

## همراهی همردیف‌های ژن *BoLA-DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرنوس

هادی آتشی<sup>۱</sup>، محمد مرادی شهربابک<sup>۲\*</sup>، حسن مهربانی یگانه<sup>۳</sup>، سید رضا میرایی آشتیانی<sup>۲</sup> و قدرت‌الله رحیمی میانجی<sup>۴</sup>  
 ۱. دانشجوی سابق دکتری، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج و دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه شیراز  
 ۲ و ۳. استادان و دانشیار، گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
 ۴. استاد، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۴)

### چکیده

هدف این پژوهش، بررسی همراهی همردیف (آلل)‌های ژن *BoLA-DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرنوس بود. حیوانات موردبررسی (۳۴۷ حیوان) شامل ۱۵۵ گوساله آمیخته هلشتاین-شاروله، ۶۰ گوساله ناشی از آمیزش حیوانات نر هلشتاین-شاروله با حیوانات ماده هلشتاین، ۴۶ گوساله ناشی از آمیزش حیوانات ماده هلشتاین-شاروله با حیوانات نر شاروله و ۸۶ گوساله هلشتاین بودند. همه حیوانات در هنگام آزمایش هم‌سن و همه تلیسه‌ها غیر آبستن بودند. برای تعیین ژنوتیپ حیوانات در جایگاه *BoLA-DRB3* روش نوالی‌یابی مستقیم استفاده شد. با استفاده از رویه REML و مدل‌های خطی مختلط همراهی همردیف‌های ژن *BoLA-DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ارزیابی شد. افزون بر تأثیر ژن *BoLA-DRB3*، عامل‌های ثابت گروه ژنتیکی و جنس و عامل تصادفی پدر نیز در مدل گنجانده شد. در این پژوهش، ۲۷ همردیف برای ژن *BoLA-DRB3* دیده شد. نتایج نشان داد همردیف‌های *DRB3\*0101* و *DRB3\*0902* با شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرنوس همراهی دارند ( $P < 0.05$ ). یافته‌های این پژوهش می‌تواند برای شناخت سازوکار زیست‌شناختی (بیولوژیکی) پاسخ ایمنی میزبان علیه استافیلوکوکوس آرنوس سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: *BoLA-DRB3*، استافیلوکوکوس آرنوس، افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، ورم پستان.

### Association of the *BoLA-DRB3* alleles with peripheral blood mononuclear cell proliferation in response to *Staphylococcus aureus*

Hadi Atashi<sup>1</sup>, Mohammad Moradi-Shahrbabak<sup>2\*</sup>, Hassan Mehrabani-Yegane<sup>3</sup>, Seyed Reza Miraei-Ashtiani<sup>2</sup> and Ghodratollah Rahimi-Mianji<sup>4</sup>

1. Former Ph.D. Student, Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran and Associate Professor, Department of Animal Science, University of Shiraz, Iran

2, 3. Professors and Associate Professor, Department of Animal Science, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Professor, Department of Animal Science, Sari University of Agricultural Science and Natural Recourses, Iran

(Received: Apr. 18, 2016 - Accepted: Sep. 25, 2016)

### ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the association of bovine leukocyte antigen-DRB3 alleles with peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation in response to *Staphylococcus aureus*. The animals included in this study (n=347) were approximately of same age and comprised of F2 Holstein-Friesian × Charolais (n = 155), Holstein-Friesian backcross (F0 Holstein-Friesian dams crossed with unrelated F1 sires, n = 60), Charolais backcross (F1 dams crossed with F0 Charolais sire, n=46) and pure Holstein-Friesian (n = 86). A sequence-based typing method was used in order to determine the genotype of the animals at *BoLA-DRB3* locus and a linear mixed model was used to evaluate the association of bovine leukocyte antigen-DRB3 alleles with peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation. Beside the *BoLA-DRB3* alleles, fixed effects of genetic group and gender and random effect of sires were included into the statistical model. In this research, 27 alleles were found for *BoLA-DRB3* gene. The results showed that alleles *BoLA-DRB3\*0101* and *BoLA-DRB3\*0902* significantly affected on the stimulation index of *S. aureus*-induced peripheral blood mononuclear cell proliferation ( $P < 0.05$ ). The results may be useful for investigating the biological mechanism of immune response against *S. aureus*.

