تحقیقات تولیدات دامی
سال چهارم/شماره اول/بهار ۱۳۹۴ (۳۴-۲۵)

بررسی بیان ژن IL8RB در برنامهٔ آمیخته‌گری گاو بومی گیلان

میثاق مریدی[۱]، سید حسین حسینی مقدم[۲*]، سید ضیاء الدین میرحسینی[۳]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۱)

چکیده

یکی از گیرنده‌های کموکاین‌ها در سطح نوتروفیل‌ها IL8RB است که برای حداکثر کارآیی نوتروفیل‌ها در زمان بروز عفونت حیاتی است. تفاوت در توالی و بیان ژن IL8RB منجر به ایجاد تفاوت در مقاومت به ورم پستان در جمعیت‌های مختلف گاو می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات میزان بروز ژن IL8RB در نتیجهٔ آمیخته‌گری در گاوهای بومی استان گیلان با گاوهای اصیل هلشتاین است. به این منظور ۵۶ نمونه خون از ۵ جمعیت گاو ایستگاه اصلاح نژاد گاو بومی استان گیلان جمع‌آوری شد. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، واکنش‌های real-time PCR در تمامی نمونه‌ها و با سه تکرار برای هر نمونه انجام گرفت. از ژن-های GAPDH و RPLP0 برای کنترل داخلی استفاده شد. بیشترین متوسط بیان ژن IL8RB (۰/۷۷±۰/۷۴) در جمعیت گاوهای بومی و کمترین میزان بیان این ژن (۰/۲۲±۰/۱۲) در گاوهای آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین بدست آمد. بیشترین به کمترین متوسط بیان این ژن در پنج جمعیت با استفاده از روش پافل به ترتیب شامل گاو بومی (۰/۷۷±۰/۷۴) ، گاو آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین (۰/۲۷±۰/۳) ، گاو آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی (۰/۳±۰/۲۶)، گاو هلشتاین (۰/۲۶±۰/۲۳) و گاو آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین (۰/۲۲±۰/۱۲) بود. چون بیان این ژن در گاو بومی بیشترین (۰/۷۷±۰/۷۴) مقدار بود بود و افزایش سهم خونی گاو هلشتاین که نسبت به ورم پستان حساس است در دام‌های آمیخته سبب کاهش بیان این ژن شد، لذا می-توان تغییرات بیان این ژن را با مقاومت به ورم پستان مرتبط دانست. با توجه به اینکه این مطالعه تأثیر آمیخته‌گری در تغییر بیان ژن IL8RB را به خوبی نشان داد، ضروری است عواقب آمیخته‌گری در برنامه اصلاح نژاد گاو بومی پیش‌بینی شود.

واژه‌های کلیدی: آمیخته‌گری، بیان ژن، cDNA، IL8RB، Real-time PCR

* نویسندهٔ مسئول: hosseini@guilan.ac.ir

مقدمه

گاو عمده‌ترین منبع تأمین کنندهٔ شیر و گوشت برای انسان می‌باشد. گاوهای امروزی را می‌توان در دو دستهٔ اصلی تقسیم‌بندی نمود که در حدود ۶۱۰۰۰۰ الی ۸۵۰۰۰۰ سال پیش اشتقاق یافته‌اند (MacHugh *et al*., 1997): گاوهای نژاد تائورین (taurine یا *Bos taurus*) که منشأ اولیهٔ آن‌ها اروپا و قسمت‌های شمالی آسیا بوده و نسبت به شرایط آب و هوایی معتدل عادت‌پذیری پیدا کرده‌اند و گاوهای نژاد ایندیسین (indicine، *Bos indicus* یا *Taurus indicus*) که منشأ آن‌ها مناطق جنوبی آسیا بوده و تحت شرایط آب و هوایی گرمسیری تکامل یافته‌اند (Fries and Ruvinsky, 1999). تفاوت‌های فنوتیپی اساسی میان دو نژاد گاو تائورین و ایندیسین وجود دارد. مهم‌ترین اختلاف بین این دو دسته از دام‌ها تفاوت قابل توجه در مقاومت در برابر تنش‌های گرمایی، انگل‌ها و بیماری‌ها می‌باشد (Utech *et al*., 1978; Hansen, 2004). گاوهای بومی ایران در دستهٔ گاوهای ایندیسین طبقه‌بندی شده و حداقل در شش جمعیت گاو سرابی، گلپایگانی، سیستانی، دشتیاری، نجدی و گاو بومی استان گیلان یا تالشی تقسیم‌بندی می‌شوند (Iran's country report on farm animal, 2004).

