

شناسایی مقایسه ای واریانت های آللی ژن BOLA در گاوهای هلشتاین آبستن و غیر آبستن با استفاده از

داده‌های توالی یابی نسل بعدی

شماره صفحات

۷۵-۸۶

علی اکبر ولی^۱، ایوب فرهادی^{۲*}، محسن قلی زاده^۲، قدرت رحیمی میانجی^۳، الهام یونسی ملردی^۴

(۱) دانشجوی دکتری تخصصی ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

(۲) دانشیار گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

(۳) استاد گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

(۴) دکتری تخصصی بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.

نویسنده مسئول: *ayoub_farhadi@sanru.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۲۴

چکیده

هدف از پژوهش حاضر مطالعه، ردیابی و مقایسه نشانگرهای مولکولی ژن BOLA در گاوهای هلشتاین آبستن و غیر آبستن بود. حیوانات مورد آزمایش شامل گاوهای هلشتاین فریزین و فاقد هر گونه بیماری های کلینیکی و یا سابقه مشکلات تولید مثلی بودند. تعداد نمونه های مورد مطالعه شامل ۸ گاو آبستن شده و ۱۱ گاو آبستن نشده بود. داده های پژوهش حاضر حاصل توالی یابی RNA بودند. خوانش ها پس از کنترل کیفیت، در برابر ژنوم مرجع همردیفی و مکان یابی شده و از نرم افزار های دو مجموعه نرم افزاری Picardtools و GATK به منظور شناسایی واریانت های مدنظر استفاده شد. شبکه کنش متقابل ژن مورد نظر در سطح پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING ترسیم گردید. نتایج نشان داد که در ژن BOLA در گاو غیر آبستن در مقایسه با گاو آبستن ۴ رونوشت متفاوت و در مجموع تعداد ۱۵ SNP وجود دارد که این چندشکلی ها در ژن BOLA و ناحیه تنظیمی بالادستی آن که محل اتصال bta-mir- microRNA 11979 است و اختصاصاً فقط در گاوهایی که آبستن نشده اند مشاهده شد. در بین جهش های مشاهده، یک جهش در موقعیت ۲۸۷۲۲۳۲۸ جفت بازی منجر به جایگزینی نوکلئوتید آدنین با سیتوزین و ایجاد کدن خاتمه در پروتئین ژن BOLA گردید. واریانت حذف/الحاق در ژن مورد نظر مشاهده نشد. با توجه به جهش های بدمعنی و خاتمه مشاهده شده در ژن BOLA که احتمالاً منجر به تغییرات اساسی در ساختار آن می گردد، از جهش های شناسایی شده در این پژوهش می توان برای انتخاب در برنامه های اصلاح نژاد استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آبستنی، چند شکلی تک نوکلئوتیدی، گاو هلشتاین، BOLA و RNA-seq.

مقدمه

پیشرفت های روش های اصلاح نژادی در دهه های اخیر همزمان با بهبود صفات تولید شیر در گاو هلشتاین، سبب کاهش توان باروری و بروز مشکلات عدیده تولید مثلی نظیر کاهش نرخ آبستنی شده است. تولید مثل عامل مهمی در تعیین بازده تولیدی گاوهای شیری است، گاوها در بهترین حالت باید سالانه یک آبستنی داشته باشند. معیار اندازه گیری تولید مثل شامل تعداد تلقیح به ازای آبستنی، تعداد روزهای باز و فاصله زایش می باشد. طولانی شدن فاصله بین دو زایمان موجب وارد آمدن زیان به دامدار می شود اما امروزه با پیشرفت در تکنولوژی های ژنتیک مولکولی و شناسایی ژن های بزرگ اثر در ارتباط با صفات مهم، امکان انتخاب بر اساس اطلاعات ژنومی افراد فراهم شد. به طوری که ردیابی ژن ها و جهش های موثر بر صفات اقتصادی با استفاده از روش های ژنتیک مولکولی منجر به شناسایی ژن های کاندید موثر بر صفات مهم اقتصادی در دام های اهلی شده است (Cochran *et al.*, 2013). تاکنون جایگاه های ژنی متعددی در ارتباط با کنترل صفات تولید مثلی در گاوهای پرورش یافته در داخل کشور با استفاده از تکنیک های ژنتیک مولکولی شناسایی و معرفی شده اند. به عنوان مثال بروز جهش بی معنی p.R12X در ژن SLC37A2 و Q579X در ژن APAF1 منجر به جایگزینی یک اسید آمینه خاتمه دهنده در توالی پروتئین ژن های فوق و منجر به از دست رفتن عملکرد آن ها و بروز اختلالات تولید مثلی خصوصاً تولید جنین های مرده می شود (Enayati *et al.*, 2021) و (Hoseini *et al.*, 2020). تلفات جنین بین روزهای ۷ تا ۱۶ جنینی را در گاوهای غیر شیرده بوس تاروس با انتقال ۲۴۴۹ (در گروه های ۳ تا ۳۰ تایی) بلاستوسیست در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. در ۱۵۲ انتقال، تلفات حاملگی که صرفاً به نارسایی گاو گیرنده نسبت داده شد (بین ۶ درصد تلیسه و ۱۶ درصد گاوهای شیری بوده است که ۳ درصد آن به دلیل عفونت های رحمی بوده است). فصل بر نرخ آبستنی تأثیری نداشت. مشاهدات اخیر نشان داد که دلیل اصلی عدم موفقیت گیرنده در حفظ جنین در زمان انتقال مرگ و میر ذاتی جنین در هفته دوم بارداری (۲۴ درصد) بود (Berg *et al.*, 2010). در سال های اخیر با ظهور تکنولوژی نوین توالی یابی نسل بعدی تحول بزرگی در علم ژنتیک و سایر علوم وابسته از جمله در تشخیص بیماری های ژنتیکی، اپی ژنتیک و شناسایی تنوعات ساختاری در ژنوم رخ داده است. با استفاده از این تکنیک، امکان تشخیص تفاوت های چند شکلی تک نوکلئوتیدی که می توانند عامل بسیاری از صفات مهم اقتصادی و بیماری ها باشند، فراهم شده است. توالی یابی RNA با توان عملیاتی بالا در ابتدا برای بررسی بیان کلی ژن ها در بافت های مختلف توسعه یافت، اگر چه امروزه یکی از روش های با کارایی مطلوب جهت شناسایی جهش های تک نوکلئوتیدی در نواحی کد شونده ژنوم می باشد (Younesi-Melerdi *et al.*, 2020). در مطالعه ای با هدف تعیین مشخصات رونوشت رحمی گاوهای آبستن در مقابل غیر آبستن در اوایل بارداری و تلاش برای تعریف مجموعه ای از ژن های نشانگر بالقوه انجام دادند. نمونه برداری های رحمی برای تجزیه و تحلیل توالی یابی RNA با پلت فرم Illumina انجام شد. در این پژوهش تعداد ۱۴,۶۵۴ ژن بین گروه ها بیان افتراقی نشان دادند. داده های رونوشت رحمی نشان داد که ۲۱۶ ژن در گاو آبستن در مقایسه با گاو غیر آبستن بیان متفاوت

