ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی

همایش ملی
ایده های نو در کشاورزی

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

کیت تشخیص ناقلین بیماری نقص ایمنی شدید مرکب در اسب های نژاد عرب

Diagnostic kit for carrier of severe combined immunodeficiency disease in Arabian horses

علیرضا ترنگ*[1]، رویا شهیدزاده [2]

۱.مدیریت پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور۲. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور

a_tarang@hotmail.com*

چکیده

بیماری نقص ایمنی شدید مرکب یک بیماری اتوزومی مغلوب است که در اسب های نژاد عرب مشاهده می شود . کره های مبتلا، در بدو تولد سالم به نظر میرسند اما در طول ماه اول زندگی به دلیل فقدان پاسخ های ایمنی به عفونت های ثانویه مبتلا شده و حداکثر تا ۵ ماه زنده می مانند. نقص ملکولی بیماری، جهش در ژن کد کننده آنزیم DNA-PKcs است. این آنزیم نقش حیاتی در نوترکیبی V(D)J دارد. نوترکیبی V(D)J در شناسایی آنتی‌ژن، مفید و برای رشد و بقا لنفوسیت‌های B و T کاملاً ضروری است. ژن کد کننده آنزیم $DNA\text{-}PK_{CS}$ در اسب‌ها روی کروموزوم 9p12 قرار دارد. حذف ۵ جفت باز TCTCA در کدون ۳۱۵۵ باعث تغییرچارچوب و تولید کدون پایان زودرس می‌شود و به دنبال آن فعالیت کینازی آنزیم از بین می‌رود. در این مطالعه، نمونه خون محیطی از ۲۲۸ اسب نژاد عرب ایرانی و ۱۶ اسب عرب خارجی تهیه شد. DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج شد. با استفاده از تکنیک ARMS PCR ۳ ناقل در بین اسب های ایرانی و ۱ ناقل در بین اسب های عرب خارجی شناسایی شدند. این اولین گزارش از وجود ناقلین بیماری SCID، در جمعیت اسب-های عرب ایران است. هدف این مطالعه طراحی کیت تشخیص بیماری SCID و شناسایی ناقلین با یک روش آسان ، ایمن، کم هزینه، سریع و مطمئن است .زیرا برنامه های تولید مثلی در حذف بیماری زمانی موثر خواهند بود که ناقلین با آزمایشات ژنومی شناسایی شوند.

واژگان کلیدی : بیماری نقص ایمنی شدید مرکب (SCID) ، اسب نژاد عرب، ARMS PCR ،کیت تشخیص بیماری

مقدمه

SCID یک بیماری وراثتی شناخته شده در گونه های مختلف است که همواره به دلیل ناتوانی در تولید آنتی ژن های اختصاصی پاسخ های ایمنی باعث مرگ زودرس در مبتلایان می‌شود(Stubs 2007) . اولین همتای حیوانی مبتلا به SCID درسال ۱۹۷۳ در اسب (*Equus caballus*) توصیف شد(McGuire 1973). کره اسب های مبتلا به بیماری SCID هنگام تولد از نظر بالینی سالم به نظر می رسند، اما علائم عفونت در طول دو ماه اول زندگی بروز می یابد آنها حساسیت زیادی به عفونت های ثانویه داشته و در صورت عدم درمان در طول ماه اول زندگی می میرند و در صورت درمان های آنتی بیوتیکی حداکثر تا شش ماهگی دوام می آورند این اختلال تنها در اسب های نژاد عرب و زاده های دورگه آنها مشاهده شده است (Perryman 2000,Wiler 1995). علت این بیماری فقدان لنفوسیت های B و T است (Lunn 1995). تنوع لنفوسیت‌های B و T به دلیل گوناگونی ساختاری در ناحیه متغییر ژن های سازنده ایمونوگلوبولین ها و گیرنده های لنفوسیت T است. این گوناگونی توسط بازآرایی، نوترکیبی، اسپلایسینگ یا جهش در تعداد زیادی از قطعات ژنی نام های V و D و J وطی فرآیندی به نام نوترکیبی سوماتیکی انجام می شود. در هر قسمت از این

