**مجله علوم دامی ایران**
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۱۴۸-۱۴۱)

# بررسی رابطه‌ی ژن TLR4 با ورم پستان بالینی در گاوهای هلشتاین ایران

**معصومه باقری[1*]، سید رضا میرایی آشتیانی[2]، محمد مرادی شهر بابک[2]، عباس پاکدل[3] و اردشیر نجاتی جوارمی[3]**
۱، دانش آموخته دکترای اصلاح نژاد دام، ۲، استادان، ۳، دانشیاران گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
( تاریخ دریافت:۹۱/۶/۱۱ - تاریخ تصویب:۹۱/۱۲/۱۲ )

## چکیده

**ژن Toll-Like Receptor 4(TLR4) به عنوان یک گیرنده‌ی سطح سلولی که در پاسخ‌های ایمنی ذاتی موثر است، سبب شناسایی لیپو پلی ساکاریدهای باکتری‌های گرم منفی می‌شود. نشانگرهای ژنتیکی مرتبط با پاسخ‌های ایمنی در طول بروز ورم پستان می‌تواند در انتخاب گاوها کمک کند. هدف از مطالعه حاضر تعیین رابطه‌ی ژن TLR4 با ورم پستان بالینی بود. ۲۷۰ فرد بر اساس بالاترین و پایینترین توزیع عوامل باقیمانده ورم پستان بالینی در دو گروه حساس و مقاوم به ورم پستان بالینی با استفاده از روش نمونه برداری توالی یابی انتخابی، انتخاب شدند. به منظور تعیین ژنوتیپ حیوانات از دو روش آزمون چند شکلی ترکیب تک رشته ای (PCR-SSCP) و آزمون چند شکلی قطعات محدود شده (PCR-RFLP) استفاده شد. پس از توالی یابی چند شکلی نوکلئوتید A-G در اگزون ۲ و C-T در اگزون ۳ از ژن مذکور شناسایی شد. اثر چند شکلی ژن TLR4 روی ورم پستان بالینی با استفاده از تابعیت لوجستیک تجزیه شد. نتایج نشان داد که ژن TLR4 به طور معنی‌داری با مقاومت به بیماری ورم پستان بالینی مرتبط است.**

**واژه های کلیدی:** گاو هلشتاین، ژن TLR4، ورم پستان بالینی

## مقدمه

گزینش ژنتیکی به منظور افزایش مقاومت حیوانات در برابر بیماری‌ها به عنوان یک استراتژی جایگزین یا مکمل روش‌های رایج پیشنهاد می‌شود. ورم پستان به عنوان یکی از بیماری‌های بسیار شایع در گاو شیری است که به وسیله ژن‌ها و عوامل محیطی زیادی کنترل می‌شود. اما شناسایی QTL برای ورم پستان بالینی بیشتر در کشورهای اسکاندیناوی صورت گرفته است. زیرا سیستم‌های رکورد برداری در این کشورها این امکان را فراهم آورده است که رکوردهای دقیقی از صفت ورم پستان در دسترس باشد (Sorensen et al., 2008). اگر چه اصلاح نژاد برای کاهش تعداد سلول‌های بدنی، ممکن است بر تولید شیر بیشتر در دوره های بعدی شیردهی موثر نباشد، اما نتایج نشان می‌دهد استفاده از تعداد سلول‌های بدنی به عنوان یک شاخص از مقاومت به ورم پستان بالینی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. امروزه به دلیل مشکل بودن رکورد برداری ورم پستان بالینی در اغلب مطالعات از معیار سلول‌های بدنی به عنوان شاخصی برای ارزیابی مقاومت به ورم پستان استفاده می شود. با توجه به رابطه مثبت و بالا (۰/۷) بین این دو صفت (Heringstad et al., 2005, 2006)، مطالعات اخیر نتوانسته است QTL مشترکی برای این دو صفت بیابد. از طرف دیگر امتیاز سلول‌های بدنی که به عنوان یک نشانگر از ورم پستان استفاده می شود، تنها متاثر از عفونت های داخل پستان نبوده و تحت تاثیر عوامل دیگری از قبیل سن دام، مرحله شیردهی، شرایط فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای نیز می باشد. نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد مقاومت به بیماری در نشخوارکنندگان دارای واریانس ژنتیکی است و در حال حاضر اکثر کشورها اهمیت زیادی به انتخاب صفات غیر تولیدی به ویژه مقاومت به ورم پستان می‌دهند ( Carlen et al., 2004). با این وجود، انتخاب حیوانات برای

* نویسنده مسئول: معصومه باقری تلفن: ۰۹۱۴۳۰۰۹۳۶۷ E-mail: bagherimas@ut.ac. ir

افزایش مقاومت به ورم پستان به دلیل عدم وجود تعریف واحد جهانی و همچنین پایین بودن توارث پذیری آن، دارای محدودیت است.

