دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی بیماریهای ژنتیکی BLAD و DUMPS در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران

مرتضی مهدوی

خردادماه ۱۳۸۸

بیماری BLAD و DUMPS در گاو سرابی

مرتضی مهدوی

۱۳۸۸

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی بیماریهای ژنتیکی BLAD و DUMPS در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران

مرتضی مهدوی

استاد راهنما

دکتر محمد رضا نصیری

استاد مشاور

دکتر علی اصغر اسلمی نژاد

خردادماه ۸۸

این پایان نامه با عنوان « بررسی بیماریهای ژنتیکی BLAD و DUMPS در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران» توسط «مرتضی مهدوی» در تاریخ با نمره و درجه ارزشیابی در حضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

تاریخ دفاع نمره و درجه ارزشیابی

هیات داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	آقای دکتر محمدرضا نصیری	دانشیار	استاد راهنما	
۲	آقای دکتر علی اصغر اسلمی نژاد	استادیار	استاد مشاور	
۳	آقای دکتر مجتبی طهمورث پور	استادیار	استاد مدعو	
۴	آقای دکتر علیرضا هروی موسوی	استادیار	استاد مدعو	
۵	آقای دکتر جواد آرشامی	دانشیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه: بررسی بیماریهای ژنتیکی BLAD و DUMPS در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران

اینجانب مرتضی مهدوی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی، گرایش ژنتیک و اصلاح دام

دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر محمدرضا نصیری متعهد می شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

بررسی بیماریهای ژنتیکی DUMPS و BLAD در گاوهای بومی نژاد سرابی ایران

چکیده

بررسی و شناسایی بیماریهای ژنتیکی در جوامع انسانی و دامی از اهمیت ویژه ای برخوردار است و در این راستا استفاده از روش های نوین مولکولی در تشخیص ژن های مغلوب نهفته و اتوزومال در افراد هتروزیگوت ما را در جلوگیری از تشخیص ژن های مغلوب در اجتماع یاری می کند. چندین ژن مغلوب اتوزومال در نژاد های مختلف گاو شناسایی شده اند که باعث مرگ و میر گوساله های تازه متولد شده و یا جنین آنها می گردند. هدف از این تحقیق، بررسی و شناسایی حاملین بیمایهای ژنتیکی نقص در ژن تولید کننده آنزیم یوریدین منوفسفات سنتاز (DUMPS) و نقص در چسبندگی گلبولهای سفید (BLAD) در گاوهای بومی نژاد سرابی بود. بدین منظور تعداد ۱۶۰ راس گاو نر و ماده سرابی واقع در مرکز تحقیقات گاو سرابی (شهرستان سراب، استان آذربایجان شرقی) به میزان ۲ سی سی خونگیری صورت گرفت. استخراج DNA با روش بوم مبتنی بر گوانیدین تیوسیونات سیلیکاژل انجام شد. در این تحقیق واکنش PCR-RFLP برای شناسایی بیماریهای ژنتیکی DUMPS و BLAD بهینه شد. قطعات ۱۰۸ و۱۰۱ جفت بازی به ترتیب از ژن UMPs و CD18 با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و جفت پرایمر های اختصاصی طراحی شده برای هر یک از ژن ها تکثیر شدند. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز عمل هضم آنزیمی (RFLP) برای بدست آوردن الگوی هضمی مناسب به منظور تشخیص و شناسایی حاملین انجام شد. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز به ترتیب برای ژن UMPs با استفاده از آنزیم *Ava* I و برای ژن CD18 با استفاده از آنزیم *Taq* I هضم گردیدند و برای تایید نتایج حاصله از هضم آنزیمی*Taq* Iازآنزیم *Hae* III استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی الگوهای هضمی برای دو بیماری BLAD و DUMPS نشان داد که هیچ یک از دام های موجود در ایستگاه تحقیقاتی گاو سرابی حامل ژن های جهش یافته نبودند. این موضوع عدم استفاده از اسپرم های خارجی و اصیل بودن دام های این ایستگاه را تایید می نماید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که لزوم استفاده از تکنیک های مولکولی به منظور شناسایی ناقلین این بیماری ها چه در سطح گله و چه در سطح اسپرم های وارداتی و تولیدی مراکز اصلاحی داخل کشور امری غیر قابل انکار می باشند.

