

مطالعه بیماری ژنتیکی پیچیدگی ستون فقرات (CVM) و نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات

سنتاز (DUMPS) در گاوهای سرابی با تکنیک PCR-RFLP و PCR-SSCP

محمد رضا نصیری^{1,2}، شاهرخ قوتی¹، مجتبی طهمورث پور^{1,2}، محمد دوستی^{1*}، مرتضی مهدوی¹، بلال صادقی¹ و محمد رضا آرمین³

¹ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فرودوسی مشهد

² پژوهشکده بیوتکنولوژی و فناوری زیستی دانشگاه فرودوسی مشهد

³ گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فرودوسی مشهد

چکیده

بررسی و تشخیص بیماری های ژنتیکی در جوامع انسانی و حیوانی از اهمیت خاصی برخوردار است. خون گیری از 162 گاو سرابی ایستگاه تحقیقاتی سراب (استان آذربایجان شرقی) انجام شد. استخراج DNA از نمونه ها به روش گوانیدین تیو سینات-سیلیکاژل صورت گرفت. هدف از این مطالعه، شناسایی حاملین بیماری پیچیدگی ستون فقرات (CVM) و نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز (DUMPS) در گاوهای بومی سرابی ایران بود. واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر قطعات 177 و 108 جفت بازی از اگزون 4 ژن SLC35A3 و اگزون 5 ژن UMPs با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی انجام شد. محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن SLC35A3 به روش SSCP برای بررسی تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد روی ژل اکریل آمید الکتروفورز شدند. عمل هضم آنزیمی (RFLP) با استفاده از آنزیم *AvaI* برای به دست آوردن الگوی هضمی مناسب به منظور تشخیص و شناسایی حاملین بیماری DUMPS روی محصولات واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن UMPs انجام شد. نتایج این بررسی نشان داد که جهش (G→T) در موقعیت 559 اگزون 4 ژن SLC35A3 و همچنین جهش (C→T) در موقعیت 405 اگزون 5 ژن UMPs در گاوهای سرابی وجود نداشتند و بنابراین هیچ دام ناقلی مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: بیماری ژنتیکی اتوزومال، پیچیدگی ستون فقرات، مارکرمولکولی، گاو سرابی، CVM، DUMPS

PCR-RFLP، PCR-SSCP

مقدمه

شد. پیچیدگی ستون فقرات یک بیماری مادرزادی کشنده در گاوهای هلشتاین است و به صورت اتوزوم نهفته بروز می‌کند. این بیماری عامل سقط، مرگ و میر جنین و زایمان گوساله به صورت مرده و زودتر از موثد می‌باشد (Agerholm et al., 2001, Rusc et al., 2007). پس از مدت کوتاهی ظهور (CVM) در آمریکا، انگلستان، هلند و ژاپن نیز گزارش شد (Duncan et al., 2001, Nagahata et al., 2002). جهش G→T در موقعیت 559 اگزون 4 ژن SLC35A3² روی کروموزوم شماره 3 عامل بیماری شناخته شده است.

ژن SLC35A3 مسئول عملکرد UDP-N-acetylglucosamine transporter می‌باشد که انتقال دهنده قندهای نوکلئوتیدی از سیتوزول به درون دستگاه گلژی می‌باشد (Ishida & Kawakita, 2004, Ishida et al., 2005). در این موضع قندهای نوکلئوتیدی به وسیله گلیکوزیل ترانسفرازها برای سنتز زنجیره قندی در گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها و پلی‌کربوهیدرات‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که سرانجام باعث رشد و توسعه بخش محوری و

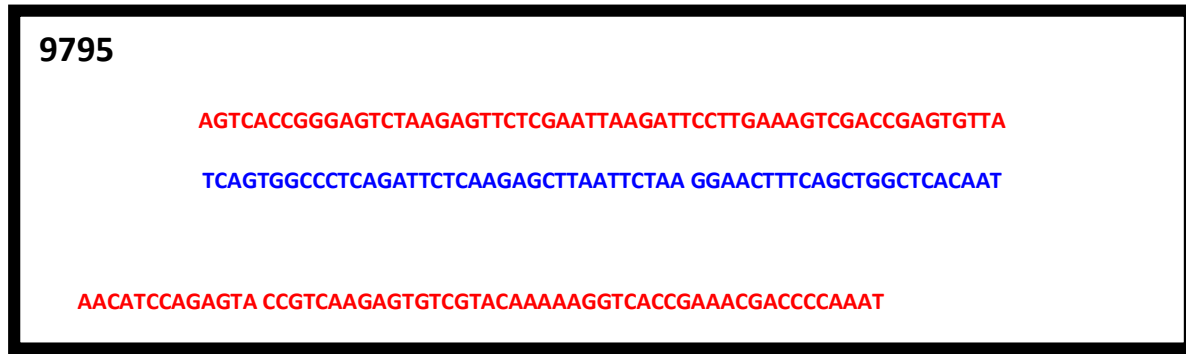
بی شک شناسایی، کنترل، حذف آلل‌های مغلوب نهفته اتوزومال در افراد هتروزیگوت و جلوگیری از انتشار آنها در گله و بهنژادی و سودآوری گله‌ها از مهمترین اهداف اصلاحی هر کشوری می‌باشد (Herzog, 1992). بنابراین، یافتن روش‌های دقیق تشخیصی در این راه، کمک شایانی به شناسایی، حذف ناقلین این بیماری‌ها و حفظ ذخایر ژنتیکی مطلوب می‌نماید. بیشتر نقص‌های ژنتیکی به صورت مغلوب به ارث می‌رسند. بنابراین، تشخیص دقیق حیواناتی که از نظر ژن عامل بیماری، هتروزیگوت هستند بسیار مشکل است، زیرا این حیوانات اغلب به طور طبیعی به زندگی خود ادامه می‌دهند. بنابراین، می‌توانند این ژن را با تولید مثل، در جمعیت پخش کنند و باعث افزایش فراوانی آلل مغلوب گردند (Herzog, 1992).