در نتیجه به عنوان یک رویه جایگزین، شناسایی ژن‌های عمده موثر بر مقاومت به ورم پستان و کاربرد رویه گزینش به کمک نشانگرها، فرصت مناسبی را به منظور بهبود وضعیت ورم پستان در صنعت گاو شیری فراهم کرده است (Lund et al., 2007). هر چند وسعت جمعیت رکوردبرداری شده از صفات سلامتی مانند ورم پستان بالینی در اجرا در اغلب کشورها می‌تواند مشکل باشد، اما داده‌های فنوتیپی از اختلالات سلامتی می تواند با داده‌های ژنومیکی ترکیب شده و در استراتژی-های انتخابی نو استفاده شود. با توجه به اینکه پیشرفت ژنتیکی برای تولید شیر مسائل سلامتی را تحت الشعاع قرار می‌دهد، بنابراین باید در برنامه‌های اصلاح نژاد گاو شیری برای افزایش تولید شیر، بهبود مقاومت به ورم پستان نیز مورد توجه قرار گیرد. ولی همبستگی ژنتیکی منفی بین تولید شیر و مقاومت به ورم پستان، بهبود ژنتیکی همزمان این صفات را با مشکل روبرو می-کند(Sahana et al., 2008).

روش توالی‌یابی انتخابی، به عنوان یک روش موثر در یافتن QTL است که با انتخاب افراد در دو انتهای منحنی توزیع افراد صورت می‌گیرد ( Bovenhuis & Spelman,1998). برای توالی‌یابی تعداد مشخصی از حیوانات، توان یافتن QTL با این روش، افزایش می‌یابد. هر چند روش تابعیت ساده برای برآورد پارامترها با روش توالی‌یابی انتخابی قابل انجام است، اما ممکن است برآوردها اریب باشد. بنابراین برای حصول برآوردهای نااریب حداکثر درستنمایی[1] در کل فایل داده‌ها می تواند مورد استفاده قرار گیرد، که تمام داده‌ها اعم از داده‌های توالی‌یابی شده و توالی‌یابی نشده در آنالیز وارد می‌شوند (Henshall & Goddard, 1999). بنابراین در مواردی که اثر QTL کوچک است، استفاده از این روش می‌تواند موثر باشد. ژن TLR4 یک گیرنده سطح سلولی است که قادر به شناسایی گستره‌ی وسیعی از الگوهای مرتبط با عوامل بیماریزا است که در پاسخ‌های ایمنی ذاتی، نقش مهمی را در دفاع در مقابل عوامل بیماریزا ایفا می کند. علاوه بر این، این ژن الگوهای مولکولی به وسیله لیپوپلی‌ساکاریدها را ارائه می‌کند که حاوی اکتو-بلاست باکتری‌های گرم منفی است. همچنین بیان فاکتورهای عفونتی IL-1، IL-6 و IL-8 را موجب می-شود. این فاکتورها در پاسخ ایمنی مشارکت داشته و مقاومت به بیماری را افزایش می‌دهند. نتایج نشان داده است که ورم پستان سبب افزایش بیان mRNA ژن TLR4 شده و در نتیجه این گمان وجود دارد که این ژن با ورم پستان ارتباط داشته باشد ( Sharma et al., 2006b; White et al., 2003).

