

ارتباط توالی اسید آمینه‌های دخیل در عرضه آنتی ژن (BoLA-DRB3) با حساسیت یا مقاومت به اسهال در گوساله‌ها

غلامرضا نیکبخت بروجنی^{۱*}، حسن تاج‌بخش^۲، محمدرضا مخبر دزفولی^۳، تقی زهرایی صالحی^۱، محمد ربانی^۱، داریوش غریبی^۱، سید مهدی امام^۱، فرزانه اسدیان^۱
محمود خرمالی

(۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) دانشگاه تهران و عضو پیوسته فرهنگستان علوم.

(۳) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۳ خرداد ماه ۱۳۸۸، پذیرش نهایی: ۲۸ تیر ماه ۱۳۸۹)

چکیده

ژن مجتمع اصلی سازگاری نسجی (mhc) ملکول‌های MHC کلاس I و II را کد می‌کند که در عرضه پپتیدهای آنتی ژنی به یاخته‌های T نقش دارند. این ملکول‌های پلی مرف نقش مهمی در بروز حساسیت و یا مقاومت به بیماری‌های عفونی دارند. در تحقیق حاضر ارتباط توالی اسید آمینه‌های جایگاه اتصال پپتید آنتی ژنی در آل‌های مختلف BoLA-DRB3 با بروز حساسیت یا مقاومت به اسهال در گوساله‌ها بررسی شد. با بررسی نمونه‌های خون اخذ شده از ۱۷۱ گوساله (۸۴ گوساله اسهالی و ۸۷ گوساله سالم) با استفاده از روش RFLP-PCR دوازده آل مختلف BoLA-DRB3 شناسایی شد. توالی اسید آمینه آل‌ها در ناحیه اتصال به پپتید آنتی ژنی مورد مقایسه قرار گرفت. آل‌های مذکور در این ناحیه ۲۶ جایگاه پلی مرف دارند. ارتباط معنی داری بین وقوع اسهال و حضور اسید آمینه‌های گلو تامیک اسید و ترئونین در پاکت ۴ و اسید آمینه‌های والین، گلو تامین و لوسین در پاکت ۹ ناحیه اتصال آنتی ژن مشاهده شد. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که اسید آمینه‌های موجود در پاکت‌های ۴ و ۹ ملکول BoLA-DRB3 در بروز حساسیت و یا مقاومت به اسهال گوساله‌ها نقش مهمی دارند.

واژه‌های کلیدی: BoLA-DRB3، MHC، PCR-RFLP، اسهال گوساله، ناحیه اتصال پپتید آنتی ژنی.

یونی (پل‌های نمکی) بین پپتید و دیواره‌های رشته‌های مارپیچ آلفا در شیار MHC نیز در اتصال پپتید به ملکول MHC شرکت می‌کنند. از آن جا که بیشتر اسیدهای آمینه درون و یا اطراف شیار ملکول‌های MHC پلی مرف هستند، آل‌های مختلف تمایل به اتصال به پپتیدهای گوناگون را خواهند داشت (۱). با داشتن ملکول‌های MHC متفاوت یک فرد می‌تواند دامنه متنوعی از آنتی ژن‌ها را عرضه نموده و بنابراین قادر به افزایش پاسخ‌های ایمنی مؤثر خواهد بود. از سوی دیگر عدم توان عرضه یک پپتید عفونی زمینه‌های عدم پاسخگویی و حساسیت به بیماری را فراهم می‌سازد. این پدیده است که اهمیت ساختار ژنی MHC را در پاسخ ایمنی یا به عبارتی حساسیت و مقاومت به بیماری‌ها نشان می‌دهد. ملکول‌های متنوع MHC با قابلیت ایجاد نوع پاسخ‌های ایمنی ارتباط نزدیکی دارند. مقاومت یا افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌های عفونی یکی از مواردی است که ارتباط آن با MHC در انسان و حیوانات مورد بررسی قرار گرفته است (۵).

ژن MHC گاو (BoLA) در ناحیه کلاس دو شامل جایگاه‌های DR، DQ، DO، DY و DI می‌باشد (۲۴). در این میان لوکوس DR شامل سه ژن DRB و یک ژن DRA است. از بین سه ژن DRB، بیان ژن DRB3 غالب بوده و چند شکلی وسیعی را نشان می‌دهد. معمولاً تنوع ژن‌های MHC کلاس دو منحصر به‌آزون ۲ بوده که دامنه I را در ناحیه اتصال به پپتید رمز می‌کند. ژن DRB2 در سطح بسیار کمی بیان شده، DRB1 ژنی کاذب

مقدمه

پیوند پپتید به ملکول‌های MHC واکنشی غیر کووالان است که با کمک اسید آمینه‌های موجود در پپتید و شیار ملکول MHC انجام می‌شود. آنتی ژن‌های پروتئینی در سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن شکسته شده و پپتیدهایی را بوجود می‌آورند که به ملکول‌های MHC متصل می‌شوند، سپس مجموعه‌های پپتید - MHC به لنفوسیت‌های T کمکی عرضه می‌گردند.

در ملکول‌های MHC ورقه‌های مسطح بتای کف شیار تورفتگی‌های یا پاکت‌هایی دارند که نقش مهمی را در اتصال به پپتیدهای آنتی ژنی ایفا می‌کنند. به این بخش از ملکول MHC ناحیه اتصال به پپتید می‌گویند. اسید آمینه‌های یک پپتید در این ناحیه به خوبی جای می‌گیرند و با پیوندهای آبگریز به اسید آمینه‌های مکمل در ملکول MHC متصل می‌شوند. اسید آمینه‌های متصل شونده در ساختار پپتید را لنگر می‌نامند، زیرا باعث اتصال مناسب پپتید به ملکول MHC می‌شود. لنگرها در وسط یا دو سر پپتید قرار دارند و هر پپتید بطور معمول یک تادو اسید آمینه لنگری دارد. اتصال یک یا دو اسید آمینه از پپتید به MHC باعث آزادی سایر اسید آمینه‌های پپتید متصل شونده خواهد شد. بنابر این امکان تنوع بیشتر برای اسید آمینه‌هایی فراهم خواهد شد که توسط سلول‌های T اختصاصی شناسایی می‌شوند. پیوندهای هیدروژنی یا



