مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۴، ۳۷۳- ۳۶۷
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,4:367-373, 2013

شناسایی و بررسی خصوصیات چند شکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین-۸ در گاوهای بومی و هلشتاین ایران

مصطفی محقق دولت آبادی *
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج، یاسوج-ایران

(دریافت مقاله: ۸ تیر ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۳ مهر ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: اینترلوکین-۸، سیتوکین پیش التهابی، پروتیین کوچکی است که نقش آن جذب و فعال کردن نوتروفیل ها در مراحل اولیه دفاع میزبان در مقابل هجوم باکتری ها است. چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین-۸ می تواند با تأثیر بر فرآیند رونویسی این ژن، نقش و فعالیت آن را تحت تأثیر قرار دهد. **هدف:** شناسایی و بررسی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر این ژن در گاوهای بومی و هلشتاین بوده است. **روش کار:** بخشی از ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین-۸ توسط تکنیک تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) در گاوهای دو نژاد تعیین ژنوتیپ شد. سپس هر الگوی مشاهده شده تعیین توالی شد و همترازی بین توالی ها جهت شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی صورت گرفت. همچنین، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی جهت بررسی ارتباط چندشکلی های تک نوکلئوتیدی برراندمان اتصال فاکتورهای رونویسی در ناحیه تکثیرشده صورت گرفت. **نتایج:** در این مطالعه، درکل نمونه های بررسی شده تعداد ۴ الگوی (SSCPs) مجزا مشاهده شدکه با تعیین توالی نوکلئوتیدی آنها تعداد ۲ چندشکلی تک نوکلئوتیدی در جایگاه های ۱۲۶- و ۱۸۰- قبل از شروع رونویسی آشکار شدکه چندشکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه ۱۲۶- تنها درگاوهای بومی مشاهدشد. بررسی بیوانفورماتیکی چندشکلی های شناسایی شده روی جایگاه فاکتورهای رونویسی نشان دادکه جایگزینی نوکلئوتیدها در جایگاه های ۱۲۶- و ۱۸۰- به ترتیب منجربه ایجاد جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی Ik-2و Oct-1شد. **نتیجه گیری نهایی:** امکان نقش کاربردی چندشکلی های شناسایی شده در فعالیت این ژن باید با استفاده ازآزمون بیان ژن به اثبات برسد. مطالعات بیشتری جهت ارزیابی چندشکلی های شناسایی شده برروی صفات مقاومت به بیماری در گاو مورد نیاز می باشد.

واژه های کلیدی: اینترلوکین-۸، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، پروموتر، SSCP، فاکتورهای رونویسی

مقدمه

هدف اصلی از اصلاح نژاد گاوهای شیری افزایش تولید شیر و ترکیبات آن است و این افزایش تولید موجب افزایش حساسیت دام به برخی بیماریها نظیر ورم پستان می شود. افزایش مقاومت ژنتیکی به این بیماری که پرهزینه ترین بیماری در پرورش گاوهای شیری است، می تواند در برنامه های اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد. بنابراین برای ایجاد مقاومت ژنتیکی، شناسایی ژن ها و آلل های مقاوم به ورم پستان ضروری می باشد. در طول بیماری ورم پستان، افزایش تعداد سلول های سوماتیکی در شیر (بویژه نوتروفیل ها) پدیده ای رایج است. این سلول های سوماتیکی نقش مهمی در مقاومت میزبان دارند. مهاجرت سلول های سوماتیکی از جریان خون به بافت غدد پستانی به عنوان پاسخی به سیتوکین های پیش التهابی مانند فاکتور تحلیل برنده تومور آلفا (TNF-α)، اینترلوکین-۱بتا (IL-1β) و اینترلوکین-۸ (IL-8) رخ می دهد. بر اساس مستندات به دست آمده پیشنهاد شده است که اینترلوکین-۸ سیتوکین جذب کننده نوتروفیل نیرومند تر نسبت به سیتوکین های دیگر می باشد (۱). از این رو، اینترلوکین-۸ یکی از ژن های کاندیدای مناسب برای مقاومت به ورم پستان در دام های شیری محسوب می شود. ژن کد کننده سیتوکین اینترلوکین-۸ در گاو روی کروموزم ۶ قرار دارد (۵) و مانند همه ژن های خانواده کموکین های CXC دارای چهار اگزون و سه اینترون می باشد (۹). این ژن پروتیینی را کد می کند که با اتصال به گیرنده IL8RA بیان شده در سطح نوتروفیل ها به عنوان کموکین نیرومندی عمل می کند (۱۴).

