران، ۱۹۹۳). این نقص ژنتیکی به صورت یک صفت اتوزومی مغلوب انتقال می‌یابد (Shanks و همکاران، ۱۹۸۴). جهش مرتبط با این بیماری در ژن UMPs شناخته شده است که باعث ایجاد یک کدون توقف در پروتئین ایجاد کننده این آنزیم می‌شود (Schwenger و همکاران، ۱۹۹۳). گوساله‌های مبتلا به DUMPs حدوداً در روز چهارم بارداری دچار مرگ زودرس شده و به صورت نارس و مرده متولد می‌شوند (Agerholm و همکاران، ۱۹۹۷). از لحاظ تولید شیر گاوهای ناقل این نقص دارای تولید شیر طبیعی بوده اما از لحاظ ترکیبات شیر در گاوهای ناقل اسیداروتیک ۵ تا ۱۰ 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

جدول ۱: مخلوط واکنش PCR

غلظت نهایی	مواد واکنش
۵۰ نانوگرم/میکرولیتر	الگو DNA
۱X	بافر PCR
۲/۵ میلی مولار	dNTPs
۵ پیکومول/میلی لیتر	آغازگر مستقیم
۵ پیکومول/میلی لیتر	آغازگر معکوس
۱/۵ میلی مولار	MgCl <sub>2</sub>
۱U	آنزیم تک پلیمرز Taq DNA polymerase
—	آب دو بار تقطیر استریل



محصولات هضم آنزیمی، با استفاده از ژل آگارز ۴ درصد با ولتاژ ۱۰۰ ولت و زمان ۱ ساعت الکتروفورز شدند. آنزیم *AvaI* دارای دو جایگاه برش بر روی الی سالم DUMPs و یک جایگاه برش بر روی الی ناقص این ژن می‌باشد، در نتیجه انتظار می‌رود که در افراد سالم با ژنوتیپ TD فقط ۳ قطعه بر اثر هضم این آنزیم پدید آید (قطعات ۵۳، ۳۶، و ۱۹ جفت بازی) و در افراد ناقل با ژنوتیپ DP (هتروزیگوت) نیز چهار قطعه (۸۹، ۵۳، ۳۶ و ۱۹ جفت بازی) حاصل خواهد شد. هر چند افراد بیمار در دوران جنینی می‌میرند و در این مطالعه انتظار دیدن ژنوتیپ آن‌ها نبود، اما در صورت بررسی ژنوتیپ آن‌ها باید دو قطعه ۸۹ و ۱۹ جفت بازی مشاهده گردد (شکل ۱).

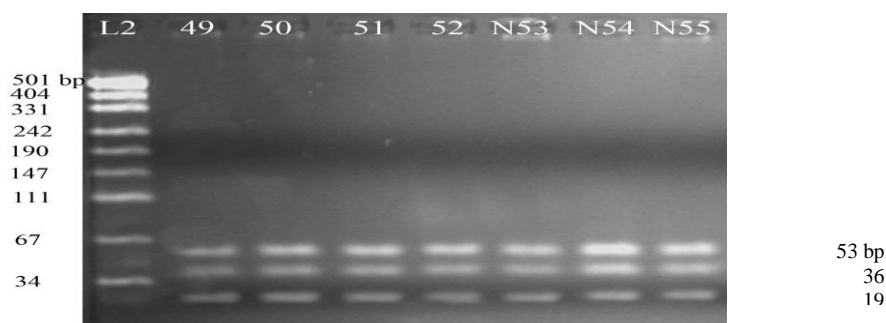


شکل ۱: تصویر شماتیک سایت برشی آنزیم *AvaI* روی ژن UMPs

آنزیم *AvaI* دارای ۲ جایگاه برش در محصولات تکثیر شده واکنش زنجیره پلیمرز است، که در نتیجه عمل هضم آنزیمی، اگر در هیچ‌یک از ۲ جایگاه جهش وجود نداشته باشد، انتظار می‌رود سه قطعه به طول ۱۹، ۳۶، و ۵۳ نوکلئوتیدی روی ژل آگارز پس از الکتروفورز مشاهده شود (هموزیگوت غالب). شکل ۲ 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.

## نتایج

استخراج DNA نمونه‌ها به خوبی انجام شد. الکتروفورز محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد از جایگاه ژن UMPs نشان داد که قطعه ۱۰۸ جفت بازی در نظر گرفته شده به خوبی 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.



شکل ۲: الکتروفورز محصولات هضم شده توسط آنزیم *AvaI*

ستون اول از سمت چپ نشانگر اندازه، شماره‌های ۵۲، ۵۱، ۵۰ و ۴۹ نمونه‌های گاو هلشتاین و شماره‌های N۵۳، N۵۴، N۵۵ و N۵۶ 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، نقلی از این بیماری وجود ندارد که با نتایج به‌دست آمده توسط Oner و همکاران (۲۰۱۰)، Akyuz و Ertugrul (۲۰۰۸)، Patel و همکاران (۲۰۰۶) و Harlizius و همکاران (۱۹۹۶) مشابه است.

در هند نیز Rajesh و همکاران (۲۰۰۶) یک گله ۶۴۲ راسی گاو هلشتاین هندی را برای شناسایی ناقلین DUMPs مورد مطالعه قرار دادند که نقلی مشاهده نشد.

طی تحقیقی که Rahimi و همکاران (۲۰۰۶) در مورد ۳۷ 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 (۲۰۱۰) پژوهشی را روی ۲۲۵ راس گاو هلشتاین واقع در آنکارا قسمت مرکزی آناتولی و ۱۲۵ 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 بر این هر قدر 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 (۲۰۰۶) و Kaminski و همکاران (۲۰۰۵) بود.

در پژوهشی که Akyuz و همکاران (۲۰۰۸) روی گاوهای بومی و براون سوئیس ترکیه انجام دادند نیز نقلی 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، ۲۰۰۱؛ Fesus و همکاران، ۱۹۹۹؛ Poli و همکاران، ۱۹۹۶).

اکثر نتایج به‌دست آمده در این مطالعات، تأیید کننده این فرضیه است که بیماری DUMPs محصولی ناخواسته از یک برنامه اصلاح نژادی بوده و منشأ 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. در صورتی که فراوانی الل مغلوب کم‌تر از ۰/۰۰۵ باشد، فراوانی هتروزیگوت‌ها که علیه آن‌ها انتخابی صورت نمی‌گیرد کم‌تر از ۰/۰۱ خواهد بود، در حالی که کل تعداد دام‌های آزمایش شده در هر جمعیت ۱۰۰ راس بوده (یعنی کم‌تر از یک راس در ۱۰۰ 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.



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.; Esmail khania, 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 57<sup>th</sup> 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.

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 هلاکت‌تین 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 بومی - فومن، 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.



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*. Vol. 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.