**Keywords:** *BoLA-DRB3*, mastitis, peripheral blood mononuclear cell proliferation, *Staphylococcus aureus*.

## مقدمه

تمرکز زیاد بر افزایش تولید در بهنژادی گاوهای شیری باعث کاهش مقاومت آن‌ها به بسیاری از بیماری‌ها از جمله ورم پستان شده است (Lund *et al.*, 1994; Rogers *et al.*, 1995; Rothschild *et al.*, 2000). ورم پستان یکی از مهم‌ترین چالش‌های گله‌های گاو شیری است و پس از اختلال‌های تولیدمثلی، دومین دلیل حذف زود هنگام دام از گله است و به دلیل هزینه‌های دارو و درمان، کاهش کمیت و کیفیت شیر، حذف زود هنگام و هزینه‌های آزمایشگاهی زین‌های فراوانی به صنعت گاو شیری تحمیل می‌کند (Weller *et al.*, 1992; Shook & Schutz, 1994; Bascom & Young, 1998; Heringstad *et al.*, 2000). بیماری توسط شمار زیادی ژن کنترل و نیز توسط شمار زیادی بیمارگر ایجاد می‌شود و سازوکار ایمنی‌شناختی (ایمنولوژیکی) و ایمنی (ایمنوژنتیکی) آن پیچیده است. همچنین سازه‌های مختلفی مانند تغذیه، شرایط فیزیولوژیکی دام و نوع مدیریت تأثیر شایان توجهی بر این بیماری دارند (Sordillo *et al.*, 1997). خطر باقی‌مانده‌های پادزی یا پادزیستی (آنتی‌بیوتیکی) در فرآورده‌های دامی و ایجاد باکتری‌های مقاوم از مهم‌ترین سازه‌های محدودکننده استفاده مداوم از پادزی‌ها برای درمان حیوانات بیمار هستند. بنابراین، متخصصان پرورش و اصلاح نژاد دام به دنبال یافتن رویه‌های نوین برای کاهش بیماری‌های دامی هستند. گزینش ژنتیکی به‌عنوان یک رویه نوین برای افزایش مقاومت حیوانات به بیماری‌ها پیشنهاد شده است. مقاومت به ورم پستان، مقاومت حیوان در برابر ورود، استقرار و افزایش بیمارگر در پستان است (Detilleux, 2000). صفاتی مانند ورم پستان بالینی، شمار یاخته‌های بدنی (SCC)<sup>۱</sup> شیر و امتیاز یاخته‌های بدنی (SCS)<sup>۲</sup> به‌عنوان معیارهایی برای افزایش مقاومت ژنتیکی به بیماری ورم پستان در بهنژادی گاوهای شیری استفاده می‌شوند. استفاده از رکوردهای ورم پستان بالینی در ارزیابی‌های ژنتیکی به دلیل کم بودن وراثت‌پذیری آن (کمتر از ۱۰ درصد) و نبود

رکوردهای دقیق و قابل‌اعتماد موفقیت شایان‌توجهی نداشته است (Weller *et al.*, 1992; Heringstad *et al.*, 2003; Rupp & Biochard, 2000; *al.*). اکنون، صفات SCC یا SCS به‌عنوان نشانگری از ورم پستان زیربالینی در برنامه‌های بهنژادی گاوهای شیری بسیاری از کشورها وجود دارد (Shook & Schutz, 1994). وراثت‌پذیری این صفات بین ۱۰ تا ۱۸ و به‌طور میانگین ۱۵ درصد و همبستگی ژنتیکی آن‌ها با ورم پستان بالینی بین ۵۰ تا ۸۰ و به‌طور میانگین ۷۰ درصد است (Rupp & Biochard, 2003). یاخته‌های بدنی شیر شامل نوتروفیل‌ها، بزرگ بیگانه‌خوار (ماکروفاژ)ها، لنفوسیت‌ها و یاخته‌های پوششی پستان هستند. زیاد بودن شمار یاخته‌های بدنی شیر افزون بر اینکه نشان‌دهنده عفونی بودن پستان است، بازتاب‌دهنده توانایی دام در ایجاد پاسخ ایمنی علیه عامل عفونت پستانی نیز است. بنابراین، گزینش برای کاهش یاخته‌های بدنی ممکن است باعث ایجاد حیواناتی با سامانه ایمنی ضعیف شود و در کاربرد آن به‌عنوان یک نشانگر برای ورم پستان نگرانی‌هایی وجود دارد (Detilleux, 2000). از این‌رو، پژوهشگران به دنبال یافتن صفات و رویه‌های مناسب‌تر برای بهبود مقاومت به ورم پستان هستند (Detilleux, 2000). شناسایی ژن‌های عمده مؤثر بر مقاومت به ورم پستان و کاربرد رویه گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را برای بهبود ورم پستان فراهم کرده است (Lund *et al.*, 1994). نقش ژن‌های مجموعه اصلی سازگار بافتی<sup>۳</sup> (MHC)، در ایجاد و تنظیم پاسخ‌های ایمنی، این مجموعه را به یکی از مهم‌ترین ژن‌های نامزد مؤثر بر مقاومت به بیماری‌ها تبدیل کرده است. ژن‌های MHC بین ۱۰ تا ۵۰ درصد از پراکنش پاسخ‌های ایمنی را باعث می‌شوند (Glass, 2004). برای ایجاد پاسخ ایمنی، بیمارگر باید درون یاخته‌های فرآوری‌کننده پادگن یا آنتی‌ژن (بزرگ بیگانه‌خورها و یاخته‌های دندرتیک)، شکسته شود، سپس قطعه‌های پپتیدی به‌دست‌آمده برای ارائه به یاخته‌های T، به‌گیرنده ارائه‌کننده پادگن متصل شوند. گیرنده‌های ارائه‌کننده