ناحیه فرادست هرژن یا پروموتر حاوی اکثر علائم تنظیم کننده شروع فرآیند رونویسی می باشد به طوری که هر گونه تغییر (جهش) در توالی نوکلئوتیدی این ناحیه می تواند احتمالاً راندمان بیان ژن را تحت تأثیر قرار داده و بر فنوتیپ میزبان تأثیر داشته باشد. در مطالعات متعددی ارتباط بین چند شکلی های تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژن های متفاوت مرتبط با پاسخ ایمنی و عملکرد گاوهای شیری تایید شده است. برای مثال، Leyva-Baca و همکاران در سال ۲۰۰۷ ارتباط معنی داری بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی A/G در جایگاه ۲۶۴۷ ژن اینترلوکین-۸ با مقدار چربی شیر و عمق پستان در گاو هلشتاین گزارش کرد (۱۰). در مطالعه ی دیگر، Leyva-Baca و همکاران در سال ۲۰۰۸، ارتباط معنی داری بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه ٔ۵ژن CXCR1 با ارزش اصلاحی برآورد شده برای تعداد سلول های سوماتیکی را مشاهده کرد (۱۱). Christine و همکاران در سال ۲۰۱۰ ارتباط چند شکلی های تک نوکلئوتیدی در تعدادی از ژن های ایمنی (مانند CXCR1، TLR2، IL8، CARD15 و

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

SERPINA1) با صفات تولید شیر و تعداد سلول‌های سوماتیکی در گاوهای شیری مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی CXCR1-1908 و مقدار پروتیین و چربی شیر مشاهده شد. همچنین، ارتباط معنی‌داری بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی ژن SERPINA1- 269 و درصد چربی و مقدار چربی شیر گزارش شد (۳). ازاین رو، هدف از این تحقیق، مطالعه ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین-۸ از نظر وجود چند شکلی تک نوکلئوتیدی و بررسی اثرات آنها بر روند فرآیند رونویسی در دو نژاد گاو هلشتاین و بومی استان کهکیلویه و بویراحمد بود.

مواد و روش کار

مقدار ۲mL خون از تعداد ۵۰ رأس گاو بومی استان کهکیلویه و بویر احمد و ۵۰ رأس گاو هلشتاین مجتمع شیر و گوشت فتاحی اصفهان در تیوب حاوی EDTA جمع آوری شد. با استفاده از کیت استخراج DNA (AccuPrep® genomic DNA extraction kit) ماده ژنتیکی هر نمونه استخراج و در دمای ۲۰- نگهداری شد. از برنامه Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) به همراه توالی پروموتر ژن اینترلوکین-۸ (بانک ژن با شماره دسترسی AY627308.1) جهت طراحی یک جفت آغازگر جدید استفاده شد. با اسفاده از آغازگرهای 5'-cagatgactcagatgtgctctca-32 و 3'-5'-caggaaaagctgccaagaga قطعه‌ای به طول ۲۶۰ نوکلئوتید از ناحیه پروموتر و بخشی از ناحیه کد کننده (۲۱۶ نوکلئوتید قبل از شروع رونویسی و ۴۴ نوکلئوتید از ناحیه کد کننده) ژن اینترلوکین-۸ تکثیر شد.