	10	20	30	40	50	60	70	80																		
BoLA-DRB3*0101	EY	SKSECHFFNGT	ERVRF	LD	DRYYT	NGEET	TVRFD	SDWGE	FRAVTE	LG	RQDAE	Y	WNS	SQ	KDF	LEEK	RAE	VDR	VCR	HNY	GGM					
BoLA-DRB3*1501	...	T	...	Y	...	FH	...	F	...	Y	...	RV	...	QL	...	G	...	T	...	RE	...	Y	...	TY	...	VV
BoLA-DRB3*2701	...	Y	...	R	...	D	...	C	...	Y	...	P	...	R	...	R	...	VG								
BoLA-DRB3*1602	...	T	...	K	...	FH	...	F	...	Y	...	P	...	L	...	R	...	N	...	TY	...	VG				
BoLA-DRB3*2003	...	C	...	R	...	L	...	FY	...	R	...	P	...	QR	...	A	...	TY	...	VV						
BoLA-DRB3*1201	...	T	...	K	...	N	...	FH	...	F	...	Y	...	P	...	EI	...	RA	...	A	...	TY	...	VG		
BoLA-DRB3*2601	...	T	...	K	...	FH	...	F	...	Y	...	RV	...	Q	...	T	...	RA	...	A	...	TY	...	VG		
BoLA-DRB3*1101	Q	H	...	G	...	L	...	HFY	...	Y	...	D	...	PS	...	RR	...	T	...	VV						
BoLA-DRB3*0701	...	C	...	R	...	CFH	...	F	...	Y	...	RV	...	Q	...	R	...	VV								
BoLA-DRB3*3101	...	Y	...	G	...	HFY	...	F	...	Y	...	PA	...	H	...	Q	...	V								
BoLA-DRB3*0601	...	C	...	R	...	L	...	CFH	...	F	...	RV	...	HL	...	EI	...	R	...	T	...	VG				
BoLA-DRB3*2704	...	Y	...	R	...	CFH	...	F	...	Y	...	PA	...	R	...	VG										

تصویر ۲- توالی اسید آمینه‌ای آلل‌های متفاوت که در این تحقیق مشخص شده‌اند.

مدیریت) جهت مطالعه انتخاب شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون بر اساس روش Miretti و همکاران انجام گرفت (۱۶).

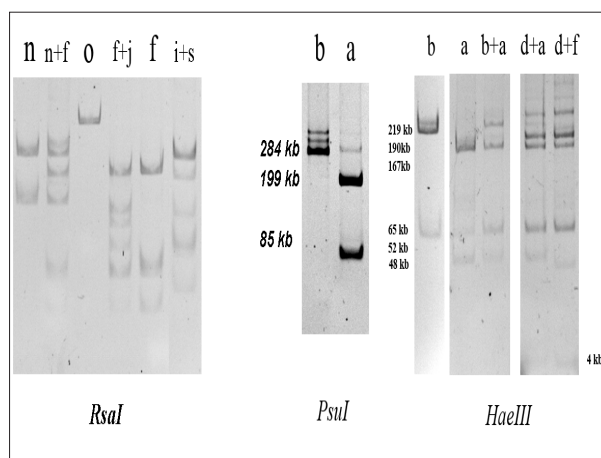
افزوده سازی ژن BoLA-DRB3*2: جهت بررسی تنوع دومین اگزون ژن BoLA-DRB3 از روشی که van Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ ارائه نموده بودند استفاده گردید (۲۶). در ابتدا ژن مذکور با روش PCR seminested در شرایط زیر افزوده شد. مرحله اول واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱/۵ میلی مولار MgCl₂ (شرکت سیناژن)، ۲۰۰ میکرومولار dNTP (شرکت سیناژن)، ۰/۴ میلی مولار پرایمرهای

5'-TTTAAATTCGCGCTCACCTCGCCGCT-3' و

5'-ATCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC-3' (HL030)

HL031

۱ واحد Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) و ۱ میکرو لیتر DNA بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۱۰ چرخه سه مرحله‌ای، شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. در مرحله دوم واکنش غلظت‌ها مشابه مرحله اول بود با این تفاوت که در حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر، پرایمر ۳' به جای 5'-TCGCCGCTGCAGTGAAACTCTC (HL032) به جای پرایمر HL031 استفاده شد. در مرحله دوم ۲ میکرو لیتر از محصول واکنش مرحله اول به عنوان الگو استفاده شد. چرخه‌های حرارتی مرحله دوم شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۲۵ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. در نهایت ۵ میکرو لیتر از محصول مرحله دوم روی ژل آگارز ۱ درصد الکترو فورز شد تا کیفیت و طول قطعه



تصویر ۱- الگوهای حاصل از برش آنزیم‌های RsaI، PstI و HaeIII.

است و تک ژن DRA نیز تنوعی ندارد (۱۱، ۲۱، ۲۴).

به دلیل نقش کلیدی BoLA در پاسخ‌های ایمنی گاو مطالعات بسیاری روی این ژن انجام شده است. گزارشات زیادی مبنی بر ارتباط BoLA با خصوصیات ایمونولوژیک، مقاومت یا حساسیت نسبت به بیماری‌های مختلف عفونی مانند: لوکوز انزوتیک گاو (EBL)، اورام پستان، تب برفکی و تیلریوز گاو و همچنین خصوصیات تولیدی در گاو هلشتاین وجود دارد (۲۸، ۲۷، ۲۵، ۲۳، ۲۲، ۱۹، ۱۸، ۱۶، ۱۴، ۱۳، ۱۲).

در این تحقیق سعی بر آن بوده تا ارتباط آلل‌های BoLA DRB3 و توالی اسید آمینه‌ای این آلل‌ها در گاوهای هلشتاین ایران با ابتلا و عدم ابتلا به اسهال در گوساله‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری و استخراج DNA: در این بررسی در مجموع ۱۷۱ نمونه خون کامل (حاوی EDTA) شامل ۸۴ نمونه خون گوساله‌های اسهالی با سن حداکثر چهارده روز و ۸۷ نمونه خون گوساله‌های سالم با سن دو هفته از نژاد هلشتاین که سابقه اسهال نداشته‌اند از یک گاو داری (تحت یک



جدول ۱- آلل‌های BoLA-DRB3 مشخص شده در این تحقیق.

