

## شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی موجود در ژن MAP4K4 موثر بر صفات اقتصادی شیر در گاوهای شیری

**خدارحیم محمدزاده**

دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

Rfamlovei5@gmail.com

**نعمت هدایت ایوریق**

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

nhedayat@uma.ac.ir

**رضا سید شریفی**

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

reza\_seyedsharifi@yahoo.com

**آزاده بوستان**

استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

boustan\_62@yahoo.com

**فرزاد میرزایی آقچه قشلاق**

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

F\_mirzaei@uma.ac.ir

**لیلا آفازاده**

دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه محقق اردبیلی

Leila.Aghazadeh.68@gmail.com

**محسن رزمی نوشهر**

دکتری دامپزشکی، دانشگاه آزاد تبریز

### چکیده

در حیوانات با برنامه های اصلاح ژنتیکی میتوان مقاومت نسبت به بیماریها را افزایش داد. ژنهای مختلفی شناسایی شده است که نسبت به ایجاد ورم پستان مقاومت ایجاد می کند ورم پستان یکی از شایعترین بیماریها در پرورش گاو شیره است که همواره هزینه های سنگین درمانی را به گاودار تحمیل کرده و مقادیر تولید شیر را بطور معنیدار کاهش میدهد. در مطالعه حاضر شناسایی چند شکلیهای نوکلئوتیدی در ژنهای عملکرد سیستم ایمنی و ارتباط این چندشکلیها با مقادیر باقیمانده نمره سلولهای بدنی به عنوان شاخص همبسته با بروز بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین بررسی شد که آگزون ۱۸ ژن MAP4K4 بود. بدین منظور، نمونه خون ۵۰ راس گاو شیری جمع آوری شد و پس از استخراج نمونههای DNA با استفاده از کیت استاندارد استخراج، یک جفت پرایمر اختصاصی برای تکثیر قطعه ۶۵۴ جفت باز از ژن MAP4K4، طراحی گردید. سپس ناحیه هدف توسط PCR تکثیر و محصول حاصله مورد توالی یابی قرار گرفت. نتایج توالی ها در این تحقیق نشان داد که در مطالعه حاضر در دو جایگاه مختلف ژن MAP4K4 در جمعیت گاو هلشتاین موجود در کشت صنعت مغان چندشکلی مشاهده شد که وجود چندشکلی در این جایگاه ژنی را تأیید می کنند. بررسی حاضر بر روی ژن MAP4K4 در گاوهای هلشتاین ۵ جهش در آگزون ۱۸ مشاهده شد که در جایگاه ۱۱۹ ژنوتیپ GA جایگزین GG و در جایگاه ۴۳۸ ژنوتیپ TC و TT جایگزین CC شده است که می تواند به عنوان ژن کانیدا در انتخاب دامهای مقاوم به ورم پستان استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی، ژن MAP4K4، صفات اقتصادی شیر، ورم پستان

