مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۱، ۵۵-۴۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 69,1:49-55, 2014

بررسی خصوصیات چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ناحیه 5َ ژن لاکتوفرین در گاوهای بومی و هلشتاین ایران

مصطفی محقق دولت آبادی* جواد حبیبی زاد فرحناز ایمانی خواه
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج، یاسوج - ایران

(دریافت مقاله: ۲۱ مرداد ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۱ آبان ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: لاکتوفرین، گلیکوپروتیین متصل شونده به آهن، دارای نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی می باشد که مهمترین آنها خواص آنتی میکروبی است. از این رو ژن کدکننده این پروتیین می تواند به عنوان ژن کاندیدایی در مقاومت به بیماری ورم پستان در نظر گرفته شود. **هدف:** بررسی ناحیه 5َ ژن لاکتوفرین گاو در نمونه‌های بومی و هلشتاین با استفاده از روش PCR-SSCP و تعیین توالی می باشد. **روش کار:** برای این منظور از تعداد ۵۰ نمونه گاو بومی و ۵۰ نمونه گاو هلشتاین ماده ژنتیکی استخراج گردید. آغازگرهای لازم جهت تکثیر بخشی از ناحیه 5َ طراحی، و قطعه مورد نظر توسط روش SSCP تعیین ژنوتیپ شد. سپس هر الگوی مشاهده شده تعیین توالی گردید و همترازی توالی‌ها جهت شناسایی چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی صورت گرفت. همچنین، تجزیه و تحلیل این سیلیکو (*In silico*) جهت تأثیر چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی برجایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی در ناحیه تکثیرشده صورت گرفت. **نتایج:** در این تحقیق، در تمام نمونه‌های مورد بررسی ۳ الگوی واضح SSCP (A، B و C) برای قطعه تکثیرشده مشاهده شد که در گاوهای بومی تنها هاپلوتیپ C آشکار گردید. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی‌ها نشان داد که جایگزینی T با G در جایگاه ۶۰۲ منجر به ایجاد جایگاه اتصالی برای فاکتور رونویسی AML-1 گردید. از طرف دیگر، جایگزینی T با C در جایگاه ۵۸۶ جایگاه اتصال فاکتور رونویسی AML-1 را منسوخ می کند. **نتیجه‌گیری نهایی:** بنابراین، جهت استفاده از ژن لاکتوفرین به عنوان نشانگر مقاومت به بیماری ورم پستان در گاوهای شیری، بررسی این چند شکلی‌ها از نظر تأثیر بر فرآیند رونویسی ژن، همچنین ارتباط آن با تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر امری ضروری می باشد.

واژه‌های کلیدی: گاو، ناحیه 5َ لاکتوفرین، هاپلوتیپ، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، فاکتور رونویسی

مقدمه

لاکتوفرین یک گلیکوپروتئین متصل شونده به آهن است که متعلق به خانواده ترانسفرین بوده و در مایعات بیولوژیکی بسیاری از گونه‌های پستانداران یافت می شود (۱). همچنین همولوژی اسیدهای آمینه لاکتوفرین در میان گونه‌های عالی پستانداران در طول تکامل محافظت شده است (۲۴). نقش اصلی لاکتوفرین دفاع در مقابل عفونت‌های میکروبی است، که عمدتاً این توانایی را با اتصال به یون‌های آهن مورد نیاز جهت رشد باکتری، اثر متقابل مستقیم با سطح باکتری‌ها (۱۳) و فعالیت مستقیم ضد باکتریایی آن به خاطر لاکتوفریسین (۸) اعمال می‌کند. البته از ویژگی‌های دیگر لاکتوفرین نقش آن در فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانت (۲۶) و ممانعت از رشد تومور (۳) می باشد.

از مایعاتی که در آن لاکتوفرین یافت می شود شیر بوده که سطح آن در بین گونه‌ها متفاوت است. مقدار لاکتوفرین شیر گاو تقریباً ۰/۱ لاکتوفرین یافت شده در دیگر پستانداران بوده و دارای غلظتی در حدود ۰/۰۲mg/mL تا ۰/۲ شیر است (۱۸). در گاوهای شیری، غلظت آن در طول دوره خشک و عفونت ورم پستان به شدت افزایش می یابد (۱۲،۲۳) و نشان می دهد که این پروتیین نقش فیزیولوزیکی مهمی در کاهش شیوع بیماری ورم پستان بازی می‌کند (۷). از طرف دیگر، در بیماری ورم پستان، تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر به عنوان نشانگر تشخیصی مناسبی بوده که شناسایی زود هنگام این بیماری را قادر می سازد (۶). در مطالعات متعددی همبستگی مثبت و بالایی بین ورم پستان بالینی و تعداد سلول‌های سوماتیکی تأیید شده است، از این رو این صفت فاکتور بسیار با ارزشی جهت برنامه‌های نظارتی ورم پستان محسوب می شود (۱۹).