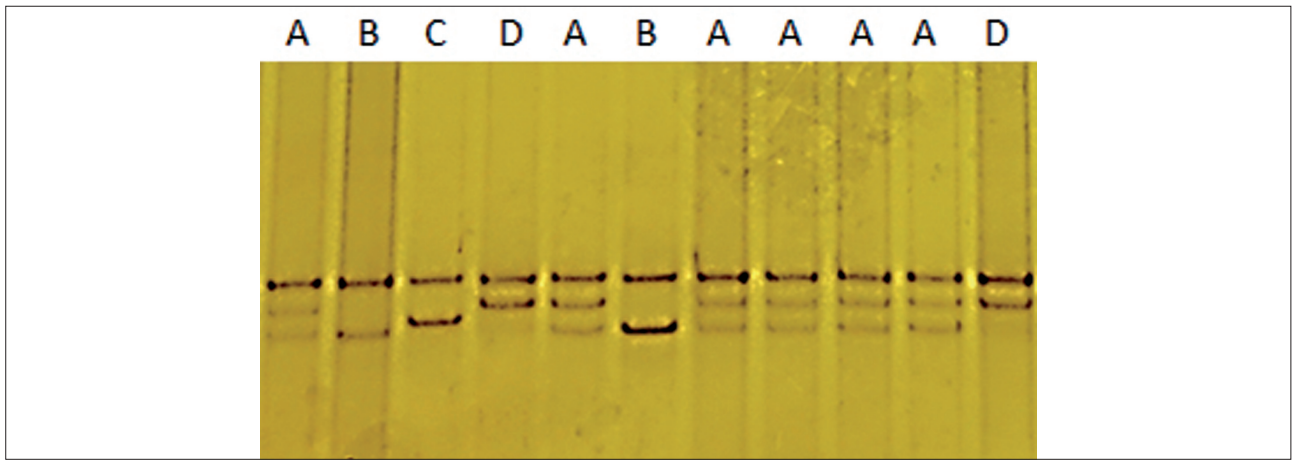
واکنش PCR با استفاده از کیت بایونیر (BiONEER) با اجزای لیوفیلیزه صورت گرفت که هر میکروتیوب حاوی ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۱۰mmol تریس- اسیدکلریدریک (pH=9)، ۵۰mmol کلرید کلسیم، ۱/۵mmol کلرید منیزیم و ۲۰۰mmol از هر نوکلئوتید بود. شرایط واکنش PCR شامل مرحله واسرشست اولیه به مدت ۲ دقیقه در دمای $95^{o}C$، به همراه ۳۰ چرخه با واسرشست DNA در دمای $95^{o}C$ برای مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به DNA در دمای $63^{o}C$ به مدت ۳۰ ثانیه و بسط آغازگرها در دمای $72^{o}C$ به مدت ۲۵ ثانیه و مرحله بسط نهایی در $72^{o}C$ 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 ۶µL بافر دناتوره (فرمامید، ۰/۲۵٪ بروموفنل بلو، ۰/۲۵٪ زایلون، EDTA ۰/۵mmol) مخلوط و برای مدت ۵ دقیقه در دمای $95^{o}C$ تک رشته‌ای شد. 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 ۱۰٪ اکریلآمید با استفاده از بافر TBE تهیه و به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق با ولتاژ ۷/۵V/Cm الکتروفورز شد. سرانجام ژل با روش نیترات نقره رنگ آمیزی و ژنوتیپ هر نمونه تعیین شد. محصولات PCR برای هر الگوی SSCP با استفاده از کیت کیاژن (Qiagen) تخلیص و مستقیماً توسط هر دو آغازگر تعیین توالی شدند. جهت شناسایی تفاوت نوکلئوتیدی در الگوهای متفاوت SSCP، همترازی توالی‌های بدست آمده توسط نرم افزار CLUSTALW (http://workbench.sdsc.edu) انجام گرفت. همچنین، برای ارزیابی تأثیر جهش‌های شناسایی شده بر جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی در ناحیه تکثیر شده، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی با استفاده از نرم افزار TFSEARCH v1.3 (http://www.cbrc.jp/researh/db/TFSEARCH.html>) صورت گرفت.