آمیخته‌گری یکی از شیوه‌های اصلاح نژادی است که می‌تواند با هدف بهبود تولید و همچنین افزایش مقاومت دام‌ها نسبت به تنش‌های محیطی، انگل‌ها و بیماری‌ها انجام شود. هدف اصلی یک سیستم آمیخته‌گری استفاده همزمان از اثرات هتروزیس و افزایشی ژنی در نتاج نژادهای مختلف است (Suzuki and Van Vleck, 1994). در نواحی گرمسیری نژادهای شیری اروپایی (با تولید بالا) نسبت به نژادهای *Bos indicus* سازگاری کمتری با شرایط محیطی دارند. بنابراین تلاقی‌گری بین دو نژاد (*Bos taurus* و *Bos indicus*) جهت بهبود تولید شیر در مناطق گرمسیری رایج است (Lasely, 1987). برنامه‌های آمیخته‌گری متعددی با هدف وارد کردن ژن گاوهای شیری پرتولید به گاوهای بومی در مناطق مختلف دنیا انجام شده است. یکی از اولین طرح‌های آمیخته‌گری در سال ۱۹۱۱ در آمریکا با استفاده از نژادهای هلشتاین و گرنزی انجام شد. در کشور هندوستان تحقیقات گسترده‌ای در مورد آمیخته‌گری انجام شده است و نژادی به نام تیلر[1] به عنوان یک نژاد پرتولید از تلاقی‌گری توده‌های بومی و نژاد زبوی شیری استرالیا بوجود آمده است. همچنین پروژهٔ آمیخته‌گری بین گاوهای هلشتاین، جرزی و براون سوئیس با گاوهای زبوی هندی در کشور هندوستان انجام شده است (Touchberry, 1992).

بر اساس رکوردگیری مرکز اصلاح نژاد دام و بهبود تولیدات دامی از سال ۱۳۸۲ تا پایان سال ۱۳۹۱ میانگین تولید شیر روزانهٔ گاو اصیل هلشتاین ۲۸/۱ کیلوگرم، گاو آمیخته ۱۰/۳ کیلوگرم و میانگین تولید شیر گاو بومی ۴/۶۸ کیلوگرم بوده است. به دلیل کم بودن تولید شیر و گوشت در گاوهای بومی، طرح‌های دورگ‌گیری گاوها از چهل سال پیش در ایران شروع شده است. آمیخته‌گری در ایران به روش‌های گوناگون (استفاده از گاو نر خارجی، اسپرم مایع و اسپرم منجمد) در حال اجرا می‌باشد. نخستین طرحی که به‌طور رسمی از سوی سازمان دامپروری کشور برای توده گاوهای دورگ تهیه شد در اوائل دهه ۱۳۷۰ ارائه و ۱۱ استان را شامل می‌شد (گل‌محمدی و ناجی، ۱۳۷۷). در استان گیلان نیز دورگ‌گیری بین گاوهای بومی این استان با گاوهای هلشتاین اصیل جهت بهبود تولید شیر و گوشت گاوهای بومی همزمان با سایر استان‌ها و عمدتا" با تلقیح مصنوعی در حال انجام می‌باشد. در مرکز پشتیبانی گاو بومی استان گیلان (حسین کوه فومن) طرحی ۲۰ ساله جهت ایجاد نژاد جدید از آمیخته‌گری گاو هلشتاین با گاو بومی استان گیلان در دو خط پدری و مادری در دست اجرا می‌باشد. هدف از اجرای این پروژه ایجاد نژادی است که در نهایت ۶۲/۵ درصد از ژن‌های گاو هلشتاین و ۳۷/۵ درصد از ژن‌های گاو بومی را دارا باشد. تاکنون نسل‌های دوم و سوم از این تلاقی‌ها گرفته شده و نسل‌های سوم و چهارم در حال متولد شدن هستند.

یکی از بیماری‌های شایع در گاو شیری ورم پستان است که هزینه‌های هنگفتی را به همراه دارد. ورم پستان به التهاب بافت پستان صرف‌نظر از عامل آن (باکتری، مخمر و یا قارچ)

[1]- Talor

گفته می‌شود (Radostits *et al*., 2000). بر اساس اطلاعات بدست آمده در گاوهای شیری بیش از ۷۰ درصد کاهش تولید شیر، ۹ درصد از دور ریز شیر پس از درمان، ۷ درصد هزینه‌های درمانی و ۱۴ درصد از کشتار گاوها ناشی از ابتلا به این بیماری می‌باشد (Bhikane and Kawitkar, 2000). با توجه به اینکه با ابتلا به ورم پستان نوتروفیل‌ها جهت مبارزه و از بین بردن اغلب پاتوژن‌ها به محل این عارضه منتقل می‌شوند، ژن‌های مرتبط با عملکرد نوتروفیل‌ها نشانگرهای ژنتیکی[1] بالقوه برای ورم پستان می‌باشند (Paape *et al*., 2000). توانایی نوتروفیل‌ها در مهاجرت به بافت‌های عفونی به شناسایی واسطه‌های التهابی[2] به‌وسیله گیرنده‌های سایتوکاین[3]، کموکاین[4] و کمپلیمنت[5] نوتروفیل‌ها بستگی دارد (Burvenich *et al*., 1994). CXCR1 (IL8RA) و CXCR2 (IL8RB) دو گیرندهٔ کموکاین‌ها در سطح نوتروفیل‌ها هستند که برای حداکثر کارآیی نوتروفیل‌ها در زمان عفونت حیاتی می‌باشند (Murphy and Tiffany, 1991). شناسایی کموکاین‌ها به‌وسیله این دو گیرنده منجر به فعال شدن نوتروفیل‌ها، کیموتاکسیس و در نهایت فاگوسیتوز پاتوژن‌ها می‌شود (Peveri *et al*., 1988; Podolin *et al*., 2002).

