نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۵ شماره ۲/ سال۱۳۹۴

بررسی نقص های ژنتیکی CVM و BLAD با استفاده از سلول‌های سوماتیک شیر و سلول های خون در جمعیتی از گاوهای هلشتاین

بهزاد همتی[1*] و علیرضا نوشری[1]

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۶

[1] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، **کرج، ایران**

[*] مسئول مکاتبه: Email: hemati@kiau.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: در تحقیق حاضر نقص‌های ژنتیکی چسبندگی گلبول‌های سفید (BLAD) و ناهنجاری ستون فقرات (CVM) در جمعیتی از گاوهای هلشتاین با استفاده از سلول‌های سوماتیک شیر و سلول های خون مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماری BLAD از طریق یک جهش نقطه‌ای به واسطه تاثیر منفی بر سیستم خون‌ساز بدن موجب کاهش مولکول‌های چسبندگی در سطح نوتروفیل‌ها می‌شود و در بیماری CVM ، یک جهش نقطه‌ای موجب می‌شود که گوساله مرده زودتر از حد طبیعی با برخی اختلالات جسمی متولد شود. **هدف**: این تحقیق به منظور جلوگیری از تولید گوساله‌های ناقص و یا مرده و همچنین مقایسه دو روش استخراج DNA از طریق خون و شیر انجام شد. **روش کار**: ابتدا نمونه تانک شیر از 50 گله گاو شیری جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، روش PCR-RFLP با به‌کار بردن جفت آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعات ژنی و هضم آنزیمی برای شناسایی جهش‌های نقطه‌ای CVM و BLAD انجام گردید. سپس یک گله (CVM+) که شامل ۱۲۰ گاو دوشا بود به طور تصادفی انتخاب و خون‌گیری از گاوهای گله انجام و دو راس گاو به عنوان ناقلین CVM شناسایی شدند. برای شناسایی گله‌های ناقل در بین ۵۰ گله با حدود تقریبی ۱۰۰۰۰ راس گاو دوشا، تنها از ۵۰ استخراج DNA و تست مولکولی استفاده شد ولی برای شناسایی ناقلین در یک گله ۱۲۰ راسی، تعداد ۱۲۰ استخراج DNA از خون و تست مولکولی انجام شد. **نتایج**: در این تحقیق جهش BLAD در گله‌های مورد بررسی مشاهده نشد ولی جهش نقطه‌ای CVM در ۱۷ گله از گله‌های مورد بررسی مشاهده شد. **نتیجه گیری نهایی**: با مقایسه نتایج فوق مشاهده می‌شود که استفاده از تانک شیر برای تشخیص وجود یک نقص ژنتیکی در گاوهای ماده، به مراتب نسبت به خون‌گیری از تک تک گاوها آسان‌تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. زیرا اگر به طور متوسط هر گله دارای ۲۰۰ گاو دوشا باشد در حقیقت ۵۰ تست برای شناسایی گله‌های آلوده انجام شده است. از طرف دیگر علاوه بر مزیت اقتصادی، به دلیل عدم ایجاد استرس در دام، تمایل دامداران به استفاده از شیر به جای خون به منظور بررسی نقص‌های ژنتیکی یا وجود بیماری‌های ویروسی بیشتر است و لذا استخراج DNA از شیر به جای خون توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: ناهنجاری ستون فقرات، گاو هلشتاین، چسبندگی گلبول‌های سفید، سلول‌های سوماتیک شیر

مقدمه

تمام گونه‌های چارپایان به انواع مختلفی از نقص‌های ژنتیکی مبتلا می‌شوند. به عنوان مثال سندرم عنکبوتی و سندرم استرس در گوسفندان دو مثال برجسته هستند که در دهه‌های اخیر منجر به فشار اقتصادی شده بودند.