کلید واژه ها: ناهنجاری های ژنتیکی اتوزومال, PCR-RFLP، DUMPS، BLAD، گاو سرابی.

تقدیر و تشکر

در آغاز سپاسگزاری صمیمانه و ارادت خود را نسبت به استاد عزیز و بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد رضا نصیری ابراز می دارم که در طول دوران تحصیلات دانشگاهیم از دانش و معلومات ایشان بهره های بسیار بردم.

از استاد مشاور محترم جناب دکتر علی اصغر اسلمی نژاد که زحمات بی شائبه ای برای انجام این پایان نامه متقبل شده و در همه مراحل چراغی بر راه این جانب بودند سپاسگذاری می کنم.

در پایان از دوستان عزیزم مهندس شاهرخ قوتی و مهندس بلال صادقی که تلاش بی مثالی در یاری بنده برای اتمام این کار داشتند و سایر عزیزانی که هر یک در پیدایش این رساله مرا یاری نموده اند صمیمانه سپاسگذاری می نمایم.

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه

۱-۱- کلیات ---------- ۱

فصل دوم : بررسی منابع

۲-۱- بیماریهای ژنتیکی ---------- ۵
۲-۲- منشا جهش ها ---------- ۵
۲-۳- تقسیم بندی جهش ها بر اثر میزان تاثیر آنها روی ماده ژنتیکی ---------- ۵
۲-۳-۱- جهش ژنومی ---------- ۶
۲-۳-۲- جهش کروموزومی ---------- ۶
۲-۳-۳- جهش ژنی ---------- ۶
۲-۳-۳-۱- جهش های همراه با از دست رفتن عملکرد ---------- ۷
۲-۳-۳-۲- جهش های همراه با افزایش عملکرد ---------- ۷
۲-۳-۳-۳- جهش های همراه با خاصیت جدید ---------- ۸
۲-۴- تقسیم بندی جهش ها بر اساس اثر آنها بر پرو تئین سازی ---------- ۸
۲-۴-۱- جهش مترادف ---------- ۹
۲-۴-۲- جهش در معنای لغت رمز ---------- ۹
۲-۴-۳- جهش بی معنائی (ختم) ---------- ۱۰
۲-۵- طبقه بندی بیماری های ژنتیکی بر مبنای اثر ترکیبی عوامل ژنتیکی و محیط ---------- ۱۰
۲-۵-۱- اختلالات تک ژنی ---------- ۱۰
۲-۵-۲- اختلالات کروموزمی ---------- ۱۱
۲-۵-۳- اختلالات چند عاملی ---------- ۱۱

۲-۶- بیماریهای ژنتیکی شایع در دامهای اهلی ---------- ۱۲
۲-۶-۱- بیماری ارثی چسبندگی انگشتان (Syndactyly) ---------- ۱۲
۲-۶-۲- بیماری نقص در ساخت آنزیم آرژنینو سوکسینات سنتتاز (Citrullinemia) ---------- ۱۲
۲-۶-۳- بیماری ژنتیکی کوتولگی (Bull dog or Mule foot) ---------- ۱۳
۲-۶-۴- بیماری ژنتیکی CVM (Complex Vertebral Malformation) ---------- ۱۳
۲-۶-۵- سندرم فری مارتین (Freemartin Syndrome)---------- ۱۶
۲-۶-۶- بیماری ژنتیکی انباشتگی عمومی گلیکوژن (POMPE'S disease)---------- ۱۷
۲-۶-۷- بیماری ژنتیکی Batten (Neuronal Ceroid lipofuscinoses) ---------- ۱۸
۲-۶-۸- بیماری ژنتیکی بره عنکبوتی(SLS) ---------- ۱۸
۲-۶-۹- بیماری بی موئی بدن (Hairless or Hypotrichosis)---------- ۱۹
۲-۶-۱۰- بیماری شربت افرا (Maple Syrup Urine Disease) ---------- ۲۰
۲-۶-۱۱- تحلیل ماهیچه های پشتی (SMA)---------- ۲۰
۲-۶-۱۲- نقص در فاکتور ۸ (Factor XI deficiency) ---------- ۲۱
۲-۶-۱۳-بیماری طاسی و کم خونی (Alopecia Anemia)---------- ۲۲
۲-۶-۱۴- دیگر بیماری های ژنتیکی---------- ۲۳
۲-۶-۱۴-۱- Tibial Hemimelia ---------- ۲۳
۲-۶-۱۴-۲-Pulmonary Hypoplasia with Anasarca---------- ۲۳
۲-۶-۱۴-۳-Idiopathic Epilepsy ---------- ۲۳
۲-۶-۱۴-۴-Hypotrichosis ---------- ۲۳
۲-۶-۱۴-۵-Arthrogryposis Multiplex ---------- ۲۴
۲-۷- بیماری‌های ژنتیکی مورد تحقیق ---------- ۲۴
۲-۷-۱- بیماری نقص چسبندگی گلبولهای سفید (BLAD) ---------- ۲۴
۲-۷-۱-۱- علت بیوشیمیایی بیماری---------- ۲۴
۲-۷-۱-۲- علائم کلینیکی بیماری---------- ۲۵