داشتند ($P < 0.01$). نتیجه، این مطالعه مجموعه منحصر به فردی از ژن‌ها را مشخص کرد که ۶ روز پس از تلقیح در رحم بیان می‌شوند، که نشان‌دهنده وضعیت پذیرش منجر به موفقیت بارداری است. علاوه بر این، بیان چنین ژن‌هایی می‌تواند به عنوان نشانگرهای بالقوه برای پیش‌بینی موثر موفقیت بارداری مورد استفاده قرار گیرد (Binelli et al., 2015). ژن BOLA در ژنوم گاو بر روی کروموزوم شماره ۲۳ قرار داشته و دارای ۸ اگزون می‌باشد. این ژن گلیکوپروتئینی را رمزگذاری می‌کند که عمدتاً روی سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن مانند سلول‌های B، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیال وریدی و سلول‌های دندریتیک بیان می‌شود که به پاتوژن‌های داخل سلولی پاسخ می‌دهند. مطالعات نشان داده‌اند که ژنوتیپ BoLA DRB3 می‌تواند بر میزان ایمنی ذاتی و تطبیقی تأثیر می‌گذارد (Garcia et al., 2000). عملکرد اصلی گلیکوپروتئین‌های بیان شده، تسهیل نقش نگهبان سیستم ایمنی در تشخیص آنتی‌ژن‌های مختلف و برانگیختن پاسخ‌های جانبی و ضد التهابی است (Klein, 1986). به دنبال درونی‌سازی توسط سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن، آنتی‌ژن‌های اگزوزن به پپتیدهای کوچکتر تجزیه می‌شوند که می‌توانند به شیار اتصال آنتی‌ژن گلیکوپروتئین‌ها متصل شوند. سپس کمپلکس پپتید-MHC حاصل شده به غشای پلاسمایی سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن منتقل می‌شود و به گیرنده‌های لنفوسیت‌های T کمکی CD4+ ارائه می‌شود (Roche and Furuta, 2015). بسته به ماهیت آنتی‌ژن‌های ارائه شده، لنفوسیت‌های T فعال شده به سلول‌های موثر TH1، TH2 یا TH17 تمایز می‌یابند که به نوبه خود می‌توانند تعدادی از پاسخ‌های پیش و ضد التهابی را تحریک کنند (Teh et al., 1988). در پژوهش حاضر نشانگرهای مولکولی حاصل از جهش‌های چند شکلی تک نوکلئوتیدی و حذف و الحاق به طور مقایسه‌ای روی ژنوم گاوهای هلشتاین آبستن و غیرآبستن با استفاده از داده‌های توالی یابی RNA ردیابی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

روش انجام پژوهش

داده‌های NGS استفاده شده در پژوهش حاضر از سایت بانک جهانی ژن (NCBI) با شماره دسترسی GSE115756 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE115756>) که حاصل پژوهش Mazzoni و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد دانلود شد. داده‌ها با استفاده از پلتفرم Illumina Hiseq2500 تولید شده بودند. فاز پرورش و فارمی این پژوهش بر اساس قوانین آزمایشات حیوانی دانمارک (شماره ۴۷۴) انجام شد. حیوانات مورد آزمایش شامل گاوهای هلشتاین فریزین در اواسط دوره‌های شیردهی اول، دوم و سوم و فاقد هر گونه بیماری‌های کلینیکی و یا سابقه مشکلات تولید مثلی بودند. تمامی فحلی‌ها به صورت خودبخودی بوده و از همزمان سازی فحلی استفاده نشده است. بروز فحلی روزی دوبار و با مونیتورینگ فعالیت دام‌ها در فواصل ۶ ساعته انجام شد. جنین‌ها برای انتقال با روش IVF تولید شده و سپس برای انتقال ۲۸ بلاستوسیت انتخاب و آزمایش‌ها برای رسیدن به تعداد ۱۲ بارداری (تعداد کافی

