

## بررسی ارتباط ناحیه راه‌انداز ژن *TLR4* و تعداد سلول‌های سوماتیک در یک جمعیت گاو هلشتاین در استان اصفهان

### Association of promoter region of *TLR4* gene with somatic cell count in a Holstein dairy herd in Isfahan province

آزاده خسروی<sup>۱</sup>، سید ضیاء الدین میرحسینی<sup>۲\*</sup>، مصطفی محقق<sup>۳</sup>

۱- کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه گیلان

۳- استادیار دانشگاه یاسوج

Khosravi A<sup>1</sup>, Mirhoseini SZ<sup>2\*</sup>, Mohaghegh M<sup>3</sup>

1,2. MSc Student and Associate Professor, Guilan University

3. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Yasouj University

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirhosin@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۴)

#### چکیده

ورم پستان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در گاوهای شیری است. برای ایجاد مقاومت ژنتیکی نسبت به این بیماری، شناسایی ژن‌ها و آلل‌های مقاوم به ورم پستان ضروری است. گیرنده‌های شبه تول (TLRs) از ژن‌های کاندیدای مناسب برای افزایش مقاومت ژنتیکی به ورم پستان در گاوهای هلشتاین هستند. در این پژوهش چند شکلی راه-انداز ژن *TLR4* و ارتباط آن با تعداد سلول‌های سوماتیک در یک جمعیت از گاوهای هلشتاین ایران مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، از ۱۰۰ گاو هلشتاین نمونه خون تهیه و DNA آنها استخراج شد. برای راه-انداز ژن *TLR4* یک جفت آغازگر طراحی شد. این آغازگرها قطعه‌ای به طول ۲۷۴ جفت باز را در فرایند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر نمودند. دو الگوی ژنتیکی A و B به ترتیب با فراوانی ۰/۲۶ و ۰/۷۴ تشخیص داده شدند. نتایج نشان داد که این الگوهای ژنتیکی اثر معنی‌داری بر تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای هلشتاین جمعیت مورد بررسی دارد ( $P < 0.01$ ). با توجه به پایین بودن توارث‌پذیری تعداد سلول‌های سوماتیک (۰/۰۹۳) و عدم کارایی انتخاب مستقیم برای بهبود صفت، انتخاب بر مبنای الگوهای ژنتیکی ژن *TLR4* می‌تواند برای بهبود مقاومت ژنتیکی در برابر ورم پستان مورد استفاده قرار گیرد.

#### واژه‌های کلیدی

ژنوتیپ،  
گاوهای هلشتاین،  
ناحیه راه‌انداز،  
ورم پستان،  
*TLR4*

## مقدمه

(. تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی شناسایی شده در اینترون یک، اگزون ۳ و ناحیه 5'UTR این ژن با تعداد سلول‌های سوماتیکی شیر در گاوهای هلشتاین برزیلی در ارتباط است ( Mesquita et al. 2012). همچنین چند شکلی‌های شناسایی شده در اگزون شماره ۳ این ژن در گاوهای ساهیوال هند با ورم پستان مرتبط هستند، به طوری که برخی ژنوتیپ‌ها به این بیماری مقاوم‌تر می‌باشند (Wakchaure et al. 2012). در گاو میش‌های Murrah هندوستان نیز SNP شناسایی شده در اگزون ۳ ژن *TLR4* موجب شده است تا ژنوتیپ‌های aa نسبت به ab ورم پستان مقاوم‌تر باشند (Gulhane and Sangwan 2012).

هدف از این مطالعه یافتن ارتباط بین چند شکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه راه انداز ژن *TLR4* و بیماری ورم پستان و شناسایی ال‌های مرتبط با مقاومت به ورم پستان در گاوهای هلشتاین جمعیت مورد نظر است.

## مواد و روش‌ها

## نمونه‌برداری

در این پژوهش از نمونه‌های خون ۱۰۰ گاو هلشتاین شرکت کشت و دام قیام وابسته به بنیاد مستضعفان و جانبازان استان اصفهان استفاده شد. اطلاعات مربوط به رکوردهای انفرادی تعداد سلول‌های سوماتیک در دوره‌های مختلف شیردهی و همچنین مشخصات شجره‌ای دام‌ها شامل شماره ثبت والدین و حیوان و سال و فصل زایش اخذ و برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت.