تشخیص مولکولی ناهنجاری ژنتیکی پیچیدگی ستون فقرات (CVM)¹، نخستین بار توسط Agerholm و همکاران (2000) در جمعیت گاوهای هلشتاین دانمارک تشخیص و گزارش

² Solute Carrier family 35, member A3

¹ Complex Vertebral Malformation

مرکزی اسکلت بدن می‌شود. جهش در موقعیت
559 ژن SLC35A3 سبب می‌شود که بازگوانین
تبدیل به تیمین شود (شکل 1).



شکل 1- جهش (G→T) مربوط به ژن SLC35A3 در موقعیت 559 اگزون 4 در کروموزوم شماره 3 گاو و در نتیجه اسید آمینه والین تبدیل به فنیل آلانین شود (Kanae et al., 2005). این جایگزینی باعث اختلال در عملکرد ژن SLC35A3 و سرانجام نقص در عمل UDP-N-acetylglucosamine transporter می‌شود (Muraoka et al., 2001, Thomsen et al., 2000).

Figure 1- G®T mutation in the SLC35A3 gene at position 559 in exon 4 of chromosome 3 cows and thus amino acid valine is converted to Phenylalanine (Kanae et al., 2005). The replacement in the SLC35A3 gene is cause dysfunction and finally failure in practice UDP-N-acetylglucosamine transporter (Muraoka et al., 2001; Thomsen et al., 2000).

بیماری نقص در آنزیم اوریدین
مونوفسفات سنتاز (DUMPS)، به صورت اتوزوم
نهفته است که اولین بار در سال 1985 در آفریقای
جنوبی در گله‌های تحت پوشش تلقیح مصنوعی
مشاهده گردید. این عارضه مختص گاوهای
هلشتاین می‌باشد و در نژادهای دیگر مشاهده آن
نادر به نظر می‌رسد. در اواخر سال 1991، 3461
نمونه از گاو هلشتاین آمریکایی مورد بررسی قرار
گرفتند که از این تعداد 307 گاو نر و 287 گاو
ماده، به عنوان ناقل شناسایی شدند. در این مدت
در اروپا نیز 1226 حیوان مورد آزمون قرار گرفتند
که 169 گاو نر و 245 گاو ماده ناقل این بیماری

برای تشخیص و شناسایی بیماری‌های یاد شده در گاوهای حامل بود.

مواد و روش‌ها

خونگیری از تعداد 162 راس گاو سرابی (28 راس نر و 134 راس ماده) ایستگاه تحقیقاتی سراب انجام شد. استخراج DNA از 100 میکرو لیتر نمونه خون، به روش گوانیدین تیو سینات - سیلیکاژل با کیت دیاتوم محصول شرکت Isogene (مسکو) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودروپ (Thermo Wilmington, USA) به روش طیف سنجی¹ تعیین شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن SLC35A3 و جفت آغازگر اختصاصی ژن UMPs برای تکثیر قطعات مورد نظر توسط دستگاه ترموسایکلر (T- Personal, Biometra, Germany) بر اساس روش استاندارد انجام شد (جدول 1). اجزای واکنش PCR در حجم نهایی 25 میکرولیتر و غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود: مواد و مقادیر (pH 8/8) 100 mM Tris-HCl، 1U

بودند (Harlizijs et al., 1996, Freeman et al., 2004).