با توجه به این که آشکار کردن مکانیسم‌های مولکولی پیچیده مسئول مقاومت به ورم پستان می‌تواند برای برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر مفید باشد، این مطالعه به عنوان راهی برای پیشبرد هدف افزایش مقاومت به ورم پستان بالینی در صنعت گاو شیری ایران مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه رابطه‌ی ژن TLR4 با مقاومت به ورم پستان بالینی و همچنین صفات تولید شیر با استفاده از روش توالی‌یابی انتخابی بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

ابتدا فایل داده‌ها، از دو گاوداری تلیسه نمونه (تهران) و فکا (اصفهان) اخذ شد. از بین ۳۸۲۳ گاو دارای رکورد ورم پستان بالینی با استفاده از فرمول زیر و proc *GLM* از نرم افزار *SAS* (*SAS Institute.*, 1999) ۲۷۰ فرد بر اساس بالاترین و پایین‌ترین توزیع عوامل باقیمانده انتخاب شدند:

$$y_{ijk} = H_i + L_j + \beta X_k + e_{ijk}$$

در این فرمول y تعداد ورم پستان بالینی مشاهده شده روی k امین گاو، $H_i$ اثر ثابت i امین گله، $L_j$ اثر ثابت j امین دوره شیردهی(دوره شیردهی دوم، سوم، چهارم و پنجم) β ضریب تابعیت میزان ورم پستان از تولید شیر ، X میزان تولید شیر k امین گاو و $e_{ijkl}$ اثر عوامل باقیمانده ورم پستان بالینی است.

بر اساس توزیع اثرات باقیمانده دو گروه تشکیل شد، ۱۳۵ فرد با کمترین باقیمانده ورم پستان بالینی به عنوان

1. Maximum Likelihood

گروه مقاوم و ۱۳۵ فرد با بالاترین باقیمانده ورم پستان بالینی به عنوان گروه حساس به بیماری. در گروه مقاوم دامنه باقیمانده ورم پستان بالینی از ۱/۳۴- تا ۰/۹۳- با میانگین ۱/۰۵- بود، در حالیکه در گروه حساس دامنه از ۱/۲۸ تا ۵/۶ با میانگین ۲/۷۱ بود. افراد مقاوم به ورم پستان بالینی هرگز به بیماری ورم پستان مبتلا نشده بودند در حالیکه افراد حساس بین ۳ تا ۶ مورد تحت درمان ورم پستانی قرار گرفته بودند. گروه مقاوم حاصل ۸۰ پدر و گروه حساس حاصل ۹۹ پدر بودند که برخی از پدرها در هر دو گروه دارای فرزند بودند. اغلب پدرها تنها یک یا دو فرزند داشتند و تنها تعداد کمی از پدرها بیش از دو فرزند داشتند.

در این مطالعه انتخاب افراد بر اساس ارزش‌های انتهایی باقیمانده موارد ورم پستان بالینی پس از محاسبه اثرات گله، دوره زایش و تولید شیر به عنوان عامل کمکی برای ورم پستان بالینی صورت گرفت. روش مورد استفاده در انتخاب افراد، در نظر گرفتن اثرات محیطی و دوره‌های زایش متفاوت این امکان را فراهم آورد که با دقت بالاتری بتوان موارد ورم پستان بالینی را مشخص کرد. پس از انتخاب افراد، خونگیری حیوانات از ورید دمی صورت گرفت و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

**استخراج و افزوده سازی DNA**

استخراج DNAی ژنومی از نمونه‌های خون با استفاده از روش بهینه یافته و تغییر شکل یافته استخراج نمکی (Miller., 1998) طبق پروتکل استاندارد انجام شد و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با استفاده از ژل یک درصد آگارز و همچنین دستگاه نانو دراپ بررسی شد. جهت بررسی تنوع ژن TLR4 در اگزون شماره ۲ در جمعیت گاو هلشتاین ایرانی از روش PCR-SSCP و در جایگاه دوم در اگزون شماره ۳ از روش PCR-RFLP و پرایمرهای طراحی شده توسط Wang et al. (۲۰۰۷) استفاده شد. افزوده سازی DNA با حجم کلی از ۲۵ میکرو لیتر شامل ۵۰ نانو گرم DNA، ۲/۵ میکرو لیتر بافر، یک میکرو لیتر از هر یک از پرایمرها، ۲ میکرو لیتر mgcl2، یک میکرو مول بر لیتر dNTP و ۰/۵ واحد *Taq DNA polymerase* که با آب مقطر به حجم کلی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد، انجام شد. ۵ میکرو لیتر از محصول به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، روی ژل آگارز الکتروفورز شد تا پس از رنگ آمیزی، کیفیت و طول قطعات تکثیر شده ارزیابی شود. در جدول ۱، توالی پرایمرها و جایگاه‌های انتخابی از ژن مورد مطالعه نشان داده شده است. همچنین شرایط مطلوب برای افزوده سازی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرها، اندازه و موقعیت جایگاههای انتخاب شده از ژن TLR4