3. Major Histocompatibility Complex

1. Somatic cell count

2. Somatic cell score

صفت بررسی شده (ورم پستان بالینی یا SCS) و جمعیت موردبررسی، ممکن است سبب تفاوت در نتایج شوند. ورم پستان توسط بیش از ۱۰۰ بیمارگر ایجاد می‌شود که هرکدام توزیع جغرافیایی متفاوت دارند و شدت بیماری ایجادشده توسط هر یک از شکل مزمن تا بسیار حاد متفاوت است (Lammers *et al.*, 2001; Kulberg *et al.*, 2007). نظر به اینکه عامل ایجادکننده ورم پستان ممکن است در جمعیت‌ها، زمان‌ها، نژادها، کشورها و گله‌های مختلف، متفاوت باشد، بنابراین همردیف‌های ژنی مختلف در جمعیت‌های مختلف می‌توانند تأثیر متفاوتی بر بیماری داشته باشند (Starkenburger *et al.*, 1997; Kulberg *et al.*, 2007). از آنجاکه همردیف‌های ژنی مختلف *BoLA-DRB3* پروتئین‌های متفاوتی را رمزدهی می‌کنند، بنابراین حیوانات دارای همردیف‌های ژنی مختلف به عامل‌های مختلف ورم پستان، پاسخ‌های متفاوت می‌دهند و همردیف وابسته به مقاومت به بیماری ورم پستان در یک منطقه، ممکن است در یک منطقه دیگر پاسخ نامطلوب دهد (Kulberg *et al.*, 2007). همچنین از آنجاکه یاخته‌های بدنی شیر شامل یاخته‌های پوششی، لنفوسیت‌های B و T، بزرگ بیگانه‌خوارها و نوتروفیل‌ها است و نسبت این یاخته‌ها در جمعیت‌های مختلف متفاوت است، بررسی آن‌ها به‌عنوان یک جمعیت واحد با عنوان SCS می‌تواند سبب تفاوت در نتایج پژوهش‌های مختلف شود (Fitzpatrick *et al.*, 2001). روش دیگر برای انجام چنین بررسی‌هایی، استفاده از صفت مقاومت به یک بیمارگر ویژه به‌جای استفاده از رکوردهای SCS یا ورم پستان بالینی است. باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرتوس از مهم‌ترین عامل‌های ایجادکننده ورم پستان زیربالینی در گاو است (Fox & Gay, 1993). یک روش درون آزمایشگاهی<sup>۲</sup> برای اندازه‌گیری افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی<sup>۳</sup> (PBMC) در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس ارائه شده است (Fitzpatrick *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2005).

پادگن به مولکول‌های سازگار بافتی موسوم هستند و توسط ژن‌هایی با همین نام (ژن‌های مجموعه اصلی سازگار بافتی) رمز می‌شوند. مجموعه اصلی سازگار بافتی در گاو<sup>۱</sup> (BoLA)، یک خوشه (کلاستر) از ژن‌های به‌هم‌پیوسته با بیش از ۲/۵ مگا جفت باز است، روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۳ قرار دارد و از سه کلاس I، II و III تشکیل شده است (Schook & Lamont, 2000). ژن‌های کلاس I و II در ایجاد و تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارند و ژن‌های کلاس III دامنه عملکرد گسترده‌ای داشته و برخی در ایمنی ذاتی نقش دارند (Sharif *et al.*, 1998). در گاو برخلاف دیگر پستانداران، کلاس II مجموعه اصلی سازگار بافتی در دو زیر ناحیه موسوم به IIa و IIb قرار دارد که فاصله ژنتیکی بین آن‌ها ۱۷ سانتی‌مورگان است (Davies *et al.*, 1994). ژن‌های MHC-DQ و MHC-DR از ژن‌های فعال موجود در زیر ناحیه IIa هستند که به ترتیب مولکول‌های MHC-DQ و MHC-DR را رمز می‌کنند (Davies *et al.*, 1994). در ژنگان (ژنوم) گاو یک ژن DRA و سه ژن DRB (DRB1، DRB2 و DRB3) وجود دارد. ژن DRA تنها یک همردیف (آلل) دارد و زنجیره آلفا از مولکول MHC-DR را رمز می‌کند. ژن DRB1 یک ژن کاذب است و بیان ژن DRB2 تاکنون گزارش نشده است. ژن DRB3 زنجیره بتا از مولکول MHC-DR را رمز می‌کند و شمار زیادی همردیف برای آن گزارش شده است (Davies *et al.*, 1994). ژن *BoLA-DRB3* یاخته‌های حرفه‌ای ارائه‌کننده پادگن مانند یاخته‌های دندان‌های (دندرتیک) و بزرگ بیگانه‌خوارها بیان می‌شود. به دلیل نقش مولکول‌های MHC-DR ارائه پادگن به یاخته‌های T، همراهی همردیف‌های آگزون دوم ژن *BoLA-DRB3* با بیماری ورم پستان و شمار یاخته‌های بدنی شیر در پژوهش‌های مختلفی بررسی شده است، اما نتایج آن‌ها متفاوت و گاهی متناقض هستند (Dietz *et al.*, 1997; Sharif *et al.*, 1998; Kulberg *et al.*, 2007). بر پایه این پژوهش‌ها می‌توان استنباط کرد که عامل‌های مختلفی مانند

2. In Vitro

3. Peripheral Blood Mononuclear Cell

1. Bovine Leucocyte Antigen

به هر نمونه اضافه شد و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت سی دقیقه، در دور ۷۰۰g سانتریفوژ شدند. بخش بالایی هر نمونه جدا شد و یاخته‌های خون که در ته لوله رسوب کرده بودند در محلول HBSS حل و شستشو شدند. عمل شستشو سه بار دیگر تکرار شد. در پایان، بخش بالایی هر لوله جدا و یاخته‌های خون شسته شده که در ته لوله رسوب کرده بودند در محیط BME, Gibco Life Technologies Ltd., (Eagles Paisley, UK) کشت داده شدند. ۱ میلی‌لیتر از محلول یادشده ( $4 \times 10^6$  یاخته) به همراه ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی سویه NCTC13047 باکتری استافیلوکوکوس آرتوس ( $2 \times 10^8$  یاخته)، محلول حاوی لخته‌کننده گیاهی (۵ میکروگرم به ازای ۱ میلی‌لیتر) و یا محلول بدون هرگونه محرک ایمنی (کنترل) و ۴۰ میکرولیتر از سرم گرمادیده با یکدیگر مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با ۵ درصد  $CO_2$  به مدت چهار روز کشت داده شدند. در روز چهارم، با استفاده از برداشت‌کننده یاخته‌ای Filtermat 196<sup>TM</sup> (Canberra Packard) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بالا جدا و به سینی‌های ۹۶ خانه‌ای (BibbySterilin, Staffordshire, UK) منتقل شدند. ۱ میکروکوری از  $^3H$ -Tymidine (Amersham Pharmacia, UK) به هر چاهک (نمونه) اضافه و در دمای ۳۷ درجه و با ۵ درصد  $CO_2$  به مدت شش ساعت در اتاقک رشد نگهداری (انکوباسیون) شدند. برای حذف  $^3H$ -Tymidine به کار نرفته در ساختمان DNA، یاخته‌های برداشت‌شده شستشو داده شدند و آنگاه ۲۰ میکرولیتر Scintillation fluid به هر نمونه اضافه شد. با استفاده از Topcount Microplate Scintillation and Luminescence Counter (Canberra Packard) شمار تیمیدین‌های نشاندارشده در DNA یاخته‌های افزایش‌شده اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت شمار  $^3H$ -Tymidine به ازای هر دقیقه یا به صورت شاخص تحریک (شمار تیمیدین‌های نشاندارشده در DNA یاخته‌های افزایش‌شده در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس به شمار تیمیدین‌های نشاندارشده DNA یاخته‌های افزایش‌شده در حالت کنترل) بیان شد.