## استخراج DNA

با استفاده از کیت دیانوم از خون هموژن DNA استخراج شد. کیفیت DNA به دست آمده با استفاده الکتروفورز یا ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد و غلظت آن با دستگاه اسپکتوفوتومتر اندازه گیری شد.

## PCR

برای تکثیر ناحیه راه انداز ژن *TLR4* به طول ۲۷۴ جفت باز، از یک جفت آغاز گر استفاده شد. این آغازگرها با استفاده از نرم

با بهبود ژنتیکی گاوهای شیری، تولید شیر افزایش یافته و افزایش تولید موجب حساسیت دام به برخی بیماری‌ها نظیر ورم پستان شده است. ورم پستان، یک بیماری تورمی غدد پستانی است که به وسیله عفونت داخل پستان ایجاد می‌شود. این بیماری به وسیله طیف وسیعی از پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی به وجود می‌آید که سبب فعال شدن سیستم ایمنی و دفاعی در پستان و افزایش سلول‌های سوماتیک در شیر می‌شود (Goldammer et al. 2004). کاهش تولید و کیفیت شیر از اثرات سوء این بیماری است. در ایران کاهش تولید ناشی از ورم پستان در سال ۱۳۸۵ معادل ۱۵۰ هزار تن برآورد شده است (Kasravi 2008). این مقدار بدون در نظر گرفتن خسارات فراوان ورم پستان بالینی نظیر کاهش عملکرد تولید مثل، کاهش ماده خشک و ترکیبات مطلوب در شیر (پروتئین، چربی، قند، پتاسیم و غیره)، افزایش ترکیبات نامطلوب در شیر (سدیم، کلر، آنزیم‌ها و غیره) و کاهش زمان ماندگاری شیر است (Kasravi 2008). افزایش مقاومت ژنتیکی به این بیماری، که پرهزینه‌ترین بیماری در پرورش گاو شیری است، می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی مد نظر قرار گیرد (Sordillo and Streicher 2008). از ژن‌های کاندیدا در زمینه مقاومت ژنتیکی می‌توان ژن‌های TLR<sup>1</sup> (گیرنده‌های شبه تول) را نام برد که خانواده‌هایی از گیرنده‌های سلولی را کد می‌کند (Sharma et al. 2006). تاکنون ۱۳ نوع ژن TLR در پستانداران شناسایی شده است. این گیرنده‌ها توالی مولکولی خاصی از عوامل بیماری‌زا (PAMP)<sup>۲</sup> را تشخیص می‌دهند و در آغاز پاسخ‌های ایمنی بدن به پاتوژن‌های میکروبی نقش محوری دارند (Sabroe et al 2003). ژن *TLR4* در بین گونه‌های گاو چندشکلی نشان می‌دهد و بروز آن در برخی نژادهای تجاری با ارزش ارثی، تداوم شیردهی و تعداد سلول‌های بدنی ارتباط دارند (Sharma et al. 2006). در بررسی‌های انجام شده در گاوهای سانهی (Sanhe) و سیمنتال و هلشتاین چینی مشخص شد که چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) موجود در اینترون یک و اگزون ۳ ژن *TLR4* با تعداد سلول‌های سوماتیکی در شیر در ارتباط است (Wang et al. 2007).

<sup>1</sup> Toll-Like receptor<sup>2</sup> Pathogen-associated molecular patterns

برای بررسی رابطه بین ژنوتیپ‌ها و تعداد سلول‌های سوماتیک در ابتدا ارزش اصلاحی دام‌ها برای تعداد سلول‌های سوماتیک با استفاده از نرم افزار Wombat ویرایش ۱/۱ برآورد شد. محاسبه وراثت‌پذیری نیز با استفاده از نرم افزار Wombat نسخه ۱,۱ انجام شد که از الگوریتم میانگین اطلاعات حداکثر درستی محدود شده (AI) REML<sup>۲</sup> استفاده میکند. برازش داده‌ها در SAS ویرایش ۹,۱ و با استفاده از اثرات ثابت سال- فصل و دوره شیردهی طبق مدل زیر انجام شد:

$$Y = Zu + Xb + e$$

در این مدل  $Y$  بردار مشاهدات؛  $b$  بردار اثر عوامل ثابت موثر برصفت شامل سال- فصل و دوره شیردهی؛  $u$  بردار اثر تصادفی ژنتیک افزایشی؛  $Z$  و  $X$  ماتریس‌های مدل و  $e$  بردار اثرات تصادفی باقی‌مانده هستند.