مجموع	اسهالی = ۱۶۸n		سالم = ۱۷۴n		Restriction patterns RsaI/PsuI/HaeIII	BoLA-DRB3	BoLA-DRB3.2, RFLP alleles
	n %		n %				
۵۹	۱۴/۲۸	۲۴	/۱۱	۲۵	nbb	DRB3.2*0101	DRB3.2*24
۲۴	۱۰/۱۱	۱۷	۴/۰۲	۷	jbd	DRB3.2*1501	DRB3.2*16
۹۶	۲۳/۸۰	۴۰	۳۲/۱۸	۵۶	nba	DRB3.2*2701	DRB3.2*23
۹۶	۲۸/۵۷	۴۸	۲۷/۵۸	۴۸	fba	DRB3.2*1602	DRB3.2*10
۸	۲/۹۷	۵	۱/۷۲	۳	iba	DRB3.2*1603	DRB3.2*15
۳۴	۱۰/۷۱	۱۸	۹/۱۹	۱۶	faa	DRB3.2*1201	DRB3.2*08
۳	۱/۷۸	۳	.	.	sbb	DRB3.2*2601	DRB3.2*19
۱	.	.	./۵۷	۱	mba	DRB3.2*1101	DRB3.2*22
۱	./۵۹	۱	.	.	obb	DRB3.2*0701	DRB3.2*28
۱	.	.	./۵۷	۱	obf	DRB3.2*3101	DRB3.2*27
۳	۱/۱۹	۲	./۵۷	۱	oab	DRB3.2*0601	DRB3.2*26
۱۶	۵/۹۵	۱۰	۳/۴۴	۶	nbf	DRB3.2*2704	DRB3.2*33

مورد مطالعه با استفاده از نرم افزار Bioedit Ver.7.0.5.3 انجام گرفت. پس از شناسایی جایگاه‌هایی که دارای اسید آمینه‌های مختلفی بودند، فراوانی هر اسید آمینه در جایگاه‌های پلی مرف در هر دو گروه بیمار و سالم مشخص گردید.

ارتباط حضور هر اسید آمینه با وقوع بیماری یا حضور در گروه سالم با استفاده از نرم افزار SPSS Ver.16 با توجه به شاخص‌های مربع کای و آزمون Fisher's exact تعیین گردید.

نتایج

پس از بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه‌ها، در نهایت ۵ الگوی متفاوت (f, j, n, o, s) در برش آنزیم RsaI، ۲ الگوی متفاوت (a, b) در برش آنزیم PsuI و ۴ الگوی متفاوت (a, b, d, f) در برش آنزیمی HaeIII مشاهده گردید (تصویر ۱).

در نهایت ۱۲ آلل مختلف به شرح زیر مشخص گردید:

*24(nbb), *26(oab), *27(obf), *28(obb), *33(nbf),
*10(fba), *15(iba), *16(jbd), *19(sbb), *22(mba), *23(nba),
DRB3.2 *08(faa),

درصد فراوانی هر یک از این آلل‌ها با استفاده از نرم افزار Popgene32 مشخص شد. الگوی قطعات به دست آمده، آلل‌ها و درصد فراوانی هر آلل در جدول ۱ ارائه گردیده است. آلل 10* دارای بیشترین فراوانی در گروه اسهالی (۲۸/۵۷ درصد) و آلل 23* نیز دارای بیشترین فراوانی (۳۲/۱۸ درصد) در گروه سالم است. قابل ذکر است آلل‌های 22* و 27* تنها در گروه سالم و آلل‌های 19* و 28* تنها در گروه اسهالی دیده شدند. جهت بررسی و تطبیق (Alignment) تنوع توالی اسید آمینه‌ای آلل‌های متفاوت که در این تحقیق مشخص شده‌اند، توالی نوکلئوتیدی آلل‌های فوق پس از ترجمه بر اساس توالی اسید آمینه‌ای مشخص در ناحیه اتصال

تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گیرد (۲۰، ۱۶، ۱۵).

آزمون بررسی تنوع طول قطعات محدود شده (RFLP): استفاده از آنزیم‌ها و مراحل کار بر اساس روش پیشنهادی van Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲ بود (۲۶). سه آنزیم محدود کننده (RsaI (Roche, Germany), PsuI (Fermentas, Germany) و HaeIII (Roche, Germany) جهت برش محصولات PCR و انجام آزمون RFLP استفاده شد. هضم آنزیمی روی ۵ تا ۱۰ میکرولیتر از محصول مرحله دوم PCR با طول ۲۸۴ جفت باز انجام گرفت و محصولات بریده شده در کنار نشانگر (Germany), MspI-digested pBR322 (Fermentas) روی ژل اکرلامید ۱۲ درصد به مدت یک ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت الکتروفورز و سپس با اتیدیوم برآمید رنگ آمیزی شد. تصاویر ژل‌ها توسط دستگاه UV ترانس ایلومیناتور ثبت شدند.

آنالیز داده‌ها: تصاویر بدست آمده از ژل‌ها به کمک نرم افزار 99.03 Photo-captMw Ver. برای هر نمونه اطلاعات مربوط به برش هر سه آنزیم با الگوهای مشخص شده توسط van Eijk و همکاران در سال ۱۹۹۲، Gelhaus و همکاران در سال ۱۹۹۵ و Maillard و همکاران در سال ۱۹۹۹ مقایسه و الگوهای موجود شناسایی گردیدند. ترکیب الگوهای بدست آمده از مجموع سه آنزیم برای هر نمونه تعیین شد و پس از شناسایی شماره الگوی PCR-RFLP، آلل‌های موجود مشخص گردید (۲۶، ۱۳، ۸).

توالی نوکلئوتیدی‌ها و اسید آمینه‌های مربوط به آلل‌های موجود در هر گروه از پایگاه اطلاعاتی تنوع ایمونونومی (IPD Database Institute (EBI) متعلق به سایت رسمی (Immuno Polymorphism European Bioinformatic) اخذ گردید (>www.ebi.ac.uk/ipd). آخرین به روز رسانی (18.2.2008).