گوساله‌های مبتلا به DUMPS دارای مرگ زود هنگام حدوداً در روز چهارم بارداری می‌باشند و به صورت نارس و مرده متولد می‌شوند (Agerholm et al., 1997). از لحاظ تولید شیر، گاوهای ماده ناقل این نقص دارای تولید شیر طبیعی می‌باشند. اما، از نظر ترکیبات شیر در گاوهای ناقل مقدار اسید اروتیک 5-10 برابر بیشتر از حد طبیعی است (Shanks & Robinson, 1990). بیماری نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز، بر اثر جهش در موقعیت کدون 405 اگزون 5 ژن اوریدین 5 مونوفسفات سنتاز (UMPs) که روی کروموزوم شماره 1 گاو واقع شده است اتفاق می‌افتد. باز سیتوزین در این موقعیت در اثر جهش تبدیل به تیمین شده که این جهش باعث ایجاد نابهنگام کدون توقف می‌شود (Harlizijs et al., 1996). هدف از انجام این پژوهش، بررسی وجود جهش‌های مرتبط با بیماری‌های CVM و DUMPS در گاوهای سرابی ایران و بهینه نمودن آزمون‌های مبتنی بر PCR-RFLP و PCR-SSCP

¹ Spectrophotometric method

بروموفنل 10 درصد + 2 میکرولیتر EDTA نیم مولار + 190 میکرولیتر گلیسرول + 800 میکرولیتر فرم آمید) مخلوط شد. سپس به مدت 5 دقیقه در دمای 95°C در دستگاه PCR قرار داده شد. بلافاصله پس از این مرحله، میکروتیوب ها در داخل یخ قرار گرفتند. سپس نمونه ها روی ژل اکریل آمید 10 درصد واسرشته با دمای 7°C ولتاژ 320 و مدت زمان 150 دقیقه جهت مشاهده تفاوت های تک نوکلئیدی الکتروفورز گردیدند. رنگ آمیزی ژل اکریل آمید به روش نترات نقره صورت گرفت.

هضم آنزیمی (RFLP)³ قطعه 108 جفت بازی ژن UMPs برای بدست آوردن الگوی هضمی مناسب با آنزیم *AvaI* انجام شد. الگوی باندهای حاصله از هضم آنزیمی روی ژل اکریل آمید 10 درصد، مورد بررسی قرار گرفت. الگوی باندهای دام سالم شامل سه باند (19، 36، 53 جفت بازی) و دام ناقل شامل چهار باند (19، 36، 53 و 89 جفت بازی) بود (شکل 2).

آنزیم Taq پلیمرز (Invitrogen, California, USA)، 0/1 میلی گرم بر میلی لیتر (BSA)¹، 1 mM، از هر 0/2 از هر (Pharmacia, Uppsala, Sweden) dNTP، 1/5 mM از MgCl_2 و 100 نانوگرم از DNA هدف که با استفاده از برنامه دمایی زیر و در 35 سیکل تکثیر شدند: 95 درجه سانتی گراد به مدت 3 دقیقه، 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، 60 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، 72 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه. برنامه دمایی و چرخه تکثیر برای ژن UMPs مشابه SLC35A3 با دمای اتصال 61 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه بود. الکتروفورز محصولات PCR برای بررسی اختصاصیت و راندمان روی ژل آگارز 2 درصد با ولتاژ 90 به مدت 40 دقیقه انجام شد و ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و محصولات توسط پرتو فرا بنفش عکسبرداری بررسی شدند.

SSCP و RFLP : برای آزمون محصولات PCR با روش (SSCP)² جهت آزمون بیماری CVM، 4 میکرو لیتر از محصولات PCR با 12 میکرو لیتر از SSCP dye (10 میکرو لیتر

³ Restriction Fragment Length Polymorphism

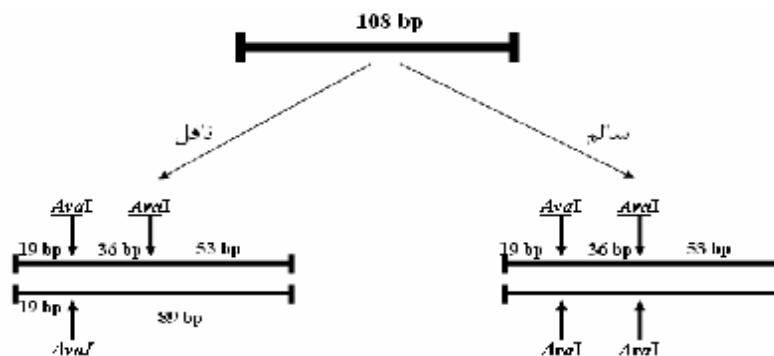
¹ Bovine Serum Albumin

² Single Strand Conformation Polymorphism

جدول 1- آغازگرهای اختصاصی ناحیه ژنی SLC35A3 و UMPs.

منبع	قطعات تولیدی (جفت باز)	توالی آغازگرها	ناحیه ژنی
Rusc, & Kaminski, 2007	177	F: 5'-TCA GTG GCC CTC AGA TTC TC-3' R: 5'-CCA AGT TGA ATG TTT CTT ATC CA-3'	SLC35A3
Schwenger et. al. 1993	108	F: 5'-GCA AAT GGC TGA AGA ACA TTC TG-3' R: 5'-GCT TCT AAC TGA ACT CCT CGA GT-3'	UMP's

Table 1 – Locus-specific-primers of SLC35A3 & UMPs gene.



شکل 2- تصویر شماتیک سایت برشی آنزیم *AvaI* روی ژن UMPs.