## ۱. مقدمه

شیر گاو یکی از مهمترین مایعات خوراکی طبیعی است که از دیرباز مورد توجه ویژه قرار داشته است و از آن بعنوان ماده غذایی کامل یاد میگردد [۱]. بطوری که این ماده غذایی، غنی از کلسیم است و کمبود مصرف آن، سبب افزایش ابتلا به بیماریهای مختلف از جمله پوکی استخوان میشود [۲]. از معضلات گاوهای شیرده پرتولید بروز بیماریهای مختلف از جمله ورم پستان، کتوز و بیماریهای تولید مثل دیگر از جمله کیستهای تخمدانی است [۳]. بیماری ورم پستان نوعی التهاب غدد پستانی است که علاوه بر هزینههای درمان و دامپزشکی، سبب کاهش تولید و کیفیت شیر، تداوم شیردهی، حذف زود هنگام دام، افزایش هزینههای جایگزینی، هزینههای کارگری و کاهش رفاه دام میگردد [۳]. ورم پستان در دو اشکال مختلف بالینی و تحت بالینی رخ میدهد که روی باروری اثر نامطلوب میگذارد. معمولا بهزای هر مورد ورم پستان بالینی ۲۰ تا ۵۰ مورد ورم پستان تحت بالینی دیده میشود [۴]. بر اساس نتایج تحقیقات پیشین مشخص شده علاوه بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی بیرونی و درونی در وقوع ورم پستان مؤثرند [۵]. بیماری ورم پستان که به التهاب غدد پستانی دام اطلاق میشود، بهعنوان مهمترین عامل افزایش سلولهای بدنی شیر محسوب میگردد و شمارش این سلولها اولین بار در سال ۱۹۶۷، به عنوان شاخص بیماری ورم پستان مطرح شد [۶]. انتخاب حیوانات برای افزایش مقاومت به ورم پستان بدلیل عدم وجود معیار جهانی و همچنین پایین بودن توارث پذیری (۰.۰۲ - ۰.۰۵) آن دارای محدودیت است. به همین دلیل در اغلب مطالعات از معیار سلولهای بدنی (SCS) با توجه به بالاتر بودن توارث پذیری آن نسبت به ورم پستان بالینی (۰.۱۵ - ۰.۷۰) بعنوان شاخصی برای ارزیابی مقاومت به ورم پستان استفاده میشود. دقت انتخاب ارزیابی ژنتیکی مقاومت به ورم پستان براساس رکوردهای فنوتیپی پایین میباشد [۷]. علم ژنتیک مولکولی با پرده برداری از مکانیسم نسخهبرداری و ترجمه در سطح ژنوم افقهای تحقیقاتی جدیدی را باز کرده که از جمله دیدگاه ژنهای کاندیدا برای کنترل صفات در تحقیقات مطرح میباشد. در این راستا، گیرندههای پاسخ ایمنی بعنوان کاندیدای کلیدی برای ایجاد مقاومت حیوان در برابر ورم پستان میباشد. ژنهای کاندیدای متعددی در خصوص آللهای مطلوب یا نامطلوب مرتبط با مقاومت و حساسیت سیستم ایمنی گاو با ابتلا به ورم پستان شناسایی شده است از جمله میتوان MAP4K4 اشاره کرد [۸].

پروتئین کیناز فعال کننده میتو ژن (MAP4K4) یک عضو از گروه کیناز مرکزی ژرمینال مرتبط با *Saccharomyces cerevisiae* است [۸ و ۹]. بسیاری از آزمایشها بر تاثیر ارتباط بیان و عملکرد ژن MAP4K4 بر روی فرایندهای پاتوفیزیولوژیکی شامل متابولیسم، التهاب، تجزیه نرونی و سرطان متمرکز شده است و نشان داده شده که این ژن عملکرد محدود کننده در فرایندهای ایجاد بیماری دارد. با توجه به اینکه ژن MAP4K4 یک ژن معهم در تنظیم التهاب می باشد لذا ممکن است بر روی مقاومت به بیماری ورم پستان مفید واقع شود و از طریق نقش بر روی مسیر سیگنالی NF-KB باعث مدیریت تنظیم کننده های رونویسی پیش التهابی در ماکروفاژها می شود [۱۰ و ۱۱]. شناسایی چندشکلی های این ژن می تواند اطلاعات مفیدی را ایجاد کند که بتوان فرضیه موثر بودن این ژن در شناسایی گاوهای مقاوم به ورم پستان و افزایش ایمنی را تایید کرد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی تنوع ژنتیکی ژن MAP4K4 و ارتباط آن با بیماری ورم پستان در گاوهای هلشتاین بود.

## ۲. مواد و روشها

در این تحقیق از رکوردهای سلولهای بدنی گاو هلشتاین کشت و صنعت مغان و همچنین با استفاده از توالیهای موجود در سایت NCBI مورد بررسی ژنتیکی قرار گرفت. پس از خونگیری نمونهها در محیط سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. DNA ژنومیک با استفاده از کیت استخراج DNA از خون پستانداران شرکت فاورژن استخراج گردید و کمیت و کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور

شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی موجود در ژن MAP4K4 استفاده گردید و جهت تکثیر ژن MAP4K4 از یک جفت آغازگر اختصاصی از گاو هلستاین با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer 3 (<http://simgene.com/Primer3>) در پایگاه اطلاعاتی NCBI به طول ۶۵۴bp استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگر ژن MAP4K4

نوع آغازگر	توالی آغازگر	تعداد جفت باز تکثیر شده
رفت	5'-GGCTCCACTTCACAATACC-3'	۶۵۴
برگشت	5'- TCTGACTCTGTGCAACCC -3'	

واکنش PCR با استفاده از کیت Master PCR (Cinnagen, Iran) و مطابق دستورالعمل کیت (جدول ۲) و بر اساس برنامه حرارتی (جدول ۳) ارائه شده، انجام گرفت.