برای مطالعات (RNA-seq) ادامه یافت. نمونه های بیوپسی در روزهای ۸-۶ سیکل فحلی (دی استروس) و به طور عمیق از رحم تهیه شدند به طوری که شامل اپیتلیوم غده ای اندومتریوم، استروما، رگ های خونی، اعصاب و لوکوسیت های مهاجم بود. نمونه های بیوپسی به میکروتیوب های ۲ میلی لیتری حاوی ۱/۵ میلی لیتر RNA later منتقل و به مدت دو ساعت در دمای محیط نگهداری شدتد. سپس هر نمونه بیوپسی به دو تکرار تقسیم و تا زمان استخراج RNA در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای استخراج RNA از کیت RNeasy minikit کمپانی کیاژن استفاده شد. انتقال جنین در روزهای ۸-۶ سیکل بعدی فحلی و وضعیت آبستنی بعد از ذبح دام ها در روزهای ۴۷-۲۶ بعد از انتقال جنین مورد بررسی قرار گرفت. از روز انتقال تا روزهای ۴۷-۲۶، گاوهای دریافت کننده جنین هیچ نوع علائم فحلی را نشان ندادند و برای جمع آوری اندام های تولید مثل ذبح شدند. بعد از کشتار شاخ های رحم باز شده و بر اساس یافته های رویان (روزهای ۴۲-۲۶)، جنین (روزهای بعد از ۴۲) و غشاهای جنینی، به عنوان آبستن یا غیر آبستن ثبت شدند. از بین ۲۴ گاو انتخاب شده (آبستن و غیر آبستن) توزیع نوبت های زایش بالانس بود. تغذیه دام ها در دوره آزمایش با استفاده از جیره استاندارد پیشنهادی NRC انجام شد. تجزیه و تحلیل داده های RNA-seq برای شناسایی واریانت های SNP و In/del انجام شد. کنترل کیفیت خوانش با استفاده از نرم افزار FastQC ویرایش 0.12.0 (Simon, 2010) انجام شد و سپس خوانش های با کیفیت مناسب در برابر ژنوم مرجع با استفاده از همردیف ساز STAR ویرایش 2.7.11b (Dobin et al., 2013) ([http:// anaconda.org/biocoda/star](http://anaconda.org/biocoda/star)) همردیفی و مکان یابی شدند بعد از همردیفی توالی ها با ژنوم مرجع از نرم افزار های فراهم شده در دو مجموعه نرم افزاری Picardtools (<http://broadinstitute.github.io/picard>) و GATK به منظور شناسایی چندشکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) و حذف/الحاق (Indel) استفاده شد. در نهایت، تفسیر جهش های شناسایی شده با استفاده از نرم افزار snpEff انجام شد. اطلاعات ژنومی و پروتئینی و جایگاه کروموزومی جهش های شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده های ژنومی Ensemble استخراج شده و بر اساس این داده ها، اطلاعات واریانت های مشاهده شده در شرایط این آزمایش در ژن مورد مطالعه از فایل VCF (Variant Calling File) استخراج گردید. سپس تفسیری از واریانت های شناسایی شده شامل میزان اثرگذاری، نوع و محل جهش و نوع رونوشت متاثر شده بر اساس پیرایش متناوب برای ژن مورد نظر ارائه شد. در ادامه شبکه کنش متقابل ژن مورد نظر در سطح پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING ترسیم گردید. به منظور دست یابی به نتایج قابل اعتمادتر، کنش متقابل با غیر فعال کردن همه موارد پیش فرض از قبیل تکست ماینینگ، دیتابیس، هم بیانی، همسایگی و غیره و تنها با استفاده از داده های حاصل از آزمایشات مولکولی آزمایشگاه های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین حداقل امتیاز کنش متقابل بین پروتئین ها برابر با ۰/۴ (سطح اطمینان متوسط) در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج کنترل کیفیت داده های مورد استفاده از قبیل کیفیت بازهای خوانش شده، وجود توالی های بیش از حد مشاهده شده، فراوانی توالی های دوبرابر شده و انحراف فراوانی مقدار بازهای آلی در هر کتابخانه و ... در پژوهش حاضر نشان داد که داده های مورد نظر از کیفیت مطلوبی برای ورود به مسیر آنالیز برخوردار هستند. نتایج حاصل از شناسایی نشانگرهای تک نوکلئوتیدی و حذف/الحاق نشان داد که در ژن BOLA در گاو غیر آبستن در مقایسه با گاو آبستن چهار رونوشت متفاوت و در مجموع تعداد ۱۵ چند شکلی تک نوکلئوتیدی وجود دارد که این چندشکلی ها به طور اختصاصی فقط در گاوهایی که آبستن نشده اند مشاهده شده است. رونوشت چهارم مربوط به microRNA به نام bta-mir-11979 می باشد که در بالادست ژن مورد نظر شناسایی شد (جدول ۱).