قطعات چندین نسخه ژنی وجود دارد. نوترکیبی سوماتیکی که نوترکیبی V(D)J نیز نامیده می شود می تواند هر قطعه ژنـی V را بـه هر قطعه ژنی J یا DJ متصل کند (نوترکیبی V(D)J با شکستن DNA در حاشیه قطعات ژن آغاز شده و در نهایت اتصـال قطعـات ژنی، توسط یک کمپلکس پروتئینی به نام DNA-PK متشکل از سه زیـر واحـد Ku_{70} ، Ku_{80} و$DNA\text{-}PK_{CS}$ انجـام مـی شـود (Perryman 2004). هترو دایمرKu حسگری است که انتهاهای شکسته شـده DNA را شناسـایی کـرده و اجـازه مـی دهـد کـه $DNA\text{-}PK_{CS}$ روی آنها عمل کند. DNA-PK در این وضعیت به یک پروتئین عملکردی تبدیل شده و گروه هـای فسـفات را بـه چندین پروتئین پذیرنده متصل می کند تا سایر مراحل نو ترکیبی انجام شود. (Lewin, 2008) . اگر نوترکیبی V(D)J اتفـاق نیفتـد لنفوسیت ها مراحل بلوغ را طی نمی کنند و سرانجام حذف می شوند(Perryman 2004).

در سال ۱۹۹۵وایلر و همکاران پیشنهاد نمودند که ژن کد کننده آنزیم $DNA\text{-}PK_{CS}$ کاندید اصلی ایجاد کننده بیماری SCID است (Wiler 1995). پس از آن بایلی و همکاران مشخص کردند که ژن کد کننده آنزیم $DNA\text{-}PK_{CS}$ کاندید اصلی بیماری بوده و روی کروموزوم 9p12 قرار دارد(Bailey 1997). مقایسه توالی ژن $DNA\text{-}PK_{CS}$ بین اسب های سالم و بیمار حذف ۵ جفت باز رانشان داد. این حذف منجر به تغییرچارچوب در کدون ۳۱۵۵ گردیده و ایجاد کدون پایان زودرس کدون پایانی رابه ۳۱۶۰ تغییر داده بود. در نتیجه آن ترجمه ۹۶۷ اسید آمینه منطقه C ترمینال متوقف و دمین کامل PI3K از انتهای زنجیره حذف شد (Shin 1997). اسب هایی که نسبت به این جهش هموزیگوت باشند، به بیماری SCID مبتلا می شوند. با توجه به اهمیت اقتصادی پرورش اسب برای کشورهای پرورش دهنده و بالا بودن ارزش اسب‌های اصیل، تولد یک کره اسب مبتلا میتواند ضررهای اقتصادی زیادی را وارد سازد. اگر ناقلین با آزمایشات ژنومی شناسایی شوند، اجرای برنامه‌های پرورشی و اصلاح نژادی در جهت حذف این بیماری کارآیی بیشتری خواهد داشت. .هدف این طرح شناسایی ناقلین بیماری SCID ، با استفاده کیت تشخیصی و براساس واکنش PCR است. این روش آسان ، ایمن ، کم هزینه ، سریع و مطمئن است. در این روش از مواد و وسایلی استفاده می شود که علاوه بر این که ارزان هستند، امکان تهیه آن برای همه آزمایشگاه ها وجود دارد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق خون گیری از ۲۲۸ اسب عرب ایرانی و ۱۶ اسب عرب خارجی انجام شد. نمونه ها از هشت استان گردآوری شدند و DNA آنها توسط کیت DNP™ Kit (سیناژن ، تهران) استخراج شد. جهت سنجش کیفیت و کمیت استخراج، نمونه های حاصل روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بار گذاری و به کمک نانودراپ بررسی شدند. شناسایی ناقلینِ آلل جهش یافته با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن منطقه و تکنیک ARMS PCR انجام شد(Bernoco and Bailey, 1998). برای هرDNA ژنومی دو واکنش PCR جداگانه انجام شد. آغازگر رفت در هر دو واکنش یکسان بود. یک واکنش دارای آغازگر برگشت آلل نرمال بود و محصولی به طول ۱۶۹ جفت باز تولید می کرد و واکنش دیگر دارای آغازگر برگشت آلل جهش یافته بود و محصولی به طول ۱۶۶ جفت باز تولید می کرد .