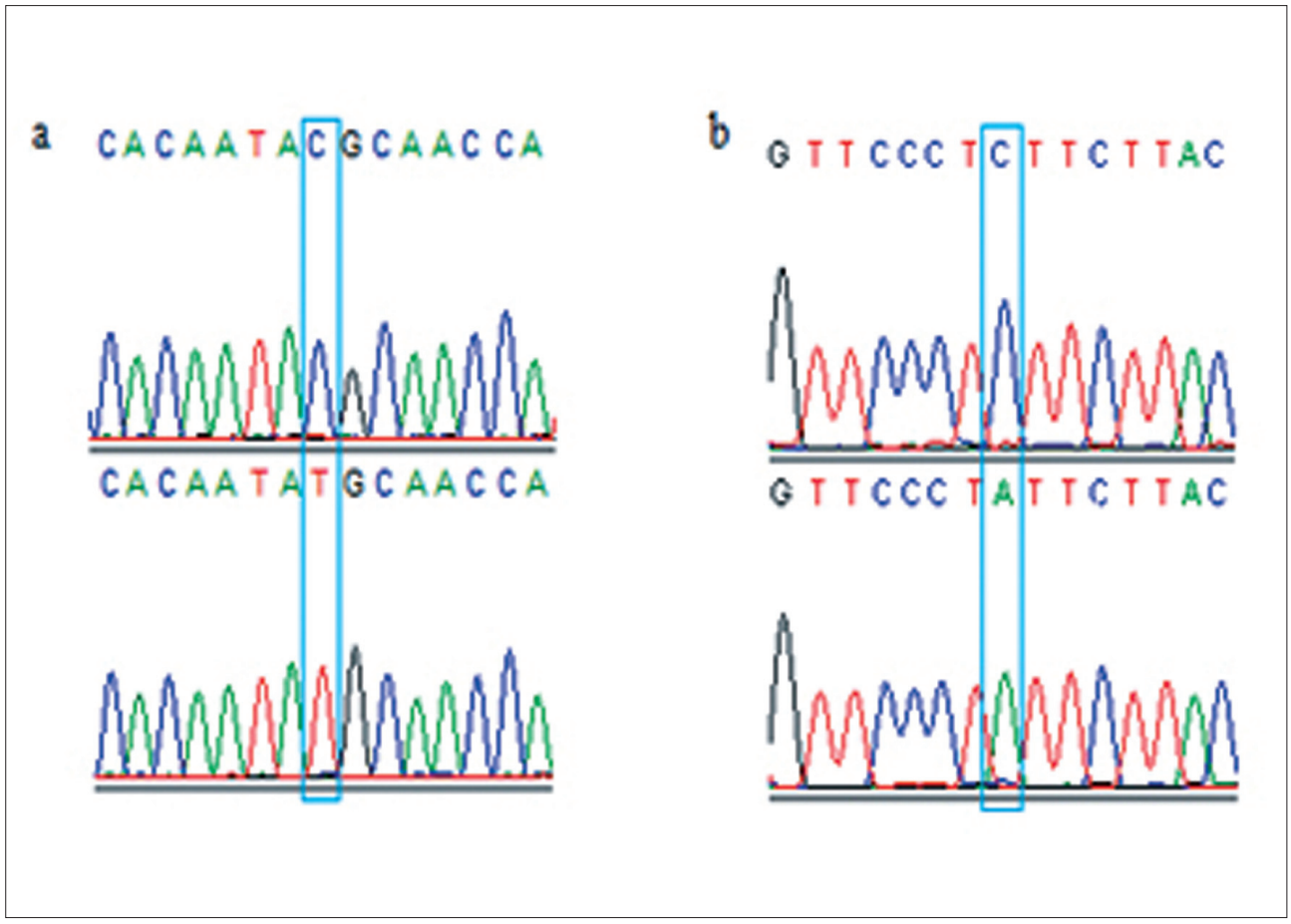
نتایج

در این تحقیق، چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین-۸ گاو با استفاده از روش PCR-SSCP و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. در تمام نمونه‌های دو نژاد بومی و هلشتاین تعداد ۴ الگوی واضح SSCP برای قطعه تکثیر شده آشکار شد که این الگوهای متفاوت باندی با حروف A تا D نامگذاری شدند (تصویر۱). مقایسه فراوانی هر الگو (جدول۱) در دو نژاد نشان می‌دهد که الگوی A بیشترین فراوانی در نژاد هلشتاین (۰/۶۲) و الگوی B دارای حداکثر فراوانی (۰/۶۸) در گاوهای بومی می‌باشد. پس از تعیین توالی الگوهای SSCP، دو چند شکلی تک نوکلئوتیدی در این ناحیه شناسایی شد: جایگزینی G با A در جایگاه ۱۸۰- و جایگزینی C با A در جایگاه ۱۲۶- نسبت به جایگاه شروع رونویسی (تصویر۲). البته چندشکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه ۱۲۶- در الگوی C تنها در گاوهای بومی مشاهده گردید بطوری که گاوهای هلشتاین برای این جایگاه هموزیگوت CC بودند. فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی چند شکلی تک نوکلئوتیدی جایگاه ۱۸۰- در جدول ۲ آمده است. در مورد چند شکلی جایگاه ۱۲۶- تنها آلل C در نژاد هلشتاین مشاهده شد ولی در نژاد بومی، ۸ درصد دام‌ها برای این جایگاه هموزیگوت AA بوده و فراوانی آلل C در این جمعیت ۰/۹۲ می‌باشد. به عبارت دیگر، ژنوتیپ هتروزیگوت برای این جایگاه (CA) در هیچکدام از دو جمعیت مشاهده نشد.