جدول ۱- نوع ژن و تعداد رونوشت های مختلف شناسایی شده در ژن BOLA در پژوهش حاضر

Table 1- type of gene and number of different transcript in BOLA gene identified in the present study

نام ژن Gene name	شناسه ژن Gene ID	شناسه رونوشت Transcript ID	نوع ژن Gene type
BOLA	ENSBTAG00000002069	ENSBTAT00000031167	کد کننده پروتئین Protein coding
BOLA	ENSBTAG00000002069	ENSBTAT00000035878	کد کننده پروتئین Protein coding
BOLA	ENSBTAG00000002069	ENSBTAT00000082694	کد کننده پروتئین Protein coding
bta-mir-11979	ENSBTAG00000054323	ENSBTAT00000082434	miRNA

با تعیین محل جهش های رخ داده در رونوشت های مختلف با استفاده از سایت Ensembl بروز جهش ها در مجموع در ۴ موقعیت مختلف در طول ژن BOLA مشاهده گردید. اطلاعات مربوط به این ۴ موقعیت و نوع جهش ایجاد شده در آن ها در هر رونوشت در جداول ۲ تا ۴ نشان داده شده است. همانگونه که در جداول ۲ و ۳ ارائه شده است، در اثر تغییرات ایجاد شده در طول ژن BOLA در رونوشت های مختلف در اثر اولین و دومین تغییر، تعداد ۴ جهش بدمعنی که منجر به تغییر یک اسید آمینه در پروتئین ژن BOLA گردیده و تعداد یک جهش بی معنی که منجر به ایجاد یک کدن خاتمه در پروتئین ژن مورد نظر گردیده است مشاهده می شود. در جهش بدمعنی در یکی از نقاط معین زنجیره پلی پپتید را یک آمینو اسید نابجا اشغال می کند و شکل فضایی پروتئین تغییر می کند. جهش بی معنی باعث تولید کدون خاتمه شده و پروتئین کوچکتری را ایجاد می نماید. جهش از نوع اسپلاسینگ به پیرایش متناوب منجر می شود که طی آن به یک ژن واحد، این توانایی را می دهد که چندین پروتئین را گدگاری کند. در این فرایند، اگزون های خاصی از یک ژن ممکن است از نسخه نهایی mRNA ساخته شده از آن ژن، حذف یا به آن اضافه شود در نتیجه، پروتئین های ترجمه شده از RNA پیرایش شده، تفاوت هایی در توالی آمینو اسیدی و عملکرد فیزیولوژیک خود خواهند داشت (Sharma et al., 2020). در توافق با یافته های نتایج حاضر (Fang et al., 2020) نشان دادند که عمدتاً ژن های سیستم ایمنی/خونی با صفات مختلف تولید مثلی در ارتباط هستند. در پژوهش آن ها داده های RNAseq مربوط به ۷۲۳ ترانسکرپتوم از ۹۱ بافت و سلول مختلف را در ارتباط با صفات پیچیده بیولوژیکی در گاو

را مورد بررسی قرار دادند. نتیجه این پژوهش منجر به تولید یک اطلس ژنی جامع برای صفات مختلف در گاو شد. نشان داده شد که ژن های خاص بافتی به طور معنی داری منعکس کننده بیولوژی مرتبط با همان بافت می باشند که تایید کننده تاثیرات متیلاسیون پروموتور و الگوهای تکاملی مجزا می باشند. به طوری که تکامل در ژن های اختصاصی بافت مغز با سرعت کمتر و ژن های خاص بیضه با سرعت بیشتری دچار تغییر شده اند. نتایج این مطالعه تعداد ۴۵ ژن مهم اقتصادی را در ارتباط با صفات مختلف در گاو نشان داد. به طوری که ژن های CCDC88c (در سیستم ایمنی/خونی) مرتبط با باروری گاو نر، ژن های TRIM46 و RAB6A (بافت مغز) برای تولید شیر و ژن های FGF6 و CCND2 (بافت های مرتبط با رشد) برای صفات ترکیب بدن شناسایی شدند.

جدول ۲- اطلاعات مربوط به اولین تغییرات ایجاد شده در طول ژن (واریانت ها، رونوشت ها و نوع جهش های مشاهده شده در ژن BOLA و bta-mir-11979) در پژوهش حاضر

Table 2- Information related to the first changes made in the length of the gene (variants, transcripts and types of mutations observed in the BOLA gene and bta-mir-11979) in the present study

شماره کروموزوم Chromosome number	اطلاعات واریانت Variant information			اولین تغییرات ایجاد شده در امتداد طول ژن First changes in gene sequence	
	موقعیت جهش Mutation position	باز اصلی Reference base	باز جایگزین Replaced base	شناسه رونوشت Transcript ID	نوع جهش* type of mutation
23	28720811	A	C	ENSBTAT00000031167	splice_region_variant & synonymous_variant
23	28721182	A	G	ENSBTAT00000035878	missense_variant
23	28721338	A	G	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721343	G	A	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721587	G	C	ENSBTAT00000082694	splice_region_variant & intron_variant
23	28721934	T	C	ENSBTAT00000035878	synonymous_variant
23	28721950	G	T	ENSBTAT00000035878	missense_variant
23	28721955	A	G	ENSBTAT00000035878	synonymous_variant
23	28722129	G	A	ENSBTAT00000035878	splice_region_variant & intron_variant
23	28722190	C	T	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28722598	A	C	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28722927	T	G	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28723237	T	A	ENSBTAT00000035878	missense_variant
23	28723238	C	A	ENSBTAT00000035878	stop_gained
23	28723243	G	T	ENSBTAT00000035878	missense_variant

*missense variant: جهش بد معنی، stop gained: جهش خاتمه، splice_region_variant & synonymous_variant: جهش در محل پیرایش mRNA، upstream_gene_variant: جهش در ناحیه بالادست ژن، synonymous_variant: جهش هم معنی، intron_variant: جهش در اینترون.