تطبیق توالی اسیدهای آمینه مربوط به آلل‌های موجود در جمعیت



جدول ۲- بررسی آماری موقعیت‌های پلی مرف توالی اسید آمینه‌ای ناحیه PBR از زنجیره مولکول DR مجتمع اصلی سازگاری نسجی کلاس II در گاوهای اسهالی و سالم. * فنیل آلانین: F، تیروزین: Y، تریپتوفان: W، هیستیدین: H، لیزین: K، آرژینین: R، گلوتامین: Q، آسپارژین: N، گلوتامیک اسید: E، آسپارتیک اسید: D، سرین: S، ترئونین: T، گلیسین: G، پرولین: P، آلانین: A، والین: V، متیونین: M، ایزولوسین: I، لوسین: L، سیتئین: C.

P	سالم (n=174)		اسهالی (n=168)		نوع اسید آمینه*	موقعیت اسید آمینه
	n %	n %	n %	n %		
۰/۴۹۹	۹۸/۵۸	۱۷۲	۱۰۰	۱۶۸	E	aa-9
۰/۴۹۹	۱/۱۵	۲	۰	۰	Q	
۰/۹۵۴	۲۴/۱۳	۴۲	۲۴/۴	۴۱	S	aa-11
۰/۲۰۵	۳۶/۲	۶۳	۲۹/۷۶	۵۰	Y	
۰/۴۱۶	۳۶/۷۸	۶۴	۴۱/۰۷	۶۹	T	
۰/۲۱۶	۲/۳۹	۴	۴/۷۶	۸	C	
۱/۰۰۰	۰/۵۷	۱	۰	۰	H	
۰/۰۲۷	۹۵/۹۷	۱۶۷	۸۹/۸۸	۱۵۱	K	aa-12
۰/۰۲۷	۴/۰۲	۷	۱۰/۱۱	۱۷	T	
۰/۹۵۴	۲۴/۱۳	۴۲	۲۴/۴	۴۱	S	aa-13
۰/۵۱۲	۳۷/۹۳	۶۶	۳۴/۵۲	۵۸	R	
۰/۴۱۶	۳۶/۷۸	۶۴	۳۵/۱۱	۵۹	K	
۰/۴۹۹	۱/۱۵	۲	۰	۰	G	
۰/۰۸۵	۶۷/۸۱	۱۱۸	۷۶/۱۹	۱۲۸	N	aa-19
۰/۰۸۵	۳۲/۱۸	۵۶	۲۳/۸	۴۰	D	
۰/۰۲۶	۹۳/۱۰	۱۶۲	۸۵/۷۱	۱۴۴	F	
۰/۰۲۷	۴/۰۲	۷	۱۰/۱۱	۱۷	Y	aa-26
۰/۵۱۶	۲/۸۷	۵	۴/۱۶	۷	L	
۰/۲۵۹	۶۲/۶۴	۱۰۹	۶۸/۴۵	۱۱۵	Y	
۰/۳۶۳	۳۶/۲۰	۶۳	۳۱/۵۴	۵۳	C	aa-30
۰/۴۹۹	۱/۱۵	۲	۰	۰	H	
۰/۰۰۸	۵۲/۲۹	۹۱	۳۸/۰۹	۶۴	Y	
۰/۰۰۸	۴۷/۷۰	۸۳	۶۱/۹	۱۰۴	F	aa-31
۰/۰۰۸	۵۲/۲۹	۹۱	۳۸/۰۹	۶۴	T	
۰/۰۰۹	۴۴/۸۲	۷۸	۵۸/۹۲	۹۹	H	aa-32
۱/۰۰۰	۲/۸۷	۵	۲/۹۷	۵	Y	
۰/۰۲۱	۵۲/۲۹	۹۱	۳۹/۸۸	۶۷	T	
۰/۰۳	۴۵/۴۰	۷۹	۵۷/۱۴	۹۶	F	aa-37
۰/۴۹۶	۱/۷۲	۳	۲/۹۷	۵	R	
۱/۰۰۰	۰/۵۷	۱	۰	۰	Y	
۱/۰۰۰	۹۹/۴۲	۱۷۳	۱۰۰	۱۶۸	G	aa-45
۱/۰۰۰	۰/۵۷	۱	۰	۰	D	
۰/۰۵۴	۵۹/۱۹	۱۰۳	۴۸/۸	۸۲	F	aa-47
۰/۰۵۴	۴۰/۸۰	۷۱	۵۱/۱۹	۸۶	Y	
۰/۱۵۴	۲۰/۱۱	۳۵	۱۴/۲۸	۲۴	Q	aa-56
۰/۰۰۳	۴/۵۹	۸	۱۳/۶۹	۲۳	R	
۰/۴۹۳	۷۵/۲۸	۱۳۱	۷۲/۰۲	۱۲۱	P	
۰/۰۰۶	۹۰/۸۰	۱۵۸	۸۰/۳۵	۱۳۵	D	aa-57
۰/۰۰۳	۴/۵۹	۸	۱۳/۶۹	۲۳	V	
۱/۰۰۰	۰/۵۷	۱	۰	۰	S	
۰/۴۱۲	۴/۰۲	۷	۵/۵۹	۱۰	A	
۰/۰۰۷	۹۴/۸۲	۱۶۵	۸۶/۳۰	۱۴۵	Y	aa-60
۰/۰۰۴	۴/۰۲	۷	۱۲/۵۰	۲۱	Q	
۱/۰۰۰	۱/۱۵	۲	۱/۱۹	۲	H	
۰/۰۲۱	۹۵/۴۰	۱۶۶	۸۸/۶۹	۱۴۹	W	aa-61
۰/۰۲۱	۴/۵۹	۸	۱۱/۳۰	۱۹	L	
۰/۰۲۷	۹۵/۹۷	۱۶۷	۸۹/۸۸	۱۵۱	S	aa-63
۰/۰۲۷	۴/۰۲	۷	۱۰/۱۱	۱۷	G	
۰/۵۲۵/۵۲۵	۹۰/۲۲	۱۵۷	۸۸/۰۹	۱۴۸	D	aa-66
۰/۰۴۲	۹/۷۷	۱۷	۱۱/۹۰	۲۰	E	
۰/۰۰۷	۵۸/۶۲	۱۰۲	۴۷/۶۱	۸۰	F	aa-67
۰/۸۳۹	۴/۰۲	۷	۱۱/۹۰	۲۰	T	
۰/۵۲۵	۲۷/۵۸	۴۸	۲۸/۵۷	۴۸	L	