تک‌هسته‌ای خون محیطی بیشتری دارند، در برابر استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم‌ترند (Fitzpatrick *et al.*, 1999). بنابراین می‌توان از این صفت برای ارزیابی مقاومت حیوانات در برابر باکتری استافیلوکوکوس آرتوس استفاده کرد. هدف این پژوهش بررسی همراهی همدیف‌های ژن *BoLA-DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس و میتوزن لخته‌کننده گیاهی<sup>۱</sup> در یک جمعیت از گاوهای هلشتاین و آمیخته هلشتاین-شاروله بود.

## مواد و روش‌ها

### محل اجرای آزمایش و حیوانات تحت آزمایش

این آزمایش در مؤسسه رزلین دانشگاه ادینبرو در کشور اسکاتلند انجام شد. حیوانات موردبررسی (۳۴۷ حیوان نر و ماده با سن ۱۱ تا ۱۳ ماه) شامل ۱۵۵ آمیخته هلشتاین و شاروله، ۶۰ گوساله ناشی از آمیزش حیوانات نر هلشتاین-شاروله با حیوانات ماده هلشتاین، ۴۶ گوساله ناشی از آمیزش حیوانات ماده هلشتاین-شاروله با حیوانات نر شاروله و ۸۶ گوساله هلشتاین بودند. همه گوساله‌ها (نر و ماده) در هنگام آزمایش هم‌سن و همه تلپسه‌ها غیر آبستن بودند.

آزمون اندازه‌گیری یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی روش استفاده‌شده برای اندازه‌گیری یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی مبتنی بر سنجش تیمیدین نشاندارشده،  $^3H$ -Tymidine بود (Young *et al.*, 2005). استفاده از تیمیدین نشاندارشده با هیدروژن رادیواکتیو ( $^3H$ )، روشی برای اندازه‌گیری میزان ساخته شدن DNA است. این ماده در گام S چرخه تقسیم یاخته‌ای به DNA می‌چسبد و شاخصی برای اندازه‌گیری رشد و افزایش یاخته‌ای به شمار می‌آید. در آغاز نمونه‌های خون با ۱۰ میلی‌لیتر HBSS<sup>۲</sup> (Sigma Ltd., Poole, UK) رقیق شدند، پس‌از آن ۲۰ میلی‌لیتر از محلول قندی (Sigma) Histopaque1077

1. Phytohemagglutinin
2. Hanks' balanced salt solution without calcium or magnesium

بیست ثانیه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و چهار دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس. محصولات ناشی از واکنش‌های توالی‌یابی با استفاده از روش مبتنی بر ETDA و اتانول شستشو داده شدند. توالی‌یابی توسط دستگاه توالی‌یاب (Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer) انجام شد.

#### شناسایی همردیف‌ها و تعیین ژنوتیپ حیوانات

پس از تجزیه محصولات به دست آمده از واکنش‌های توالی‌یابی در دستگاه توالی‌یاب، با استفاده از نرم‌افزار فنچ تی‌وی<sup>۲</sup> مناسب بودن نتایج بررسی و با استفاده از روش چشمی اشتباه‌های احتمالی شناخته شد. در نرم‌افزار بایو ایدیت<sup>۳</sup> ویرایش‌های لازم صورت گرفت و ژنوتیپ هر حیوان با استفاده از نرم‌افزار هاپلوفاینر (<http://www.bioinformatics.roslin.ac.uk/haplofin>) تعیین شد.

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این آزمایش، داده‌های چهار صفت تجزیه شدند: افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس، افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به میتوزن لخته‌کننده گیاهی، شاخص تحریک افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس (افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس به افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل) و شاخص تحریک افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به میتوزن لخته‌کننده گیاهی (افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به میتوزن لخته‌کننده گیاهی به افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل). برای نرمال کردن توزیع داده‌ها، از تبدیل لگاریتم طبیعی استفاده شد. برای ارزیابی همراهی همردیف‌های ژن *BoLA-DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی و برآورد تأثیر جایگزینی همردیف‌ها، از مدل خطی مختلط زیر در نرم‌افزار Genstat (10<sup>th</sup> edition, )