Figure 2- Schematic diagram of *AvaI* restriction site on the UMPs gene.

روی این دو ژن فاقد جایگاه برشی و دارای یک جایگاه برشی بود.

به منظور بررسی عملکرد صحت آنزیم *AvaI*، فعالیت این آنزیم روی محصولات PCR به دست آمده از دو ژن لپتین گاوی¹ و ²FGFR3 آزمایش شد. بطوریکه آنزیم *AvaI* به ترتیب بر

¹ Bovine Leptin gene

² Fibroblast Growth Factor Receptor 3

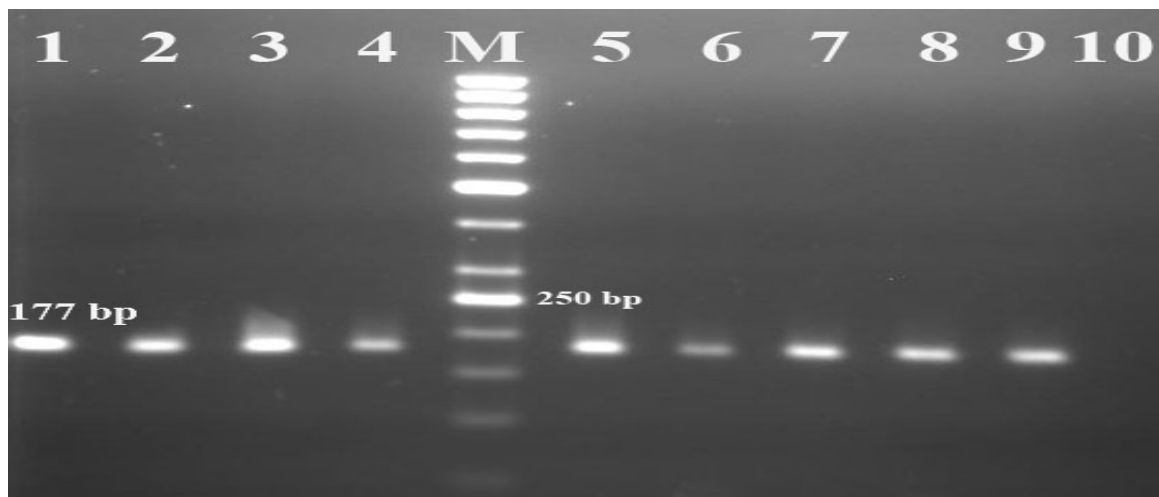
نتایج و بحث

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمرز

نتایج طیف سنجی نشان داد که DNA های استخراج شده از کیفیت مناسبی برای انجام PCR برخوردار بودند. نتایج بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز نشان دادند که الگوی بانندی مربوط به تکثیر قطعه 177 جفت بازی ژن SLC35A3 و 108 جفت بازی ژن UMPs فاقد باند غیر اختصاصی، دایمر و اسمیر بود که موید اختصاصی بودن جفت آغازگرها می باشد (شکل 3 و شکل 4).

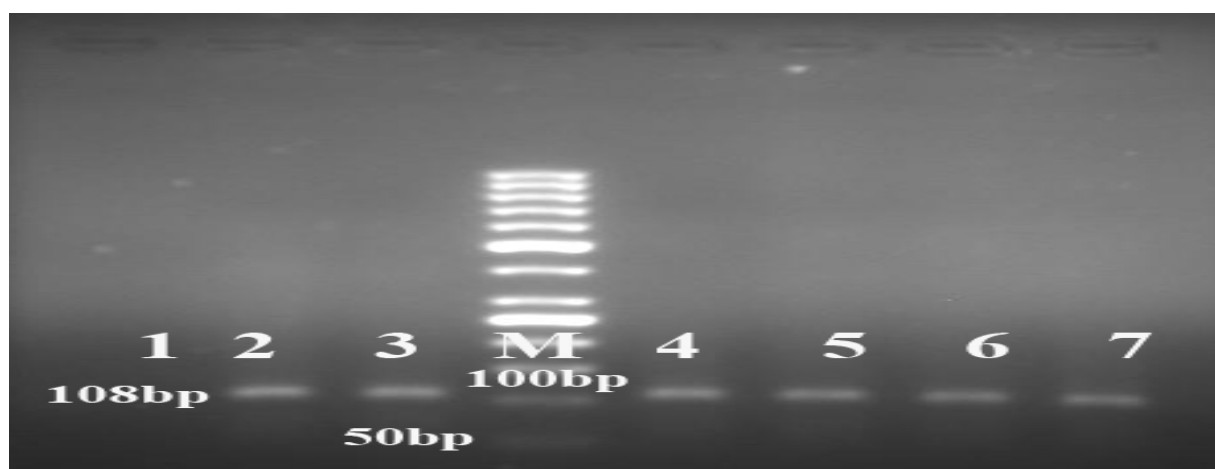
CVM: نتایج بررسی الگوی تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) روی ژل اکریل امید 10 درصد واسرشته، نشان داد که هیچ یک از دام های موجود در ایستگاه گاو سرابی حامل ژن جهش یافته نبودند و این بدین معنی است که در دام های سرابی مورد بررسی، هیچ ناقلی از بیماری