۲-۷-۱-۳- بررسی سوابق مطالعاتی صورت گرفته تا به امروز ---------- ۲۵
۲-۷-۲- بیماری ژنتیکی نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز (DUMPS)---------- ۳۰
۲-۷-۲-۱- علت بیوشیمیایی بیماری ---------- ۳۰
۲-۷-۲-۲- علائم کلینیکی بیماری---------- ۳۰
۲-۷-۲-۳- بررسی تاریخچه بیماری DUMPS ---------- ۳۲
۲-۷-۲-۴- بررسی سوابق مطالعاتی صورت گرفته تا به امروز ---------- ۳۳
۲-۸- روشهای متداول تشخیص بیماریهای ژنتیکی بر مبنای PCR ---------- ۳۴
۲-۸-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) ---------- ۳۴
۲-۸-۲-PCR-RFLP ---------- ۳۵
۲-۸-۳- تفاوت فرم فضائی رشته‌های منفرد(SSCP) ---------- ۳۶
۲-۸-۴- سیستم تکثیر متزلزل جهش ها (ARMS) ---------- ۳۶
۲-۸-۵- ریزآرایه (Microarray) ---------- ۳۸

فصل سوم : مواد وروش ها

۳-۱- خونگیری جهت استخراج DNA ---------- ۳۹
۳-۲- استخراج DNA به روش گوانیدین تیوسیانات – سیلیکاژل ---------- ۳۹
۳-۲-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA ---------- ۴۰
۳-۲-۱-۱- تایید صحت استخراج DNA ---------- ۴۰
۳-۲-۱-۲-تعیین کمیت DNA استخراجی ---------- ۴۰
۳-۲-۱-۳- تعیین کیفیت DNA استخراج شده ---------- ۴۱
۳-۳- تکثیر بخشی از ژن UMPS به کمک واکنشPCR ---------- ۴۱
۳-۳-۱- شرح جزئیات PCR ---------- ۴۱
۳-۳-۲- توالی پرایمر های بکار رفته در واکنش PCR ---------- ۴۲
۳-۳-۳- برنامه حرارتی برای انجام واکنشPCR ---------- ۴۲

۳-۳-۴- توالی قطعه تکثیر شده در واکنش PCR ---------- ۴۲
۳-۳-۵- الکتروفورز محصولات PCR ژن UMPS---------- ۴۳
۳-۴- مراحل انجام هضم آنزیمی قطعه UMPS ---------- ۴۳
۳-۴-۱- بررسی محصولات هضمی آنزیم با روش الکتروفورز و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره ------ ۴۵
۳-۴-۱-۱- مراحل رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره ---------- ۴۵
۳-۴-۲- بررسی عملکرد آنزیم *Ava*I---------- ۴۵
۳-۵- تکثیر بخشی از ژن CD18 به کمک واکنش PCR---------- ۴۶
۳-۵-۱- شرح جزئیات PCR ---------- ۴۶
۳-۵-۲- توالی پرایمر های به کار رفته در واکنش PCR---------- ۴۷
۳-۵-۳- برنامه حرارتی واکنش PCR ---------- ۴۷
۳-۵-۴- توالی قطعه تکثیر شده ژن CD18 در واکنش PCR ---------- ۴۸
۳-۵-۵- بررسی محصولات PCR ژن CD18 از طریق الکتروفورز ---------- ۴۸
۳-۵-۶- روش RFLP برای شناسایی ناقلین BLAD---------- ۴۹
۳-۵-۷- بررسی محصولات هضمی آنزیم با روش الکتروفورز---------- ۵۰