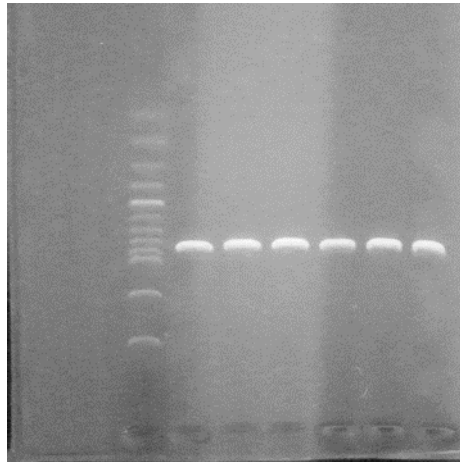
جدول ۲- غلظت‌های مناسب شرایط PCR ژن MAP4K4

MAP4K4	غلظت مورد نیاز برای هر نمونه
پرایمر F	۱
پرایمر R	۱
آب	۷/۵
Master mix	۱۲/۵
DNA	۳

جدول ۳- دما و زمان چرخه‌های حرارتی PCR ژن MAP4K4

مرحله	نوع سیکل	دما	زمان
۱	واسرشته سازی اولیه	۹۵°C	۵ دقیقه
۲	واسرشته سازی	۹۴°C	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر	۵۸°C	۳۰ ثانیه
۴	بسط آغازگر	۷۲°C	۱ دقیقه
۵	تکرار مرحله ۲ الی ۴ (۳۳ مرتبه)	-	-
۶	بسط نهایی آغازگر	۷۲°C	۱۰ دقیقه
۷	نگهداری	۴°C	∞

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند (شکل ۱).



شکل ۱: الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن MAP4K4

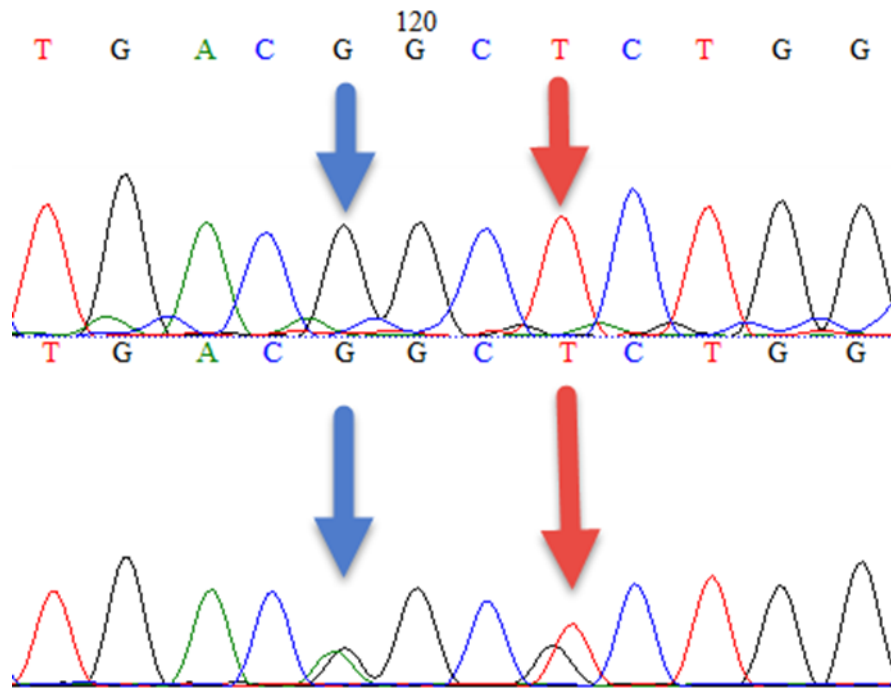
بعد از تکثیر ژن MAP4K4 جهت بررسی تنوع موجود در این جایگاه‌ها و شناسایی تک‌نوکلئوتیدی (SNP) توسط شرکت آمریکایی ماکروژن (Macrogen) با استفاده از دستگاه ABI 3130 به روش خودکار (اتوماتیک) سانگر توالی‌یابی گردید. نمونه‌ها توالی‌یابی شده و کلیه توالی‌های استخراجی از سایت NCBI با استفاده از نرم‌افزار Bioedit 7 مرتب و تفاوت‌ها مشخص شد. شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی موجود در ژن MAP4K4 موثر بر صفات اقتصادی شیر در گاوهای شیری به‌دست آمده ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Mega 6.0 با استفاده از روش Clustal W برهم‌نهمش گردید [۱۲]. سپس با استفاده از نرم‌افزار DanSP 5.10 هاپلوتایپ‌ها و فراسنجه‌های مربوط به تنوع ژنتیکی شامل تنوع نوکلئوتیدی و تنوع هاپلوتیپی به‌دست آمد [۱۳].