| ژن | موقعیت جایگاه | اندازه(جفت باز) | توالی پرایمر |
|---|---|---|---|
| TLR4(۱) | اگزون ۲ | ۳۱۶ | Forward: 5′-AGGTTGACTGGTCTCTTTG-3′<br>Reverse:5′-ACAGTGGTAGAACTCATGC-3′ |
| TLR4(۲) | اگزون ۳ | ۳۸۲ | Forward : 5'-AGACAGCATTTCACTCCCTC-3′<br>Reverse: 5′-ACCACCGACACACTGATGAT-3′ |

جدول ۲- شرایط مطلوب افزوده سازی برای جایگاههای ژن TLR4

| ژن | واسرشته سازی اوالیه | واسرشته سازی | دمای اتصال | توسعه | تعداد سیکل | توسعه نهایی |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TLR4(۱) | دقیقه ۵ ، ۹۰°C | ثانیه ۳۰ ، ۹۴°C | ثانیه ۳۰ ، ۵۸°C | ثانیه ۵۰ ، ۷۲°C | ۳۵ | دقیقه ۱۰ ، ۷۲°C |
| TLR4(۲) | دقیقه ۵ ، ۹۰°C | ثانیه ۳۰ ، ۹۴°C | ثانیه ۳۰ ، ۶۱°C | ثانیه ۵۰ ، ۷۲°C | ۳۵ | دقیقه ۱۰ ، ۷۲°C |

آزمون چند شکلی ترکیب تک رشته ای(SSCP)

۷ میکرو لیتر از محصول PCR قطعه اول ژن TLR4، با ۱۲ میکرو لیتر محلول واسرشته و ۱ میلی لیتر بافر ترکیب شد. و واسرشته سازی به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد انجام شد. محصول به دست آمده به سرعت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از آن محصولات روی ژل

اکریل آمید در دمای ۴ درجه سانتیگراد الکتروفورز شدند، سپس با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

**آزمون چند شکلی قطعات محدود شده (RFLP)**

۲۰ میکرولیتر، شامل ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم *Alu1* ، ۲ میکرو لیتر بافر و ۱۰/۵ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در بن ماری هضم قرار داده شدند. محصول هضم روی ژل آگارز با اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. تصاویر ژل با دستگاه یو وی ترانس مینیاتور ثبت شدند.

**آنالیز پیوستگی**

بررسی رابطه بین جایگاه‌های ژن TLR4 و باقیمانده ورم پستان بالینی با استفاده از روش ارائه شده توسط Henshal & Goddard(۱۹۹۹)، برای داده‌های توالی‌یابی انتخابی انجام شد. در ابتدا آنالیز تابعیت لوجستیک تحت Glimmix macro نرم افزار *SAS* و با استفاده از مدل آماری زیر انجام شد( Wolfinger & O'Connell., 1993).

$$\text{logit}(\pi_r) = \log\left[\frac{\pi_r}{1-\pi_r}\right] = a + bY_r$$

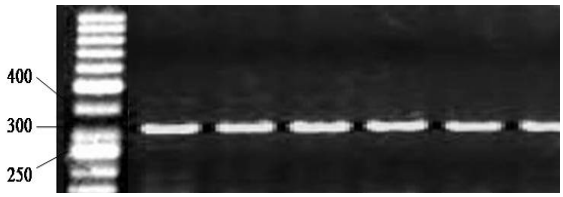
در مدل فوق $\pi_r$، احتمال ژنوتیپ AG یا CT برای r امین حیوان، a عرض از مبدا، $Y_r$ باقیمانده ورم پستان بالینی و b ضریب تابعیت ژنوتیپ AG یا CT بر باقیمانده ورم پستان بالینی است. همچنین آزمون معنی‌داری ضرایب تابعیت خطی (b) مبنای مجموع مربعات نوع اول قرار گرفت (König et al., 2005). در مرحله بعد رابطه مقایسه (α) ژنوتیپ هتروزیگوت با هر یک از هموزیگوت‌ها، با باقیمانده ورم پستان بالینی و با استفاده از معادله زیر برآورد شد.