برای بررسی رابطه بین تعداد سلول‌های سوماتیک و الگوهای ژنتیکی از مدل رگرسیون لجستیک استفاده شد.

$$\text{Logit}(\pi) = \log[\pi / (1 - \pi)] = \beta_0 + \beta_1 x_i$$

در این مدل  $\beta_0$  عرض از مبدأ؛  $\beta_1$  شیب خط و  $x_i$  متغیر مستقل پیوسته (سلول سوماتیک) هستند.

### نتایج و بحث

نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز، صحت قطعه ۲۷۴ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه راه-انداز ژن *TLR4* گاوهای هلشتاین را توسط نشانگر اندازه مورد تایید قرار داد (شکل ۱). نتایج حاصل از الکتروفورز ژل اکریلامید برای گاوهای هلشتاین مشخص کرد که ناحیه راه‌انداز ژن *TLR4* در گاوهای هلشتاین حالت چندشکلی از خود نشان می‌دهد که منجر به شناسایی الگوی ژنتیکی A و B (شکل ۲) با فراوانی ۰/۷۴ و ۰/۲۶ در این گاوها شده است. براساس نتایج ارائه شده، مقدار آماره کای‌اسکووار ( $\chi^2 = 13.811$ ) معنی‌دار شده است ( $P < 0.01$ ) بنابراین در مدل رگرسیونی لجستیک برازش یافته، تنها حضور متغیر وضعیت الگوی ژنتیکی (A و B) مورد تایید قرار گرفت که دارای اثر معنی داری بر روی تعداد سلول‌های سوماتیک مشاهده شده (وقوع ورم پستان) است ( $P < 0.01$ ).

افزار 3 Primer و با استفاده از توالی بانک ژن به شماره DQ839567.1 طراحی شد. توالی آغازگر مورد استفاده به شرح زیر بود:



واکنش زنجیره ای پلیمرز به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و ۳۵ چرخه و با استفاده از یک جفت آغازگر و با ترکیب دو میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، واحد آنزیم *Taq* پلیمرز، ۲۵۰ میکرومولار dNTPs، ۵۰ نانو گرم DNA، آغازگرهای رفت و برگشت هر کدام ۱۰ پیکو مول و بافر واکنش یک برابر انجام شد. برنامه حرارتی شامل دمای واسرشته سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای واسرشته سازی ثانویه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷ دقیقه بود. برای این منظور از دستگاه ترموسایکلر شرکت BIO-RAD استفاده شد.

برای تعیین اندازه قطعه به دست آمده از مرحله تکثیر، ۸ میکرولیتر از محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و با نشانگر وزنی M100 با ولتاژ ۹۵ ولت و به مدت یک ساعت بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز انجام شد.