شاید معروف‌ترین مثال از نقص‌های ژنتیکی در صنعت دامپروری در قرن بیستم، کوتولگی باشد که در سال های ۱۹٤۰ تا ۱۹۵۰ در نژادهای هرفورد و آنگوس بیشترین شیوع را داشته است. علاوه بر آن چندین نقص ژنتیکی دیگر از جمله نقص‌های ژنتیکی چند انگشتی و چسبندگی گلبول های سفید خون در نژادهای مختلف گوشتی و شیری در دهه های گذشته یافت شده است. در مواردی بسیار نادر نیز برخی از پرورش دهندگان گاو با تولد گوساله‌هایی مواجه می‌شدند که همزمان چندین نقص را با هم داشتند. اخیرا با نقص ژنتیکی جدیدی در گله‌ها مواجه هستیم که CVM[۱] یا ناهنجاری ستون مهره ها نامیده می‌شود این نقص ژنتیکی منجر به ایجاد یک بیماری کشنده موروثی در گاوهای هلشتاین می‌شود. در این بیماری گوساله مرده زودتر از حد طبیعی با اختلالاتی چون گردنی کوتاه‌تر از حد طبیعی، دست و پاهای بد شکل، ستون فقرات خمیده، دنده‌هایی متصل به هم، عقب ماندگی رشد و بعضا با برخی ناهنجاری‌های قلبی متولد می‌شود و به جز در استخوان خاجی جراحت و آسیب در تمام استخوان‌ها مشاهده می‌شود. اغلب جنین‌های مبتلا به ناهنجاری ستون مهره‌ها قبل از روز ۲٦۰ آبستنی سقط می‌شوند (آگرهولم[۲] و همکاران ۲۰۰۰؛ آگرهولم و همکاران ۲۰۰٤ و فی[۳] و همکاران ۲۰۰۸).

توارث این بیماری به صورت اتوزومال مغلوب است و علت آن جهش از نوکلئوتید G به T در موقعیت ۵۵۹ کروموزوم شماره سه اگزون چهار از ژن SLC35A3 می‌باشد که این جهش باعث تغییر یوریدین ۵-دی فسفات-ان-استیل گلوکزآمین می‌شود که نتیجه آن تبدیل اسیدآمینه والین به فنیل آلانین می‌باشد (چو[٤] و همکاران ۲۰۰۸؛ بتکا[۵] و همکاران ۲۰۰۸؛ بوجنان[٦] و همکاران ۲۰۰۹ و رضایی و همکاران ۲۰۰۹).

ژن مربوط به ناهنجاری ستون مهره‌ها[۷] درگاو به طور کامل تعیین توالی شده و طول کامل آن ۲۲٤۰۰ باز[۸] می‌باشد. بیشترین ضربه اقتصادی این ژن، از دست رفتن جنین‌ها و نیز فاصله زیاد گوساله‌زایی است. از نرخ عدم بازگشت به فحلی[۹] نیز معمولا به عنوان معیاری برای باروری استفاده می‌شود. طبق بررسی‌هایی که توسط کانائی[۱۰] و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام شد، تا روز ۲۸ آبستنی هیچ تفاوتی بین دام‌های سالم و دام‌های ناقل از نظر نرخ عدم بازگشت به فحلی دیده نمی‌شود. طبق گزارش آنها، اولین تفاوت‌ها از نظر نرخ عدم برگشت به فحلی در روز ۱٦۸ مشاهده می‌شود و تنها صفتی که تحت تاثیر آلل مغلوب ژن CVM قرار گرفت، تعداد دفعات تلقیح در گاوهای فحل بود. همین یافته در نتایج حاصل از تحقیقات مالهر[۱۱] و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تایید شد.

وجود الل مغلوب نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات، نرخ باروری را در حاملین این الل کاهش می‌دهد و گاوهای حاملی که در دو یا سه آبستنی متوالی سقط

[۱] Complex vertebral malformation
[۲] Agerholm
[۳] Fee
[٤] Chu
[۵] Betka
[٦] Boujenane
[۷] SLC35A3
[۸] Access no: AY160683
[۹] Non Return Rate
[۱۰] Kanae
[۱۱] Malher