ژن کدکننده لاکتوفرین در گاو بر روی کروموزم ۲۲ قرار گرفته و دارای ۱۷ اگزون می باشد که در حدود ۳۴/۵Kbs از ژنوم گاو را در بر گرفته است (۲۰). ناحیه 5َ این ژن حاوی توالی پروموتر، جعبه غیرمتعارف TATA، و تعدادی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی مورد نیاز جهت بیان ژن می باشد (۲۸). نظریه‌های محکمی در مورد ارتباط بین چند شکلی‌های ناحیه 5َ ژن با فرآیند بیان ژن وجود دارد. در ناحیه 5َ ژن لاکتوفرین در گاو چند شکلی‌های متعددی در نژادهای مختلف شناسایی شده که بعضی از آنها ارتباط معنی داری با تعداد سلول‌های سوماتیکی، عملکرد تولید مثلی و صفات تولید شیر در گاوهای شیری نشان داده‌اند (۹،۱۱،۱۷). مطالعات گذشته نشان دادند که تغییر ساختار پروموتر مانند منسوخ کردن جعبه TATA و یا جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی تأثیر معکوسی بر نقش پروموتر ژن لاکتوفرین در شرایط آزمایشگاهی داشت (۲۱،۲۲،۲۷). از این رو، هدف از این تحقیق مطالعه چند شکلی‌های شناسایی شده (۴،۱۶) در جایگاه‌های ۶۰۲- (G/T)، ۶۰۰- (G/A) و ۵۸۶- (C/T) قبل از

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۷۴۱-۲۲۲۴۸۴۰ نمابر: ۰۷۴۱-۲۲۲۴۸۴۰ Email: mmuhaghegh@yu.ac.ir

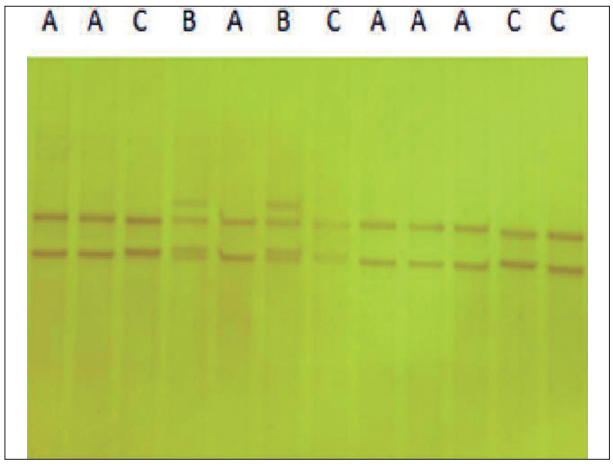
جایگاه شروع رونویسی ناحیه ´5 ژن لاکتوفرین در گاوهای شیری هلشتاین ونژاد بومی استان کهکیلویه و بویراحمد و بررسی تأثیر آنها بر جایگاه‌های فاکتورهای رونویسی در این ناحیه است.

مواد و روش کار

از تعداد ۵۰ راس گاو بومی استان کهکیلویه و بویر احمد (Taurus Bos) و ۵۰ راس گاو هلشتاین مقدار ۲ mL خون در تیوب حاوی EDTA جمع آوری گردید. سپس با استفاده از کیت استخراج DNA (DNA genomic extraction kit AccuPrep®) ماده ژنتیکی هر نمونه استخراج و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. از برنامه Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) به همراه توالی ناحیه ´5 ژن گیرنده هورمون رشد (بانک ژن با شماره دسترسی AH000852) جهت طراحی یک جفت آغازگر جدید استفاده گردید. از آغازگرهای ´3- 5'- tgttgtgcttcaagggagtg و 5'- ccagcctggagttttgaaag -3' قطعه ای بطول ۳۷۹ نوکلئوتید از ناحیه ´5 ژن لاکتوفرین (از نوکلئوتید ۸۵۹ - تا نوکلئوتید ۴۸۰- قبل از کدون آغازین) تکثیر شد.

واکنش PCR با استفاده از کیت بایونیر (Bioneer) با اجزای لیوفیلیزه صورت گرفت که هر میکروتیوب حاوی ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۱۰ mM تریس- اسیدکلریدریک (pH=9)، ۵۰ mM کلرید کلسیم، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰۰ mM از هر نوکلئوتید، ۲۰ pmol از هر آغازگر و ۵۰ng DNA ژنومی بود. شرایط واکنش PCR شامل مرحله واسرشست اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵°C، به همراه ۳۰ چرخه با واسرشست DNA در دمای ۹۵°C برای مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به DNA در دمای ۶۳ °C به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگرها در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط نهایی در ۷۲°C درجه به مدت ۷ دقیقه بود.