P	سالم (n=۱۷۴)		اسهالی (n=۱۶۸)		نوع اسید آمینه*	موقعیت اسید آمینه
	n %	n %	n %	n %		
۰/۰۴۰	۹/۷۷	۱۷	۱۱/۹۰	۲۰	I	aa-67
۰/۰۴۰	۵۵/۷۴	۹۷	۴۴/۶۴	۷۵	E	aa-70
۰/۰۵۳	۴۱/۹۵	۷۳	۵۲/۳۸	۸۸	R	
۰/۷۴۷	۲/۲۹	۴	۲/۹۷	۵	Q	aa-70
۰/۳۷۳	۴۸/۸۵	۸۵	۴۴/۰۴	۷۴	K	
۰/۰۲۷	۴/۰۲	۷	۱۰/۱۱	۱۷	E	aa-70
۰/۳۷۵	۳۷/۹۳	۶۶	۳۳/۳۳	۵۶	R	
۰/۳۲۵	۹/۱۹	۱۶	۱۲/۵۰	۲۱	A	aa-74
۰/۰۳۱	۵۷/۴۷	۱۰۰	۴۵/۸۳	۷۷	E	
۰/۰۲۷	۴/۰۲	۷	۱۰/۱۱	۱۷	Y	aa-74
۰/۸۳۹	۲۷/۵۸	۴۸	۲۸/۵۷	۴۸	N	
۰/۲۱۳	۱۰/۹۱	۱۹	۱۵/۴۷	۲۶	A	aa-77
۰/۰۳۱	۵۶/۳۲	۹۸	۴۴/۶۴	۷۵	R	
۰/۰۳۱	۴۳/۶۷	۷۶	۵۵/۳۵	۹۳	T	aa-78
۰/۰۳۱	۵۷/۴۷	۱۰۰	۴۵/۸۳	۷۷	V	
۰/۰۳۱	۴۲/۵۲	۷۴	۵۴/۱۶	۹۱	Y	aa-85
۰/۰۹۲	۲۱/۲۶	۳۷	۱۴/۲۸	۲۴	G	
۰/۰۹۲	۷۸/۷۳	۱۳۷	۸۵/۷۱	۱۴۴	V	aa-86
۰/۱۵۴	۲۰/۱۱	۳۵	۱۴/۲۸	۲۴	M	
۰/۰۶۱	۷/۴۷	۱۳	۱۳/۶۹	۲۳	V	aa-86
۰/۹۳۶	۷۲/۴۱	۱۲۶	۷۲/۰۲	۱۲۱	G	

بوده است ($p < 0.05$) (جدول ۲).

بحث

ناحیه اتصال به پپتید آنتی ژنی یا PBR با دامنه‌های ۱± و ۱± ملکول‌های MHC II شکل می‌گیرد. این جایگاه ترکیبی است از دو دیواره مارپیچ ± و بستری متشکل از ۸ صفحه موازی و در جهت‌های مخالف. ناحیه PBR محل وقوع تنوع وسیع ملکول‌های MHC II است. زنجیرهای جانبی اسید آمینه‌های PBR یک ساختار سه بعدی غیر متداول را تشکیل می‌دهند که شامل فرورفتگی‌ها (پاکت‌ها) و برآمدگی‌هایی است. پاکت‌ها جایگاه‌هایی هستند که با اسید آمینه‌های خاصی از پپتید آنتی ژنی متصل می‌شوند که اسید آمینه‌های لنگر نام گرفته‌اند. بیشترین تنوع ناحیه PBR در این پاکت‌ها متمرکز است. ملکول MHC II دارای ۴ پاکت می‌باشد که P1، P4، P6 و P9 نام دارند (۱۷). جایگاه‌های اسید آمینه‌ای تشکیل دهنده پاکت‌های BoLA-DR به این ترتیب است: پاکت ۱ در برگزیده اسید آمینه‌های ۸۲، ۸۶ و ۸۹ می‌باشد، پاکت ۴ شامل جایگاه‌های ۱۳، ۷۰، ۷۱، ۷۴ و ۷۸ بوده، پاکت ۶ تنها شامل جایگاه ۱۱ است و پاکت ۹ در برگزیده جایگاه‌های ۹، ۳۷، ۵۷، ۶۰ و ۶۱ می‌باشد (۲۲). جدول ۳ ترکیب اسید آمینه‌های هر پاکت را نشان می‌دهد.

در این تحقیق از روش PCR-RFLP جهت مشخص نمودن آلل‌های MHC گاوها در دو گروه اسهالی و غیر اسهالی استفاده شد. آلل 10* دارای بیشترین فراوانی در گروه اسهالی (۲۸/۵۷ درصد) و آلل 23* نیز دارای بیشترین فراوانی (۲۲/۱۸ درصد) در گروه سالم بوده است. قابل ذکر

به پپتید با یکدیگر مطابقت داده شدند (تصویر ۲). از مجموع توالی ۹۰ اسید آمینه‌ای رمز شده توسط آگزون دوم ژن BoLA-DRB3، ۲۶ جایگاه پلی مرف در آلل‌های جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. یک جایگاه (۱۱) با ۵ اسید آمینه متفاوت بیشترین تنوع را نشان داد و پس از آن ۶ جایگاه (۱۳، ۳۷، ۵۷، ۶۷، ۷۱، ۷۴) با ۴ اسید آمینه، ۷ جایگاه (۲۶، ۳۰، ۳۲، ۵۶، ۶۰، ۷۰، ۸۶) با ۳ اسید آمینه و ۱۲ جایگاه (۹، ۱۲، ۱۹، ۳۱، ۴۵، ۴۷، ۶۱، ۶۳، ۶۶، ۷۷، ۷۸، ۸۵) با ۲ اسید آمینه متفاوت مشخص شدند.

نتایج آزمون‌های آماری نشان داد که حضور اسید آمینه لیزین (K) در جایگاه‌های ۱۲ و ۷۱، اسید آمینه فنیل آلانین (F) در جایگاه‌های ۲۶ و ۶۷، اسید آمینه تیروزین (Y) در جایگاه‌های ۳۱ و ۶۰، اسید آمینه ترئونین (T) در جایگاه‌های ۳۲ و ۳۷، اسید آمینه آسپارتیک اسید (D) در جایگاه ۵۷، اسید آمینه تریپتوفان (W) در جایگاه ۶۱، اسید آمینه سرین (S) در جایگاه ۶۳، اسید آمینه گلوتامیک اسید (E) در جایگاه‌های ۷۰ و ۷۴، اسید آمینه آرژینین (R) در جایگاه ۷۷ و اسید آمینه والین (V) در جایگاه ۷۸ در گروه سالم معنی دار بوده است ($p < 0.05$).