تاکنون مطالعه‌ای درباره تغییرات ناشی از آمیخته‌گری گاو بر بیان ژن‌ها انجام نشده است. تغییرات ترانسکریپتوم در برنامهٔ آمیخته‌گری ماهی آزاد اقیانوس اطلس مورد مطالعه قرار گرفته است (Roberge *et al*., 2008). در این مطالعه از دو روش real-time PCR و ریز آرایه[6] استفاده شد که هر دو روش نتایج تقریبا" مشابهی را نشان دادند. همچنین از نتایج بدست آمده از روش qrtPCR جهت تأیید نتایج ریزآرایه استفاده شد. تنها مطالعه‌ای که به مقایسهٔ ترانسکریپتوم نژادهای ایندیسین و تائورین پرداخته است مطالعهٔ Huang *et al*. (2012) می‌باشد که از نمونه‌های خون محیطی در سه نژاد گاو هلشتاین، جرزی و کولیستانی استفاده نمودند. دو نژاد اول جزء نژادهای *Bos taurus* بوده و نژاد سوم که متعلق به نواحی بیابانی پاکستان می‌باشد، جزء نژادهای *Bos indicus* طبقه‌بندی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تفاوت‌های فنوتیپی این سه نژاد گاو از جنبه‌های مختلف مقاومت به گرما، کنه‌ها و بیماری‌ها در دو سطح ژنومیکس و ترانسکریپتومیکس بود که برای این منظور علاوه بر RNA-sequencing بیان ده ژن (CCL5، EEF1A1، IL1B، IL8RB، CLUS، JUNB، JUND، NFKBIZ، TAC3 و DGAT2) را با استفاده از روش real-time PCR مورد مطالعه قرار دادند. دو روش RNA-sequencing و qrt-PCR نتایج تقریبا" مشابهی را نشان دادند. نسبت میزان بیان ژن‌های CCL5، IL1B، IL8RB، JUNB، JUND، NFKBIZ و DGAT2 در نژاد ایندیسین نسبت به نژاد تائورین بیشتر و این نسبت برای ژن‌های EEF1A1، CLUS و TAC3 میزان کمتری را نشان داد.

در جمعیت‌های دامی داخل کشور در زمینهٔ ژن‌های موثر بر ورم پستان گاو مطالعات متعددی صورت گرفته است که بیشتر آنها در زمینه شناسایی آلل‌های ژن BoLA-DRB3 بوده‌اند (Nassiry *et al*., 2005; Mohammadi *et al*., 2009). ارتباط بین آلل‌های ژن BoLA-DRB3 با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر و صفات شیر (مقدار شیر و درصد پروتئین و چربی شیر) به‌وسیله Pashmi *et al*. (2009) بررسی شده است، که در این مطالعه بین آلل‌های این ژن با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر و درصد چربی و پروتئین شیر ارتباط معنی‌دار بدست آمده و هیچگونه ارتباطی بین آلل‌های این ژن با مقدار شیر تولیدی بدست نیامده است. در مطالعه‌ای دیگر Norouzy *et al*. (2005) تنوع موثر در ایجاد بیماری BLAD [7] در ژن CD18 را با استفاده از روش PCR-RFLP و به‌وسیله آنزیم‌های برشی *TaqI* و *HaeIII* مورد بررسی قرار دادند.