جنین داشته باشند، غالبا در تلقیح بعدی انتخاب نمی‌شوند و کشتار می‌شوند (آگرهولم و همکاران ۲۰۰۰). نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون BLAD[۱] در دام‌ها نیز یک نقص ژنتیکی اتوزومال مغلوب و کشنده مربوط به نقص سیستم ایمنی است که منجر به عفونت‌های باکتریایی و به تاخیر انداختن التیام زخم و تاخیر در رشد می‌شود. نقص چسبندگی گلبول‌های سفید خون تنها به علت یک جهش نقطه‌ای به وقوع می پیوندد و این جهش موجب جابجایی دو باز آلی آدنین و گوانین در موقعیت نوکلئوتید ۳۸۳ ژن CD18 می‌شود و موجب جانشینی اسید آمینه اسپارتیک با گلیسین در موقعیت ۱۲۸ خواهد شد و در نهایت منجر به مرگ زودرس گوساله‌های تازه متولد شده در سنین قبل از یک تا سه ماهگی می‌شود. از علائم آن می‌توان به اسهال شدید، ذات الریه، تب شدید و عفونت‌های دیگر اشاره کرد (اونر[۲] و همکاران ۲۰۱۰).

یکی از محدودیت‌های انتخاب بر اساس رکوردهای فنوتیپی این است که در حین انتخاب ، بسیاری از ژن‌های مفید احتمالا نادیده گرفته می شوند یا به طور موثر مورد استفاده واقع نمی‌شوند و از طرفی ممکن است به‌طور ناخواسته تعدادی از نقایص ژنتیکی نظیر BLAD ، CVM ، DUMPS[۳] ، FACTOR XI و ... به نسل بعد انتقال یابند. چنین وضعیتی نیاز به کاربرد تکنیک‌های متنوع ژنتیک مولکولی را که منجر به شناخت بهتر ژنوم می گردد، روز به روز افزایش می دهد. شناسایی ناقلین نقص‌های ژنتیکی به‌ویژه در گاوهای نر و جلوگیری از آمیزش بین ناقلین، راهی بسیار موثر در پیشگیری از بروز نواقص ژنتیکی و کاهش خسارات ناشی از کاهش تولید و افزایش فاصله نسلی می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی ناقلین نقص‌های ژنتیکی مذکور، به منظور جلوگیری از تولید گوساله‌های ناقص و یا مرده و همچنین مقایسه دو روش استخراج DNA از طریق خون و شیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۵۰ گله گاو شیری، از استان البرز به‌صورت تصادفی انتخاب و از تانک شیر آنها نمونه گیری شد. هر یک از گله‌ها دارای حدود ۱۰۰ تا ٤۰۰ راس گاو دوشا بودند. از هر یک از گله‌های انتخاب شده، ۳۰ میلی لیتر نمونه شیر از تانک شیر تهیه و سپس در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. ۱.۵ میلی لیتر از نمونه شیر هر گله به صورت جداگانه درون میکروتیوپ ۱.۵ میلی لیتری ریخته شد و سپس به مدت ۲۵ دقیقه درون بن ماری در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس ماده شناور و چربی سطح مایع تخلیه و رسوب باقی‌مانده با استفاده از محلول تامپون PBS[٤] شستشو داده شد، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت کیاژن[۵] مطابق دستورالعمل شرکت، صورت گرفت. پس از استخراج DNA ، برای مشاهده و بررسی کیفیت آن از ژل آگارز ۱.۵ درصد استفاده شد. نمونه‌ها عاری از هر گونه کشیدگی و شکستگی بودند که نشان از کیفیت خوب و عدم آلودگی آنها داشت و کیفیت آنها برای PCR مناسب ارزیابی گردید.

برای تکثیر ناحیه جهش یافته CVM از آغازگرهای طراحی شده توسط کپنک[٦] (۲۰۰۷) استفاده شد که توالی آغازگرها به صورت زیر بودند:

Forward: 5'CACAATTTGTAGGTCTCACTG CA3'
Reverse: 5'CGATGAAAAAGGAACCAAAAGGG3'

برای تکثیر ناحیه جهش یافته در ژن CD18 نیز از آغازگرهای طراحی شده توسط واتاسو بالکان[۱] و

[۱] Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency

[۲] Oner

[۳] Deficieny of Uridine Mono-Phosphate Synthase

[4] Phosphate Buffered Saline

[۵] Dnasy tissue

[٦] Kepenek

همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد که توالی آغازگرها به صورت زیر بودند:

Forward: 5˙ - CCT TCC GGA GGG CCAAGG GCT- 3˙

Reverse: 5˙ - CTC GGT GAT GCC ATT GAG GGC - 3˙

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از کیت PCR شرکت کیاژن[۲] استفاده شد. برنامه‌های دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۳۰ سیکل تکثیر با دمای واسرشت اولیه ۹٤ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، دمای واسرشت ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، دمای اتصال ٥٥ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ٤۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود.