همچنین اسید آمینه ترئونین در جایگاه‌های ۱۲ و ۷۷، اسید آمینه تیروزین در جایگاه‌های ۲۶، ۷۴ و ۷۸، اسید آمینه فنیل آلانین در جایگاه ۳۱، اسید آمینه هیستیدین (H) در جایگاه ۳۲، اسید آمینه آرژینین در جایگاه ۵۶، اسید آمینه والین در جایگاه ۵۷، اسید آمینه گلوتامین (Q) در جایگاه ۶۰، اسید آمینه لوسین (L) در جایگاه ۶۱، اسید آمینه گلیسین (G) در جایگاه ۶۳ و اسید آمینه E در جایگاه ۷۱ در گروه بیمار از نظر آماری معنی دار



بررسی شد. به این ترتیب نوع و موقعیت اسید آمینه‌هایی که حضور آن‌ها در گروه‌های سالم و بیمار معنی‌دار بود به دست آمد و سپس حضور این اسید آمینه‌ها در پکت‌های MHC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور اسید آمینه‌های K (وضعیت ۷۱)، E (وضعیت‌های ۷۴، ۷۰) و V (وضعیت ۷۸) در پکت ۴ و اسید آمینه‌های Y (وضعیت ۶۰)، T (وضعیت ۳۷)، D (وضعیت ۵۷) و W (وضعیت ۶۱) در پکت ۹ در گروه سالم معنی‌دار بوده است. در حالی که حضور اسید آمینه‌های Y (وضعیت‌های ۷۴، ۷۰) و E (وضعیت ۷۱) در پکت ۴ و اسید آمینه‌های V (وضعیت ۵۷)، Q (وضعیت ۶۰) و L (وضعیت ۶۱) در پکت ۹ در گروه بیمار معنی‌دار بود (جدول ۳).

با مقایسه وضعیت‌های از پکت‌ها که حضور اسید آمینه خاصی در آن‌ها با وقوع یا عدم وقوع اسهال رابطه معنی‌داری دارد به این نتیجه می‌رسیم که وضعیت‌های ۷۴، ۷۱ و ۷۸ در پکت ۴ و وضعیت‌های ۵۷، ۶۰ و ۶۱ در پکت ۹ هم در بروز حساسیت و هم وقوع مقاومت به اسهال نقش دارند، به عبارت دیگر در پکت ۴ حضور اسید آمینه‌های E، K و V به ترتیب در وضعیت‌های ۷۱، ۷۴ و ۷۸ با مقاومت به اسهال و حضور اسید آمینه‌های V، Q و L در همین وضعیت‌ها با حساسیت به اسهال رابطه معنی‌داری دارند. در پکت ۹ نیز در وضعیت‌های ۵۷، ۶۰ و ۶۱ چنین وضعیتی را دارند. به طور کلی می‌توان اظهار داشت که تعویض اسید آمینه در وضعیت‌های فوق به هر دو حالت حساسیت و مقاومت منجر گشته ولی در سایر وضعیت‌ها (وضعیت ۷۰ در پکت ۴ و ۳۷ در پکت ۹) تنها با حالت سالم مرتبط است. پیش از این مطالعات بسیاری ارتباط بین اسید آمینه‌های موجود در پکت‌های مختلف را با مقاومت یا حساسیت به بیماری‌های عفونی گاو مشخص نموده‌اند. اسید آمینه وضعیت ۷۴ در پکت ۴ با حساسیت نسبت به عفونت استافیلوکوکی در ورم پستان مرتبط است (۲۲). در مورد آلودگی با ویروس لکوز گاوی نیز حضور اسید آمینه‌های گلوتامین و آرژینین در موقعیت‌های ۷۰ و ۷۱ پکت ۴ با مقاومت نسبت به لنفوسیتوز پایدار ارتباط دارد، همچنین آلل‌هایی که واجد اسید آمینه‌های گلوتامین و والین در موقعیت‌های ۷۴ و ۷۸ پکت ۴ می‌باشند، ممکن است در برابر شکل‌گیری تومور مقاوم باشند (۱۰). در بررسی دیگری رابطه معنی‌داری بین الگوی (Motif) اسید آمینه‌ای EIAY در وضعیت‌های ۶۶، ۶۷، ۷۴ و ۷۸ ملکول BoLA-DRB3.2 و مقاومت به درماتوفیلوز در بز نشان داده شده است (۱۲). تحقیق حاضر نیز نشان دهنده اهمیت و نقش اسید آمینه‌های پکت‌های ۴ و ۹ در وقوع حساسیت یا مقاومت به اسهال می‌باشد.

اسید آمینه‌های وضعیت ۱۱ بیشترین تنوع در آلل‌های مورد مطالعه برخوردار بود. وضعیت ۱۱ همان پکت ۶ است و وجود تنوع در این جایگاه دور از انتظار نیست ولی در ارتباط این جایگاه با مقاومت و حساسیت به بیماری هیچ‌گونه ارتباط معنی‌داری بدست نیامد که حاکی از احتمال عدم دخالت موثر این وضعیت در ساختار عرضه آنتی ژن‌های عامل بیماری است.

جدول ۳- اسید آمینه‌های مختلف موجود در پکت‌های DR-BoLA در آلل‌های مختلف BoLA-DRB3.2. اسید آمینه قرمز (تیره) با مقاومت و سبز (روشن) با حساسیت مرتبط است. محل و شماره اسید آمینه‌های هر پکت‌ها منطبق بر داده‌های Sharif و همکاران در سال ۲۰۰۰ تنظیم شده‌اند.