[1]- Genetic marker

[2]- Inflammatory mediator

[3]- Cytokine

[4]- Chemokine

[5]- Complement

[6]- Microarray

[7]- Bovine leucocyte adhesion deficiency

بر اساس گزارش آیت‌اللهی (۱۳۹۲) در گاو بومی استان گیلان، تقریبا" مورد طبیعی ابتلا به بیماری ورم پستان در سطح حاد مشاهده نمی‌شود و موارد تحت حاد نیز بسیار اندک می‌باشد، اما در گاوهای هلشتاین استان گیلان ابتلا به این بیماری به‌صورت تحت حاد شایع بوده و موارد حاد نیز به صورت موردی در گله‌ها مشاهده می‌شود. گسترش روزافزون تلقیح مصنوعی در مناطق مختلف کشور باعث افزایش کنترل نشدهٔ سهم خونی نژادهای خارجی و کاهش سهم نژادهای بومی شده است و با وجود افزایش تولید شیر موجبات کاهش مقاومت گاوها نسبت به شرایط نامناسب محیطی و تغذیه‌ای و افزایش حساسیت آن‌ها به تنش‌های گرمایی، تغذیه‌ای و بیماری‌های متفاوت شده است (گل-محمدی و ناجی، ۱۳۷۷). در دهه اخیر بحث آمیخته‌گری کنترل شده در کشور بسیار مورد توجه قرار گرفته ولی در طی این سال‌ها مطالعات مختصری روی آمیخته‌ها صورت گرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی تغییر میزان بروز ژن IL8RB در نتیجهٔ آمیخته‌گری در گاوهای بومی استان گیلان با گاوهای هلشتاین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خون محیطی از سیاهرگ دمی ۵۶ رأس گاو (۱۴ رأس گاو بومی، ۸ رأس گاو آمیخته ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی، ۱۰ رأس گاو آمیخته ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین، ۱۲ رأس گاو آمیخته ۷۵ درصد هلشتاین و ۱۲ رأس گاو هلشتاین) جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها درون لوله ونوژکت حاوی هپارین به عنوان مادهٔ ضد انعقاد از ایستگاه پشتیبانی گاو بومی واقع در حسین‌کوه فومن جمع‌آوری و روی یخ در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه جهت استخراج RNA منتقل شدند. استخراج RNA کل با استفاده از روش Trizol (Invitrogen) انجام گرفت و کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (spectrophotometer) ND-2000 (Thermo)، نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ دستگاه اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۰/۸ درصد (۳۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰) تعیین شدند. با توجه به کمیت و کیفیت RNAهای بدست آمده، cDNA تمامی نمونه‌ها با استفاده از کیت ساخت cDNA (Thermo Scientific) و مطابق دستورالعمل شرکت سازندهٔ ساخته شدند. طراحی آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) برای ژن هدف IL8RB و دو ژن کنترل مرجع GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) و RPLP0 (ribosomal protein, large, P0) انجام گرفت. طول قطعات، دمای اتصال مناسب و عدم تشکیل ساختارهای ثانویه در طراحی آغازگرها مدنظر قرار گرفت (جدول ۱). برای بدست آوردن دمای مناسب اتصال آغازگرها از واکنش گرادیان دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction یا PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتری که حاوی ۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۴ mM MgCl2، ۰/۱۶ mM dNTPs، ۰/۲۴ mM از هر آغازگر، ۲ واحد آنزیم Taq پلیمراز و تقریبا" ۵۰ ng DNA بودند استفاده شد. این واکنش با استفاده از برنامهٔ استاندارد PCR انجام شد که شامل ۵ دقیقه جداسازی آغازین زنجیره‌های الگو در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس، ۴۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجهٔ سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دماهای متفاوت گرادیان دمایی و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجهٔ سلسیوس و در نهایت تکثیر نهایی زنجیرهٔ الگو به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس بود. محصولات PCR جهت تعیین دمای مناسب اتصال هر آغازگر، روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۸۵ الکتروفورز شدند. از اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

Table 1. Characteristics of used primers

Primer name		Sequence	Primer length (bp)	Melting temperature (°C)	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)
IL8RB	Froward	5' TGCCCATCTTCATCTTCCG 3'	19	58.9	95	60
	Reverse	5' CATCCGCCATTTCGTTGT 3'	18	57.1		
GAPDH	Forward	5' CATTGCCCTCAACGACCA 3'	18	57.8	77	60
	Reverse	5' CCACCACCCTGTTGCTGTAG 3'	20	58.5		
RPLP0	Forward	5' CAACCCTGAAGTGCTTGACAT 3'	21	57.5	189	60
	Reverse	5' GCAAGTGGGAAGGTGTAATCA 3'	21	57.6		