$$\alpha = \frac{-1+\sqrt{1+b^2\sigma_X^2}}{b}$$

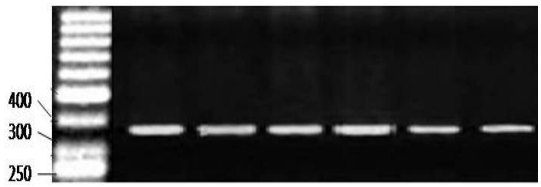
در معادله فوق $\sigma_X^2$، واریانس باقیمانده ورم پستان بالینی در جمعیت پایه انتخاب نشده (۳۸۲۳ گاو) بود، α، مقایسه ژنوتیپ هتروزیگوت با هر یک از هموزیگوت‌ها در هر دو جایگاه بود. از آنجاکه نتایج تجزیه و تحلیل دو آللی در سه ژنوتیپ متفاوت بودند، بنابراین برای هر یک از جایگاه‌ها، دو هموزیگوت در دو آنالیز متوالی با هتروزیگوت مربوطه مورد مقایسه قرار گرفتند.

## نتایج و بحث

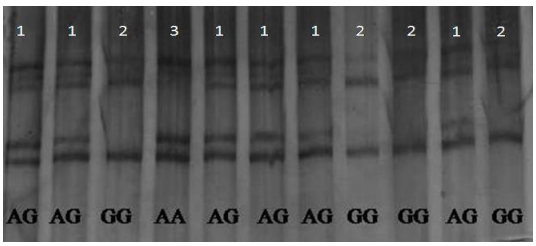
برای قطعات ۳۱۶ و ۳۸۲ جفت باز از ژن TLR4 افزوده‌سازی انجام شد (شکل ۱ و ۲). چند شکلی‌های ژنتیکی افراد انتخابی در هر دو گروه شناسایی شدند. با استفاده از روش چند شکلی ترکیب تک رشته‌ای (شکل ۳)، در جایگاه اول ژن TLR4 چند شکلی‌هایی مشاهده شد، بر اساس الگوهای به دست آمده از ژل‌های اکریل آمید در روش مذکور، از هر الگو تعدادی از نمونه‌های PCR برای تعیین توالی به موسسه تحقیقات علوم دامی ارسال شده و تعیین توالی در موسسه مذکور با روش Big Dye terminator V3.1 انجام شد. پس از تجزیه نتایج به دست آمده از توالی‌یابی نشان داده شد که در نوکلئوتید ۴۵۲۵ یک جهش A-G وجود دارد. نتایج بلاست ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه اول ژن TLR4 در شکل ۴ نشان داده شده است. در قطعه دوم ژن مذکور نتایج چند شکلی‌ها در شکل ۵ نشان داده شده است.