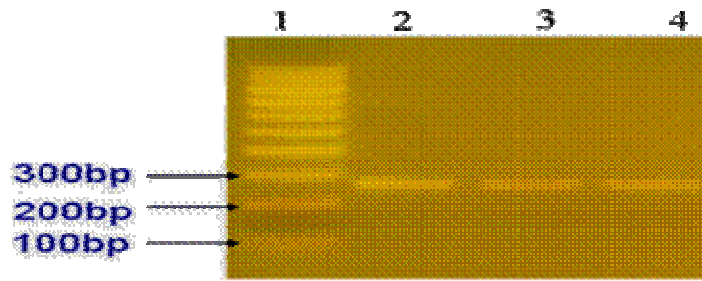
الکتروفورز

با توجه به اندازه آل‌ها و قدرت تفکیک ژل‌های مختلف، پلی اکریل آمید ۸ درصد برای تفکیک ال‌های مورد نظر به کار برده شد. در این تحقیق از تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد SSCP<sup>۱</sup> برای تشخیص چند شکلی ژنتیکی در این جایگاه ژنی استفاده شد. در این روش تفاوت‌های موجود در تک نوکلئوتیدها موجب تفاوت در فرم فضایی ساختار نوع سوم DNA تک رشته‌ای می‌شود. برای تک‌رشته‌ای کردن محصولات PCR قبل از انجام الکتروفورز، ۶ میکرولیتر از محصول PCR با ۹ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر قرار داده شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از مخلوط مورد نظر در چاهک‌ها بارگذاری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

<sup>2</sup> Average Information restricted maximum likelihood

<sup>1</sup> Single strand conformation polymorphism



شکل ۱- محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد. ستون اول از چپ مربوط به نشانگر اندازه و ستون های ۲-۴ نمونه های مربوط به گاوها هستند.



شکل ۲- باندهای ایجاد شده توسط آغازگر مورد استفاده روی ژل اکریلامید ۸ درصد. عدد ۱ و ۲ به ترتیب مربوط به الگوهای ژنتیکی A و B هستند.

سوماتیک ( $P < 0/01$ )، درصد پروتئین و همچنین درصد چربی شیر ( $P < 0/05$ ) مرتبط بود (Beecher et al. 2010).

در جمعیت گاوهای هلشتاین برزیلی سه لوکوس ژن *TLR4* (اینترون ۱، اگزون ۳ و ناحیه 5'UTR) مورد بررسی قرار گرفت و سه آلل A و B و C در این لوکوسها مشاهده شد. گاوهای با ژنوتیپ AA در لوکوس یک و CC در لوکوسهای ۲ و ۳ تعداد سلولهای سوماتیکی کمتری ( $P < 0/05$ ) در شیر خود داشتند (Mesquita et al. 2012). چند شکلیهای تک نوکلئوتیدی SNPs لوکوسهای اینترون یک و اگزون ۳ ژن *TLR4* گاوهای هلشتاین و سیمنتال و Sanhe در چین منجر به شناسایی دو آلل A و B در این جمعیتها شد. بر اساس این گزارش تعداد سلولهای سوماتیکی موجود در شیر با این چندشکلی مرتبط بوده و آلل A می تواند نقش مهمی در مقاومت ژنتیکی به ورم پستان ایفا نماید (Wang et al. 2007). در گاوهای ساهیوال هندوستان نیز با

براساس برآورد، پارامترهای  $\beta_0$  و  $\beta_1$  معنی دار بوده و مدل مربوطه به صورت زیر ارائه می شود:

$$\text{Logit}(\pi) = -0.005 + 1.686 (\text{سلول سوماتیک})$$

نتایج مشابهی نیز در سایر نژادهای گاو گزارش شده است (Sharma et al. 2006; Wang et al. 2007; Beecher et al. 2010; Wakchaure et al. 2012; Mesquita et al. 2012) نتایج بررسی های Sharma et al. 2006 در گاوهای هلشتاین کانادا یک چندشکلی در ناحیه راه انداز (P-226) و دو چند شکلی در اگزون ۳ (E+1656 و E+2021) را گزارش کردند. در این تحقیق همچنین ارتباط تداوم شیردهی با ژنوتیپهای P-226 ( $P < 0/004$ ) و E3+1656 ( $P < 0/002$ ) و E3+2021 ( $P < 0/003$ ) با ژنوتیپ E3+2021 ( $P < 0/003$ ) مورد تایید واقع شده است.