همانگونه که در جدول ۴ ارائه شده است، در اثر تغییرات ایجاد شده در طول ژن BOLA در رونوشت های مختلف در اثر سومین تغییر، تعداد ۳ جهش بدمعنی که منجر به تغییر یک اسید آمینه در پروتئین ژن BOLA گردیده و تعداد یک جهش بی معنی که منجر به ایجاد یک کدن خاتمه در پروتئین ژن مورد نظر گردیده است مشاهده می شود. در توافق با یافته های پژوهش حاضر گزارش شده است که در روز هفتم چرخه فعلی، الگوی بیان ژن آندومتر تلیسه هایی که حاملگی آن ها منجر به زایمان می شود در مقایسه با مواردی که منجر به حاملگی نمی شود، تفاوت معنی داری دارد. نشان داده شد که بیان نابجای ژن در آندومتر رحم از علل اصلی اختلال آبستنی در گاو بوده است. با این حال، انتخاب گاو هایی که دارای پذیرش آندومتر کافی و جنین هایی با قابلیت رشد بهتر بر اساس الگوی بیان ژن هستند، چالش بزرگ تری بوده است. برای بررسی اینکه آیا الگوی بیان

ژن آندومتر قبل از انتقال جنین رابطه مستقیمی با موفقیت بارداری آینده دارد، یک آنالیز کلی روی رونوشت آندومتر با استفاده از فناوری بیوپسی آندومتر و داده‌های بارداری انجام شد به طوری که در روز ۷ سیکل فحلی تعداد ۳۰ تا ۴۰ درصد از بلاستوسیست‌ها به عنوان بیوپسی برای تجزیه و تحلیل رونوشت به گاو گیرنده منتقل شدند. این تفاوت‌ها با تغییر کمی و کیفی فرآیندهای بیولوژیکی اصلی و مسیرهای مولکولی همراه بود. اما تفاوت بیان ژن آندومتر بین گاو آبستن و غیر آبستن در روز ۱۴ چرخه فحلی حداقل بود. به طور مشابه، تجزیه و تحلیل رونوشت بین نمونه‌برداری‌های جنینی که منجر به زایمان شد و نمونه‌هایی که منجر به بارداری نشد نیز حداقل بود (Salilew-Wondim *et al.*, 2010).

جدول ۳- اطلاعات مربوط به دومین تغییرات ایجاد شده در طول ژن (واریانت‌ها، رونوشت‌ها و نوع جهش‌های مشاهده شده در ژن BOLA و bta-mir-11979) در پژوهش حاضر

Table 3- Information related to the second changes made in the length of the gene (variants, transcripts and types of mutations observed in the BOLA gene and bta-mir-11979) in the present study

اطلاعات واریانت			دومین تغییرات ایجاد شده در امتداد طول ژن		
Variant information			Second changes in gene sequence		
شماره کروموزوم	موقعیت جهش	باز اصلی	باز جایگزین	شناسه رونوشت	نوع جهش*
Chromosome number	Mutation position	Reference base	Replaced base	Transcript ID	type of mutation
23	28720811	A	C	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721182	A	G	ENSBTAT00000031167	missense_variant
23	28721338	A	G	ENSBTAT00000035878	intron_variant
23	28721343	G	A	ENSBTAT00000035878	intron_variant
23	28721587	G	C	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721934	T	C	ENSBTAT00000031167	synonymous_variant
23	28721950	G	T	ENSBTAT00000031167	missense_variant
23	28721955	A	G	ENSBTAT00000031167	synonymous_variant
23	28722129	G	A	ENSBTAT00000031167.	splice_region_variant&intron_variant
23	28722190	C	T	ENSBTAT00000035878	intron_variant
23	28722598	A	C	ENSBTAT00000035878	intron_variant
23	28722927	T	G	ENSBTAT00000035878	intron_variant
23	28723237	T	A	ENSBTAT00000031167	missense_variant
23	28723238	C	A	ENSBTAT00000031167	stop_gained
23	28723243	G	T	ENSBTAT00000031167.5	missense_variant

*missense variant: جهش بد معنی، stop gained: جهش خاتمه، splice_region_variant & synonymous_variant: جهش در محل پیرایش mRNA، upstream_gene_variant: جهش در ناحیه بالادست ژن، synonymous_variant: جهش هم معنی، intron_variant: جهش در اینترون.

در جدول شماره ۵ انواع جهش‌های مشاهده شده در اثر تغییر در موقعیت چهارم در طول ژن BOLA و microRNA اختصاصی آن نشان داده شده است. نشان داده شده است که جهش در نواحی تنظیم‌کننده از جمله پروموتورها و تقویت‌کننده‌ها، می‌تواند اتصال فاکتورهای رونویسی را مختل یا تقویت کند و وضعیت بیان ژن تک ژن‌ها را تغییر دهد (And and Patzel, 2013).