فصل چهارم : نتایج و بحث

۴-۱- استخراج DNA ---------- ۵۱
۴-۱-۱-کیفیت استخراج DNA ---------- ۵۱
۴-۱-۲-کمیت DNA استخراج شده ---------- ۵۲
۴-۱-۳- تعیین خلوص DNA استخراجی ---------- ۵۲
۴-۲- تکثیر بخشی از ژن UMPS به کمک واکنش PCR ---------- ۵۳
۴-۲-۱- بهینه سازی برنامه PCR ---------- ۵۳
۴-۲-۲- نتایج حاصل از تکثیر بخشی از ژن UMPS ---------- ۵۴

۴-۳- بررسی الگوهای هضمی حاصل از آنزیم *Ava* I بر روی قطعه تکثیر شدهٔ از ژنUMPS ------ ۵۴
۴-۴- بررسی عملکرد آنزیم *Ava*I ---------- ۵۶
۴-۵- تکثیر بخشی از ژن CD18 به کمک واکنش PCR---------- ۵۸
۴-۵-۱- بهینه سازی برنامه PCR ---------- ۵۸
۴-۵-۲- نتایج حاصل از تکثیر بخشی از ژن CD18 ---------- ۵۹
۴-۶- بررسی الگوی باندی حاصل از RFLP برای شناسایی ناقلین BLAD ---------- ۶۰
نتیجه گیری کلی ---------- ۶۳
پیشنهادات ---------- ۶۵

پیوست ها

پیوست ۱: اسامی لاتین اشخاص و فارسی آنها ---------- ۶۹
پیوست ۲: استخراج DNA از خون تام با استفاده از کیت DIAtom DNA Prep ---------- ۷۵
پیوست ۳: مراحل الکتروفورز بر روی ژل آگارز ---------- ۷۹
پیوست ۴: انجام PCR با استفاده از کیت تر ---------- ۸۱
پیوست ۵: آماده‌سازی ژل پلی‌آکریل‌آمید ---------- ۸۳
پیوست ۶: پروتوکل خالص سازی DNA ---------- ۸۵

فهرست منابع ---------- ۸۷
چکیده لاتین ---------- ۱۰۲
عنوان لاتین ---------- ۱۰۴

فهرست نگاره ها

نگاره ۲-۱ : جهش (G→T) مربوط به ژن SLC35A3 در موقعیت ۵۵۹ اگزون ۴ در کروموزوم شماره سه گاو ----------۱۴

نگاره ۲-۲: فراوانی گاوهای نر ناقل بیماری BLAD در طول سالهای ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۶ در کشور لهستان -------۳۰

نگاره ۲-۳ : جهش (C→T) مربوط به ژن UMPS (اوریدین ۵ منوفسفات سنتتاز) در کدون ۴۰۵ اگزون ۵ در کروموزوم شماره یک گاو ----------۳۱

نگاره ۳-۱ : توالی پرایمرها و توالی قطعه ۱۰۸ جفت بازی تکثیر شده از ژن UMPS----------۴۳

نگاره ۳-۲ : تصویر شماتیک سایت برشی آنزیم *Ava* I روی ژنFGFR3 ----------۴۶

نگاره ۳-۳: توالی قطعه تکثیر شده از ژن CD18 ----------۴۸

نگاره ۳-۴: نواحی برش آنزیمهای *Taq*I و *Hae*III در قطعه تکثیر شده (۱۰۱ جفت باز) از ژن CD18 و اندازه قطعات حاصل بعد از هضم آنزیمی جهت تشخیص سالمین و حاملین که به صورت شماتیک نشان داده شده -----۴۹

نگاره ۴-۱ : الکتروفورز DNA استخراج شده از خون روی ژل آگارز ۱٪ ----------۵۱

نگاره ۴-۲ : تعیین غلظت DNA استخراجی به کمک DNA فاژ لاندا روی ژل آگارز ۱٪ مبین غلظت ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرمی DNA استخراجی ما می باشد ----------۵۲

نگاره ۴-۳ : الکتروفورز محصولات PCR بطول ۱۰۸ جفت باز حاصل از تکثیر بخشی از ژنUMPS روی ژل آگارز۱,۵٪ ----------۵۴

نگاره ۴-۴: تصویر شماتیک سایت برشی آنزیم *Ava* I روی ژنUMPS ----------۵۵

نگاره ۴-۵ : الکتروفورز ژل آگارز ۴٪ محصولات هضمی حاصل از آنزیم *Ava* I نشان دهنده الگوی باندی ژنوتیپ سالم می باشد ----------۵۵