پاکت ۹	پاکت ۶	پاکت ۴	پاکت ۱	Alleles
37, 57, 60, 61 9,	11	70, 71, 74, 78 13,	82, 86, 89 *	
ETDYW	S	SEKEV	NNF	DRB3.2*0101
EFVQL	S	SREYY	NVF	DRB3.2*1501
ETDYW	Y	REREV	NGF	DRB3.2*2701
EFDYW	T	KRKNY	NGF	DRB3.2*1602
ERDYW	C	RQRAY	NVF	DRB3.2*2003
EFDYW	T	KRAAY	NGF	DRB3.2*1201
ETVQW	T	KRAAY	NGF	DRB3.2*2601
QYSYW	H	GRREV	NVF	DRB3.2*1101
EFVQW	C	REREV	NVF	DRB3.2*0701
EFAHW	Y	GQKEV	NVF	DRB3.2*3101
EFVHL	C	RRKEV	NGF	DRB3.2*0601
EFAYW	Y	REREV	NGF	DRB3.2*2704

است آلل‌های ۲۲* و ۲۷* تنها در گروه سالم و آلل‌های ۱۹* و ۲۸* تنها در گروه اسهالی دیده شدند (جدول ۱). در سایر مطالعات نیز ارتباط آلل‌های MHC با حساسیت یا مقاومت به بیماری‌های مختلف در گاو بررسی شده است. به عنوان مثال آلل‌های ۲۲*، ۲۴*، ۲۷*، ۲۸*، ۱۶*، ۸*، ۲-DRB3-BoLA حساس به بیماری لکوز گاو معرفی شده‌اند و همچنین یک ارتباط معنی‌داری بین آلل‌های ۱۷۰۱*، ۰۹۰۲-DRB3.2-BoLA و تیتراژ پایین آنتی بادی در برابر پروتئین‌های اصلی ساختمانی ویروس لکوز گاوی gp51 (env) و gag p24 مشخص شده است (۲۸، ۲۷، ۹). آلل‌های ۲۷*، ۲۰*، ۱۶*، ۱۸-DRB3.2-BoLA به آلودگی کنه microplus ۱۸* به تب برفکی حساس بوده و آلل‌های ۲۲*، ۲۳*، ۱۲-DRB3.2-BoLA نیز در ارتباط با حساسیت به ورم پستان استافیلوکوکی معرفی شده‌اند (۲۲، ۱۴، ۷). در یک مطالعه نیز ارتباط آلل‌های گوناگون ۲-DRB3-BoLA با افزایش مقادیر شمارش سلول‌های سوماتیک، درصد پروتئین و چربی شیر بررسی شد و نتایج نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین آلل ۸* و افزایش مقادیر SCC (که بیانگر افزایش احتمال ابتلا به ورم پستان تحت بالینی است) وجود دارد. ارتباط بین آلل‌های ۱۱* و ۲۲* با درصد چربی شیر و آلل‌های ۲۲* و ۲۴* با درصد پروتئین شیر نیز مشخص گردید (۱۹).

در این تحقیق جزئیات بیشتری در ساختار محل عرضه آنتی ژن مورد بررسی قرار گرفته است. پس از مشخص نمودن توالی اسید آمینه آلل‌ها ارتباط معنی‌دار هر اسید آمینه در زنجیر پپتیدی با موارد اسهال و سالم



References

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pallai, S. (2007) Cellular and molecular immunology. (6th ed.). Saunders company. Philadelphia, USA.
2. Alizadeh, Z., Karrow, N., Mallard, B. A. (2003) Biological effect of varying peptide binding affinity to the BoLA-DRB3*2703 allele. *Genet. Sel Evol.* 1: 51-65.
3. Ballingall, K. T., Luyai, A., Rowlands, G. J., Sales, J., Musoke, A. J., Morzaria, S. P., McKeever, D. J. (2004) Bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*2703 and DRB3*1501 alleles are associated with variation in levels of protection against *Theileria parva* challenge following immunization with the sporozoite p67 antigen. *Infect. Immun.* 72: 2738-2741.
4. da Mota, A. F., Gabriel, J. E., Martinez, M. L., Coutinho, L. L. (2002) Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (*Bos indicus*). *Eur. J. Immunogenet.* 29: 223-227.
5. Delves, P., Seamus, M., Burton, D., Roitt, I. (2006) Roitt, s Essential Immunology. (11th ed.). Blackwell publishing. London, UK.
6. Dietz, A. B., Detilleux, J. C., Freeman, A. E., Kelley, D. H., Stabel, J. R., Kehrli, M. E. (1997) Genetic association of bovine lymphocyte antigen DRB3 alleles with immunological traits of Holstein cattle. *J. Dairy. Sci.* 80: 400-405.
7. Garcia-Briones, M. M., Russell, G. C., Oliver, R. A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., Palma, E. L., Sobrino, F., Glass, E. J. (2001) Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine.* 19: 1167-1171.
8. Gelhaus, A., Schnittger, L., Mehltitz, D., Horstmann, R. D., Meyer, C. G. (1995) Sequence and PCR-RFLP analysis of 14 novel BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet.* 26: 147-153.
9. Juliarena, M. A., Poli, M., Ceriani, C., Sala, L., Rodriguez, E., Gutierrez, S., Dolcini, G., Odeon, A., Esteban, E. N. (2009) Antibody response against

جالب توجه است که در این تحقیق ارتباط معنی داری هم بین اسید آمینه‌های خارج پاکت‌ها و موارد بیمار و سالم مشخص گردید. حال پرسش این است که اسید آمینه‌های خارج از پاکت‌ها چگونه در اتصال یا عرضه آنتی ژن دخالت کرده و حساسیت یا مقاومت نسبت به بیماری را ایجاد می‌کنند. این موضوع دو فرضیه را به ذهن متبادر می‌سازد: ۱- تنوع آنتی ژن‌های دخیل در ایجاد اسهال (عفونی یا آلرژیک) به قدری است که تنوع گسترده تری را در ناحیه عرضه آنتی ژن می‌طلبد ۲- نوعی عدم تعادل در پیوستگی (linkage disequilibrium) در ساختار اسید آمینه‌ای PBR موجود است که همزمانی این جایگاه‌ها را با حساسیت یا مقاومت به بیماری تعیین می‌کند. به عبارتی شاید این جایگاه‌ها در حساسیت یا مقاومت مستقیماً دخالت ندارند یا همزمان با عوامل موثر دیگر به ارث می‌رسند. این‌ها موضوعات مهمی است که باید در تحقیقات آینده به آن‌ها توجه نمود. به هر حال می‌توان به صورت تجربی از نتایج این تحقیق در طرح‌های اصلاح نژاد و انتخاب حیوانات مقاوم استفاده نمود. از سوی دیگر با در نظر گرفتن ارتباط نزدیک MHC با آنتی ژن و اهمیت ساختارهای ملکولی در تعیین تمایل اتصال آنتی ژن به پپتید از این داده‌ها می‌توان برای طراحی واکسن‌های موثر بهره برد.

three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. *J. Dairy. Sci.* 92: 375-381.