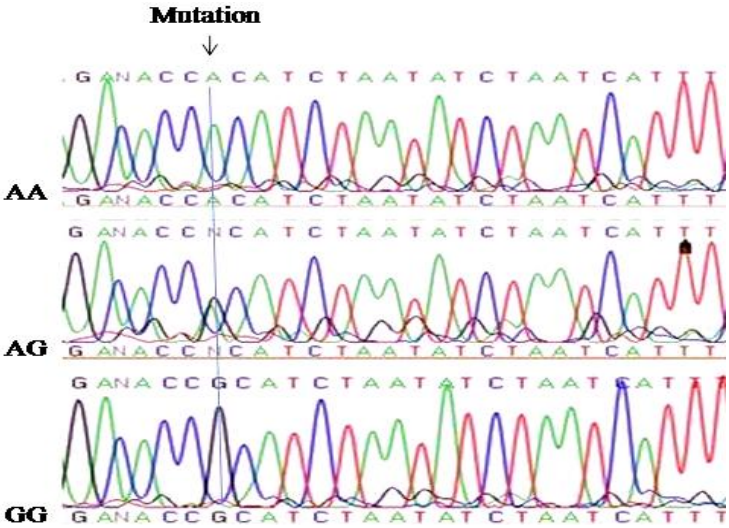

شکل ۱- نتایج PCR برای جایگاه اول ژن TLR4



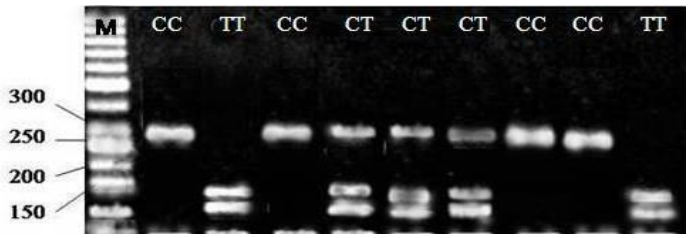

شکل ۲- نتایج PCR برای جایگاه دوم ژن TLR4




شکل ۳- نتایج PCR-SSCP جایگاه اول ژن TLR4




شکل ۴- بلاست ژنوتیپ‌های مختلف جایگاه اول ژن TLR4




شکل ۵- نتایج PCR-RFLP برای جایگاه دوم ژن TLR4

از آنجاکه تعدادی از نمونه‌ها حین انجام استخراج و در طول تعیین ژنوتیپ از کیفیت مناسبی برخوردار نبودند این نمونه‌ها وارد تجزیه و تحلیل نشدند. به این ترتیب تعداد ۲۵۳ فرد تعیین ژنوتیپ شده تجزیه و تحلیل شدند. فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در هر دو جایگاه به ترتیب در جدول‌های شماره ۳ و ۴ نشان داده شده است. برای آزمون معنی‌داری فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در هر دو گروه مقاوم و حساس به ورم پستان بالینی، از آزمون مربع کای استفاده شد. فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در سطح بسیار معنی‌داری بین گروه مقاوم و گروه حساس متفاوت بودند (P<۰/۰۰۰۱ ). در هر دو گروه مقاوم و حساس هموزیگوت‌ها وجود داشتند اما فراوانی‌های آنها در گروه‌های مقاوم و حساس تا حدودی متفاوت بودند. آلل G آلل عمده در جایگاه اول، نماینده گاوهای مقاوم به ورم پستان بالینی بود. در جایگاه دوم فراوانی آلل T در مقایسه با آلل C بالاتر بود. فراوانی آلل C در گروه مقاوم به ورم پستان بالینی بالاتر بود در حالیکه آلل T در گروه حساس فراوانی بالاتری داشت. در هر دو جایگاه بالاترین فراوانی‌ها مربوط به ژنوتیپ‌های هتروزیگوت بود.

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی و آللی در حیوانات مقاوم و حساس به ورم پستان بالینی برای ژن TLR4 در جایگاه اول

| گروه | فراوانی آللی | | فراوانی ژنوتیپی | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | G | A | GG | AG | AA |
| مقاوم | ۱۷۵ | ۶۳ | ۶۳ | ۴۹ | ۷ |
| حساس | ۱۰۸ | ۱۶۰ | ۱۴ | ۸۰ | ۴۰ |
| آزمون آماری کای مربع | $\chi_1^2$=۵۶/۴۷ | | $\chi_2^2$ =۶۷/۱۳ | | |
| P- value | P<۰/۰۰۰۱ | | P<۰/۰۰۰۱ | | |

* نویسنده مسئول: معصومه باقری تلفن: ۰۹۱۴۳۰۰۹۳۶۷ E-mail: bagherimas@ut.ac. ir

جدول ۴- فراوانی ژنوتیپی و آللی در حیوانات مقاوم و حساس به ورم پستان بالینی برای ژن TLR4 در جایگاه دوم

| گروه | فراوانی آللی | | فراوانی ژنوتیپی | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | T | C | TT | CT | CC |
| مقاوم | ۱۰۹ | ۱۲۹ | ۲۲ | ۶۵ | ۳۲ |
| حساس | ۱۷۵ | ۹۳ | ۵۱ | ۷۳ | ۱۰ |
| آزمون آماری کای مربع | $\chi_1^2$=۱۹/۴۶ | | $\chi_2^2$=۲۲/۷۰ | | |
| P- value | P<۰/۰۰۰۱ | | P<۰/۰۰۰۱ | | |

تفاوت‌های باقیمانده ورم پستان بالینی در مقایسه ژنوتیپ هتروزیگوت با هر یک از هموزیگوت‌ها در هر دو جایگاه ژن TLR4 در جدول ۵ نشان داده شده است. در جایگاه اول، ژنوتیپ های AG و GG ارزش‌های پایین‌تری برای باقیمانده ورم پستان بالینی در مقایسه با ژنوتیپ‌*های* AA داشتند. بنابراین ژنوتیپ AA با ورم پستان بالینی رابطه مثبت دارد. در حالیکه در جایگاه دوم ژنوتیپ‌های CT و TT دارای ارزش پایین‌تری برای باقیمانده ورم پستان بالینی در مقایسه با ژنوتیپ *CC* داشتند.