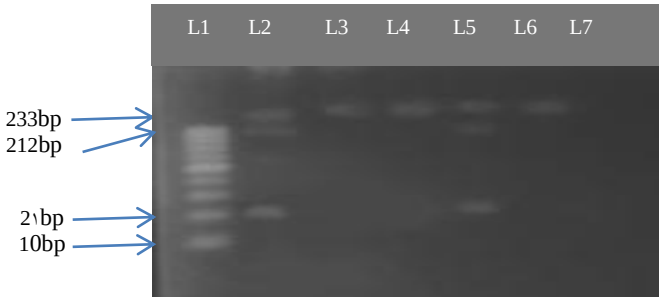
جدول ۱ – دما و زمان چرخه های حرارتیPCR

مراحل PCR	حرارت(^{0}C)	زمان
واسرشته سازی اولیه	۹۴˙C	۳ دقیقه
واسرشته سازی	۹۴˙C	۴۵ ثانیه
اتصال آغازگر	۵۵˙C	۲۰ ثانیه
بسط آغازگر	۷۲˙C	۱ دقیقه
تکرار مرحله دوم تا چهارم (۳۰ مرتبه)	–	–
بسط نهایی آغازگر	۷۲˙C	۱۰ دقیقه
نگهداری محصول در دستگاه ترموسایکلر	۴˙C	۶۰ دقیقه

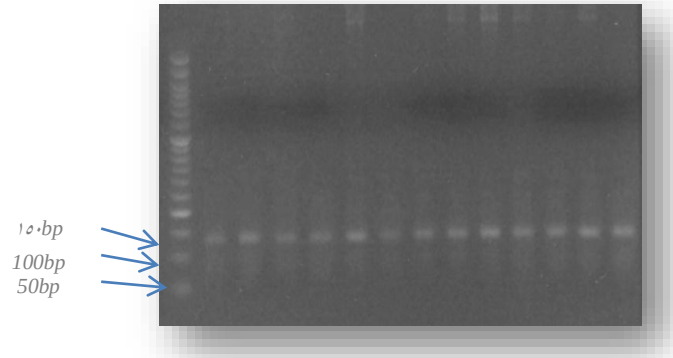
شکل ۱- L1 سایز مارکر، L2-L11 تکثیر قطعه ۲۳۳ جفت بازی حاصل از اگزون ۴ از ژن SLC35A3، L12 شاهد منفی

سپس با توجه به اختصاصی بودن آغازگرهای به‌کار برده شده برای تکثیر اگزون ٤، کروموزوم ۳ از ژن SLC35A3 به اندازه ۲۳۳ جفت باز که حاوی جهش مورد نظر ما بود، دستگاه ترموسایکلر قطعه مورد نظر را تکثیر نمود و پس از بارگذاری روی ژل آگارز دو درصد، بدون هیچ گونه باند غیر اختصاصی مشاهده شد.

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پس از برش با آنزیم EcoT22I برای شناسایی ژنوتیپ‌های ٥۰ گله گاو هلشتاین و تعیین فراوانی ژنوتیپی، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز گردید.