#### استفاده از روش مبتنی بر توالی‌یابی برای تعیین همردیف‌های ژن *BoLA-DRB3*

برای افزایش آگزون دوم ژن *BoLA-DRB3* آغازگر (پرایمر)های DRB3REV و DRB3FRW به ترتیب با توالی‌های 5'-CGC TCC TGT GA(C/T) CAG 3' و 5'-CAC CCC CGC GCT ATC TAT CC-3' (Baxter et al., 2010) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر متشکل از ۲۰۰ میکرومولار از هر کدام از NTPها، ۱۵ پیکومولار از هر کدام از آغازگرها و ۰/۲۵ واحد آنزیم *Taq* پلی‌مراز (Roche Applied Science) انجام شد. برنامه دمایی استفاده شده در واکنش‌های PCR چنین بود: واسرشت‌سازی DNA، ده دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، آنگاه سی چرخه: تک‌رشته‌ای شدن DNA سی ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای سی ثانیه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس، بسط آغازگر یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در پایان یک چرخه تکمیل بسط به مدت پنج دقیقه و در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. پیش از انجام واکنش‌های توالی‌یابی، لازم است محصولات PCR از آنزیم، آغازگر، dNTP و نمک‌های باقیمانده پاک شوند و بدین منظور از کیت خالص‌سازی محصول PCR (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) استفاده شد. واکنش‌های توالی‌یابی با استفاده از کیت BigDye® v 3.1 (Applied Biosystems, UK) و آغازگرهای استفاده شده در مرحله PCR انجام شدند. این واکنش‌ها در حجم ۱۰ میکرولیتر و با استفاده از ترکیب‌های زیر انجام شدند. ۰/۵ میکرولیتر BigDye® v 3.1 terminator، ۱ میکرولیتر Big Dye® Buffer، ۰/۵ میکرولیتر DMSO، ۲/۵ پیکومول آغازگر DRB3REV یا DRB3FRW به طور جداگانه و ۲ میکرولیتر محصول PCR خالص شد. برنامه دمایی استفاده شده در واکنش‌های توالی‌یابی چنین بود: واسرشت‌سازی DNA، سه دقیقه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس، آنگاه سی چرخه: سی ثانیه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس،

ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد (نگاره ۱). کیفیت نتایج به دست آمده از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار فنچ تی وی بررسی شد (نگاره ۲). در این پژوهش، ۲۷ هم‌دیف از ۱۰۵ هم‌دیفی که تاکنون برای ژن *BoLA-DRB3* گزارش شده است (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/bola>) دیده شد. هم‌دیف‌های 1201\*، 1601\*، 2707\*، DRB3\*1101، 0101\*، 0901\* و 09023\* بیشترین فراوانی را داشتند و ۷۷ درصد از فراوانی هم‌دیفی را شامل شدند (نگاره ۳). نتایج به دست آمده از همراهی هم‌دیف‌های ژن *BoLA-DRB3* با میزان افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، در جدول ۱ ارائه شده است. هیچ‌کدام از هم‌دیف‌ها با افزایش افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس و لخته‌کننده گیاهی همراهی نداشتند ( $P \geq 0.05$ )، اما هم‌دیف‌های DRB3\*0101 و 0902\* با شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرتوس (نسبت افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس به افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل) همراهی معنی‌دار نشان دادند ( $P < 0.05$ ).

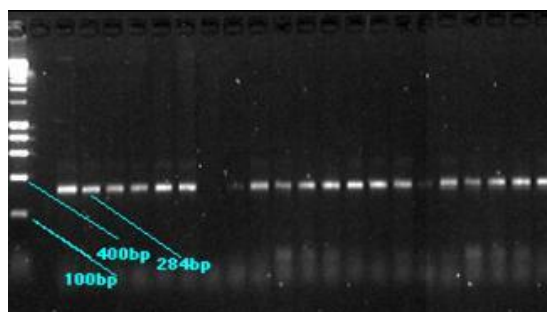
(Agricultural Trust, Rothamsted, UK) استفاده شد. هم‌دیف‌های ژنی با فراوانی برابر یا بیشتر از ۲ درصد به‌طور مستقیم وارد مدل شدند و هم‌دیف‌های ژنی با فراوانی کمتر از ۲ درصد در دسته "other" قرار داده شدند.

$$y_{ijkm} = \mu + GG_i + Sex_j + Sire_k + \sum_l b_l BoLA_{ijkl} + e_{ijkm}$$

$y_{ijkm}$ : متغیر وابسته،  $\mu$ : میانگین مدل،  $GG_i$ : اثر ثابت لامین گروه ژنتیکی (هلشتاین خالص، تلاقی برگشتی<sup>۱</sup> گاوهای ماده هلشتاین با نسل  $F_1$  ناشی از آمیزش هلشتاین-شاروله، تلاقی برگشتی گاوهای نر شاروله با نسل  $F_1$  ناشی از آمیزش هلشتاین-شاروله، نسل  $F_2$  ناشی از آمیزش هلشتاین-شاروله)،  $Sex_j$ : اثرگذاری ثابت لامین جنس،  $Sire_k$ : اثرگذاری تصادفی پدر،  $k$ : پدر،  $b_l$ : ضریب تابعیت متغیر وابسته از شمار نسخه‌های لامین هم‌دیف *BoLA-DRB3*،  $BoLA_{ijklm}$ : شمار نسخه (۰، ۱، یا ۲) هم‌دیف *BoLA*،  $e_{ijkm}$ : اثر تصادفی باقی‌مانده با توزیع نرمال و واریانس  $\sigma_e^2$ .