آنالیز تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) با استفاده از دستگاه کوچک الکتروفوریز انجام شد. مقدار ۲µL از محصول PCR با ۸µL بافر دناتوره (فرمامید، ۰/۲۵ ٪ بروموفنل بلو، ۰/۲۵ ٪ زایلون، mM ۰/۵ EDTA) مخلوط و برای مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C دناتوره گردید. سپس تیوب‌های حاوی این مخلوط با قرار دادن در یخ به مدت ۱۰ دقیقه به سرعت سرد شده، در آخر تمام آن در ژل لود گردید. ژل ۸ ٪ اکریلآمید با استفاده از بافر TBE تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق با ولتاژ ۷/۵v/Cm الکتروفورز گردید. سرانجام ژل با روش نیترات نقره رنگ آمیزی و ژنوتیپ هر نمونه تعیین شد. محصولات PCR با استفاده از کیت کیاژن (Qiagen) تخلیص و مستقیماً توسط آغازگرها تعیین توالی شدند. همچنین، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی در ناحیه تکثیر شده، با استفاده از نرم افزار TFSEARCH v1.3 (<http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) صورت گرفت.

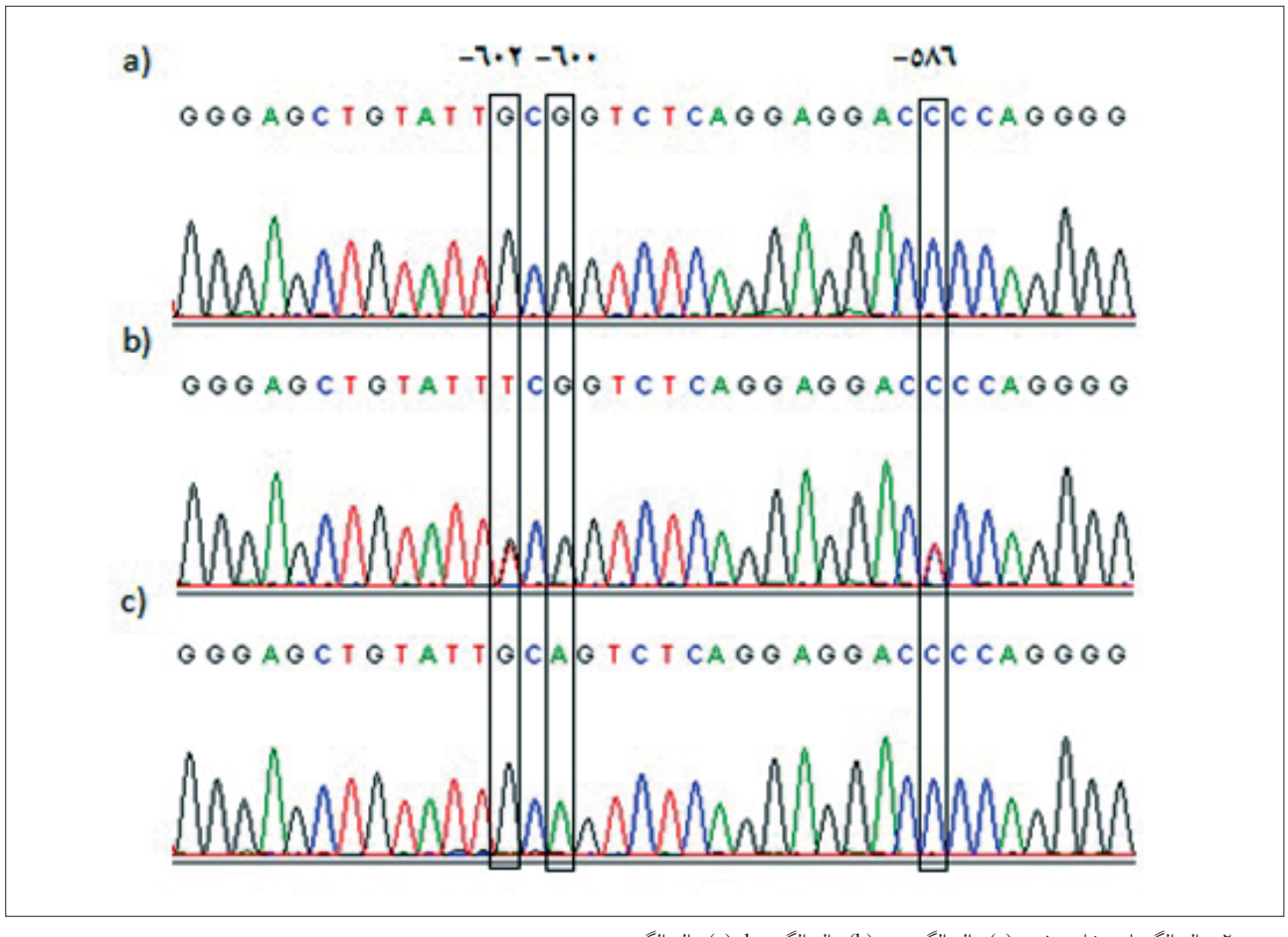


تصویر ۱. الگوهای SSCP مشاهده شده در قطعه تکثیر شده از ناحیه ´5 ژن لاکتوفرین.

نتایج

در این تحقیق، بخشی از ناحیه ´5 ژن لاکتوفرین گاو، که بر اساس گزارش‌های قبلی حاوی ۳ چند شکل تک نوکلئوتیدی است، با استفاده از روش PCR-SSCP و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. در تمام نمونه‌های مورد بررسی ۳ الگوی واضح SSCP (A، B و C) برای قطعه تکثیر شده آشکار گردید (تصویر۱) که فراوانی آنها در نژاد هلشتاین به