CVM وجود ندارد (شکل 5). در مطالعه Nagahata و همکاران (2002) در ژاپن، 40 گاو نر را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش، بررسی های گوناگونی از قبیل توجه در علائم ماکروسکوپی، علائم کالبد شکافی و علائم رادیوگرافی در گوساله های مبتلا به CVM انجام شد که نهایتاً از این تعداد، 13 مورد ناقل CVM از طریق تکنیک های مولکولی شناسایی شد. همچنین در کشور لهستان برای تعیین فراوانی ناقلین CVM، Rusc و همکاران (2007) تعداد 202 گاو نر را که در سال های 2001 تا 2004 در تلقیح استفاده می شدند و 403 گاو نری که تحت ارزیابی برای استفاده آینده در تلقیح بودند را آزمون نمودند که همگی از نژاد هلشتاین - فرزین لهستانی (لهستانی سیاه و سفید) بودند. از تعداد 605 گاو نر بیان شده، 150 مورد ناقل CVM شناسایی شد.



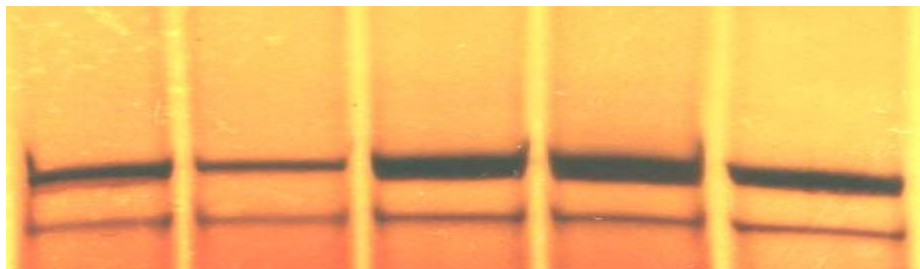
شکل 3- الکتروفورز محصولات PCR ژن SLC35A3. شماره 1-9 (قطعه 177 جفت بازی)، شماره 10 (کنترل منفی)، M: نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی M50 از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (50-100-150-200-250-300-400-500-600-700-800-900-1000).

Figure 3- Agarose gel electrophoresis of SLC35A3 gene PCR products. Lanes (1-9), 177 bp fragment; Lane 10, Negative control, M, 50 bp ladder.



شکل 4- الکتروفورز محصولات PCR ژن UMPs. شماره 1 کنترل منفی، شماره 2-7 قطعه 108 جفت بازی، M: نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی M50 از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (50-100-150-200-250-300-400-500-600-700-800-900-1000).

Figure 4- Agarose gel electrophoresis of UMPs gene PCR products. Lane 1, Negative control, Lanes (2-7), 108 bp fragment; M, 100 bp ladder.



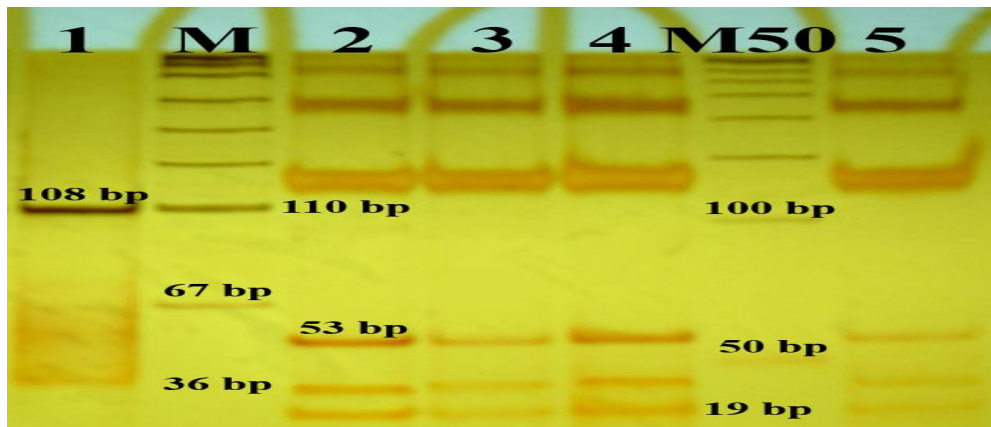
شکل 5- الکتروفورز اکریل آمید محصولات PCR ژن SLC35A3 برای بررسی به روش SSCP.

Figure 5- SLC35A3 gene PCR products on polyacrylamid gel electrophoresis for detecting of SSCP patterns.

دادند و این بدین معنی است که در دام‌های سرابی مورد بررسی هیچ ناقلی از بیماری DUMPS وجود ندارد (شکل 6-).