از آنجایی که نتیجه‌ی مورد انتظار در بعضی از DNA های مورد بررسی، عدم وجود محصول بود، اطمینان از کارایی و صحت واکنش PCR اهمیت داشت. به همین دلیل، تکثیر هم‌زمان ناحیه‌ی دیگری از DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای دیگر به عنوان کنترل داخلی انجام شد. آغازگر HMSO2 به عنوان آغازگر کنترل داخلی، برای بررسی کارایی PCR استفاده شد که محصول تکثیر شده آن طولی در حدود ۲۳۸–۲۱۸ جفت باز داشت و با طول محصول PCR با پرایمرهای جهش یافته و نرمالSCID متفاوت بود، به طوری که تفاوت آنها بر روی ژل آگارز قابل تشخیص بود. از آنجایی که این قطعه در همه‌ی اسب‌ها وجود دارد، بنابراین در هر دو

واکنش PCR مربوط به یک فرد، باندِ مربوط به پرایمر کنترل داخلی تشکیل می‌شود. به این معنی که، عدم حضور باند HMSO2، به روشنی بیان‌گر انجام نشدن واکنش PCR است که در این صورت آزمایش PCR تکرار خواهد شد. کنترل داخلی از وب سایت http://wwwuser.gwdg.de/~uatz/FAO انتخاب شد. توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

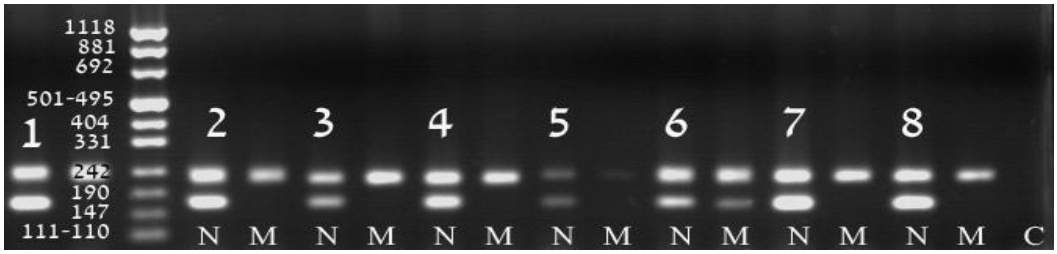
جدول۱- آغازگرهای تکثیر دهنده آلل نرمال و جهش یافته ژن SCID و کنترل داخلی

نام	توالی 5'→3'
SCID-Forward	TGTTGCAAAAGGAGACAGAAT
SCID- Reverse Normal	AGAGTTTAAGGGGAATTCTCTG
SCID- Reverse Mutant	TAGTTTAAGGGGAATTCTCTGAA
HMS02-Forward	ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG
HMS02-Reverse	CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG

غلظت DNA ژنومی در هر واکنش بین ۲۵ تا ۱۰۰ نانو گرم در هر میکرولیتر بود. هر مخلوط PCR ، با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل PCR Buffer 10X، dNTPs ۲ میلی مولار ، کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، آنزیم Taq (۵U/µl) و پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکو مول بر میکرولیتر بود. برنامه PCR شامل ۳۳ چرخه، شامل واسرشته سازی با دمای ۹۴ درجه سانتیگرادبه مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. از دستگاه ترمو سایکلر Gene Amp مدل 9700 بهره گرفته شد. فراورده های PCR بر روی ژل آگارز با خلوص بالا و غلظت ۲ درصد (اینویتروژن) بارگذاری و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. از الگوی نواری به دست آمده با دستگاه ثبت ژل عکس برداری شد. جهت اطمینان از نتیجه آزمایش تعدادی از نمونه ها توالی یابی شدند.

نتایج و بحث

در این تحقیق برای هر DNA ژنومی دو واکنش PCR انجام گرفت و برای هر فرد دو محصول PCR بدست آمد. در مورد پرایمر HMSO2، باندی در حدود ۲۱۸bp تا ۲۳۸bp در هر دو واکنش تشکیل شد اما در مورد پرایمر های اختصاصی SCID، در افراد سالم هموزیگوت فقط یک باند bp ۱۶۹و در افراد هتروزیگوت دو باند bp ۱۶۹ و bp ۱۶۶ تشکیل شد. از ۲۲۸ نمونه‌ای که از جمعیت اسب‌های عرب ایرانی تهیه شده بود، ۳ ناقل (۲ نر و یک ماده) و از ۱۶ نمونه‌ی اسب‌های عرب خارجی، یک ناقل (نر) شناسایی شد (شکل۱).