ترتیب ۰/۴۲، ۰/۳۶ و ۰/۲۲ بود در حالی که در گاوهای بومی تنها هاپلوتیپ C مشاهده شد که نشان دهنده فقدان تنوع ژنتیکی ناحیه تکثیر شده در نژاد بومی است. پس از تعیین توالی الگوهای SSCP با هر دو آغازگر (از هر الگو ۲ نمونه)، هاپلوتیپ مشاهده شده در نمونه‌های بومی (هاپلوتیپ C) برای چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی گزارش شده در جایگاه‌های ۶۰۲- (G/T)، ۶۰۰- (G/A) و ۵۸۶- (C/T) به ترتیب هموزیگوت GG، AA و CC بودند. در گاوهای هلشتاین، علاوه بر هاپلوتیپ C هاپلوتیپ‌های A و B نیز مشاهده شد که در هاپلوتیپ A، نمونه‌ها برای این شکلی‌های نوکلئوتیدی به ترتیب هموزیگوت GG، GG و CC بودند. در هاپلوتیپ B نمونه‌های هلشتاین برای جایگاه‌های ۵۸۶- و ۶۰۲- هتروزیگوت بوده در حالی که برای چند شکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه ۶۰۰- هموزیگوت GG بودند (تصویر۲).

جستجو جهت شناسایی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی ممکن در ناحیه تکثیر شده با استفاده از نرم افزار TFSEARCH، جایگاه‌های متعددی برای اتصال فاکتورهای رونویسی مانند CdxA، SRY، C/EBPb، GATA-2، AML-1a، deltaE، C/EBPa Nkx-2، و Lyf-1 آشکار گردید (تصویر۳). از طرف دیگر، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی جهت بررسی نتایج چند شکلی‌های گزارش شده در این ناحیه بر روی جایگاه‌های اتصال نشان داد که جابجایی T با G در جایگاه ۶۰۲- منجر به ایجاد جایگاه اتصالی برای فاکتور رونویسی AML-1 گردید. از طرف دیگر، جایگزین T با C در جایگاه ۵۸۶- منجر به حذف