DUMPS

هضم آنزیمی (RFLP) قطعه 108 جفت بازی ژن UMPs نشان داد هیچ یک از دام‌های موجود در ایستگاه گاو سرابی حامل ژن جهش یافته نبودند و همه دام‌ها الگوی سه بانندی را نشان

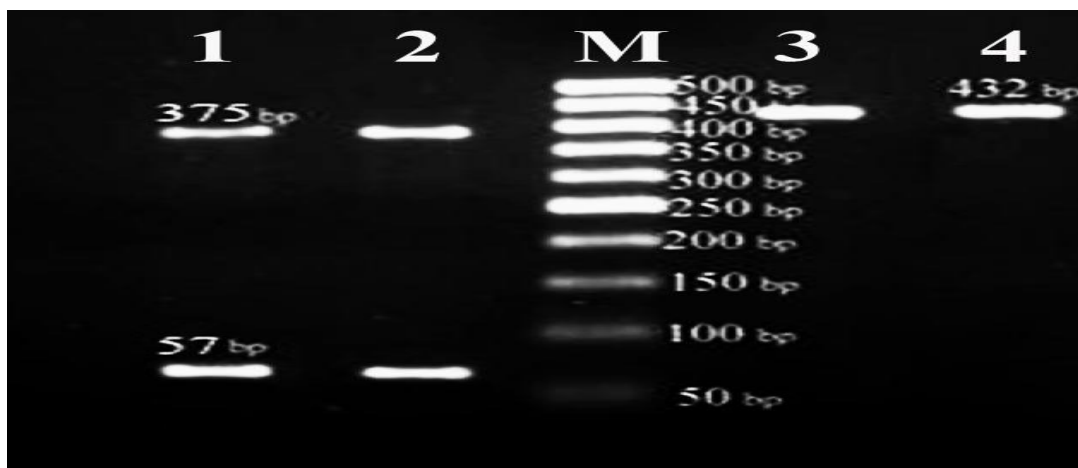


شکل 6- الکتروفورز اکریل آمید محصولات هضمی آنزیم برشی *AvaI* شماره 1 (قطعه هضم نشده)، شماره 2-5 (محصولات هضم شده)، M نشانگر وزنی pUC19/MspI مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (111-147-190-242-331-404-489-501-501): M50: نشانگر وزنی، اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می باشد (34-67-110-110-150-200-250-300-350-400-450).

Figure 6- Restriction profiles of the 108 bp PCR fragments obtained after treatment with *AvaI* on polyacrylamid gel, Lane 1, undigested PCR product; Lanes (2-7), digested PCR products, M, pUC19/MspI ladder; M50, 50 bp ladder.

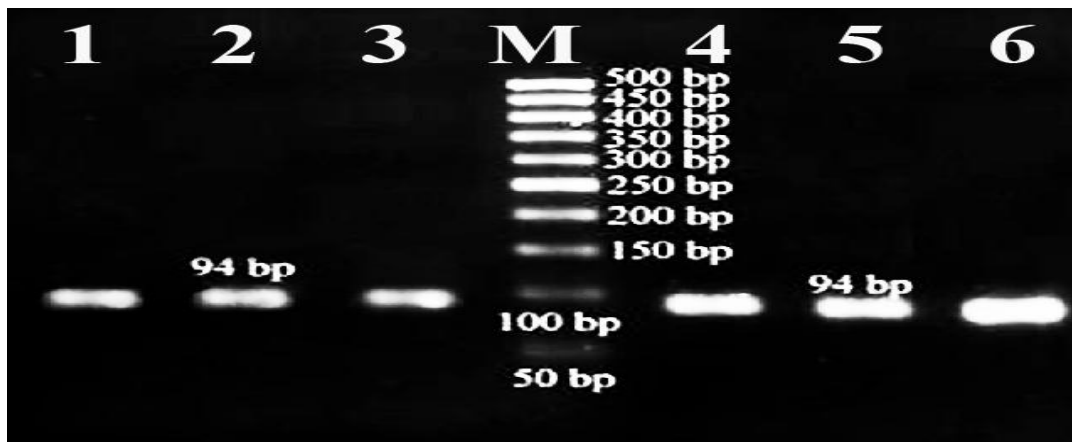
همین اساس، برای بررسی صحت عملکرد آنزیم *AvaI* این آنزیم روی محصولات PCR بدست آمده از دو ژن *FGFR3* و لپتین گاوی مورد آزمون قرار گرفت. نتایج این آزمون فعالیت برشی صحیح آنزیم *AvaI* را تأیید نمود (شکل 7 و 8).

با توجه به اینکه در این مطالعه برای اولین بار از آنزیم *AvaI* برای کاوش ژن UMPs گاو نژاد سرابی استفاده گردید و عدم وجود نمونه کنترل مثبت امکان حصول نتایج فرعی نیز وجود داشت که این خود دقت ویژه ای را می‌طلبید. بر



شکل 7- الکتروفورز محصولات PCR ژن *FGFR3* و محصولات هضمی با آنزیم برشی *AvaI*. شماره 1-2 (قطعه هضم شده)، شماره 3-4 (محصولات PCR ژن *FGFR3*)، M نشانگر وزنی 50bp مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین برحسب bp به قرار زیر می‌باشد (50-100-150-200-250-300-350-400-450-500).