جدول - ۵ - اختلاف باقیمانده ورم پستان بالینی( $CMR^1$) در مقایسه ژنوتیپ هتروزیگوت با هر یک از هموزیگوت‌ها در دو جایگاه ژن TLR4

| جایگاه | تفاوت AG vs. AA | | | تفاوت AG vs. GG | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| اول | b-value[۲] | SD units | General units | b-value | SD units | General units |
| | -۰/۲۶** | ۰/۲۴ | -۰/۲۳ | ۰/۴۷*** | ۰/۴۳ | ۰/۴۰ |
| جایگاه | تفاوت CT vs. CC | | | تفاوت CT vs. TT | | |
| دوم | b-value | SD units | General units | b-value | SD units | General units |
| | ۰/۲۷** | ۰/۲۵ | -۰/۲۴ | ۰/۱۸* | ۰/۱۷ | -۰/۱۶ |

باقیمانده برای موارد ورم پستان بالینی در هر مرحله شیردهی بعد از محاسبه اثرات گله، شکم زایش و سطح تولید شیر

ارزش تابعیت، سطح معنی داری: *** = $P \leq 0.001$ ** = $P \leq 0.01$, * = $P \leq 0.05$

Sharma et al. (۲۰۰۶ b) نشان دادند که بین چند شکلی‌های ژن TLR4 و کاهش امتیاز سلول‌های بدنی و نیز افزایش تداوم شیردهی رابطه‌ی مطلوبی وجود دارد. در مطالعه‌ی دیگری Sharma et al. (۲۰۰۶ a) که بر اساس توالی‌یابی انتخابی روی ورم پستان بالینی صورت گرفت، نشان داده شد که نشانگر CGILA می‌تواند در بهبود ورم پستان بالینی موثر باشد به این ترتیب که ژنوتیپ GG با موارد پایین‌تر ورم پستان بالینی ارتباط داشت.

در مطالعه حاضر رویکرد استفاده از توالی‌یابی انتخابی در ترکیب با تجزیه و تحلیل تابعیت لوجستیک سبب شناسایی ژنوتیپ‌های نشانگری مفیدی در دو ناحیه از ژن TLR4 شد. علاوه بر این برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در دو گروه مقاوم و حساس به ورم پستان بالینی در یک خط با نتایج حاصل از آنالیز پیوستگی ورم پستان بالینی قرار داشتند. به طوریکه آلل A در گروه مقاوم به ورم پستان بالینی نسبتا کمتر بود. آنالیز پیوستگی همچنین نشان داد که اثرات مطلوبی بین باقیمانده ورم پستان بالینی و آلل G وجود دارد. بنابراین آلل G می‌تواند به عنوان آلل مطلوب برای مقاومت به ورم پستان بالینی در گاو هلشتاین ایران معرفی شود. در مطالعه‌ی دیگری روی گاو هلشتاین چینی نشان داده شد که جایگاه T4CRBR1 از ژن TLR4 روی امتیاز سلول‌های بدنی موثر است به این ترتیب که ژنوتیپ‌های AA امتیاز سلول‌های بدنی کمتری نسبت به ژنوتیپ‌های BB داشتند اما در این مطالعه اثر جایگاه T4CRBR2 بر امتیاز سلول‌های بدنی معنی‌دار نبود (Wang et al., 2007). رویکرد معمول برای برآورد اثرات ژنوتیپی، صفت مورد نظر را به عنوان متغیر وابسته و ژنوتیپ را به عنوان متغیر مستقل لحاظ می‌کند. اما مطالعه حاضر بر اساس احتمال ژنوتیپ هتروزیگوت با هر یک از هموزیگوت‌ها و مدل‌سازی صفت مورد نظر به عنوان ضریب تابعیت خطی توسعه یافت. باید توجه داشت زمانیکه روش تابعیت ساده به جای روش تابعیت لوجستیک به کار

می‌رود ممکن است نتایج اریب باشند (Henshall & Goddard., 1993). با توجه به نتایج مطالعات انجام شده، ژن TLR4 به عنوان یک ژن کاندیدای مهم در بهبود پاسخ به انتخاب برای بهبود مقاومت به ورم پستان در جمعیت گاو شیری پیشنهاد می‌شود (Ogorevc et al., 2009).