جهت تعیین رقت مناسب cDNAهای ساخته شده و بدست آوردن بازده تکثیر آغازگرها ((primer efficiency (E)) و نمودار استاندارد واکنش real-time PCR از دمای اتصال بهینه بدست آمده در هر آغازگر استفاده شد. برای این کار از رقت‌های ۱ به ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴ و ۲۸ در سه تکرار برای هر رقت استفاده گردید. این واکنش برای تمامی نمونه-ها با رقت بدست آمده، در سه تکرار (برای هر کدام از سه ژن) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام کار از کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Termo Scientific) و دستگاه CFX96 (Bio-Rad) استفاده شد. واکنش‌های real-time PCR شامل ۵ دقیقه جداسازی آغازین زنجیره‌های الگو در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس، ۴۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجهٔ سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال هر آغازگر و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجهٔ سلسیوس بود. خوانش پلیت جهت ترسیم نمودار تکثیر در این مرحله انجام گرفت و سپس ۶۰ سیکل ۵ ثانیه‌ای در هر سیکل ۰/۵ درجه سلسیوس افزایش دما جهت بدست آوردن نمودار نقطهٔ ذوب (melt curve) تکثیر از دمای ۶۵ تا ۹۵ درجهٔ سلسیوس اجراء شد. از رابطهٔ زیر جهت محاسبهٔ میزان نسبی بیان ژن‌ها در تمامی نمونه‌ها استفاده گردید (Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al*., 2002):

$$RQ_{sample(GOI)} = E_{GOI}^{(C_{T(MIN)} - C_{T(sample)})}$$

RQ = مقدار نسبی ژن مورد نظر.

E = بازده جفت آغازگر های مورد استفاده.

GOI = ژن مورد نظر (یک ژن یا هدف یا مرجع).

$C_{T(MIN)}$ = میانگین C(t) برای نمونه‌ای که پایین‌ترین C(t) را برای GOI دارد.

$C_{T(sample)}$ = میانگین C(t) برای هر نمونه.

$$E = (\%\ Efficiency \times 0.01) + 1$$

اگر بازده تکثیر آغازگر ۱۰۰ درصد باشد آنگاه E برابر ۲ خواهد بود.

پس از محاسبهٔ میزان نسبی بیان ژن‌های هدف و مرجع در هر نمونه از رابطهٔ زیر جهت نرمال‌سازی بیان ژن‌ها استفاده شد، که در این رابطه مخرج کسر را عامل نرمال‌سازی گویند (Pfaffl, 2001; Vandesompele *et al*., 2002):

$$\text{Normalized expression}_{sample(GOI)} = \frac{RQ_{sample(GOI)}}{\left(RQ_{sample(ref1)} \times RQ_{sample(ref2)} \times \ldots \times RQ_{sample(refn)}\right)^{\frac{1}{n}}}$$

$$\text{Normalization factor}_{\text{sample(GOI)}} = \left(\text{RQ}_{\text{sample(ref1)}} \times \text{RQ}_{\text{sample(ref2)}} \times \ldots \times \text{RQ}_{\text{sample(refn)}}\right)^{\frac{1}{n}}$$

ref = ژن هدف مرجع در یک آزمایش که یک یا بیش از یک ژن برای هر نمونه را شامل می‌شود.

n = تعداد ژن‌های هدف مرجع.

پس از نرمال‌سازی نتایج میزان بیان نسبی ژن IL8RB در تمامی نمونه‌ها، میانگین میزان بیان این ژن و نسبت تغییر بیان ژن IL8RB بین جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه تعیین شد و در نهایت کلیهٔ نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

جهت تعیین میزان بیان ژن IL8RB در لوکوسیت‌های خون، نمونه‌های خون محیطی از پنج جمعیت گاو جمع‌آوری شدند. جهت یکسان‌سازی شرایط محیطی، تمامی نمونه‌ها از یک گاوداری (حسین کوه فومن) و در یک فصل (فصل بهار) جمع‌آوری شدند. استخراج RNA از تمامی نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن پس از نمونه‌گیری با موفقیت انجام گرفت. RNAهای استخراج شده به طور متوسط غلظت ۳۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر را نشان دادند و متوسط نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ برای نمونه‌ها ۱/۹ بدست آمد. برای تمامی نمونه‌ها cDNA با غلظت یک میکروگرم ساخته شد. با توجه به نمودار استاندارد بدست آمده برای ژن هدف، نسبت رقیق‌سازی cDNAها ۱ به ۱۲ و بازدهی تکثیر پرایمرها ۱۱۳/۳ درصد بدست آمد. پس از انجام موفقیت‌آمیز واکنش‌های Real-time در سه تکرار برای ژن‌های هدف و مرجع در همهٔ نمونه‌ها اطلاعات بدست آمده مرتب شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. حداقل میانگین سیکل آستانه (threshold cycle (Ct)) نمونه‌ها برای ژن‌های IL8RB، GAPDH و RPLP0 به‌ترتیب برابر با ۲۰/۸۲، ۱۷/۸۱ و ۱۸/۷ بودند. پس از نرمال‌سازی مقادیر نسبی بروز ژن هدف، به طور متوسط بیشترین میزان بیان ژن هدف در جمعیت دام‌های بومی (۰/۷۷±۰/۷۴) و کمترین میزان در جمعیت دام‌های آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین (۰/۲۲±۰/۱۲) بدست آمد (جدول ۲).