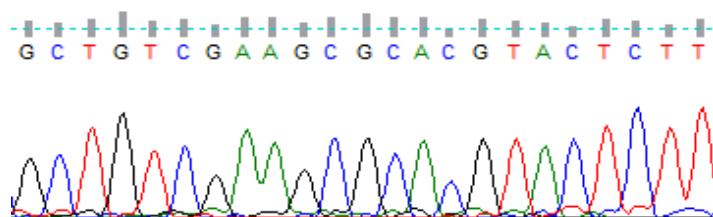
## نتایج

کنترل کیفیت محصول واکنش‌های PCR با استفاده از



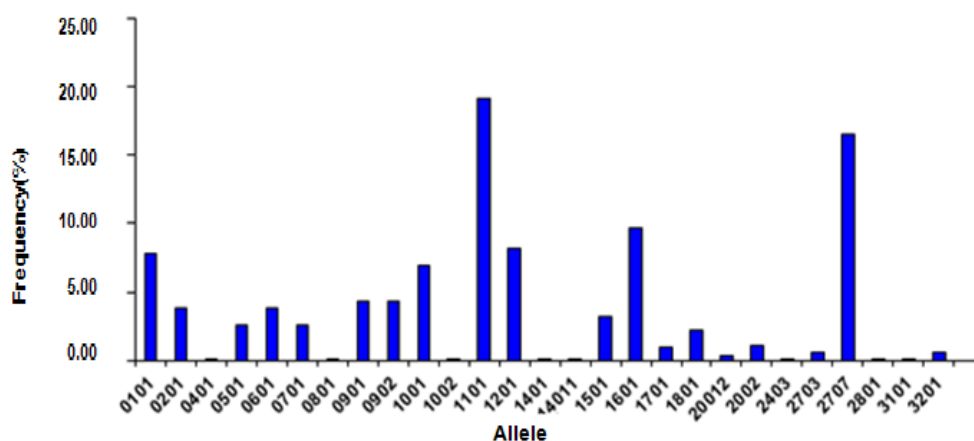
نگاره ۱. نتایج به دست آمده از بارگذاری محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد.

Figure 1. Agarose gel (1.5%) of PCR products obtained with species primers.



نگاره ۲. نتایج به دست آمده از توالی‌یابی در نرم‌افزار فنچ تی وی.

Figure 2. The output for a sequencing using a program called FinchTV.



نگاره ۳. فراوانی همردیفی ژن *BoLA-DRB3* شناسایی شده با روش مبتنی بر توالی‌یابی (شمار=۳۴۷).

Figure 3. Allele frequency of *BoLA-DRB3* gene determined using sequence-based typing method (n = 347).

جدول ۱. اثر جایگزینی (خطای استاندارد) همردیف‌های ژن *BoLA-DRB3* بر افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی.

Table 1: *BoLA-DRB3* allele substitution effect (SE) on peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation.

<i>BoLA-DRB3</i> allele	Spontaneous PBMC proliferation <sup>1</sup>	The PBMC proliferation in response to		The PBMC proliferation stimulation index of:	
		phytohemagglutinin (PHA) mitogen <sup>2</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>3</sup>	phytohemagglutinin (PHA) mitogen <sup>4</sup>	<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>5</sup>
<i>BoLA-DRB3</i> *0101	0.83 (0.24)*	-0.17 (0.24)	0.11 (0.31)	0.64 (0.30)*	0.91 (0.34)*
<i>BoLA-DRB3</i> *0201	-0.42 (0.27)	-0.00 (0.28)	-0.18 (0.38)	0.40 (0.34)	0.22 (0.40)
<i>BoLA-DRB3</i> *0501	0.72 (0.31)	-0.21 (0.32)	-0.50 (0.44)	0.48 (0.41)	0.21 (0.46)
<i>BoLA-DRB3</i> *0601	0.52 (0.26)	0.19 (0.27)	-0.59 (0.37)	0.67 (0.34)*	-0.11 (0.38)
<i>BoLA-DRB3</i> *0701	0.52 (0.29)	0.12 (0.30)	0.38 (0.40)	0.25 (0.37)	0.75 (0.43)
<i>BoLA-DRB3</i> *0901	0.39 (0.28)	0.38 (0.30)	0.08 (0.41)	0.88 (0.37)*	0.55 (0.42)
<i>BoLA-DRB3</i> *0902	-0.53 (0.25)	-0.31 (0.25)	0.10 (0.35)	0.39 (0.32)	0.81 (0.36)
<i>BoLA-DRB3</i> *1001	0.71 (0.24)	0.00 (0.24)	-0.29 (0.33)	0.48 (0.31)	0.20 (0.34)
<i>BoLA-DRB3</i> *1101	0.51 (0.20)	0.02 (0.20)	0.05 (0.27)	0.44 (0.25)	0.48 (0.28)
<i>BoLA-DRB3</i> *1201	0.42 (0.24)	0.27 (0.24)	-0.04 (0.33)	0.44 (0.30)	0.13 (0.34)
<i>BoLA-DRB3</i> *1501	0.22 (0.29)	0.25 (0.30)	-0.32 (0.41)	0.95 (0.37)*	0.37 (0.41)
<i>BoLA-DRB3</i> *1601	0.73 (0.23)	-0.18 (0.24)	-0.26 (0.33)	0.59 (0.30)*	0.48 (0.34)
<i>BoLA-DRB3</i> *1801	-0.83 (0.33)	-0.36 (0.33)	-0.44 (0.45)	0.56 (0.42)	0.49 (0.46)
<i>BoLA-DRB3</i> *2707	0.92 (0.22)	0.07 (0.22)	0.06 (0.30)	0.15 (0.27)	0.15 (0.31)
Others <sup>6</sup>	-0.08 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
Constant <sup>7</sup>	3.99 (0.43)	8.73 (0.44)	9.98 (0.61)	4.75 (0.55)	5.98 (0.62)

۱. افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل

۲. افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به لخته‌کننده گیاهی

۳. افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس

۴. نسبت افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به لخته‌کننده گیاهی به افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل

۵. نسبت افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس به افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در حالت کنترل

۶. همردیف‌های با فراوانی کمتر از ۲ درصد

۷. میانگین مدل.