نگاره ۴-۶ : الکتروفورز محصولات هضمی حاصل از آنزیم *Ava* I بررروی ژن FGFR3 (سمت چپ) و محصولات PCR ژن FGFR3 (سمت راست) بر روی ژل آگارز ۲٪ ----------۵۷

نگاره ۴-۷ الکتروفورز محصولات هضمی حاصل از آنزیم *Ava* I بررروی ژن Leptin (سمت راست) و محصولات PCR ژن Leptin (سمت چپ) بر روی ژل آگارز ۲٪----------۵۷

نگاره ۴-۸ : الکتروفورز محصولات PCR حاصل از ژن CD18 به طول ۱۰۱ جفت باز بر روی آگارز ۱,۵٪ ----۵۹

نگاره ۴-۹: الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با آنزیم *TaqI* بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ ----------۶۱

نگاره ۴-۱۰: الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی با آنزیم *Hae3* بر روی ژل اکریل آمید ۸٪ ----------۶۱

فهرست جداول

جدول ۱-۱: تعداد و نوع توارث نقص های تک ژنی در انسان ها و گاوها ----------۱

جدول۳-۱: ترکیب مواد مورد استفاده در واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه ای از ژن UMPS ----------۴۱

جدول ۳-۲: برنامه حرارتی برای انجام واکنش PCR برای تکثیر بخشی از ژن UMPS ----------۴۲

جدول ۳-۳: ترکیب مواد مورد استفاده جهت هضم آنزیمی قطعه ۱۰۸ جفت بازی ژن UMPS ----------۴۴

جدول۳-۴: ترکیب مواد مورد استفاده در واکنش PCR به منظور تکثیر قطعه ای از ژن CD18 ----------۴۶

جدول ۳-۵: برنامه حرارتی برای انجام واکنش PCR تکثیر ژن CD18----------۴۷

جدول ۳-۶: ترکیب مواد مورد استفاده جهت هضم آنزیمی قطعه ۱۰۱ جفت بازی ژن CD18 ----------۴۹

جدول ۴-۱: نسبت ۲۶۰/۲۸۰ حاصل از طیف سنجیDNA مبین خلوص DNA استخراجی می باشد ------۵۳

جدول ۴-۲: ترکیب و غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش PCR تکثیر ژنUMPS بعد از بهینه سازی---۵۳

جدول ۴-۳: برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش PCR تکثیر ژنUMPS بعد از بهینه سازی ----------۵۴

جدول ۴-۴: ترکیب و غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش PCR تکثیر ژن CD18 بعد از بهینه سازی ---۵۸

جدول ۴-۵: برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش PCR تکثیر ژن CD18 بعد از بهینه سازی ----------۵۸

جدول ۴-۶:شمای قطعات تولیدی بعد از هضم آنزیمی با آنزیم های *Taq*I و *Hae*III برای دامهای هموزیگوس غالب، هتروزیگوس (حاملین) و هموزیگوس مغلوب در گاو شیری ----------۶۰

فهرست علائم و اختصارات

اختصار	معادل انگلیسی	معادل فارسی
BLAD	Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency	نقص در چسبندگی گلبولهای سفید
DUMPS	Dificiency Of Uridine Monophate Sythase	نقص آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتتاز
CVM	Complex Vertebral Malformation	ناهنجاری شکلی ستون فقرات
SLS	Spider Lamb Syndrome	سندرم بره عنکبوتی
NELs	Neuronal Ceroid Lipofuscinoses	-------
GSD	Glycogen Storage Disease	انباشتگی عمومی گلیکوژن
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism	پلی مورفیسم قطعات حاصل از برش آنزیمی
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism	تفاوت فرم فضائی رشته‌های منفرد
ARMS	Amplification Refractory Mutation System	سیستم تکثیر متزلزل جهش ها
HF	Holestein Frisian	هلشتاین ـ فرزین
ASS	Argino Succinate Synthetas	آرژنینو سوکسینات سنتتاز
LAF	Leukocyte Adhesion Factor	فاکتور چسبندگی گلبولهای سفید
BSA	Bovine Albumen Serum	آلبومن سرم گاوی
MSUD	Maple Syrup Urine Disease	بیماری شربت افرا
SMA	Spinal Muscular Atrophy	تحلیل ماهیچه های پشتی
LRP4	Low Density Lipoprotein Receptor –Related Protein	پروتئین های مرتبط با گیرنده لیپوپروتئین با دانسیته کم