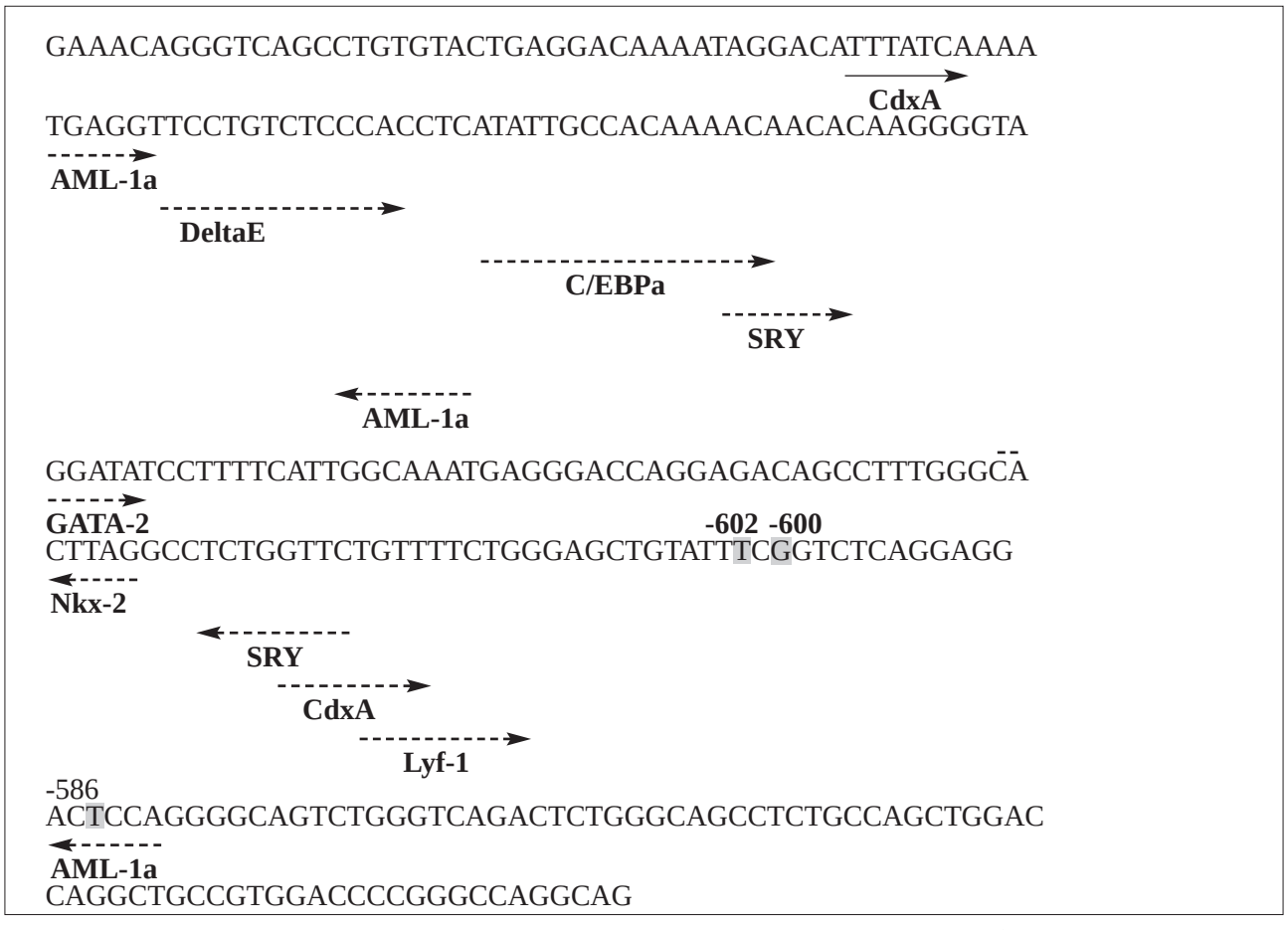
تصویر ۲. توالی الگوهای مشاهده‌شده. (a) توالی الگوی a ، (b) توالی الگوی b ، (c) توالی الگوی c.

جایگاه اتصال فاکتور رونویسی AML-1 می شود.

بحث

تنظیم بیان ژن فرآیند پیچیده‌ای است که مراحل آن (رونویسی و ترجمه) تحت کنترل دقیق می باشد. در هر ژن ناحیه ′5 آن حاوی اجزایی است که شروع رونویسی را کنترل کرده و از این رو چند شکلی های موجود در این نواحی می تواند تأثیرات عمده ای روی بیان ژن داشته باشند. بر این اساس، جستجو و شناسایی چند شکلی های نوکلئوتیدی در ناحیه ′5 ژن، بویژه در جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی یا کنار این جایگاه‌ها نوید بخش به نظر می رسد. بطور کلی، ناحیه ′5 ژن لاکتوفرین در گاو از چند شکلی بالایی برخوردار است. در ۲/۲ kb از ناحیه ′5 این ژن تعداد ۲۹ چند شکلی تک نوکلئوتیدی در نژادهای مختلف گاو گزارش شده است که بعضی از آنها در جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی واقع شده‌اند (۴،۱۶).