Eul). در نشخوارکنندگان اینترفرون تاو ($IFN-\tau$)، یک سیتوکین اصلی تولید شده توسط تروفکتودرم (پیش لانه گزینی)، به عنوان یک عامل کلیدی برای تشخیص بارداری است. $IFN-\tau$ بعنوان یک عامل تشخیص بارداری است که لانه گزینی جنین را در نشخوارکنندگان تنظیم می کند. پیشنهاد شده است که $IFN-\tau$ در بیان microRNA و آنتی ژن لکوسیت گاوی (BoLA) دخیل باشد. مطالعه حاضر تأیید کرد که با کاهش بیان bta-miR-204 در بافت رحمی میزان BoLA در بافت های رحم گاوهای شیری در اوایل بارداری افزایش می یابد. $IFN-\tau$ ممکن است با سرکوب بیان bta-miR-204 برای افزایش بیان BoLA در طول دوره لانه گزینی جنین در گاو عمل کند. همچنین پیشنهاد شد که $IFN-\tau$ با تنظیم BoLA، بر پاسخ ایمنی سلول T تأثیر گذاشته و در نتیجه ایمن سازی گاوهای باردار را تنظیم می کند (Wang et al., 2021). نتایج بررسی شبکه کنش متقابل ژن BOLA در سطح پروتئین با استفاده از پایگاه داده STRING بر اساس نتایج داده های آزمایشگاه های مولکولی در شکل ۱ و جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که ژن مورد نظر با هفت ژن مختلف از جمله ژن های B2M، CD8A و RPA2 در کنش متقابل است.

جدول ۴- اطلاعات مربوط به سومین تغییرات ایجاد شده در طول ژن (واریانت ها، رونوشت ها و نوع جهش های مشاهده شده در ژن

BOLA و bta-mir-11979) در پژوهش حاضر

Table 4- Information related to the third changes made in the length of the gene (variants, transcripts and types of mutations observed in the BOLA gene and bta-mir-11979) in the present study

اطلاعات واریانت			سومین تغییرات ایجاد شده در امتداد طول ژن		
Variant information			Third changes in gene sequence		
شماره کروموزوم	موقعیت جهش	باز اصلی	باز جایگزین	شناسه رونوشت	نوع جهش*
Chromosome number	Mutation position	Reference base	Replaced base	Transcript ID	type of mutation
23	28720811	A	C	ENSBTAT00000035878	downstream_gene variant
23	28721182	A	G	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721338	A	G	ENSBTAT00000031167	intron_variant
23	28721343	G	A	ENSBTAT00000031167	intron_variant
23	28721587	G	C	ENSBTAT00000035878	intron_variant
23	28721934	T	C	ENSBTAT00000082694	synonymous_variant
23	28721950	G	T	ENSBTAT00000082694	missense_variant
23	28721955	A	G	ENSBTAT00000082694	synonymous_variant
23	28722129	G	A	ENSBTAT00000082694	splice_region_variant&intron variant
23	28722190	C	T	ENSBTAT00000031167	intron_variant
23	28722598	A	C	ENSBTAT00000031167	intron_variant
23	28722927	T	G	ENSBTAT00000031167	intron_variant
23	28723237	T	A	ENSBTAT00000082694	missense_variant
23	28723238	C	A	ENSBTAT00000082694	stop_gained
23	28723243	G	T	ENSBTAT00000082694	missense_variant

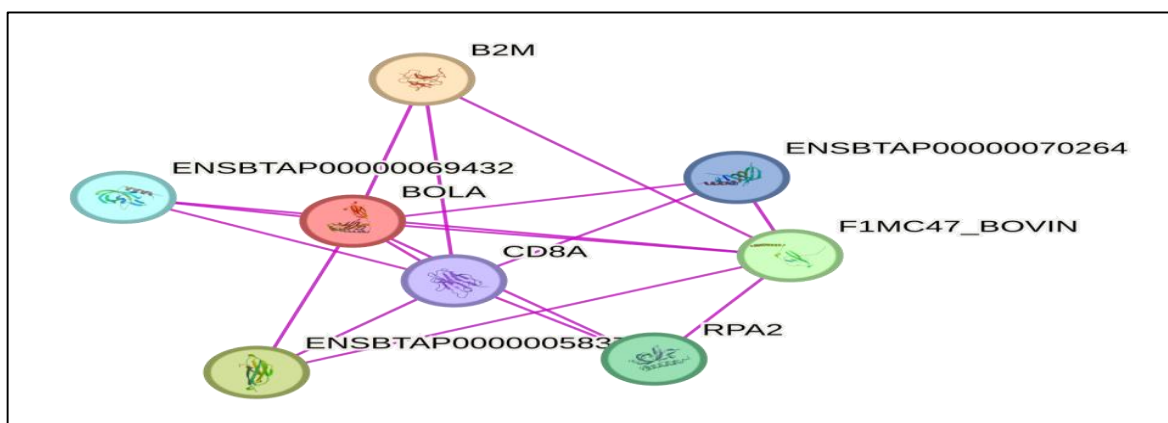
*missense variant: جهش بد معنی، stop gained: جهش خاتمه، splice_region_variant & synonymous_variant: جهش در محل پیرایش mRNA، upstream_gene_variant: جهش در ناحیه بالادست ژن، synonymous_variant: جهش هم معنی، intron_variant: جهش در اینترون.