### ۳. نتایج و بحث

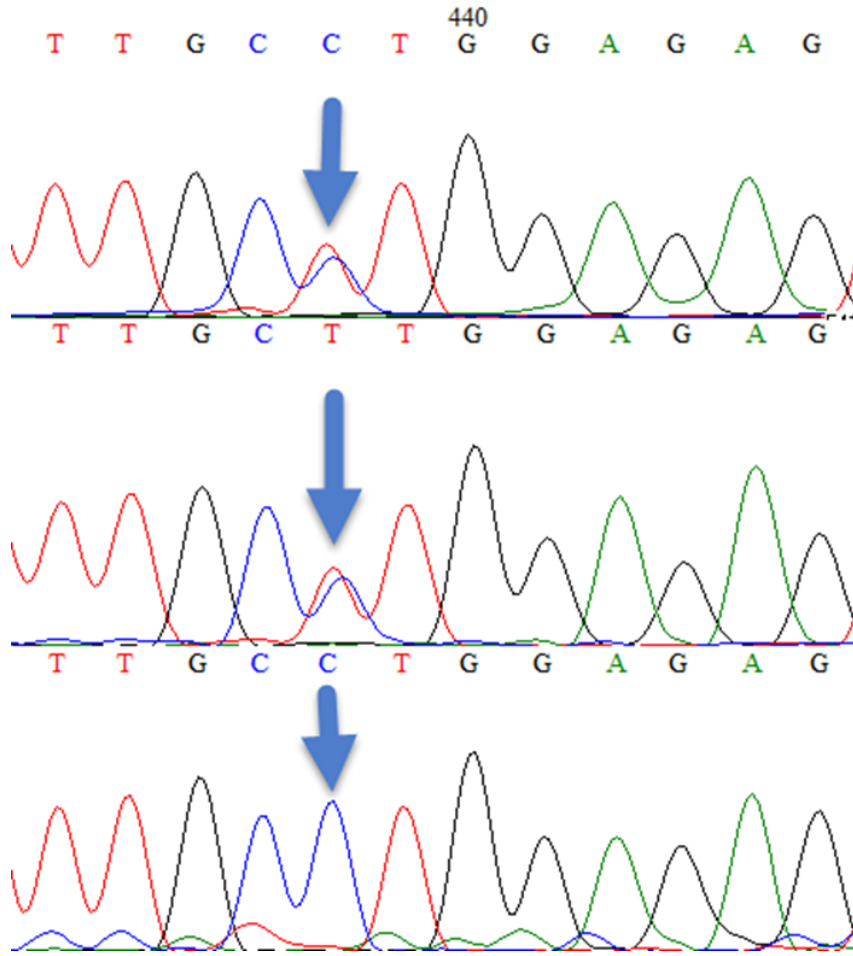
ارزیابی‌های کیفی DNA حکایت از عدم آلودگی DNA استخراج شده داشت. واکنش PCR قطعات اختصاصی برای ناحیه ۱۸ اگزون ژن MAP4K4 تولید نمود (شکل ۱). در مطالعه حاضر پنج الگوی بانندی در جایگاه ژن MAP4K4 در جمعیت گاو هلشتاین موجود در کشت صنعت مغان به روش توالی‌یابی سانگر مشاهده شد که وجود چندشکلی در این جایگاه ژنی را تأیید می‌کنند. بررسی حاضر بر روی ژن MAP4K4 در گاوهای هلشتاین ۵ جهش در اگزون ۱۸ مشاهده شد که در جایگاه ۱۱۹ ژنوتیپ GA جایگزین GG (شکل ۲)، در جایگاه ۱۲۲ ژنوتیپ TG جایگزین TT (شکل ۳)، در جایگاه ۱۷۶ ژنوتیپ GA جایگزین AA (شکل ۴)، در جایگاه ۲۵۹ ژنوتیپ CT جایگزین TT (شکل ۵) و در جایگاه ۴۳۸ ژنوتیپ TC و CT جایگزین CC شده است (شکل ۶) که می‌تواند به عنوان ژن کاندیدا در انتخاب دام‌های مقاوم به ورم پستان استفاده شود.