\* معنی‌داری در سطح  $P \leq 0.05$ .

1. The PBMC proliferation in control group

2. The PBMC proliferation in response to phytohemagglutinin (PHA)

3. The PBMC proliferation in response to *Staphylococcus aureus*

4. The ratio of PHA-stimulated PBMC proliferation divided by spontaneous PBMC proliferation.

5. The ratio of *Staphylococcus aureus* -stimulated PBMC proliferation divided by spontaneous PBMC proliferation.

6. The alleles with frequency < 2%

7. Overall mean of the model

\* Significant at  $P < 0.05$

پاسخ به استافیلوکوکوس آرتوس بررسی شد. با

استفاده از روش مبتنی بر توالی‌یابی همردیف‌های

*BoLA-DRB3* حیوانات تعیین شد. در این بررسی، ۲۷

## بحث

در این پژوهش همراهی همردیف‌های ژن *BoLA-*

*DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون در

دارند، به میزان بیشتری پاسخ ایمنی تولید می‌کنند. با توجه به اثر معنی‌دار و مثبت هم‌دیف‌های DRB3\*0101 و 0902\* بر شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرنوس، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حیوانات دارای یک یا دو نسخه از این هم‌دیف‌ها در مقایسه با حیوانات دیگر به استافیلوکوکوس آرنوس مقاوم‌تر هستند. حیوانات این بررسی، متشکل از چهار جمعیت متفاوت از نظر ژنتیکی بودند و این جمعیت‌ها از نظر حالت پیوستگی ژن DRB3 با دیگر ژن‌های مؤثر بر عملکرد ایمنی به‌ویژه ژن‌های MHC با یکدیگر متفاوت هستند. از سوی دیگر، ایجاد پاسخ ایمنی علیه هر بیمارگر توسط سامانه ایمنی ذاتی و اکتسابی میانجی‌گری می‌شود که هرکدام توسط شمار زیادی ژن کنترل و تنظیم می‌شوند. بنابراین پژوهش برای یافتن همراهی یک ژن با مقاومت به یک بیماری، ساده کردن مسئله است و ممکن است نتیجه قابل‌اعتمادی در پی نداشته باشد. به‌عنوان مثال، در یک پژوهش، با مشاهده افزایش یاخته‌های T و B در پاسخ به ویروس تب برفکی در گاو گزارش شد تک‌جور (هاپلوטיפ)‌های متفاوت MHC پاسخ‌های ایمنی متفاوتی تولید می‌کنند (Lewin et al., 1999). بنابراین بررسی‌های بعدی باید بر بررسی همراهی تک‌جورهای MHC و بیماری‌ها متمرکز شوند و به بررسی همراهی تک‌ژن‌ها با بیماری اکتفا نشود.

#### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های این پژوهش، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که هم‌دیف‌های DRB3\*0101 و 0902\* بر شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرنوس تأثیر مثبت دارند. بنابراین، می‌توان با شناسایی تفاوت‌های موجود بین پروتئین‌های رمز شده توسط هم‌دیف‌های یاد شده با دیگر هم‌دیف‌ها، سازوکار زیستی ایجاد پاسخ ایمنی علیه استافیلوکوکوس آرنوس را بهتر بررسی کرد. همچنین هم‌دیف‌های DRB3\*0501، 0701\*، 0901\*، 1501\* و 1601\* بر شاخص تحریک لخته‌کننده گیاهی تأثیر داشتند و می‌تواند برای بررسی ژنتیک مقاومت به دیگر بیماری‌ها مورد توجه قرار گیرند.

هم‌دیف از ۱۰۵ هم‌دیفی که تاکنون برای ژن *BoLA-DRB3* گزارش شده است، مشاهده شد. همان‌گونه که در پژوهش‌های همسان پیشین نیز نشان داده شده است، ژن *BoLA-DRB3* به میزان زیادی چند شکل است (Dietz et al., 1997; Kelm et al., 1997; Starkenburg et al., 1997; Sharif et al., 2007; Rupp et al., 2007). هم‌دیف‌های DRB3\*1101، 2707\*، 1601\*، 1201\*، 0101\*، 0901\* و 0902\* بیشترین فراوانی را داشتند. تاکنون گزارشی در ارتباط با فراوانی هم‌دیفی ژن *BoLA-DRB3* در نژاد شاروله وجود ندارد تا نتایج این بررسی را با آن مقایسه کرد. هم‌دیف‌های DRB3\*1001، 1002\*، 1201\*، 0901\*، 0902\*، 1501\*، 1502\*، 0101\* و 0102\* بیشترین فراوانی در گاوهای هلشتاین دارند (Dietz et al., 1997; Kelm et al., 1997; Starkenburg et al., 1997; Sharif et al., 2007; Rupp et al., 2007).

گوساله‌های هلشتاین کمترین افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی در پاسخ به استافیلوکوکوس آرنوس را داشتند. این نتیجه با لحاظ کردن اندکی احتیاط می‌تواند به راهبردهای متفاوت گزینش ژنتیکی در نژاد هلشتاین و شاروله منتسب شود. گزینش برای افزایش تولید شیر، که اغلب با کاهش پاسخ ایمنی علیه بیشتر بیمارگرها همراه است، در نژاد هلشتاین با شدت بیشتری در مقایسه با نژاد شاروله انجام شده است و پاسخ ایمنی در نژاد هلشتاین را کاهش داده است. نتایج همراهی هم‌دیف‌های ژن *BoLA-DRB3* با افزایش یاخته‌های تک‌هسته‌ای خون نشان داد هم‌دیف‌های DRB3\*0101 و 0902\* بر شاخص تحریک استافیلوکوکوس آرنوس اثر دارند. هم‌دیف‌های مختلف DRB3 پروتئین‌های متفاوت را رمز می‌کنند، پروتئین‌های متفاوت نیز ساختار فضایی متفاوت دارند. بر پایه ساختار فضایی پپتیدهای به‌دست‌آمده از هر بیمارگر و نوع پروتئین‌های رمز شده توسط هم‌دیف‌های هر حیوان، پاسخ ایمنی ایجاد شده متفاوت است (Day & Schultz, 2011). بنابراین می‌توان استنباط کرد که هم‌دیف‌هایی که در پاسخ به یک بیمارگر افزایش یاخته‌های محیطی خون بیشتری