جستجو جهت شناسایی جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی ممکن با استفاده از TFSEARCH، جایگاه‌های متعددی برای اتصال فاکتورهای رونویسی مانند AP-1، C/EBPb، NF-kap، c-Rel، 1-GATA، 2-Nkx و CdxA و TATA آشکار شد (تصویر۳). از طرف دیگر، تجزیه و تحلیل اینسیلیکو (In silico) جهت بررسی نتایج چند شکلی‌های شناسایی شده روی جایگاه‌های اتصال نشان داد که جابجایی G با A در جایگاه ۱۸۰- نه تنها هیچ جایگاهی از فاکتورهای رونویسی را مختل نکرد بلکه منجر به ایجاد جایگاهی برای فاکتور رونویسی Oct-1 گردید. علاوه بر این جایگزینی C با T در جایگاه ۱۲۶- قبل از شروع رونویسی نیز منجر به ایجاد جایگاهی برای فاکتور رونویسی Ik-2 شد (تصویر۳).



تصویر ۱. الگوهای SSCP مشاهده شده در قطعه تکثیر شده از پروموتر ژن اینترلوکین ـ ۸.

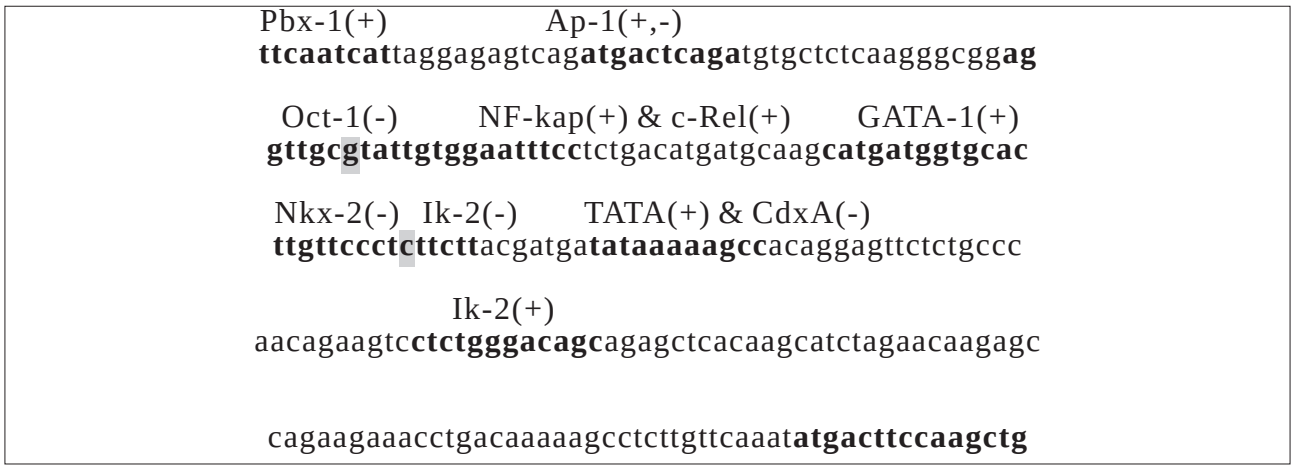


تصویر ۲. چندشکلی های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ـ ۸. a) جایگزینی G با A در جایگاه ۱۸۰ـ در زنجیرهَ ۵ ⟵ ۳َ. b) جایگزینی C با A در جایگاه ۱۲۶ـ در زنجیرهَ ۵ ⟵ ۳َ.