جدول ۵- اطلاعات مربوط به چهارمین تغییرات ایجاد شده در طول ژن (واریانت‌ها، رونوشت‌ها و نوع جهش‌های مشاهده شده در ژن BOLA و bta-mir-11979) در پژوهش حاضر

Table 5- Information related to the fourth changes made in the length of the gene (variants, transcripts and types of mutations observed in the BOLA gene and bta-mir-11979) in the present study

اطلاعات واریانت				چهارمین تغییرات ایجاد شده در امتداد طول ژن	
Variant information				Fourth changes in gene sequence	
شماره کروموزوم	موقعیت جهش	باز اصلی	باز جایگزین	شناسه رونوشت	نوع جهش*
Chromosome number	Mutation position	Reference base	Replaced base	Transcript ID	type of mutation
23	28720811	A	C	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28721182	A	G	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28721338	A	G	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28721343	G	A	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28721587	G	C	ENSBTAT00000031167	intron_variant
23	28721934	T	C	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721950	G	T	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28721955	A	G	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28722129	G	A	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28722190	C	T	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28722598	A	C	ENSBTAT00000082694	intron_variant
23	28722927	T	G	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28723237	T	A	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28723238	C	A	ENSBTAT00000082434	upstream_gene_variant
23	28723243	G	T	ENSBTAG00000054323	upstream_gene_variant

*missense variant: جهش بد معنی، stop gained: جهش خاتمه، splice_region_variant & synonymous_variant: جهش در محل پیرایش mRNA. upstream_gene_variant: جهش در ناحیه بالادست ژن، synonymous_variant: جهش هم معنی، intron_variant: جهش در اینترون.



شکل ۱- شبکه کنش متقابل پروتئین ژن BOLA با استفاده از پایگاه داده STRING. گره قرمز رنگ ژن BOLA را نمایش می‌دهد.

Figure 1- Network of interaction of BOLA gene protein using STRING database. The red node shows the BOLA gene.

ژن B2M جزء کمپلکس سازگاری بافتی اصلی کلاس یک (MHC I) است که در ارائه آنتی ژن های پپتیدی به سیستم ایمنی نقش دارد (Wang *et al.*, 2022). ژن RPA2 زیر واحدی از کمپلکس هتروداایمر پروتئین همانندسازی را کد می کند که به DNA تک رشته ای (ssDNA) متصل شده و یک کمپلکس نوکلئوپروتئینی را تشکیل می دهد که نقش مهمی در متابولیسم DNA ایفا می کند و در همانندسازی، ترمیم و نوترکیبی DNA نقش دارد (Kaur *et al.*, 2023). زنجیره آلفا گلیکوپروتئین سطح سلول T؛ یک گلیکوپروتئین غشایی است که نقش مهمی در پاسخ ایمنی در مقابل عوامل خارجی و داخلی دارد. آنتی ژن CD8 یک گلیکوپروتئین سطح سلول است که در اکثر لنفوسیت های T وجود دارد که واسطه تعامل سلول-سلولی کارآمد در سیستم ایمنی بدن است (Apriyanto *et al.*, 2024).

جدول ۶- اطلاعات پروتئین های موجود در شبکه کنش متقابل با پروتئین BOLA

Table 6- Information of proteins in the interaction network with BOLA protein

نام اختصاری پروتئین Abbreviation of protein	نام کامل پروتئین Full name of protein	نقش زیستی پروتئین Biological role of protein	امتیاز (بر اساس آزمایشات) Score (Experiment)
B2M	Beta-2-microglobulin	در ارائه آنتی ژن های پپتیدی به سیستم ایمنی نقش دارد. It is involved in providing peptide antigens to the immune system.	0.607
ENSBTAP00000058374	Beta-2-microglobulin	در ارائه آنتی ژن های پپتیدی به سیستم ایمنی نقش دارد. It is involved in providing peptide antigens to the immune system	0.607
F1MC47_BOVIN	DUF1968 domain-containing protein	اعضای این خانواده در گیرنده آنتی ژن سلول T پستانداران یافت می شوند. عملکرد دقیق آن ها هنوز مشخص نشده است Members of this family are found in the T - cell receptor. Their precise role has not yet been determined.	0.56
RPA2	Replication protein A2, 32kDa.	پروتئین هتروداایمر مورد نیاز برای ترمیم، نوترکیبی و همانندسازی DNA. Heterodimer protein needed for repair, recombination and DNA repair.	0.541
ENSBTAP00000069432	RPA_C domain-containing protein.	در همانندسازی و نوترکیبی همولوگ نقش دارد. It plays a role in the replication and homologous recombination.	0.541
ENSBTAP00000070264	RPA_C domain-containing protein	در همانندسازی و نوترکیبی همولوگ نقش دارد. It plays a role in the replication and homologous recombination.	0.541
CD8A	T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain	نقش مهمی در پاسخ ایمنی دارد و در پاسخ های مختلف در برابر عوامل خارجی و داخلی عملکردهای مختلفی را انجام می دهد. It plays an important role in the immune response and performs different functions in various responses to external and internal factors.	0.536

نتیجه گیری

با مقایسه صحت و اطمینان ردیابی واریانت ها با مقایسه داده های حاصل از RNAseq و DNaseq نشان داده شده است

که ردیابی جهش‌ها با استفاده از داده‌های RNAseq با صحت و اطمینان بالایی انجام می‌شود (Jehl et al., 2021). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که جهش‌های بدمعنی که منجر به تغییر اسیدآمینه و جهش‌های بی‌معنی که منجر به اضافه شدن کدن خاتمه در زنجیره پروتئین می‌گردند در ژن BOLA مشاهده گردید. بروز این گونه جهش‌ها در نتیجه منجر به ایجاد تغییرات اساسی در ساختار ژن مورد نظر در گاوهای آبستن نشده خواهد شد. بنابراین از چند شکلی‌های شناسایی شده در این پژوهش می‌توان در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر برای شناسایی و حذف دام‌هایی که آبستن نخواهند شد در برنامه‌های اصلاح نژادی استفاده نمود.