با بررسی ژن MAP4K4 در گاوهای چینی دو جهش را اگزون ۱۸ گزارش کردند که ژنوتیپ TT در هر دو جهش باعث کاهش معنی‌دار میزان سلولهای سوماتیک می‌شود و همچنین جایگزینی T به جای G تاثیر معنی‌داری بر روی درصد پروتئین، شیر تولیدی و میزان سلولهای سوماتیک دارد. اطلاعاتی زیادی در گاوهای شیری گزارش نشده است ولی مطالعات بر روی انسان نشان داده است جهش موجود در این ژن MAP4K4 یک کاندیدا مهم در مقاومت به بیماریهای باکتریای ورم پستان می‌باشد. اطلاعات آماری نشان داده است که گاوهای دارای ژنوتیپ GG و TG تاثیر معنی‌داری با صفات مورد بررسی دارد در حالی که گاوهای ژنوتیپ CC در جایگاه دیگری از اگزون ۱۸ نیز دارای سلولهای سوماتیکی کمتری است بنابراین ژنوتیپ‌های GG, TG و CC می‌تواند به عنوان ژن کاندیدا در انتخاب دام‌های مقاوم استفاده شود [۱۴]. پنج جهش مختلف

در انشان را گزارش شده که در ارتباط با مقاومت به انسولین و مقاومت به التهاب مختلف بود که ممکن در شرایط خطر و ابتلا به بیماریها چندشکلیهای موجود می تواند موثر واقع شود [۱۵].



شکل ۲- جهش جایگزینی در جایگاههای ۱۱۹ و ۱۲۲ اگزون ۱۸ ژن MAP4K4



شکل ۲- جهش جایگزینی در جایگاه ۴۳۸ اگزون ۱۸ ژن MAP4K4

#### ۴. نتیجه‌گیری

از مهمترین اهداف انتخاب در گاوهای شیری، بالا بردن بهره‌وری و بهبود انتخاب گاوهایی است که علاوه بر تولید شیر با کیفیت و کمیت مناسب، کاهش مشکلات مدیریتی می‌باشد. شناسایی ژن‌های موثر بر مقاومت به بیماری‌ها از جمله ورم پستان و کاربرد رویه‌گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را به منظور بهبود وضعیت ورم پستان در صنعت گاو شیری فراهم کرده است که میتوان با استفاده از این کارایی برنامه‌های اصلاح نژاد را افزایش داد. مطالعه حاضر از MAP4K4 بعنوان یک ژن کاندیدا در ارتباط با بیماری ورم پستان و صفات ایمنولوژیکی در جمعیت گاوهای هلشتاین کشت و صنعت مغان 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 حاصل شد و بررسی اثر ژنتیکی هر یک از این ترکیبات ژنی بر روی شمارش سلولهای بدنی شیر که بعنوان یک ابزار انتخاب غیرمستقیم برای کاهش ورم پستان در بسیاری از مطالعات پیشنهاد شده است، میتوان در برنامه انتخاب به وسیله نشانگر بهره برد.