جدول ۲- متوسط بروز ژن IL8RB در جمعیت‌های مختلف (N = گاو بومی، H = گاو هلشتاین، 75C = گاو آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین، 50CSN = گاو آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین، 50CSH = گاو آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی، M = میانگین و STD = انحراف استاندارد)

Table 2. Average gene expression of IL8RB gene in different populations (N = Native cow, H = Holstein cow, 75C = 75 percent Holstein crossbred cow, 50CSN = 50 percent sire Native and dam Holstein crossbred cow, 50CSH = 50 percent sire Holstein and dam Native crossbred cow, M = Mean, and STD = Standard deviation)

Gene		Cows population				
		50CSH	50CSN	75C	H	N
IL8RB	M	0.26	0.3	0.12	0.23	0.74
	STD	0.3	0.27	0.22	0.26	0.77

همچنین متوسط میزان تغییر در بیان ژن هدف در دام‌های بومی نسبت به دام‌های هلشتاین، آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین، آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین و دام‌های آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی به‌ترتیب برابر با ۳/۲۲، ۶/۱۷، ۲/۴۷ و ۲/۸۵ و این میزان در دام‌های هلشتاین نسبت به دام‌های بومی، آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین، آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین و دام‌های آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی به‌ترتیب برابر با ۰/۳۱، ۱/۹۲، ۰/۷۷ و ۰/۸۸ بدست آمد. سایر نسبت‌های بدست آمده در جدول ۳ قابل مشاهده می‌باشند. بیشترین تغییر در میزان بیان ژن در گاوهای بومی نسبت به گاوهای آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین (افزایش ۶/۱۷ برابری) و کمترین تغییر بیان ژن در گاوهای آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین نسبت به گاوهای بومی (افزایش ۰/۱۶ برابری) بدست آمد.

جدول ۳- نسبت تغییر بیان ژن IL8RB در جمعیت‌های مختلف گاو (N = گاو بومی، H = گاو هلشتاین، 75C = گاو آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین، 50CSN = گاو آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین، 50CSH = گاو آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی) *

Table 3. Expression change ratio of IL8RB gene in different cow populations (N = Native cow, H = Holstein cow, 75C = 75 percent Holstein crossbred cow, 50CSN = 50 percent sire Native and dam Holstein crossbred cow, 50CSH = 50 percent sire Holstein and dam Native crossbred cow) *

	N	H	75C	50CSN	50CSH
N	1.00	0.31	0.16	0.41	0.35
H	3.22	1.00	0.52	1.30	1.13
75C	6.17	1.92	1.00	2.50	2.17
50CSN	2.47	0.77	0.40	1.00	0.87
50CSH	2.85	0.88	0.46	1.15	1.00

* Reading of numbers is column-based, i.e., columns are compared with rows.

نتایج بدست آمده در این مطالعه (جدول ۳) بیانگر کاهش ۲/۴۷ برابری میزان بیان ژن IL8RB در گاوهای آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین و به طور تقریبا" مشابه کاهش ۲/۸۵ برابری در گاوهای آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی نسبت به گاوهای بومی بودند و در نتیجهٔ کاهش سهم ژنتیکی گاوهای بومی در گاوهای آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین می‌توان کاهش ۶/۱۷ برابری میزان بیان ژن IL8RB در این گاوها را نسبت به گاوهای بومی مشاهده نمود. میزان بیان ژن IL8RB در گاوهای آمیختهٔ ۵۰ درصد پدر بومی و مادر هلشتاین و به طور مشابه آمیخته‌های ۵۰ درصد پدر هلشتاین و مادر بومی نسبت به گاوهای هلشتاین افزایش به‌ترتیب ۱/۳ و ۱/۱۳ برابری نشان دادند، اما میزان بیان ژن IL8RB در گاوهای آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین کاهش ۱/۹۲ برابری نسبت به گاوهای هلشتاین نشان دادند. در این مطالعه میزان بیان ژن IL8RB در گاوهای بومی ۳/۲۲ برابر بیان این ژن در گاوهای هلشتاین بدست آمد که مشابه نتایج قبلی مبنی بر بالاتر بودن میزان بیان ژن IL8RB در گاوهای نژاد ایندیسین نسبت به گاوهای تائورین می‌باشد (Huang *et al*., 2012).