**نتیجه گیری**

با توجه به اینکه فقدان داده‌های فنوتیپی مورد نیاز برای صفات سلامتی مانع وارد شدن این قبیل صفات در آزمون‌های اصلاحی می‌شود، انتخاب مستقیم روی ژن‌ها یا نشانگرهای حامل آلل‌های بهبود دهنده‌ی این صفات، در انتخاب گروه‌های کوچک حیوانات با داشتن بیشترین افزایش پیشرفت ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح گاو شیری می‌تواند کاربردی شود. روش توالی‌یابی انتخابی در شناسایی چند شکلی جایگاه اول ژن TLR4 در ارتباط با ورم پستان بالینی موفق واقع شد. همچنین توالی‌یابی انتخابی با استفاده از فنوتیپ‌های انتهایی یک جایگزین مقرون به صرفه در توالی‌یابی گروه‌های بزرگ است.

## سپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از همکاری دو گاوداری تلیسه نمونه و فکا انجام شده است که به این وسیله از همکاری پرسنل این دو گاوداری در انجام نمونه گیری و در اختیار گذاشتن اطلاعات فنوتیپی صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## REFERENCES

1. Bovenhuis H., & Spelman R. J. (1998). Selective genotyping to detect QTL for multiple traits in outbred populations, pp. 241– 244 in *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production 26*, Armidale, New South Wales, Australia.
2. Carlen E., Strandberg. E. & Roth A. (2004). Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 87, 3062–70.
3. Henshall J. M. & Goddard. M. E. (1999). Multiple-trait mapping of quantitative trait loci after selective genotyping using logistic regression. *Journal of Genetics*. 151, 885–894.
4. Heringstad B., Chang Y. M., Gianola. D. & Klemetsdal. G. (2005). Genetic association between susceptibility to clinical mastitis and protein yield in Norwegian dairy cattle. *Journal of Dairy Science.* 88, 1509–1514.
5. Heringstad B., Gianola D., Chang Y. M., Odegard J. & Klemetsdal G. (2006). Genetic associations between clinical mastitis and somatic cell score in early first-lactation cows. *Journal of Dairy Science*. 89, 2236–2244.
6. König S., Sharifi A. R., Wentrot H., Landmann D., Eise M. & Simianer H. (2005). Genetic parameters of claw and foot disorders estimated with logistic model. *Journal of Dairy Science*. 88, 3316-3325.
7. 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 sell score on five chromosomes in three nordic dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*. 90, 5282–5290.
8. Miller S. A., Dykes D. D. & Polesky H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Journal of Nucleic Acids Research*. 16, 1215.
9. Ogorevc J., Kunej T., Razpet A. & Dovc P. (2009). Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Journal of Animal Genetics*. 40, 832-851.
10. SAS Institute (1999). SAS User's Guide. Statistics, Version 8 Developer's Edition. *SAS Inst. Inc*., Cary, NC.
11. Sahana G., Lund M. S., Andersson-Eklund L., Hastings N., Fernandez A., Iso-Touru T., Thomsen B., Viitala S., Sørensen P., Williams J. L. & Vilkki J. (2008). Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Journal of Animal Genetics*, 39, 354–362.
12. Sharma B. S., Jansen G. B., Karrow N. A., Kelton D. & Jiang Z. (2006a). Detection and characterization of amplified fragment length polymorphism markers for clinical mastitis in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science.* 89, 3653–3663.
13. Sharma B. S., Leyva I., Schenkel F. & Karrow N. A. (2006b). Association of Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms with Somatic Cell Score and Lactation Persistency in Holstein. *Journal of Dairy Science.* 89, 3626–3635.
14. Sorensen L. P., Guldbrandtsen B., Thomasen J. R. & Lund M. S. (2008). Pathogen-Specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish Holstein cattle. *Journal of Dairy Science.* 91, 2493–2500.

15. Wang X., Shangzhong X., Xu G., Hongyan R. & Jinbao C. (2007). Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *Journal of Genetic & Genomic.* 34, 406-412.
16. White S. N., Taylor K. H., Abbey C. A., Gill C. A. & Womack J. E. S. (2003). Haplotype variation in bovine Toll-like receptor 4 and computational prediction of a selected ligand-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100, 10364-10369.
17. Wolfinger R., & O'Connell M. (1993). Generalized linear mixed models: A pseudo-likelihood approach. *Journal of Statistical Computation and Simulation*. 48, 233-243.