شکل ۱: الکتروفورزمحصولات ARMS PCR بر روی آگارز اینویتروژن ۲٪ با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی آلل و آغازگر کنترل داخلی. هر دو ستون کنار هم مربوط به DNA ژنومی یک فرد است. نمونه های ستون N با آغازگرهای اختصاصی آلل نرمال SCID و نمونه های ستون M با آغازگرهای

اختصاصی آلل جهش یافته SCID تکثیر شده اند. در هر دو واکنش مربوط به یک فرد، باند حاصل از آغازگر کنترل داخلی(HMSO2) مشاهده می شود. فرد شماره ۶ ناقل و سایر افراد سالم می باشند. ستون C شاهد آب (کنترل منفی) است. . شاخص به کار رفته pUC Mix Marker 8 است.

در سال ۲۰۰۶ پژوهشی بر روی ۱۲۰ اسب نژاد عرب در ایران انجام شد که همه نمونه ها سالم گزارش شدند (Seyedabadi, 2006). این اولین گزارش از وجود آلل ناقل بیماری SCID در جمعیت اسب های نژاد عرب ایرانی است. اسب های ناقل فنوتیپ نرمال دارند و هیچ عواقب منفی در سلامتی و یا فعالیت نشان نمی‌دهند، اما با احتمال ۵۰ درصد می توانند آلل معیوب را به زاده های شان انتقال دهند و ازآنجایی که این بیماری به صورت اتوزومی مغلوب به ارث میرسد در صورت آمیزش دو اسب ناقل ۲۵ درصد احتمال تولد کره مبتلا وجود دارد. اسب نژاد اصیل عرب ایران به عنوان یکی از نژادهای برتر اسب و جد تعدادی از نژادهای دیگر اسب در جهان شناخته شده است. خاستگاه اصلی این اسب ایران بوده و در حال حاضر به نام اسب عرب شناخته می‌شود. در حال حاضر بهترین نوع این اسب در کشورهای غربی، عربی و ایران وجود دارد. در دهه ۱۹۷۰ چند راس اسب عرب از امریکا به ایران وارد و با اسب های عرب ایرانی تلاقی داده شدند بنابراین در بعضی از خطوط خونی اسب عرب به نام های این اسبان وارداتی بر می خوریم. علاوه بر این از اسب های عرب برای ایجاد نژادهای آمیخته از سایر نژادهای اسب های ایران نیز استفاده می گردد. به همین دلیل امکان وارد شدن ژن این بیماری به خزانه ژنی اسب های ایران وجود دارد.

درگذشته تولد کره بیمار مبتلا به SCID و بررسی تست نتّاج تنها راه شناسایی ناقلین بود. از زمان کشف علت ژنتیکی بیماری SCID در اسب های نژاد عرب، چندین کشور، با استفاده از تکنیک های مختلف ملکولی، جهت شناسایی ناقلین این بیماری اقدام نموده‌اند. شرکت Vetgen در امریکا نماینده انحصاری آزمایشات ژنتیکی برای حیوانات اهلی است و نمونه‌ها برای بررسی به آن شرکت ارسال می‌شود. طی سال‌های ۱۹۹۷ تا ۲۰۱۰، ۹۴۵۵ نمونه از سراسر دنیا به این شرکت ارسال شده است که از بین آنها ۱۵۶۰ نمونه، ناقل بیماری بودند(http://www.vetgen.com/equine-references.html. ©2010 AHA). آزمایش تشخیصی در این شرکت، با استفاده از دستگاه DNA آنالایزر و توالی یابی ژن انجام می گیرد. دستگاه DNA آنالایزر بسیار گران است و از طرفی در همه آزمایشگاه‌ها موجود نیست. هدف این طرح شناسایی ناقلین بیماری SCID، با استفاده کیت تشخیصی و براساس واکنش ARMS PCR است. دامنه کاربرد این روش در جامعه عبارتند از:

۱. جلوگیری از خروج ارز جهت ارسال نمونه ها به آزمایشگاه های خارج از کشور و امکان انجام دقیق این آزمایش در کشور.

۲. غربالگری جمعیت اسب های نژاد عرب ایران ، اسب های نژاد عرب وارداتی و اسب های دورگه حاصل از آمیزش اسب های نژاد عرب با سایر نژادها.

۳. مدیریت مناسب در برنامه ی تولید مثلی اسب های ناقل و پیشگیری از تولد کره اسب بیمار و ضررهای اقتصادی ناشی از آن.

۴. درج اطلاعات حاصل از آزمایشات ژنتیکی در شناسنامه اسب ها

نتیجه گیری

هدف این پژوهش طراحی کیت تشخیص بیماری و شناسایی ناقلین با یک روش آسان، ایمن، کم هزینه، سریع و مطمئن است. در این روش از مواد و وسایلی استفاده می شود که علاوه بر این که ارزان هستند، امکان تهیه آن برای همه آزمایشگاه ها وجود دارد.