مطالعات متعددی روی ژن‌های موثر بر ورم پستان در جمعیت‌های دامی داخل کشور با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط این ژن‌ها با تعداد سلول‌های سوماتیک شیر و صفات شیر صورت گرفته است (Mohammadi *et al*., 2009; Pashmi *et al*., 2009; Norouzy *et al*., 2005). همچنین در خارج از کشور مطالعات متعددی با هدف بررسی بیان ژن‌های متعدد موثر بر ورم پستان جمعیت‌های مختلف گاو صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان به مطالعهٔ Huang *et al.* (2012) اشاره نمود. اما، در این مطالعه برای نخستین بار تغییرات بیان یک ژن در یک برنامهٔ آمیخته‌گری در گاو مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست

آمده، آمیخته‌گری گاوهای بومی استان گیلان با گاوهای هلشتاین منجر به افزایش بیان ژن IL8RB در گاوهای آمیختهٔ ۵۰ درصد نسبت به گاوهای هلشتاین شده است و با کاهش بیشتر سهم ژنتیکی گاوهای بومی و افزایش سهم ژنتیکی گاوهای هلشتاین در گاوهای آمیختهٔ ۷۵ درصد هلشتاین میزان بیان این ژن نسبت به گاوهای بومی و بخصوص گاوهای هلشتاین کاهش پیدا کرده است. بنابراین با توجه به اهمیت ژن IL8RB در مقاومت به ورم پستان (Murphy and Tiffany, 1991; Peveri *et al*., 1988; Podolin *et al*., 2002) تثبیت سهم ژنتیکی گاوهای آمیخته در سطح ۵۰ درصد و یا آمیخته‌گری کنترل شده‌تر گاوهای بومی در جهت حفظ مقاومت ژنتیکی این جمعیت از گاو توصیه می‌شود. تغییرات بیان ژن IL8RB در گاوهای بومی، هلشتاین و آمیخته‌های بدست آمده از آن‌ها در این مطالعه تأیید کنندهٔ مطالعات قبلی (Paape *et al*., 2000) مبنی بر مناسب بودن این ژن به عنوان نشانگر زیستی برای ورم پستان می‌باشد و می‌تواند در سطوح مختلف سهم ژنتیکی گاوهای آمیخته جهت تعیین مناسب بودن مقاومت ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد. این مطالعه تأثیر آمیخته‌گری در تغییر بیان ژن IL8RB را به خوبی نشان می‌دهد و بیانگر عواقب آمیخته‌گری کنترل نشده بوده و می‌تواند به عنوان الگویی در طراحی برنامه‌های آمیخته‌گری در گاوهای بومی مورد استفاده قرار گیرد. بررسی تعداد بیشتر ژن‌های مرتبط با ورم پستان و سایر ژن‌های مرتبط با مقاومت ژنتیکی و همچنین بررسی تغییرات نوکلئوتیدی ژن IL8RB و سایر ژن‌ها در این برنامهٔ آمیخته‌گری می‌تواند پیامدهای آمیخته-گری و همچنین نحوهٔ برنامه‌ریزی برای طراحی یک برنامهٔ آمیخته‌گری در جمعیت‌های گاو بومی را روشن‌تر سازند.

فهرست منابع

آیت‌اللهی م. ۱۳۹۲. مطالعهٔ چندشکلی ژن لاکتوفرین در گاو بومی استان گیلان و آمیخته‌های آن با هلشتاین. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد. دانشگاه گیلان.

گل‌محمدی ح. و ناجی ا. ۱۳۷۷. بررسی و شناخت عملکرد تودهٔ گاوهای آمیخته منطقهٔ گلپایگان در شرایط روستایی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی.

Bhikane A. V. and Kawitkar S. B. 2000. Handbook for Veterinary Clinician. Venkateh Books. Udgir, India.

Burvenich C., Paape M. J., Hill A. E., Guidry A. J., Miller R. H., Heyneman R., Kremer W. D. and Brand A. 1994. Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. The Veterinary Quarterly, 16: 45–50.

Fries R. and Ruvinsky A. 1999. The genetics of cattle Fries, R., Ruvinsky, A., eds. New YorkNY: CABI Publising.

Hansen P. J. 2004. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. Animal Reproduction Science, 82–83: 349–360.

Huang W., Nadeem A., Zhang B., Babar M., Soller M. and Khatib H. 2012. Characterization and comparison of the leukocyte transcriptomes of three cattle breeds. PLoS ONE, 7: 30244-30251.

Iran's Country Report on Farm Animal Genetic Resources. 2004. Animal Science Research Institute of Iran. Draft Iran's Country Report on Farm Animal Genetic Resources, Tehran, Iran.

Lasely J. F. 1987. Genetics of livestock improvement. Chapter 13. Pp. 246-363.

MacHugh D. E., Shriver M. D., Loftus R. T., Cunningham P. and Bradley D. G. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). Genetics, 146: 1071–1086.

Mohammadi A., Nassiry M., Mosafer J., Mohammadabadi M. and Sulimova G. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (*Bos indicus*). Russian Journal of Genetics, 45: 198-202.

Murphy P. M. and Tiffany H. L. 1991. Cloning of complementary DNA encoding a functional il-8 receptor. Science, 253: 1278–1280.