شکل ۲- L1 سایز مارکر، L2, L5 هتروزیگوت، L3, L4, L6 هموزیگوت غالب، L7 شاهد منفی



شکل ۳- قطعه ۱۳۶ جفت بازی حاصل از تکثیر اگزون ۵ از ژن CD18 در مقایسه با سایز مارکر

از آنزیم TaqI که یک توالی چهار نوکلئوتیدی TTCC را در محل اتصال T و C در آلل‌های غالب ژن CD18 را در مدت سه الی هشت ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می‌شکند، برای شناسایی ناقلین نقص ژنتیکی چسبندگی

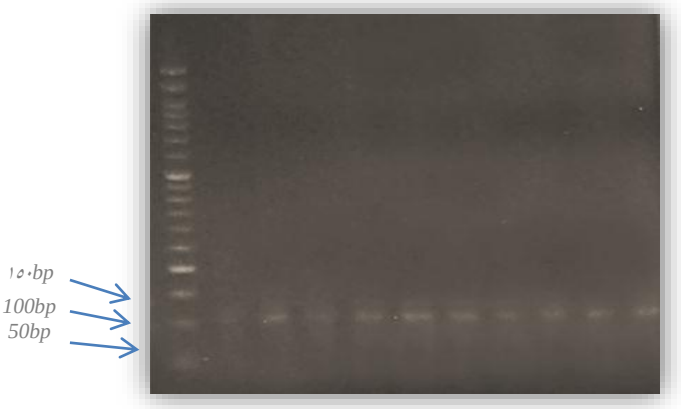
---

[۱] Vatasescu-Balcan

[۲] Hot StarTaq PCR

گلبول‌های سفید (BLAD) اگزون۵ از ژن مذکور به اندازه ۱۳٦ جفت باز تکثیر گردید. و مورد هضم آنزیمی با آنزیم TaqI قرار گرفت، این آنزیم در تمام نمونه‌ها باعث شکسته شدن قطعه مذکور به قطعات ۱۰۸ و ۲۸ جفت باز شد که نشان‌دهنده عدم وجود آلل مغلوب ژن CD18 در بین نمونه‌ها می‌باشد.

در مرحله بعد برای شناسایی دام یا دام‌های حامل، یکی از گله‌های حامل آلل موتانت ژن CVM که شامل ۱۲۰ گاو دوشا بود به طور تصادفی انتخاب شد و سپس از تک تک گاوهای موجود در گله خون گیری انجام شد. پس از استخراج DNA و تکثیر قطعات ژنی مورد نظر در نمونه‌های جدید، عمل هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم EcoT22I برای شناسایی ناقلین نقص ژنتیکی ناهنجاری ستون فقرات، روی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن SLC35A3 انجام شد و نمونه‌ها به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند.



شکل ۴ - شکست قطعه ۱۳۶ جفت باز به قطعات ۱۰۸ و ۲۸ جفت باز

توضیح اینکه قطعه ۲۸ جفت باز به علت سایز کوچک قطعه و کیفیت پایین تصویر مشاهده نمی‌شود.

نتایج و بحث

از ۵۰ گله گاو هلشتاین که از طریق استخراج DNA از سلول‌های شیر مورد بررسی قرار گرفتند، در ۱۷ گله، ژنوتیپ Aa شناسایی گردید که نشان‌دهنده ناقل بودن این گله‌ها از نظر الل موتانت ناهنجاری ستون فقرات است و در ۳۳ گله، فقط ژنوتیپ AA شناسایی گردید که نشان‌دهنده سالم بودن این گله‌ها از نظر آلل موتانت ژن CVM است و تمام گله‌های مورد بررسی از لحاظ وجود ژنوتیپ هتروزیگوت برای نقص چسبندگی گلبول‌های سفید، سالم تشخیص داده شدند. در مورد گله‌هایی که عاری از دام ناقل بودند بار دیگر نمونه گیری از تانک شیر به عمل آمد و منفی بودن آنها مجددا تایید شد. اگر این ۳۳ گله که به طور متوسط دارای ۲۰۰ گاو دوشا بوده‌اند از انجام آزمون حذف شوند به جای ٦٦۰۰ خون گیری فقط ٦٦ آزمون از طریق سلول‌های سوماتیک انجام می‌شود.