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

بررسی و تشخیص بیماریهای ژنتیکی در جوامع انسانی و حیوانی از اهمیت خاصی برخوردار است. لذا یافتن روشهای عالی تشخیصی در این راه کمک شایانی به شناسایی حاملین که به صورت هتروزیگوس توزیع شده اند، می نماید. با مشاهده نقصهای ژنتیکی در انسان، موارد زیادی از نقصهای ژنتیکی در گاوها نیز مشاهده گردید که اکثر آنها به صورت مغلوب به ارث می رسیدند.(جدول ۱-۱،هلی و همکاران, ۱۹۹۵)

جدول ۱-۱: تعداد و نوع توارث نقص های تک ژنی در انسان ها و گاوها

نوع نقص	انسان [الف]	گاو [ب]
غالب	۱۸۶۴ (٪۷۰)	۵۳ (٪۱۱)
مغلوب	۶۳۱(٪۲۴)	۱۸۵ (٪۸۷)
وابسته به جنس	۱۶۱ (٪۶)	۴ (٪۲)
کل	۲۶۵۶	۲۴۲

[الف] بر گرفته شده از مک کویسک، ۱۹۹۰

[ب] بر گرفته شده از هاستو، ۱۹۹۳

چندین ژن مغلوب اتوزومال در نژادهای مختلف گاو شناخته شده است که باعث مرگ و میر در گوساله های تازه متولد شده می شوند. تشخیص این نقصها در سطوح بیوشیمیایی یا مولکولی در حیوانات هتروزیگوس برای جلوگیری از شیوع این بیماریها بسیار ضروری است. بیماری های ژنتیکی آلفا مانوزیدوسیس در گاوهای آنگوس ، بیماری های ژنتیکی انباشت عمومی گلیکوژن در برهمن و شورت هورن (ریچمن و همکاران, ۱۹۸۷) و سندرم فری (مک نیل و همکاران, ۲۰۰۶)، بیماری ژنتیکی سیترولنیمیا یا بیماری نقص در ساخت آنزیم آرژینینو سوکسینات سنتتاز (هلی و همکاران, ۱۹۹۰ و گروپ و همکاران, ۱۹۹۶)، نقص آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز (فسوس و همکاران, ۱۹۹۹ و کنوته و اسمیت, ۱۹۹۰) و نقص در چسبندگی گلبول های سفید در هلشتاین فرزین (ویانا و همکاران, ۱۹۹۸ ، نوروزی و همکاران,

۲۰۰۵ و نصیری و همکاران, ۲۰۰۵) مشاهده شده است. همچنین بیماری ناهنجاری شکلی ستون فقرات در نژاد هلشتاین (کانا و همکاران, ۲۰۰۵ ، جولی و تامپسون, ۱۹۷۸ ، فرای و رووینسکی, ۱۹۹۹و آگیرهولم و همکاران, ۲۰۰۱) و بیماری ارثی چسبندگی انگشت در گاوهای نژاد هلشتاین و آنگوس (دروگ مولر و همکاران, ۲۰۰۷) و بیماری ژنتیکی کوتولگی (کوتاهی پاها) (کاوانا و همکاران, ۲۰۰۷) در گاو وجود دارند و از جمله بیماری های ژنتیکی در گوسفند می توان به بیماری بره عنکبوتی (ناکانو و همکاران, ۱۹۹۴ و دروگ مولر و همکاران, ۲۰۰۵) و بیماری بی موئی (فینوچییارو و همکاران, ۲۰۰۳) و بیماری عصبی Batten(فروگیر و همکاران, ۲۰۰۸) اشاره کرد که ثابت شده است این بیماریها باعث ضرر و زیان اقتصادی بزرگی به گله ها می شود.