Figure 7- Agarose gel electrophoresis of *FGFR3* gene PCR products & restriction profiles of this PCR fragments obtained after treatment with *AvaI*. Lanes (1-2), digested PCR products, Lanes (3-4), *FGFR3* gene PCR products, M, 50 bp ladder.



شکل 8- الکتروفورز محصولات PCR ژن لپتین گاو و محصولات هضمی با آنزیم برشی *AvaI*. شماره 1-3 (محصولات PCR هضم نشده)، شماره 4-6 (محصولات PCR ژن لپتین گاو)، M نشانگر وزنی 50bp مورد استفاده برای تعیین اندازه محصولات PCR. اندازه باندهای نشانگر وزنی از بالا به پایین بر حسب bp به قرار زیر می باشد (50-100-150-200-250-300-350-400-450-500).

Figure 8- Agarose gel electrophoresis of bovine leptin gene PCR products & restriction profiles of this PCR fragments obtained after treatment with *AvaI*. Lanes (1-3), undigested PCR products, Lanes (4-6), bovine leptin gene PCR products, M, 50 bp ladder.

DUMPS مشاهده نکردند. در مطالعه‌ای Patel و همکاران (2006) روی گاوهای بومی هند و گاوهای زیو را مورد بررسی قرار دادند و در نهایت نقلی از این بیماری را مشاهده نکردند. همچنین Akyuz و همکاران (2008) در پژوهشی گاوهای بومی ترکیه و گاوهای براون سوئیس منطقه را آزمایش کردند و نتایج آنها نشان داد که هیچ دام نقلی از این بیماری در گله‌های مورد بررسی وجود ندارد. نتایج این پژوهش، یافته‌های گزارش شده توسط افراد ذکر شده را تأیید نمود.

همچنین نتایج حاصله تأیید کننده این فرضیه می‌باشد که بیماری DUMPS محصولی ناخواسته از یک برنامه اصلاح نژادی بوده و منشا آن اسپرم گاوهای مرتبط با Happy herd beautician می‌باشد، چرا که در این پژوهش و پژوهش‌های مشابه روی نژادهای بومی مناطق دیگر دنیا، این بیماری شناسایی نشده است. مطالعه Kaminski و همکاران (2005) روی گاوهای هلشتاین لهستانی انجام دادند و با وجود جامعه بزرگی (2209 راس) که مورد بررسی قرار دادند هیچ اثری از ناقلین

نتیجه گیری کلی

عدم مشاهده آلل مغلوب جهش یافته بیماری‌های ژنتیکی پیچیدگی ستون فقرات و نقص در آنزیم اوریدین مونوفسفات سنتاز در گاوهای بومی سرابی مرکز اصلاح نژاد سراب استان آذربایجان شرقی نیز عدم استفاه از اسپرم‌های خارجی پرتولید و اصیل بودن دام‌های این ایستگاه را تایید نمود. ویژگی‌های خاص این دام، نوید بخش یک منبع ژنتیکی مناسب برای آن منطقه می‌باشد. برای حفظ خلوص ژنتیکی باید تمهیدات گسترده تری از سوی مسئولین صورت گیرد. زیرا خالص‌سازی این گله‌ها برای داشتن ذخایر ژنی خالص و مطلوب به منظور انجام کارهای اصلاحی و بهنژادی و اجرا نمودن راهبرد های اصلاحی هیچ مشکلی به لحاظ انتشار آلل مغلوب و همچنین کاهش راندمان اقتصادی بوجود نمی‌آورد و با اطمینان و ضریب دقت بالا می‌توان از اسپرم گاوهای برتر این نژاد، برای اصلاح نژاد دام‌های منطقه و اجرا نمودن راهبردهای اصلاح نژادی استفاده نمود. نتایج این پژوهش نشان دادند که لزوم استفاده از تکنیک‌های مولکولی (PCR-SSCP و PCR-RFLP) به منظور شناسایی ناقلین