توضیح اینکه در هر میلی لیتر شیر گاوهای نرمال که فاقد ورم پستان هستند به طور متوسط ۱۸۰۰۰۰ سلول سوماتیک وجود دارد که این تعداد در مواقع ابتلا به بیماری‌های عفونی- به واسطه عملکرد سیستم ایمنی- افزایش می یابد. لذا با عنایت به اینکه این سلول‌ها در تانک شیر با هم مخلوط می‌شوند و تقریبا به صورت همگن و تصادفی در شیر پخش می‌شوند انتظار می‌رود که در هر میلی لیتر شیر مربوط به گله، تعداد قابل توجهی سلول از هر گاو وجود داشته باشد. در مرحله بعد برای شناسایی دام یا دام‌های حامل برای الل موتانت ژن CVM، یکی از گله‌های حامل آلل موتانت به طور تصادفی انتخاب شدند. این گله شامل ۱۲۰ راس گاو دوشا بود که در مرحله قبلی آلل موتانت ژن CVM در نمونه تانک شیر آنها به عنوان نماینده گله مشاهده شده بود و به عنوان حامل این نقص شناسایی گردیده بودند. پس از خون گیری از ۱۲۰ گاو، استخراج DNA صورت گرفت و تعداد ۱۱۸ دام دارای ژنوتیپ AA و دو راس دام دارای ژنوتیپ Aa تشخیص داده شدند.

ژنوتیپ	تعداد مشاهده	فراوانی %
AA	۱۱۸	0.9833
Aa	۲	0.0167

aa	۰	۰

با توجه به سقط جنین افراد هموزیگوت مغلوب در مراحل اولیه رشد، عدم دسترسی به گوساله‌های موتانت تلف شده و یا عدم استفاده از اسپرم‌های ناقل ژن موتانت تعداد ژنوتیپ‌های aa برابر با صفردرصد مشاهده و ثبت گردید. علت کم بودن تعداد افراد ناقل در این گله استفاده از اسپرم‌های غیر ناقل برای CVM توسط دامدار می‌باشد. بر اساس مطالعات قبلی افراد با ژنوتیپ مغلوب aa اغلب تا قبل از روز ۲۶۰ آبستنی می‌میرند و یا مرده به دنیا می‌آیند بنابراین عدم وجود ژنوتیپ مغلوب aa در گله‌های مذکور طبیعی می‌باشد. بر اساس شواهد بالینی نرخ بازگشت به فحلی در گاوهای ناقل ژن مذکور با گاوهای هموزیگوت غالب اختلاف نسبتا بالایی داشت که می‌تواند به‌دلیل سقط جنین در مراحل اولیه رشد باشد. از طرف دیگر برخی از ژن‌های مسئول نقص‌های ژنتیکی با صفات تولیدی مانند تولید شیر همبستگی بالایی دارند. به طوری که گاوهای ماده ناقل، شیر بیشتری تولید می کنند (پیراهری و همکاران ۱۳۸۸). رضایی و همکارانش (۲۰۰۹) هیچ دام حاملی را در گله‌های مورد بررسی در مشهد مشاهده نکردند. آگرهولم[۱] و همکارانش (۲۰۰۰ و ۲۰۰٤); ناگاهاتا[۲] و همکارانش (۲۰۰۲); چو[۳] و همکارانش (۲۰۰۸); بتکا[٤] و همکارانش(۲۰۰۸) و غانم[٥] و همکارانش (۲۰۰۸) فراوانی‌های مختلفی از نظر حاملین CVM در گله‌های خود تعیین کرده‌اند. انتخاب شیر برای استخراج DNA از سلول‌های سوماتیک موجود در آن علاوه بر صرفه جویی در زمان و هزینه، نسبت به خون گیری راحت تر است و استرسی به دام وارد نمی کند. علاوه بر آن اگر ماده گاوها آبستن باشند به علت استرس وارده به دام معمولا از طرف دامدار اجازه خون‌گیری داده نمی‌شود و در این صورت قادر به بررسی نواقص ژنتیکی در **دام**های آبستن نخواهیم شد. لذا استخراج DNA از سلول‌های سوماتیک شیر به جای استخراج از طریق سلول‌های خونی منطقی و مقرون به صرفه به‌نظر می‌رسد. همچنین با عنایت به اینکه سلول‌های سوماتیک شیر که از گلبول‌های سفید و جزیی از سیستم دفاعی دام در برابر عوامل بیماری زا هستند در زمان درگیر شدن دام، عوامل بیماری‌زا مانند باکتری و یا ویروس را منهدم و یا با خود حمل می‌کنند که می‌تواند به عنوان یکی از روش‌های دقیق تشخیص ژن‌های اختصاصی مربوط به عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرد. اگر تصور کنیم که هر یک از این ۵۰ گله به طور متوسط دارای 200 راس گاو دوشا باشند برای دستیابی به چنین نتیجه‌ای لازم بود که از حدود ۱۰۰۰۰ راس گاو خون‌گیری و آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز به عمل آید. ضمنا علاوه بر مزیت اقتصادی، از دیگر مزایای استفاده از تانک شیر گله، عدم ایجاد استرس اضافی در گاوها و در نتیجه تمایل و رضایت بیشتر گاودارها به استفاده از شیر به جای خون‌گیری از گاوها می‌باشد.