منابع :

1. Bernoco, D., Bailey, E., 1998. Frequency of the SCID gene among Arabian horses in the USA. Animal Genetics. 29: 41-2.
2. Bailey, E., Reid, R.C., Lear, T.L., Skow, L.C., Mathiason, K., , McGuire, T.C., 1997. Linkage of the gene for equine combined immunodeficiency disease to microsatellite markers HTG8 and HTG4; synteny and FISH mapping to ECA9. Animal Genetics. 28: 268-273
3. Lewin, B., 2008. Genes IX. Louis C, USA , Jones and Bartlett Publisher. Mississauge, Ontario, Canada, p.892
4. Lunn, D.P., McClure, J.T., Schobert. C.S., Holmes, M.A., 1995. Abnormal patterns of equine leucocyte differentiation antigen expression in severe combined immunodeficiency foals suggests the phenotype of normal equine natural killer cells. Immunology. 84: 495-499.
5. McGuire, T.C., Poppie, M.J., 1973Hypogammaglobulinemia and Thymic Hypoplasia in Horses: a Primary Combined Immunodeficiency Disorder. Infection And Immunity. 8: 272-277.
6. Perryman, L.E., Torbeck, R., 1980. Combined immunodeficiency of Arabian horses: confirmation of autosomal recessive mode of inheritance. Journal of the American Veterinary Medical Association.176: 1250–1251.
7. Perryman, L.E., 2004. ANIMAL MODELS Molecular Pathology of Severe Combined Immunodeficiency in Mice, Horses, and Dogs. Veterinary Patholology. 41:95–100.
8. Lunn, D.P., McClure, J.T., Schobert. C.S., Holmes, M.A., 1995. Abnormal patterns of equine leucocyte differentiation antigen expression in severe combined immunodeficiency foals suggests the phenotype of normal equine natural killer cells. Immunology. 84: 495-499.
9. Shin, E.K., Perryman, L.E., Meek, K., 1997a. A kinase-negative mutation of DNA-PKcs in equine SCID results in defective coding and signal joint formation. The Journal of Immunology. 158: 3565-3569.
10. Stubs B, Distl O. Mapping the horse genome and its impact on equine genomics for identification of genes for monogenic and complex traits. Archiv Fur Tierzucht 2007; 50: 15
11. Wiler, R,. Leber, B., Moore, B.B., VanDyk, L.F., Perryman, L.E., Meek, K., 1995. Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V(D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. Proceeding of the Natlional Academy of Science. 92: 11485-90.
12. http://www.vetgen.com/equine-references.html. ©2010 AHA
13. http://wwwuser.gwdg.de/~uatz/FAO2004

Diagnostic kit for carrier of severe combined immunodeficiency disease in Arabian horses

Tarang, A.R*, Shahidzade, R.
a_tarang@hotmail.com*

Severe combined immunodeficiency disease is an autosomal recessive disease that are observed in Arabaian horses. A foals affected by SCID appears to be healthy at birth, but during the first month symptoms appear in them, and because of opportunistic infections dies after 5 months. Molecular defects in disease due to mutations in the DNA-PKcs. DNA-PKcs plays a crucial role in V (D) J recombination. Successful V(D)J recombination is useful in terms of antigen recognition and it is absolutely required for the development and survival of B and T cells. Equuin DNA-PK_{CS} is located on chromosome 9p12. Researches show that deletion of a five-base pair TCTCA, resulting a mutation in frame-shift at codon 3155 and premature stop codon Subsequently kinase activity of the enzyme is lost.In this study, peripheral blood samples of 228 Persian Arab horses, and 16 Foreign Arab horses were prepared. Genomic DNA was extracted using the kit. All sampels were tested by ARMS PCR. 3 horses in the Persian Arab horses and one horse in Foreign Arab horses were recognised as infected and others were clean. This is the first report of the existence of the SCID carriers in the population of Iran's Arab horses. The purpose of this study is design the SCID diagnosis kit to detect carriers with an easy, safe, low cost, fast and reliable methode. Breeding programs for eliminition of disease are much more efficient if the carriers could be detected by testing their genom.

Key word: Severe combined immunodeficiency the disease, Arabian horse, ARMS PCR , Diagnostic kit