10. Konnai, S., Takeshima, S., Tajima, S., Ai Yin, S., Okada, K., Onuma, M., Aida, Y. (2003) The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in Bovine Leukemia Virus infection. *Microbiol. Immunol.* 47: 223-232.
11. Lewin, H. A. (1996) The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animals. CRC Press. Florida, USA.
12. Maillard, J. C., Martinez, D., Bensaid, A. (1996) An Amino Acid sequence coded by the exon 2 of the BoLA DRB3 gene associated with a BoLA class I specificity constitutes a likely genetic marker of resistance to Dermatophilosis in Brahman zebu cattle of Martinique. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 791: 185-197.
13. Maillard, J. C., Renard, C., Chardon, P., Chantal, I., Bensaid, A. (1999) Characterization of 18 new BoLA-DRB3 alleles. *Anim Genet.* 30: 200-203.



14. Martinez, M. L., Machado, M. A., Nascimento, C. S., Silva, M. V., Teodoro, R. L., Furlong, J., Prata, M. C., Campos, A. L., Guimaraes, M. F., Azevedo, A. L., Pires, M. F., Verneque, R. S. (2006) Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet. Mol. Res.* 5: 513-524.
15. Miltiadou, D., Law, A. S., Russell, G. C. (2003) Establishment of a sequence-based typing system for BoLA-DRB3 exon 2. *Tissue Antigens.* 62: 55-65.
16. Miretti, M. M., Ferro, J. A., Lara, M. A., Contel, E. P. (2001) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) in exon 2 of the BoLA-DRB3 gene in South American cattle. *Biochem. Genet.* 39: 311-324.
17. Nikolich-Zugich, J., Fremont, D. H., Miley, M. J., Messaoudi, I. (2004) The role of MHC polymorphism in anti-microbial resistance. *Mic. Infec.* 6: 501-512.
18. Park, Y. H., Joo, Y. S., Park, J. Y., Moon, J. S., Kim, S. H., Kwon, N. H., Ahn, J. S., Davis, W. C., Davies, C. J. (2004) Characterization of lymphocyte subpopulations and major histocompatibility complex haplotypes of mastitis-resistant and susceptible cows. *J. Vet. Sci.* 5: 29-39.
19. Pashmi, M., Qanbari, S., Ghorashi, S. A., Sharifi, A. R., Simianer, H. (2009) Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. *J. Anim. Breed Genet.* 126: 296-303.
20. Ripoli, M. V., Liron, J. P., De Luca, J. C., Rojas, F., Dulout, F. N., Giovambattista, G. (2004) Gene frequency distribution of the BoLA-DRB3 locus in *Saavedreno Creole* dairy cattle. *Biochem. Genet.* 42: 231-240.
21. Schaschl, H., Goodman, S. J., Suchentrunk, F. (2004) Sequence analysis of the MHC class II DRB alleles in Alpine chamois. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 265-277.
22. Sharif, S., Mallard, B. A., Sargeant, J. M. (2000) Presence of glutamine at position 74 of pocket 4 in the BoLA-DR antigen binding groove is associated with occurrence of clinical mastitis caused by *Staphylococcus* species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76: 231-238.
23. Sharif, S., Mallard, B. A., Wilkie, B. N., Sargeant, J. M., Scott, H. M., Dekkers, J. C., Leslie, K. E. (1999) Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) with production traits in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 30: 157-160.
24. Tizard, I. R. (2004) *Veterinary Immunology*. (7th ed.) Saunders company. Philadelphia, USA.
25. Udina, I. G., Karamysheva, E. E., Turkova, S. O., Orlova, A. R., Sulimova G. E. (2003) Genetic mechanisms of resistance and susceptibility to leukemia in Ayrshire and black pied cattle breeds determined by allelic distribution of gene BoLA-DRB3. *Genetika.* 39: 383-396.
26. Van Eijk, M. J., Stewart-Haynes, J. A., Lewin, H. A. (1992) Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Anim. Genet.* 23: 483-496.
27. Xu, A., van Eijk, M. J., Park, C., Lewin, H. A. (1993) Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. *J. Immunol.* 151: 6977-6985.
28. Zanotti, M., Poli, G., Ponti, W., Polli, M., Rocchi, M., Bolzani, E., Longeri, M., Russo, S., Lewin, H. A., van Eijk, M. J. (1996) Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. *Anim. Genet.* 27: 337-341.



ASSOCIATION BETWEEN AMINO ACID SEQUENCES IN PEPTIDE BINDING REGION (BoLA-DRB3) AND SUSCEPTIBILITY OR RESISTANCE TO CALF DIARRHEA

Nikbakht, Gh.^{1*}, Tadjbakhsh, H.², Mokhber-Dezfouli, M.³, Zahraei Salehi, T.¹, Rabbani, M.¹, Gharibi, D.¹,
Emam, M.¹, Assadian, F.¹, khormali, M.¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of
Tehran, Tehran- Iran.

²Fellow member, The academy of science of Islamic republic of Iran.

³Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-
Iran.

(Received 13 June 2009 , Accepted 19 July 2010)

Abstract:

The major histocompatibility complex genes (mhc) encode MHC I and II molecules which present peptide fragments to T cells. Therefore these polymorphic molecules critically influence susceptibility to infectious diseases. At present study potential relationship between amino acid sequences in the antigen binding groove of different BoLA-DRB3 alleles and susceptibility or resistance to calf diarrhea was investigated. Twelve different DRB3 alleles were found among 171 calves (84 diarrheic and 87 healthy) analysed by PCR-RFLP method. Amino acid sequences of the encoded peptide binding region were compared. 26 polymorphic positions were detected in this region. A significant association ($p < 0.05$) was shown between occurrence of diarrhea and the presence of glutamic acid and tyrosine in pocket 4 and valine, glutamine and leucine in pocket 9 of peptide binding region. Thus it can be concluded that pockets 4 and 9 of the BoLA-DRB3 molecule would be involved in conferring susceptibility of calf to diarrhea.

Key words: MHC, BoLA-DRB3, PCR-RFLP, calf diarrhea, peptide binding region.

*Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057 , Fax: 021-66427517