پیشنهادات

۱- استفاده از نمونه تانک شیر جهت تشخیص نقص‌های ژنتیکی و بیماری‌های ویروسی توصیه می‌گردد.

۲- اگر نمونه شیر یک گله عاری از نقص ژنتیکی تشخیص داده شد ممکن است این تشخیص به دلیل وجود تعداد کافی سلول سوماتیک مربوط به ناقلین به دلیل هموژن نبودن شیر باشد.

۳ – در مورد پاسخ منفی لازم است که جهت اطمینان از کاذب نبودن نتیجه، حداقل دو بار دیگر انجام آزمون[٦]

[۱] Agerholm
[۲] Nagahata
[۳] Chu
[٤] Betka
[٥] Ghanem
[٦] PCR-RFLP

پس از استخراج DNA از نمونه شیر جدید از گله تکرار گردد.

٤- در مورد پاسخ مثبت لازم است که برای شناسایی ناقلین موجود در گله، از تک تک گاوها نمونه گیری انجام گردد.

٥- پس از مشخص شدن ناقلین، لازم است که ناقل بودن آنها ثبت شده و استفاده از اسپرم‌های ناقل برای آنها ممنوع گردد.

٦- با رعایت موارد فوق انتظار می رود که فاصله نسلی و نرخ بازگشت به فحلی کاهش یافته و میزان تولید گله افزایش یابد.

٧- با توجه به اهمیت نقش گاوهای نر، در مورد گاوهای نری که ژنوتیپ آنها برای نقص ژنتیکی نامشخص است نیز استفاده از اسپرم‌های ذخیره شده به جای خون‌گیری جهت تعیین ژنوتیپ توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر به عنوان طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه و با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و در محل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی صورت گرفته است و لذا بدینوسیله از همکاری و مساعدت ریاست محترم دانشگاه، معاونت محترم پژوهش و فناوری و کلیه همکاران و عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری ومساعدت نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

پیراهری ا، نومی س، بادامی م، الیاسی‌زرین قبایی ق و غفاری ا، ۱۳۸۸. بررسی مولکولی بیماری BLAD در گاوهای نر مولد مرکز اصلاح نژاد دام شمال غرب و غرب کشور . مجله علوم کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره : ۳، شماره: ۱۱: ۳۹ –٤٦ .

Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O and Arnbjerg J, 2000. Complex vertebral malformations in Holstein calves. at S:\OA\2000\Arvelige sygdomme\0016 CVM.

Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O and Arnbjerg J, 2001. Complex vertebral malformations in Holstein calves. J Vet Diagn Invest 13: 333-336.

Agerholm JS, Andersen O, Almskou MB, Bendixen C, Arnbjerg J, Amand GP, Nielsen US, Panitz F and Petersen AH, 2004. Evaluation of the inheritance of the complex vertebral malformation syndrome by breeding studies. Acta vet scand 45: 133-137.

Betka L, Tatjana K and Vladimir M, 2008. Detection of recessive mutations (CVM, BLAD and Red factor) in Holstein bulls in Slovenia J Cent Eur Agric Volume 9(1): 101-106.

Boujenane I and Ouhmama K, 2009. Prevalence of BLAD and CVM in Holstein dairy cattle introduced to morocco. Egyptian J Anim Prod 46(1): 19-26.

Chu Q, Sun D, Yu Y Zhang Y and Zhang Y, 2008. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. J Vet Diagn Invest 20: 228–230.