در این تحقیق، تجزیه و تحلیل PCR-SSCP و تعیین توالی بخشی از ناحیه ′5 ژن لاکتوفرین، چند شکلی های گزارش شده در نوکلئوتیدهای ۵۸۶-، ۶۰۰- و ۶۰۲- قبل از شروع رونویسی را تنها در نمونه‌های گاو هلشتاین آشکار کرد. فقدان تنوع ژنتیکی ناحیه تکثیر شده در نمونه‌های بومی می تواند به دلیل رانش ژنتیکی، درجه همخونی بالای نمونه‌ها به دلیل کاهش تدریجی تعداد گاوهای بومی منطقه و فقدان برنامه اصلاحی جهت بهبود تولید و ترکیبات شیر در این نژاد باشد. امروزه، برنامه‌های اصلاحی در گاوهای هلشتاین جهت افزایش تولید شیر و ترکیبات آن منجر به تغییر فراوانی ژن‌ها در جهت اهداف اصلاحی می‌گردد بطوری که در این نژاد که توانایی تولید شیر بسیار بالایی دارد فراوانی ژن‌های مؤثر بر تولید بسیار بیشتر از نژاد بومی خواهد بود. اما انتخاب در جهت افزایش تولید منجر به کاهش مقاومت گاوهای هلشتاین به بیماری ورم پستان گردیده است و از آنجایی که گاوهای بومی مقاومت نسبتاً بالایی به این بیماری نشان می دهند احتمال ارتباط تنها هاپلوتیپ شناسایی شده در ناحیه ′5 ژن لاکتوفرین با مقاومت به ورم پستان وجود دارد که تأیید آن نیاز به بررسی و مقایسه بیان این ژن در هر سه هاپلوتیپ شناسایی شده دارد. در مطالعات متعددی ارتباط چند شکلی های ناحیه ′5 ژن لاکتوفرین با صفت تعداد سلول های سوماتیکی و صفات تولید شیر در نژادهای مختلف گاو گزارش شده است. OHalloran و همکاران در سال ۲۰۰۹ تعداد سلول های سوماتیکی بالایی را برای گاوهای دارای نوکلئوتید C در جایگاه ۵۸۶-



تصویر ۳. توالی قطعه تکثیر شده از ناحیه ´5 ژن لاکتوفرین، جایگاه چند شکلی های تک نوکلئوتیدی و فاکتورهای رونویسی موجود در این ناحیه.

مشاهده کردند(۱۶). Huang و همکاران در سال ۲۰۰۹ ارتباط معنی داری بین هاپلوتیپ های ۳ چند شکلی (-3879_3880insG, and -4432T>C 3440T>G,) ناحیه ´5 ژن لاکتوفرین و تعداد سلول های سوماتیکی در گاوهای هلشتاین چین شناسایی کرد (۹). همچنین، ارتباط معنی داری بین چند شکلی ژن لاکتوفرین و تعداد سلول های سوماتیکی در گاوهای شیری سیاه و سفید لهستان گزارش شده است (۲۷). Kaminski و همکاران در سال ۲۰۰۶ ارتباط معنی داری بین چندشکلی جایگاه ۳۲ـ پروموتر ژن لاکتوفرین و مقدار پروتیین شیر در گاوهای هلشتاین لهستان مشاهده کرد (۱۱).

آنالیز اینسیلیکو در ناحیه تکثیر شده جایگاه های متعددی برای اتصال فاکتورهای رونویسی مانند CdxA، SRY، C/EBPb، GATA-2، AML-1a، deltaE، Nkx-2 C/EBPa, و Lyf-1 را آشکار کرد (تصویر ۳). همچنین تأثیر این چند شکلی های شناسایی شده بر جایگاه های اتصال فاکتورهای رونویسی مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، در ناحیه تکثیر شده جابجایی T با G در جایگاه ۶۰۲ـ منجر به ایجاد جایگاه اتصالی برای فاکتور رونویسی AML-1 (Acute Myeloid Leukemia-1) گردید. از طرف دیگر، جایگزین T با C در جایگاه ۵۸۶ـ جایگاه اتصال فاکتور رونویسی AML-1 را منسوخ می کند. فاکتور رونویسی AML-1 به توالی اجماع TGT/cGGT اتصال می یابد، و در پروموتر و قسمت تحریک کننده بسیاری از ژن ها دیده می شود (۲). برای مثال، فاکتور رونویسی AML-1 در تمام اجداد سلول های خونی بیان شده و به عنوان تنظیم کننده بیان بسیاری از ژن های مخصوص در تشکیل سلول های خونی عمل می کند (۱۰). جهش در جایگاه AML-1 موجود در ناحیه ´5 ژن *BPI* (bactericidal permeability increasing) در انسان منجر به کاهش فعالیت پروموتر در سلول های مغز استخوان شد (۱۴). از این فاکتور رونویسی نقش بازدارنده (۵) و همچنین تحریک کننده (۱۵) میزان بیان ژن گزارش شده است. بر اساس گزارشات مختلف پیشنهاد می شود بعضی از این جهش ها بر روی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی تأثیر گذاشته و با تغییر میزان رونویسی ژن لاکتوفرین ممکن است منجر به تفاوت سطح لاکتوفرین گردد. برای مثال، چندشکلی در جایگاه ۳۲- (G/C) ژن لاکتوفرین گاو بر روی میزان بیان ژن تأثیر گذاشته، چنان که آلل G با کاهش میزان بیان ژن لاکتوفرین منجر به کاهش تعداد سلول های سوماتیکی در شیر گاو گردید. در مقابل، آلل C با تحریک بیان ژن لاکتوفرین و افزایش تعداد سلول های سوماتیکی پاسخ ایمنی قوی تری را