بیماری‌های ژنتیکی اتوزومال در سطح گله‌های پایه و تجاری و همچنین در سطح اسپرم‌های وارداتی و تولیدی مراکز اصلاحی داخل کشور امری غیر قابل انکار است و این روش‌ها به آسانی توانایی بهینه شدن، تفکیک و شناسایی دام‌های حامل و آلل‌های جهش یافته را دارند. همچنین روش ارائه شده در این پژوهش می‌تواند برای شناسایی و غربالگری سایر دام‌های بومی و اسپرم‌های گاوهای مراکز اصلاح نژاد کشور برای تشخیص حاملین استفاده شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی و آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد به سبب فراهم نمودن امکانات و تجهیزات پژوهشی، همکاران مرکز اصلاح نژاد دام ایستگاه تحقیقاتی سراب (استان آذربایجان شرقی) و همکاران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب ایران صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J (2000) Complex vertebral malformations in Holstein calves. Report LK-564. National Committee on Danish Cattle Husbandry, Aarhus, Denmark.
2. Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J (2001) Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13:283–289.
3. Agerholm JS, Willadsen CM, Nielsen TK, Giese SB, Holm E, Jensen L, Agger JF (1997) Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *Journal of Veterinary Medicine A* 44: 551-558.
4. Akyuz B, Ertugrul O (2008) Detection of deficiency of Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) in Holstein and native cattle in Turkey. *Journal of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine* 55: 57-60.
5. Duncan RB, Colin Jr, Carrig B, Agerholm JS, Bendixen C (2001) Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 13:333–336.
6. Freeman AR, Meghen CM, Machugh DE, Loftus RT, Achukwi MD, Bado A, Sauveroché B, Bradley DG (2004) Admixture and diversity in West African cattle populations. *Molecular Ecology* 13: 3477-3487.
7. Harlizius B, Schrober S, Tammen I, Simon D (1996) Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 133: 303-309.
8. Herzog A (1992) Genetic defects in cattle and the possibilities of control. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 79: 142-148
9. Ishida N, Kawakita M (2004) Molecular physiology and pathology of the nucleotide sugar transporter family (SLC35). *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 447: 768-775
10. Ishida N, Kuba T, Aoki K, Miyatake S, Kawakita M, Sanai Y (2005) Identification and characterization of human Golgi nucleotide sugar transporter SLC35D2, a novel member of the SLC35 nucleotide sugar transporter family. *Genomics* 85: 106-116.
11. Kaminski S, Grzybowski G, Prusak B, Rusc A (2005) No incidence of DUMPS carriers in Polish dairy cattle. *Journal of Applied Genetics* 46 (4): 395-397.
12. Kanae Y, Endoh D, Nagahata H, Hayashi, M (2005) A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17: 258-262.
13. Muraoka M, Kawakita M, Ishida, N (2001) Molecular characterization of human UDP-glucuronic acid/UDP-N-acetylgalactosamine transporter, a novel nucleotide sugar transporter with dual substrate specificity. *FEBS Letters* 495: 87-93.
14. Nagahata H, Oota H, Nitani A, Oikawa S., Higuchi H., Nakade T, Kurosawa T, Morita M, Ogawa H. (2002). Complex Vertebral Malformation in a Stillborn Holstein Calf in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64(12): 1107-1112.
15. Patel RK, Singh KM., Soni KJ, Chauhan JB, Sambasiva Rao KRS (2006) Lack of carriers of citrullinaemia and Dumps in Indian Holstein cattle. *Journal of Applied Genetics* 47(3): 239-242.

16. Rusc A, Kaminski S (2007). Prevalence of complex vertebral malformation carriers among Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics* 48(3): 247-252.
17. Schwenger B, Schober S, Simon D (1993). DUMPS cattle carry a point mutation in the Uridine Monophosphate synthase gene. *Genomics* 16: 241-244.
18. Shanks RD, Robinson JL (1990) Deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein cattle. *Cornell Veterinarian* 80: 119-122.
19. Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen A. H, Holm L (2006) A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research* 16: 97-105.

Investigation of Iranian native Sarabi Cows for Complex Vertebral Malformation (CVM) and Deficiency in Uridine Mono Phosphate Syntase Enzyme (DUMPS) Genetic Disorders by Using PCR-SSCP and PCR-RFLP Technique

Nassiry M.R.^{1,2}, Ghovvati S.¹, Tahmoorespour M.¹, Doosti M.^{*1}, Mahdavi M.¹, Sadeghi B.¹, Armin M.R.³

¹ Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, P. O. Box: 91775-1163, Iran.

² Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Abstract

Evaluating and detection of genetic disorders is very important in both human and animal communities. Blood samples were prepared from 162 cows from Sarabi cows' research station in Sarab, East Azerbaijan province, Iran. DNA extraction was done based on guanidine thiocyanate – silica gel method. The aim of this study was to identify the CVM and DUMPS carriers in Sarabi native cows of Iran. Standard polymerase chain reaction was applied to amplify a 177 bp and a 108 bp fragments from exon 4 in SLAC35A3 gene and exon 5 in UMPs gene using specific primers pair. The SLC35A3 gene PCR products were analyzed using single stranded conformation polymorphism (SSCP) to reveal their mutations on polyacrylamide gel. In order to identify DUMPS carrier animals, a RFLP assay was conducted and the UMPs PCR products were digested by *AvaI* restriction enzyme. Results indicated that no G→T mutation at position 559 in exon 4 of SLAC35A3 gene and C→T mutation at position 405 in exon 5 of UMPs gene in examined cows respectively and subsequently no carrier was identified.

Keywords: Autosomal Genetic Diseases, CVM, DUMPS, Sarabi cow, PCR-RFLP, PCR-SSCP.

* Corresponding author: M. Doosti

Email: Doosti.mohammad@stu-mail.um.ac.ir