Fee SA, Malone FE, 2008, Complex vertebral malformation in a Holstein fetus in Ireland, Veterinary Record 162: 132.

Ghanem ME, Akita M, Suzuki T, Kasuga A, Nishibori M, 2008. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. Anim Reprod Sci 103: 348-354.

KanaeY, Endoh D, Nagahata H and Hayashi M, 2005. A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis. J Vet Diagn Invest 17: 258-259.

Kepenek ES, 2007. Polymorphism of Prolact in (PRL), Diacylglycerol Acyl transferase (DGAT-1) and Bovine Solute Carrier Family 35 Member 3 (SLC35A3) genes in native cattle breeds and its implication for Turkish cattle breeding. Master’s thesis, Middle East Technical University, Ankara.

Malher X, Beaudeau F, Fourichon C and Philipot JM, 2003. Effects of Sire and Dam Genotype for Complex Vertebral Malformation (CVM) on Fertility in Holstein dairy cows and heifers in Brittany (France). Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics.

Nagahata H, Oota H, Nitanai A, Oikawa Sh, Higuchi H, Nakade T, Kurosava T, Morita M and Ogawa H, 2002. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. J Vet Med Sci 64(12): 1107–1112.

Oner Y, Keskin ZA and Elmaci C, 2010. Identification of BLAD, DUMPS, CitruUinamia and Factor XI Deficiency in Holstein Cattle in Turkey. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 5(1): 60-65.

Rezaei AR, Nassiry MR, Sadeghi B, Shafagh-Motlagh A, Tahmoorespour M and Valizadeh R, 2009. Implication of complex vertebral malformation and deficiency of Uridinemonophosphate synthase on molecular-based testing in the Iranian Holstein bulls population. African Journal of Biotechnology 8(22): 6077-6081.

Vatasescu-Balcan RA, Manea MA, Georgescu SE, Dinischiotu A, Tesio CD and Costache M, 2007. Evidence of single point mutation inducing BLAD disease in Romanian Holstein-derived cattle breed. Biotechnol Anim Husb 23**:** 375-381.

The study of CVM and BLAD genetic defects using milk somatic cells and blood cells in a population of Holstein cows

B Hemati[1]* and A Noshari[1]

Received: August 24, 2014 Accepted: February 15, 2015
[1]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran
*Corresponding author: Email: Hemati@kiau.ac.ir

Abstract

BACKGROUND: In the present research, molecular detection of **B**ovine **L**eukocyte **A**dhesion **D**eficiency (BLAD) and **C**omplex **V**ertebral **M**alformation (CVM) in a population of Holstein cows have been done using milk somatic cells comparing with Blood cells. BLAD characterized by negative affecting on the haematopoietic system via reduced expression of the adhesion molecules on neutrophils. The molecular cause of BLAD is a single point mutation. CVM characterized by intra-uterine mortality with some disorders. The molecular cause of CVM is also a point mutation. **OBJECTIVES:** This study has been done in order to prevention of intra-uterine mortality and comparing of DNA extraction by Milk or blood. **METHODS:** In the first step of our research program, tank milk samples from 50 herds were collected. PCR-RFLP was performed to detect a point mutation of both CVM and BLAD genes. Then an affected herd with 120 cows was randomly selected for individual test using blood samples. We showed two cows out of 120 were identified as carriers of this gene. We have done 50 DNA extractions and molecular testes in order to detect existence of carriers in 50 herds with total of 10000 cows and we have done also 120 testes for detection of carriers in a herd with 120 cows. **RESULTS:** In these herds, we didn't find any affected herd with the mutant allele of BLAD but we found the single point mutation of CVM in 17 different herds. **CONCLUSIONS:** In the present study we showed that, detection for all genetic defects using tank milk samples is more economic and easyer than the other methods. because if we assume the average of 200 dairy cows for each herd, in fact we have done 50 testes instead of 10000 in 50 herds. On the other hand, sampling with less stress for cows is always preferable for breeders to blood sampling for purposes like detection of genetic defects or viral diseases.

Keywords: CVM, BLAD, Holstein cows, Genetic defects, Milk somatic cells