باعث گردید (۱۱). بنابراین، برای استفاده از این چند شکلی‌ها در برنامه‌های اصلاحی جهت افزایش مقاومت به ورم پستان باید نقش این چند شکلی‌های شناسایی شده در ناحیه ′5 ژن لاکتوفرین با استفاده از ارزیابی بیان ژن و ارتباط آنها با صفات تعداد سلول‌های سوماتیکی و ورم پستان در گاوهای شیری بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است ازمسئولین واحد دامداری شیر و گوشت فتاحی اصفهان و آقای مهندس نجاریان مدیر تولید واحد جهت فراهم کردن نمونه خون تشکر و قدرانی شود.

References

1. Baker, E.N., Baker, H.M. (2005) Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. Cell Mol Life Sci. 62: 2531-2539.
2. Bae, S.C., Yamaguchi-Iwai, Y., Ogawa, E., Maruyama, M., Inuzuka, M., Kagoshima, H., Shigesada, K., Satake, M., Ito, Y. (1993) Isolation of PEBP2aB cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene, AML1. Oncogene. 8: 809-814.
3. Bezault, J., Bhimani, R., Wiprovnick, J., Furmanski, P. (1994) Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice. Cancer Res. 54: 2310- 2312.
4. Daly, M., Ross, P., Giblin, L., Buckley, F. (2006) Polymorphisms within the lactoferrin gene promoter in various cattle breeds. Anim Biotechnol. 17: 33-42.
5. Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., Meyers, S., Hiebert, S.W., Nimer, S.D. (1995) The AML1/ ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. Oncogene. 11: 2667-2674.
6. Green, M.J., Green, L.E., Schkken, Y.H., Bradley, A.J., Peele, E.J., Barkema, H.W., de Haas, Y., Collis,V.J., Medley, G.F. (2004) Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. J Dairy Sci. 87: 1256-1264.
7. Hagiwara, S., Kawai, K., Anri, A., Nagahata, H. (2003) Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. J Vet Med Sci. 65: 319-323.
8. He, J., Furmanski, P. (1995) Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. Nature. 373: 721-724.
9. Huang, J., Wang, H., Wang, C., Li, J., Li, Q., Hou, M., et al. (2009) Single nucleotide polymorphisms, haplotypes and combined genotypes of lactoferrin gene and their associations with mastitis in Chinese Holstein cattle. Mol Biol Rep. 37: 477-483.
10. Ito, Y., Bae, S.C. (1997) The Runt domain transcription factors, PEBP2/ CBF, and its involvement in human leukemia. In: Progress in Gene Expression. Karin, M. (ed.). Birkhauser. Cambridge, MA, USA. p. 107-132.
11. Kaminski, S., Olenski, K., Brym, P., Malewski, T., Sazanov, A.A. (2006) Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows. Russ J Genet. 42: 924-927.
12. Kutila, T., Pyorala, S., Saloniemi, H., Kaartinen, L. (2003) Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. Acta Vet Scand. 44: 35-42.
13. Legrand, D., Pierce, A., Elass, E., Carpentier, M., Mariller, C., Mazurier, J. (2008) Lactoferrin structure and functions. Adv Exp Med Biol. 606: 163-194.
14. Lennartsson, A., Pieters, K., Ullmark, T., Vidovic, K., Ullberg, U. (2003) AML-1, PU.1, and Sp3 regulate expression of human bactericidal/permeability-increasing protein AML-1, PU.1, and Sp3 regulate expression of human bactericidal/ permeability-increasing protein. Biochem Biophys Res Commun. 311: 853-863.
15. Mulloy, J.C., Jankovic, V., Wunderlich, M., Delwel, R., Cammenga, J., Krejci, O., Zhao, H., Valk, P.J., Lowenberg, B., Nimer, S.D. (2005) AML1-ETO fusion protein up-regulates TRKA mRNA expression in human CD34+ cells, allowing nerve growth factor-induced expansion. Proc Natl Acad Sci USA. 102: 4016-4021.
16. O'Halloran, F., Bahar, B., Buckly, F., O'Sullivan, O., Sweeney, T., Giblin, L. (2009) Characterisation of

single nucleotide polymorphisms identified in the bovine lactoferrin gene sequences across a range of dairy cow breeds. Biochimie. 91: 68-75.