Nassiry M., Shahroodi F. E., Mosafer J., Mohammadi A., Manshad E., Ghazanfari S., Abadi M. M. and Sulimova G. 2005. Analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Iranian Holstein cattle. Russian Journal of Genetics, 41: 664-668.

Norouzy A., Nassiry M., Shahrody F. E., Javadmanesh A., Abadi M. M. and Sulimova G. 2005. Identification of bovine leucocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein and Brown Swiss AI bulls in Iran. Russian Journal of Genetics, 41: 1409-1413.

Paape M. J., Shafer-Weaver K., Capuco A. V.,Van Oostveldt K. and Burvenich C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. Advances in Experimental Medicine and Biology, 480: 259–277.

Pashmi M., Qanbari S., Ghorashi S., Sharifi A. and Simianer H. 2009. Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3. 2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. Journal of Animal Breeding and Genetics, 126: 296-303.

Peveri P., Walz A., Dewald B. and Baggiolini M. 1988. A novel neutrophil-activating factor produced by human polymorphonuclear leukocytes. Journal of Experimental Medicine, 181: 1547–1559.

Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29: 2002-2007.

Podolin P. L., Bolognese B. J., Foley J. J., Schmidt D. B., Buckley P. T., Widdowson K. L., Jin Q., White J. R., Lee J. M., Goodman R. B., Hagen T. R., Kajikawa O., Marshall L. A., Hay D. W. and Sarau H. M. 2002. A potent and selective nonpeptide antagonist of cxcr2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. Journal of Immunology, 169: 6435-6444.

Radostits O. M., Blood D. C., Gay C. C. and Hinchkliff K. W. 2000. Veterinary medicine. 9th ed.London: ELBS-Bailliere Tindal.

Roberge C., Normandeau E., Einum S., Guderley H. and Bernatchez L. 2008. Genetic consequences of interbreeding between farmed and wild Atlantic salmon: insights from the transcriptome. Molecular Ecology, 17: 314–324.

Suzuki S. Van Vleck D. 1994. Heritability and Repeatability for milk production traits of Japanese Holsteins from an animal model. Journal of Dairy Science, 77: 583-588.

The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. Elsik C. G., Tellam R. L. and Worley K. C. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. Science, 324: 522–528.

The Bovine HapMap Consortium. 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. Science, 324: 528–532.

Touchberry R. W. 1992. Crossbreeding effects in dairy cattle: the illinios experiment, 1949 to 1969. Journal of dairy science, 75: 640-667.

Utech K. B., Wharton R. H. and Kerr J. D. 1978. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. Australian Journal of Agricultural Research, 29: 885–895.

Vandesompele J., DePreter K., Pattyn F., Poppe B., VanRoy N., DePaepe A. and Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 3: 1-12.

Animal Production Research
Vol. 4, No. 1, 2015 (25-34)

University of Guilan

Study on IL8RB gene expression in crossbreeding program of Guilan Native cow

M. Moridi[1], S. H. Hosseini Moghaddam[2*], S. Z. Mirhosseini[3]

1. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: 27-9-2014 – Accepted: 2-3-2015)

Abstract

IL8RB gene is one of the chemokine receptors presented on neutrophil surfaces which are necessary for maximizing of neutrophils ability during infection. Different sequence and expression of IL8RB gene lead to different resistance to mastitis in cow populations. The aim of current study was to investigate expression changes of IL8RB gene resulted from crossbreeding of Guilan Native cows with Holstein cows. We collect 56 blood samples from 5 different cow populations in Guilan Native cattle breeding center. After RNA extraction and cDNA synthesis, real-time PCR reactions were performed in all samples with three repeats for each sample. We used GAPDH and RPLP0 as internal reference control genes. The maximum amount of IL8RB gene (0.74±0.77) average normalized expression was in Native cow populations and the minimum expression (0.12±0.22) was in 75 percent Holstein crossbred cow populations. Highest to lowest amount of IL8RB gene average normalized expression was in Native cow (0.74±0.77), 50 percent sire Native and dam Holstein crossbred cow (0.3±0.27), 50 percent sire Holstein and dam Native crossbred cow (0.26±0.3), Holstein cow (0.23±0.26), and 75 percent Holstein crossbred cow (0.12±0.22), respectively. With Consideration of highest gene expression in Native cow and decreasing in gene expression respect to increasing in blood contribution of Holstein cow which they are sensitive to mastitis, consequently changes in gene expression of IL8RB are related to resistance to mastitis. As this study showed the effect of crossbreeding on IL8RB gene expression changes, then it is necessary to consider the consequences of crossbreeding on native cattle breeding program.

Keywords: Crossbreeding, Gene expression, cDNA, IL8RB, Real-time PCR

*Corresponding author: hosseini@guilan.ac.ir