اکثر نقص های ژنتیکی به صورت مغلوب به ارث می رسند، بنابراین تشخیص دقیق حیواناتی که از نظر ژن عامل بیماری، هتروزیگوت هستند بسیار مشکل است، زیرا این حیوانات اغلب بطور طبیعی به زندگی خود ادامه می دهند. این حیوانات بصورت بالفعل بیمار نیستند ولی حامل ژن بیماریزا می باشند، بنابراین می توانند این ژن را با تولید مثل در جمعیت پخش کنند و باعث افزایش فراوانی ژن بیماری گردند. از مهمترین عوامل پخش ژنهای بیماریزا اسپرمها و گاوهای نر مورد استفاده در باروری هستند که می توان با کنترل ژنتیکی از ورود اسپرمها و گاوهای نر حامل بیماری به چرخه تولید مثلی گاوداری ممانعت به عمل آورد.

با توجه به اینکه با استفاده از تکنیک تلقیح مصنوعی، ژنهای یک دام نر به سرعت در بین یک جامعه پخش می شوند حصول اطمینان از عدم وجود موتاسیون های عامل بیماریهای ژنتیکی در گاو نر مورد استفاده در تلقیح دامهای ماده کمک بزرگی به حفظ خزانه ژنی در جامعه گاوهای بومی می کند.

وجود روابط غالب و مغلوبی بین این ژنها شناخت دامهای هتروزیگوس را از روی فنوتیپ آنها غیر ممکن می سازد و در بعضی بیماریهای نقص آنزیمی با منشا ژنتیکی در دامهای حامل فعالیت آنزیم خاص تا ۵۰٪ کاهش می یابد که اندازه گیری آن با محدودیتهایی روبروست (هلی و همکاران, ۱۹۹۵). لذا در مقایسه با این محدودیتها، روش ارزان، قابل اطمینان و موثر استفاده از ژنتیک ملکولی و تکنولوژی PCR در تشخیص حاملین (هتروزیگوس) که از نظر فنوتیپی سالم هستند از اهمیت خاصی برخوردار است. امروزه تستهای تشخیصی DNA در برنامه کنترل بیماریهای ژنتیکی و کاهش شیوع بیمارهای ژنتیکی بسیار مهم می باشند.در همین راستا در مراکز اصلاح نژادی و تهیه و توزیع اسپرم نیز این گونه تستهای ژنتیکی به منظور

جلوگیری از توزیع آللهای مغلوب بیماریزا در جمعیت گاوها صورت می گیرد و نتایج ارزیابی های ژنتیکی نیز امروزه در کاتالوگهای اسپرم آورده می شود بدین ترتیب امروزه آزمونهای تشخیصی DNA در برنامه کنترل بیماریهای ژنتیکی و کاهش شیوع بیمارهای ژنتیکی از جایگاه ویژه ای برخوردار می باشند (زیباک و همکاران, ۱۹۹۸).

در این پایان نامه سعی شده تا دو بیماری BLAD و DUMPS در جمعیت گاوهای بومی نژاد سرابی مورد مطالعه قرار گیرد. بیماری نقص چسبندگی گلبولهای سفید یا BLAD یکی از بیماریهای ژنتیکی است که فراوانی آن به دلایل خاص و بعضی ذهنیتهای غلط در مورد وجود پیوستگی آن با لوکاس های تولیدی، بیش از دیگر بیماریهای ارثی توزیع شده،این بیماری یک بیماری ژنتیکی مادرزادی است که تا کنون تنها در نژاد هلشتاین گزارش شده است، دامهای حامل، بیماری را نشان نمی دهند. علائم کلینیکی در گوساله های بیمار هموزیگوت عبارت است از: کاهش مقاومت طبیعی اعضاء مختلف نسبت به عفونتهای باکتریایی و قارچی، کاهش رشد، ریختن پشم و دندانها، التهاب بافتهای اطراف دهان، التهاب روده، افزایش مداوم نوترونها، طولانی شدن مدت التیام زخمها، پاسخ ضعیف به عفونتهای قارچی و باکتریایی پوست، ناتوانی برای ایجاد یک پاسخ التهابی طبیعی علیه پاتوژنها در بافتها، عفونتهای مکرر و ... تاکنون درمانی برای این بیماری گزارش نشده و مبتلایان بسته به درجه و جایگاه عفونت اغلب در ماههای اول زندگی تلف می شوند(شوستر و همکاران, ب ۱۹۹۲، ویانا و همکاران, ۱۹۹۸، وانر و همکاران, ۱۹۹۹، پولی و همکاران, ۱۹۹۶، پتل و همکاران, ۲۰۰۷، ناگاتا و همکاران, ۸۳،۱۹۹۷ ، نوروزی و همکاران, ۲۰۰۵، کرلی, ۱۹۹۷و کرلی و همکاران, ۱۹۹۰). لازم به ذکر است: تاکنون منابع مختلف حظور تنها یک آلل را به عنوان مسبب بیماری در گاوهای هلشتاین تأیید نموده است. شوستر (۱۹۹۲ب) اولین سری اطلاعات در مورد شیوع بیماری بلد را ارائه نمود، در گزارش شوستر قید شده که ۱۴,۱٪ گاوهای نر مورد استفاده در تلقیح مصنوعی و ۱۷,۱٪ از ۱۰۰ گاو برتر بر طبق شاخص عملکرد کل و ۵,۸٪ از ماده گاوهای هلشتاین فریزین ناقل بیماری BLAD بوده اند، این آمار بسیار وحشتناک بوده و نشانگر امکان توسعه وسیع این بیماری در سطح گله های آمریکا می باشد. بیشترین میزان شیوع BLAD درسال ۱۹۸۷–۱۹۸۸در آمریکا گزارش شده است (پائول، ۱۹۹۶) در سالهای ۱۹۸۷ به میزان ۱۶,۷٪ و در سال ۱۹۸۸ معادل ۲۴,۲٪.