## REFERENCES

1. Bascom, S. S. & Young, A. J. (1998). A summary of the reasons why farmers cull cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 2299-2305.
2. Baxter, R., Craigmile, S. C., Haley, C., Douglasc, A.J., Williams, J. L. & Glass, E. J. (2010). BoLA-DR peptide binding pockets are fundamental for foot-and-mouth disease virus vaccine design in cattle. *Vaccine*, 28, 28-37.
3. Davies, C. J., Joosten, I., Andersson, L., Arriens, M. A., Bernoco, D., Bissumbar, B., Byrns, G., Van Eijk, M. J., Kristensen, B., Lewin, H. A., Mikko, S., Morgan, A. L. G., Muggli-Cockett, N. E., Nilsson, P. R., Oliver, R. A., Park, C. A., van der Poel, J. J., Polli, M., Spooner, R. L. & Stewart, J. A. (1994). Polymorphism of bovine MHC class II genes - Joint report of the Fifth International Bovine Lymphocyte Antigen (BoLA) Workshop. Interlaken, Switzerland, 1 August 1992. *European Journal of Immunogenetics*, 21, 259-289.
4. Day, M. J. & Schultz, R. D. (2011). *Veterinary immunology principles and practice*. London, UK: Manson Publishing.
5. Detilleux, J. C. (2002). Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 88, 103-110.
6. Dietz, A. B., Cohen, N. D., Timms, L. & Kehrl, J. M. E (1997). Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 80, 406-412.
7. Fitzpatrick, J. L., Logan, K. E., Young, F. J., Stera, M. J., Platt, D. J. & McGuirk, B. J. (1999). Breeding cattle for mastitis resistance. pp 46-53 in proceedings of the British Mastitis Conference, Stoneleigh, UK. Institute for Animal Health, Compton, UK.
8. Fox, L. K. & Gay, J. M. (1993). Contagious mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 9, 475-487.
9. Glass, E. J. (2004). Variation and responses to vaccines. *Animal Health Research Reviews*, 52, 197-208.
10. Heringstad, B., Klemetsdal, G. & Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 1, 95-106.
11. Kelm, S. C., Detilleux, J. C., Freeman, A. E., Kehrl, J. M. E., Dietz, A. B., Fox, L. K., Butler, J. E., Kasckovics, I. & Kelley, D. H. (1997). Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in perparturient Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. 80, 1767-1775.
12. Kulberg, S., Heringstad, B., Guttersrud, O. A. & Olsaker, I. (2007). Study on the association of *BoLA-DRB3.2* alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cow. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124, 201-207.
13. Lammers, A., van Vorstenbosch, C. J., Erkens, J. H. & Smith, H. E. (2001). The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Veterinary Microbiology*, 80, 255-265.
14. Lewin, H. A., Russell, G. C. & Glass, E. J. (1999). Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunology Review*, 167, 145-158.
15. 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. & Vilkki, J. (2007). Joint analysis of quantitative trait loci for clinical mastitis and somatic cell score on five chromosomes in three Nordic dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 90, 5282-5290.
16. Rogers, G. W., Hargrove, G. L. & Cooper, J. B. (1995). Correlations among somatic cell score of milk within and across lactation and linear type traits of Jerseys. *Journal of Dairy Science*, 78, 914-920.
17. Rothschild, M. F., Skow, L. & Lamont, S. J. (2000). The major histocompatibility complex and its role in disease resistance and immune responsiveness. In: Axford, R. F. E., Bishop, S. C., Nicholas, F. W. & Owen, J. B. (Eds.). *Breeding for disease resistance in farm animals*. CAB Publishing, Oxon.
18. Rupp, R. & Boichard, D. (2003). Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 34, 671-688.
19. Rupp, R., Hernandez, A. & Mallard, B. A. (2007). Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 90, 1029-1038.
20. Schook, L. B. & Lamont, S. J. (2000). *The major histocompatibility complex region of domestic animal species*. CRC Press, chapter 4, pp. 65-98.
21. Sharif, S., Mallard, B. A., Wilkie, B. N., Sargeant, J. M., Scott, H. M., Dekkers, J. C. & Leslie, K. E. (1998). Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (*BoLA-DRB3*) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29, 185-193.

22. Shook, G. E. & Schutz, M. M. (1994). Selection on somatic cell scores to improve resistance to mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science*, 77, 648-658.
23. Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K. & DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80, 1851-1865.
24. Starckenburg, R. J., Hansen, L. B., Kehrli, J. M. E. & Chester- Jones, H. (1997). Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for Holsteins milk selection and control lines. *Journal of Dairy Science*, 80, 3411-3419.
25. Weller, J. L., Saran, A. & Zeliger, Y. (1992). Genetic and environmental relationships among somatic cell count, bacterial infection, and clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 75, 2532-2540.
26. Young, F.J., Woolliams, J.A., Williams, J.L., Glass, E.J., O'Neill, R.G. & Fitzpatrick, J.L. (2005). In vitro peripheral blood mononuclear cell proliferation in a crossbred cattle population. *Journal of Dairy Science*, 88, 2643-2651.