17. O'Halloran, F., Berry, D.P., Bahar, B., Howard, D.J., Sweeney, T., Giblin, L. (2010) Polymorphisms in the bovine lactoferrin promoter are associated with reproductive performance and somatic cell count. J Dairy Sci. 93: 1253-9.
18. Schanbacher, F.L., Goodman, R.E., Talhouk, R.S. (1993) Bovine mammary lactoferrin: implications from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. J Dairy Sci. 76: 3812-3831.
19. Schukken, Y.H., Wilson, D.J., Welcome, F., Garrison-Tikfsky, L., Gonzales, R.N. (2003) Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res. 34: 579-596.
20. Schwerin, M., Solinas Toldo, S., Eggen, A., Brunner, R., Seyfert, H.M., Fries, R. (1994) The bovine lactoferrin gene (LTF) maps to chromosome 22 and synthetic group U12. Mamm Genome. 5: 486-489.
21. Shi, H., Teng, C. (1996) Promoter-specific activation of mouse lactoferrin gene by epidermal growth factor involves two adjacent regulatory elements. Mol Endocrinol. 10: 732-41.
22. Stokes, K., Alston-Mills, B., Teng, C. (2004) Estrogen response element and the promoter context of the human and mouse lactoferrin genes influence estrogen receptor {alpha}-mediated transactivation activity in mammary gland cells. J Mol Endocrinol. 33: 315-34.
23. Swanson, K.M., Stelwagen, K., Dobson, J., Henderson, H.V., Davis, S.R., Farr, V.C., Singh, K. (2009) Transcriptome profiling of Streptococcus uberis- induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. J Dairy Sci. 92: 117-129.
24. Teng, C.T. (2002) Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. Biochem. Cell Biol. 80: 7-16.
25. Wang, S.R., Lin, J., Cheng, I.C., Lin, T.Y. (1998) Characterization and functional analysis of the porcine lactoferrin gene promoter. Gene. 215: 203-12.
26. Ward P.P., Paz, E., Conneely, O.M. (2005) Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. Cell Mol Life Sci. 62: 2540-2548.
27. Wojdak, M.K., Kmiec, M., Ziemak, J. (2006) Associations between bovine lactoferrin genpolymorphism and somatic cell count in milk. Vet Med. 51: 14-20.
28. Zheng, J., Ather, J.L., Sonstegard, T.S., Kerr, D.E. (2005) Characterization of the infection-responsive bovine lactoferrin promoter. Gene. 353: 107-117.

Characterization of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5'-flanking region of bovine lactoferrin gene in the local and holstein cattle of Iran

Muhaghegh Dolatabady, M.*, Habibizad, J., Imanikhah, F.

Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Yasouj-Iran

(Received 12 August 2013 , Accepted 23 October 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Lactoferrin (*Lf*), an iron binding glycoprotein, has a variety of physiological roles and its foremost is antimicrobial properties. Therefore, the lactoferrin gene can be considered as a potential candidate gene for resistance to mastitis. **OBJECTIVES:** This study was carried out to determine the haplotype frequency of the 5'-flanking region of bovine lactoferrin gene in local and Holstein cattle breeds of Iran using PCR-SSCP and DNA sequencing. **METHODS:** Genomic DNA was isolated from 100 blood samples of two cattle breeds (50 Local, 50 Holstein). Two new primer pairs were designed from *Lf* sequence to amplify a part of 5'-flanking region of the gene. The amplified fragment was screened by single strand conformation polymorphism (SSCP) and DNA sequencing. The multiple alignments were carried out for the nucleotide sequences of different SSCP patterns. In silico analysis of identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the 5'-flanking region of bovine *Lf* gene was screened, to identify any association on transcription factor binding affinity. **REULTS:** Analysis of the whole samples revealed three SSCP patterns (A, B and C) for amplified fragment that C haplotype was the only variant identified in local breed samples. The bioinformatics analysis revealed that the T to G trans version at position -602 created an AML-1 transcription binding site in combined genotype A. In -586 position, T to C transition abolished binding site of AML-1 transcription factor. **CONCLUSIONS:** Therefore, to apply *Lf* gene for marker-assisted selection, additional studies are required to evaluate the functional role of these identified polymorphic sites on gene expression and somatic cell counts in cattle.

Key words: cattle, 5'-flanling region of lactoferrin, haplotype, SNP, transcription factors

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Different SSCP patterns of amplified fragment at the 5'-flanking region of bovine Lactoferrin gene.

Figure 2. Sequence chromatographs of identified Haplotypes. a) Sequence of A haplotype. B) Sequence of B haplotype and c) Sequence of C haplotype.

Figure 3. Putative transcription factor binding sites (Bold font) and SNPs (red color) at the amplified fragment of 5?- flanking region in the bovine Lactoferrin gene.

***Corresponding author's email: mmuhaghegh@yu.ac.ir, Tel: 0741-2224840, Fax: 0741-2224840**