بحث

یکی از نواحی بسیار مهم در فرآیند بیان ژن ناحیه پروموتر هر ژن است که آنزیم RNA پلیمراز و فاکتورهای رونویسی با DNA در این ناحیه متصل و فرآیند رونویسی از ژن را آغاز می‌کنند. در این ناحیه توالی‌های تنظیمی وجود داشته که هرگونه تنوع ژنتیکی در آنها ممکن است در راندمان رونویسی ژن موثر باشد. این امر محرکی برای انجام تحقیقات بسیاری برای شناسایی تنوع ژنتیکی ناحیه پروموتر ژن‌های مختلف و تأثیر آن بر صفاتی مانند بیماری ورم پستان در گاو شده است.

در این مطالعه، با بررسی ناحیه پروموتر ژن IL-8، وجود چهار الگوی



تصویر ۳. جایگاه فاکتورهای رونویسی و چند شکلی های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده (رنگ طوسی) در قطعه تکثیرشده از ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ـ ۸ (علامت + برای زنجیره سنس یا زنجیره ´۵ ⟶ ´۳ و علامت ـ برای زنجیره آنتی سنس یا زنجیره ´۵ ⟶ ´۳).

جدول۱. درصد فراوانی الگوهای مشاهده شده در دو نژاد گاو.

نژاد	الگوی A	الگوی A	الگوی C	الگوی D
هلشتاین	۶۲	۱۸	۰	۲۰
بومی	۱۲	۶۸	۸	۱۲

جدول۲. درصد فراوانی ژنوتیپی و آللی چند شکلی جایگاه ۱۸۰-.

نژاد	ژنوتیپ AA	ژنوتیپ AG	ژنوتیپ GG	آلل A	آلل G
هلشتاین	۲۰	۶۲	۱۸	۵۱	۴۹
بومی	۱۳	۱۳	۷۴	۱۹/۵	۸۰/۵

متفاوت SSCPs آشکار شد که در نمونه‌های هلشتاین الگوی C مشاهده نشد. فقدان این الگو در گاوهای هلشتاین نشان دهنده تنوع پایین این ناحیه در گاوهای هلشتاین نسبت به گاوهای بومی است. به طور کلی، اهداف اصلاحی در گاوهای شیری مانند هلشتاین منحصر ا به صفات تولید شیر مانند مقدار شیر و ترکیبات آن متمرکز شده است که نتیجه آن کاهش جدی در پتانسیل ژنتیکی گاوهای شیری در مقاومت به بیماریها می باشد. در مقایسه با نمونه‌های گاوهای بومی، کمتر بودن تنوع ژنتیکی و متفاوت بودن میزان فراوانی الگوها در گاوهای هلشتاین نشان می دهد که انتخاب برای صفات تولید شیر منجر به کاهش تنوع ژنتیکی و تغییر فراوانی ژنوتیپ‌های موثر بر سیستم ایمنی در جمعیت می‌گردد. Meade و همکاران در سال ۲۰۱۲ با مطالعه ۲/۱Kbp از ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ـ۸ در دو نژاد گاو شیری، ۲۹ جایگاه چند شکلی در این ناحیه شناسایی کرد. تجزیه و تحلیل این چند شکلی ها، تعداد ۳ هاپلوتیپ برای این ناحیه مشخص کرد که فراوانی ۲ هاپلوتیپ در دو نژاد مطالعه شده فراوانی بسیار بالایی را نشان داد. در این پژوهش، فراوانی آلل G در یک نژاد هلشتاین فریزین تحت انتخاب جهت بهبود صفات تولید شیر برابر ۰/۵۴ بود در حالی که برای نژاد هلشتاین نیوزیلندی که در معرض انتخاب ژنتیکی قرار نگرفته بود این آلل فراوانی ۰/۳۴ را نشان داد (۱۲).

با تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ناحیه پروموتر ژن IL-8 جایگاه‌های متعددی برای اتصال فاکتورهای رونویسی مانند AP-1، C/EBPb، kap-، NF، c-Rel، GATA-1، Nkx-2، CdxA و TATA مشاهده شد. همچنین تأثیر این چند شکلی های نوکلئوتیدی شناسایی شده بر جایگاه‌های اتصال فاکتورهای رونویسی مورد بررسی قرار گرفت. در این ناحیه تکثیر شده جابجایی G با A در جایگاه ۱۸۰ـ منجر به ایجاد جایگاه اتصالی برای فاکتور رونویسی Oct-1 گردید. فاکتور رونویسی Oct-1 جزئ خانواده فاکتورهای رونویسی POU بوده که در انواع بسیاری از سلول ها بیان می شود و جایگاه اتصال آن توالی ATGCAAAT می باشد (۱۵). اگرچه، فاکتورهای متعددی در کنترل رونویسی ژن اینترلوکین ـ۸ درگیر هستند (۶)، اما نقش فاکتور رونویسی oct-1 به دلیل توانایی بازدارندگی بیان ژن اینترلوکین ـ۸ بسیار مهم بوده (۱۹،۱۶،۷،۲)، که این فعالیت خود را با جابجا کردن تحریک کننده رونویسی C/EBP از پروموتر اینترلوکین ـ۸ انجام می دهد (۱۸) اتصال این فاکتور رونویسی می تواند منجر به کاهش حساسیت توالی ژن اینترلوکین ـ۸ به محرک های داخلی و خارجی گردد (۱۲).

جایگزینی C با T در جایگاه ۱۲۶ـ قبل از جایگاه شروع رونویسی نیز منجر به ایجاد جایگاهی برای فاکتور رونویسی Ik-2 شد. این فاکتور رونویسی متعلق به خانواده پروتیینی ایکاروس بوده که به جایگاه خود (C/TGGGAA/T) در پروموتر ژن متصل می شود. برای این خانواده از فاکتورهای رونویسی نیز هر دو فعالیت تحریک کنندگی و بازدارندگی روی فرآیند رونویسی گزارش شده است (۸،۱۳،۱۷). در موش، فاکتورهای رونویسی ایکاروس جهت توسعه سلول های لنفوئیدی و فعالیت ژن های تحلیل برنده تومور ضروری بوده و بر این اساس پیشنهاد شده که تغییر بیان پروتیین های ایکاروس ممکن است در سرطان های خون درگیر باشند (۴).

به طور کلی، این اولین تحقیق جهت شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین ـ۸ در گاوهای بومی و

هلشتاین در ایران می‌باشد. چند شکلی‌های گزارش شده در این مطالعه می‌تواند در تنظیم رونویسی ژن اینترلوکین-۸ موثر باشند. از این رو، بررسی نقش چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در ناحیه پروموتر این ژن به منظور اندازه گیری میزان بیان ژن اینترلوکین-۸ ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم است از مسئولین واحد دامداری شیر و گوشت فتاحی اصفهان و آقای مهندس نجاریان مدیر تولید واحد جهت فراهم کردن نمونه تشکر و قدرانی شود. همچنین از آقای مهندس جواد حبیبی زاد جهت کمک‌های قابل توجه ایشان در انجام این تحقیق کمال تشکر را دارم.

References

1. Bellomo, R. (1992) The cytokine network in the critically ill. Anaesth Intensive Care. 20: 288-302.
2. Bhat, R., Weaver, J.A., Sterling, K.M., Bresnick, E. (1996) Nuclear transcription factor Oct-1 binds to the 5'-upstream region of CYP1A1 and negatively regulates its expression. Int J Biochem Cell Biol. 28: 217-227.
3. Christine, B., Mairead, D., Stuart, C., Donagh, P.B., David, A.M., Tommie, V.M.C., Linda, G. (2010) Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. BMC Genet. 11: 99.
4. Georgopoulos, K., Winnandy, S., Avitahl, N. (1997) The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. Ann Rev Immunol. 15: 155-76.
5. Heaton, M.P., Laegreid, W.W., Beattie, C.W., Smith, T.P.L., Kappes, S.M. (1999) Identification and, genetic mapping of bovine chemokine genes expressed in epithelial cells. Mamm Genome. 10: 128-133
6. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., Kracht, M. (2002) Multiple control of interleukin-8 gene expression. J Leukoc Biol. 72: 847-855.
7. Jennifer, S.G., James, J.P. (2007) Transcriptional regulation of deoxynivalenol-induced IL-8 expression in human monocytes. Toxicol Sci. 99: 502-511.
8. Koipally, J., Heller, E.J., Seavitt, J.R., Georgopoulos, K. (2002) Unconventional potentiation of gene expression by Ikaros. J Biol Chem. 15: 13007-13015.
9. Kusner, D.J., Luebbers, E.L., Nowinski, R.J., Konieczkowski, M., King, C.H., Sedor, J.R. (1991) Cytokine- and LPS-induced synthesis of interleukin-8 from human mesangial cells. Kidney Int. 39: 1240-8.
10. Leyva-Baca, I., Schenkel, F., Sharma, B.S., Jansen, G.B., Karrow, N.A. (2007) Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine CCL2, IL8, CCR2 and IL8RA genes and their association with health and production in Canadian Holsteins. Anim Genet. 38: 198-202.
11. Leyva-Baca, I., Schenkel, F.,Martin, J., Karrow, N.A. (2008) Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada. J Dairy Sci. 91: 407-417.
12. Meade, K.G., O'Gorman, G.M., Narciandi, F., MacHung, D.E., O'Farrelly, C. (2012) Functional characterization of bovine interleukin 8 promoter haplotypes in vitro. Mol Immunol. 50: 108-116.
13. Pierangela, S., Niall, D. (2005) The *λ5-VpreB1* locus-a model system for studying gene regulation during early B cell development. Semin Immunol. 17: 121-127.
14. Proudfoot, A.I. (2002) Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol. 2: 106-115.
15. Ryan, A.K., Rosenfeld, M.G. (1997) POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. Genes Dev. 11: 1207-1225.
16. Sibbet, G. J., Cuthill, S., Campo, M. S. (1995) The enhancer in the long control region of human papillomavirus type 16 is up-regulated by PEF-1 and down-regulated by Oct-1. J Virol. 69: 4006-4011.
17. Westman, B.J., Mackay, J.P., Gell, D. (2002) Ikaros: a key regulator of haematopoiesis. Int J Biochem Cell Biol. 34: 1304-1307.
18. Wu, G. D., Lai, E. J., Huang, N., Wen, X. (1997) Oct-1 and CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP)

bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. J Biol Chem. 272: 2396-2403.

19. Zhang, H., Shepherd, A.T., Eason, D.D., Wei, S., Diaz, J.I., Djeu, J.Y., Wu, G.D., Blanck, G. (1999) Retinoblastoma protein expression leads to reduced Oct-1 DNA binding activity and enhances interleukin-8 expression. Cell Growth Differ. 10: 457-465.

Identification and characterization of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of bovine IL-8 gene in Iranian native and Holstein cattle

Muhaghegh-Dolatabadi, M.*

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

(Received 28 June 2013 , Accepted 25 September 2013)

Abstract:

BACKGROUND: IL-8, a proinflammatory cytokine, is a small protein that attracts and activates neutrophils in the early stages of host defense against bacterial invasion. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region of IL-8 gene can influence this gene transcription process and consequently its role and function. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to identify and analyze SNPs in the promoter region of IL-8 gene in Iranian native and Holstein cattle breeds (Bos Taurus). **METHODS:** A part of promoter region of IL-8 gene was screened by single strand conformation polymorphism (SSCP) method and DNA sequencing. The multiple alignments were carried out for the nucleotide sequences of different SSCP patterns. In silico analysis was conducted to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the promoter region of bovine IL-8 gene was screened, to identify any association with transcription factor binding. **RESULTS:** A total of 4 distinct SSCP patterns were observed which by determining the nucleotide sequence, 2 SNPs were found at positions -126 and -180. The SNP at position -126 was found only in the native breed. The in silico analysis on location of transcription factors showed that SNPs identified at -126 and -180 created putative binding sites for Ik-2 and Oct-1 transcription factors, respectively. **CONCLUSIONS:** The possible functional role of identified SNPs in this gene activity should be proved using gene expression analysis. Further studies required to evaluate the identified SNPs for disease resistant traits in cattle.

Key words: IL-8, SNPs, promoter region, SSCP, transcription factors

Figure Legends and Table Captions

Figure1. Different SSCP patterns of amplified fragment at promoter region of bovine IL-8 gene.

Figure2. Sequence chromatograph of identified SNP in the promoter region of IL8 gene a) substitution of G to A at position of -180 in 3' → 5' strand, b) substitution of C to A at position -126 in 5' → 3' strand

Figure3. Putative transcription factor sites (Bold font) and SNPs (grey color) in amplified fragment of promoter region of bovine IL-8 gene (+ for 3' → 5' strand and - for 5' → 3' strand).

Table1. Frequency of different SSCP patterns in two cattle breeds (%).

Table2. Genotypes and allele's frequency of SNP at position -180 (%).

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