امروزه در کاتالوگهای جدید اسپرم علاوه بر ثبت اطلاعات مربوط به خصوصیات تیپ و تولید، سخت زایی، و ...، نتایج ارزیابی حظور نقایص ژنتیکی نیز ثبت می شوند. بیماری ژنتیکی BLAD هم در کاتالوگهای اسپرم با کد های BL(BLAD Carrier) و TL(Test Free of BLAD carrier) نشان داده شده است.

بیماری نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز (DUMPS) نقصی ژنتیکی در گاوهای هلشتاین می‌باشد که به صورت آتوزوم نهفته به ارث می‌رسد. از لحاظ فنوتیپی هیچ تفاوتی از لحاظ وزن تولید، اندازه بدن، رشد بین فرد ناقل این عارضه با فرد سالم وجود ندارد(شانک و همکاران, ۱۹۹۲، شانک و همکاران, ۱۹۸۷، روبینسون و همکاران, ۱۹۸۳، کوکت و همکاران, ۱۹۹۹و سیتک و همکاران, ۲۰۰۶) و تنها آزمون PCR متمایزکننده ناقلین از گاوهای سالم می‌باشد، گوساله‌های مبتلا به DUMPS دارای مرگ زود هنگام حدوداً در روز چهلم بارداری می‌باشند و به صورت نارس و مرده متولد می‌شوند (شانک و همکاران, ۱۹۸۹، شانک, ۱۹۹۰و آگیرهولم و همکاران, ۱۹۹۷). اگر گاو نر سالم با ماده‌های ناقل در دومین شیردهی یا شیردهی‌های بعدی تلاقی یابند، فاصله گوساله‌زائی ۳۷ روز طولانی‌تر از گاوهای ماده سالم می‌باشد. البته این عارضه را نمی‌توان عهده‌دار و مسئول تمام مسائل و مشکلات مربوط به تولیدمثل دانست اما بی‌شک یکی از اصلی‌ترین علت‌های اختلال تولید مثلی محسوب می‌شود به طوری که گاوهای حامل، به میزان بالائی احتیاج به تلقیح مکرر دارند (کون و شانک, ۱۹۹۴و فرای و روویسنسکی, ۱۹۹۹). این نقص اولین بار در سال ۱۹۸۵ کشف و در آفریقای جنوبی در گله‌های تحت پوشش تلقیح مصنوعی مشاهده گردید که هنوز هم می‌توان در این گله، نتایج حاوی این نقص را مشاهده کرد. این عارضه مختص گاوهای هلشتاین می‌باشد و در نژادهای دیگر مشاهده آن نادر به نظر می‌رسد.

این پژوهش با اهداف زیر طراحی شده است:

۱) بهینه کردن روش PCR-RFLP در جهت تشخیص ناقلین بیماری DUMPS و BLAD.

۲) بررسی فراوانی آللهای بیماریهای ژنتیکی BLAD و DUMPS در گله تحقیقاتی گاو سرابی.

۳) شناسایی ناقلین بیماری و گزارش آن به ایستگاه های اصلاح نژاد، به منظور حذف دام های ناقل و پیشگیری از گسترش بیماری.