مراجع

- [1] Ghazanfari Kherabadi, M.R. 2011. Polymorphisms TLR4 gen and association with somatic cell score in Holstein and Brown Swiss in khorasan. Master's thesis, University Birjand, pp: 5-7 (In Persian).
- [2] Katsafadou, A.I. and G.C. Fthenakis. 2013. Breeding for mastitis resistance in sheep and goats. *Journal Veterinary Science Technology*, 4(4): 71 pp.
- [3] Jamali, N., A. Sadeghi Sefid Mazgi and M.M. Moeini. 2013. Evaluation of milk somatic cell count in dairy farms of industrial and traditional in Tehran. *Livestock production*, 14(1): 29-21 (In Persian).
- [4] Zamiri, M.J. 2006. Training of dairy cattle. 6nd edn, Shiraz University Press, pp: 75-85 (In Persian).
- [5] Naghshineh, S. 2011. Evaluation of inbreeding and its effect on milk production and subclinical mastitis in dairy cows. Master's thesis. University of Tabriz, pp: 4-5 (In Persian).
- [6] Hillerton, J.E. 1999. Balancing mastitis and quality. *The Proceeding of the British Mastitis Conference*, 31-36.
- [7] Zhang, L.P., Q.F. Gan, T.H. Ma, H.D. Li, X.P. Wang, J.Y. Li, X. Gao, J.B. Chen, H.Y. Ren and S.Z. Xu. 2009. Toll-like receptor 2 gene polymorphism and its relationship with SCC in dairy cattle. *Animal Biotechnology*, 20: 87-95.
- [8] DELPIRE, E. 2009. The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 458, 953-967.
- [9] ZOHAN, I. E., LI, Y., SKOLNIK, E. Y., ANDERSON, K. V., HAN, J. & NISWANDER, L. 2006. P38 and a P38-interacting protein are critical for downregulation of E-cadherin during mouse gastrulation. *Cell*, 125, 957-969.
- [10] KARIN, M. & GRETEN, F. R. 2005. NF- $\kappa$ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature Reviews Immunology*, 5, 749.
- [11] Dror, N., ALTER-KOLTUNOFF, M., AZRIEL, A., AMARIGLIO, N., JACOB-HIRSCH, J., ZELIGSON, S., MORGENSTERN, A., TAMURA, T., HAUSER, H. & RECHAVI, G. 2007. Identification of IRF-8 and IRF-1 target genes in activated macrophages. *Molecular immunology*, 44, 338-346.
- [12] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- [13] Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- [14] BHATTARAI, D., CHEN, X., UR REHMAN, Z., HAO, X., ULLAH, F., DAD, R., TALPUR, H. S., KADARIYA, I., CUI, L. & FAN, M. 2017. Association of MAP4K4 gene single nucleotide polymorphism with mastitis and milk traits in Chinese Holstein cattle. *Journal of Dairy Research*, 84, 76-79.
- [15] Li, T.-T., QIAO, H., TONG, H.-X., ZHUANG, T.-W. & WANG, T.-T. 2016. Association of common genetic variants in mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 with type 2 diabetes mellitus in a Chinese Han population. *Chinese medical journal*, 129, 1179.

## Identification of Single Nucleotide Polymorphism in MAP4K4 related to economic traits in dairy cattle

K.R. Mohamadzadeh\*, N. Hedayat, R. Seyedsharifi, A. Boustan, F. mirzaei and L. Aghazadeh, M. Razmi

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabil.

\*Corresponding Author: Rfamlovei5@gmail.com

### Abstract

Management of animal breeding programs could be increased resistant to disease in mammalian. Some genes identified that was related with resistance to mastitis. This disease is the most common disease in dairy cattle that create a lot of costs for industry. In this study, we research to identify single nucleotide polymorphism (SNP) related to immune system. For this reason exon 18 of MAP4k4 were sequenced. The analysis of sequences identified two polymorphism loci with adequate frequency. In 119 locus a substitution of G to A were observed but we just found two genotype including GA and GG. In the 438 locus we found three genotypes TT, CC and CT due to mutation of C to T. this results show that MAP4K4 gene could be effective candidate gene for resistant to mastitis.

**Keywords:** SNP, MAP4K4 Gene, Economic Milk Traits, Mastitis.