منابع

- Apriyanto, A., & Rasak, A. (2024).** The role of cluster of differentiation-8 (CD8) in the Immune system sinergi: *Jurnal Riset Ilmiah*, 1(2), 70-79.
- Berg, D. K., Van Leeuwen, J., Beaumont, S., Berg, M., & Pfeffer, P. L. (2010).** Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*, 73(2), 250-260.
- Binelli, M., Scolari, S. C., Pugliesi, G., Van Hoeck, V., Gonella-Diaza, A. M., Andrade, S. C., ... & Coutinho, L. L. (2015).** The transcriptome signature of the receptive bovine uterus determined at early gestation. *PLoS One*, 10(4), e0122874.
- Cochran, S. D., Cole, J. B., Null, D. J., & Hansen, P. J. (2013).** Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BMC genetics*, 14, 1-23.
- Díaz-Gimeno, P., Horcajadas, J. A., Martínez-Conejero, J. A., Esteban, F. J., Alamá, P., Pellicer, A., & Simón, C. (2011).** A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertility and sterility*, 95(1), 50-60.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S. & Gingeras, T. R. (2013).** STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* [Internet]. 2013; 29: 15–21.
- Enayati, K., Farhadi, A., & Rahimi-Mianji, G. (2021).** Detection of Lack of Function Mutation of p. Q879X Affecting Abortion in APAF1 Gene in Holstein Cattle. *Research On Animal Production*, 12(31), 146-156.
- Eul, J., & Patzel, V. (2013).** Homologous SV40 RNA trans-splicing: a new mechanism for diversification of viral sequences and phenotypes. *RNA biology*, 10(11), 1689-1699.
- Fang, L., Cai, W., Liu, S., Canela-Xandri, O., Gao, Y., Jiang, J., & Liu, G. E. (2020).** Comprehensive analyses of 723 transcriptomes enhance genetic and biological interpretations for complex traits in cattle. *Genome research*, 30(5), 790-801.
- Garcia-Briones, M. M., Russell, G. C., Oliver, R. A., Tami, C., Taboga, O., Carrillo, E., ... & Glass, E. J. (2000).** Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccine*, 19(9-10), 1167-1171.
- Hoseini, Z. S., Farhadi, A., Gholizadeh, M., & Rahimi-Mianji, G. (2020).** Detection of Lack of Function Mutation of P. R12X in SLC37A2 Locus in Montbeliarde and Holstein Cattle. *Research On Animal Production*, 11(29), 135-142.
- Jehl, F., Degalez, F., Bernard, M., Lecerf, F., Lagoutte, L., Désert, C., ... & Lagarrigue, S. (2021).** RNA-Seq data for reliable SNP detection and genotype calling: interest for coding variant characterization and cis-regulation analysis by allele-specific expression in livestock species. *Frontiers in Genetics*, 12, 655707.

- Kaur, G., Prajapat, M., Singh, H., Sarma, P., Bhadada, S. K., Shekhar, N., ... & Medhi, B. (2023).** Investigating the novel-binding site of RPA2 on Menin and predicting the effect of point mutation of Menin through protein–protein interactions. *Scientific Reports*, *13*(1), 9337.
- Klein, J. (1986).** Natural history of the major histocompatibility complex. New York: Wiley; 1986.
- Mazzoni, G., Pedersen, H. S., Rabaglino, M. B., Hyttel, P., Callesen, H., & Kadarmideen, H. N. (2020).** Characterization of the endometrial transcriptome in early diestrus influencing pregnancy establishment in dairy cattle after transfer of in-vitro produced embryos. *bioRxiv*, 2020-03.
- Roche, P. A., & Furuta, K. (2015).** The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, *15*(4), 203-216.
- Salilew-Wondim, D., Hölker, M., Rings, F., Ghanem, N., Ulas-Cinar, M., Peippo, J., ... & Tesfaye, D. (2010).** Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer. *Physiological genomics*, *42*(2), 201-218.
- Sharma, J., Keeling, K. M., & Rowe, S. M. (2020).** Pharmacological approaches for targeting cystic fibrosis nonsense mutations. *European journal of medicinal chemistry*, *200*, 112436.
- Simons, A. (2010).** A quality control tool for high throughput sequence data. *A quality control tool for high throughput sequence data*, *10*, f1000research.
- Teh, H. S., Kisielow, P., Scott, B., Kishi, H., Uematsu, Y., Blüthmann, H., & Von Boehmer, H. (1988).** Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature*, *335*(6187), 229-233.
- Wang, X., Yuan, T., Yin, N., Ma, X., Yang, Y., Yang, J., ... & Deng, G. (2021).** Interferon- τ regulates the expression and function of bovine leukocyte antigen by downregulating bta-miR-204. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(6), 1-11.
- Wang, C., Wang, Z., Yao, T., Zhou, J., & Wang, Z. (2022).** The immune-related role of beta-2-microglobulin in melanoma. *Frontiers in oncology*, *12*, 944722.
- Younesi-Melerdi, E., Nematzadeh, G. A., Pakdin-Parizi, A., Bakhtiarizadeh, M. R., & Motahari, S. A. (2020).** De novo RNA sequencing analysis of *Aeluropus littoralis* halophyte plant under salinity stress. *Scientific Reports*, *10*(1), 9148.