در بررسی که در گاوهای هلشتاین فرزین ایرلندی صورت گرفت، چندشکلی موجود در ژن *TLR4-2021* با تعداد سلول های

جدول ۱- برآورد پارامترهای  $\beta_0$  و  $\beta_1$  موجود در مدل لجستیک

	B	S.E.	Wald	df	Sig	(B) Exp
سلول سوماتیک	0.005	0.002	8.770	1	0.003	0.995
مقدار ثابت	1.686	0.314	28.740	1	0.000	5.397

بر اساس جدول ۲ همبستگی ژنتیکی بین الگوهای ژنتیکی و ارزش‌های اصلاحی ۰/۲۶۴ و همچنین همبستگی ژنتیکی بین الگوهای ژنتیکی و سلول‌های سوماتیک ۰/۲۲۴ برآورد شده است ( $P < 0.03$ ) پایین بودن توارث‌پذیری صفت بیانگر این امر است که انتخاب مستقیم برای این صفت نمی‌تواند رشد ژنتیکی مناسبی را به همراه داشته باشد و به عبارتی تعداد سلول‌های سوماتیکی مشاهده شده برای هر گاو، معیار خوبی برای انتخاب گاوها نیست. از سوی دیگر میزان همبستگی مناسب تعداد سلول‌های سوماتیکی با الگوهای ژنتیکی مشاهده شده می‌تواند معیار مناسبی برای انتخاب گاوها بر مبنای ژنوتیپ آن‌ها ارایه نماید. Sharma et al. (2006) همبستگی ژنتیکی بین SCC و وقوع ورم پستان کلینیکی را بررسی، و اعلام کردند که همبستگی بین این دو صفت بالا است و از این رو چندشکلی در ژن *TLR4* و سلول‌های سوماتیک می‌توانند با هم ارتباط داشته باشند.

در حال حاضر با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری ورم پستان، تعداد سلول‌های سوماتیک (علیرغم پایین بودن توارث‌پذیری) به عنوان یک صفت در شاخص انتخاب گاوها برای مقاومت به ورم پستان استفاده می‌شود (Koivula et al. 2005). دلیل این امر این است که تعداد رکوردهایی که برای سلول‌های سوماتیک در هر دوره شیردهی ثبت می‌شود بالاست (جزء صفات تکرارشونده در زمان<sup>۱</sup> است)، علاوه بر دارا بودن همبستگی بالا با ورم پستان، وراثت‌پذیری بالاتری نسبت به ورم پستان دارد در نتیجه برآوردهای دقیق‌تری برای گاوهای مورد آزمون نتاج<sup>۲</sup> می‌دهد. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی می‌تواند کارایی پایین انتخاب مستقیم برای این صفت را جبران نماید.

استفاده از روش PCR-RFLP و به‌کارگیری آنزیم محدودالثر *HinfI* آگزون ۳ ژن *TLR4* مورد بررسی قرار گرفت. دو آلل C و D در این جایگاه مشخص شدند که ژنوتیپهای CC و DD نسبت به ورم پستان حساس‌تر بودند (Wakchaure et al. 2012). با توجه به تشابه عملکرد ژن *TLR4* در گونه‌های مختلف گاو، تفاوت تک‌نوکلئوتیدی آگزون ۳ این ژن در گاوهای Murrah هندوستان با استفاده از آنزیم محدودالثر StyI و روش PCR-RFLP منجر به شناسایی دو آلل A و B شد. ژنوتیپ‌های AA نسبت به ورم پستان مقاوم‌تر ( $P < 0.05$ ) از ژنوتیپ‌های AB بودند (Gulhane and Sangwan 2012).

جدول ۲ بیانگر الگوهای ژنتیکی و برآورد همبستگی‌های ژنتیکی ( $R_g$ ) بین این الگوهای A و B و ارزش‌های اصلاحی و تعداد سلول‌های سوماتیک، واریانس باقیمانده ( $V_e$ ) و واریانس ژنتیکی ( $V_g$ ) تعداد سلول‌های سوماتیک و میزان احتمال معنی‌داری همبستگی‌های ژنتیکی (P) است. طبق اطلاعات به دست آمده از جدول ۲ تعداد سلول‌های سوماتیک در گاوهای شیری این تحقیق وراثت‌پذیری پایینی دارند ( $h^2 = 0.093$ ). وراثت‌پذیری پایین سلول‌های سوماتیک بیانگر این مطلب است که این صفت بیشتر تحت تاثیر اثرات محیطی بوده و پیشرفت ژنتیکی آن کم است و انتخاب مستقیم برای این صفت نمی‌تواند کارگشا باشد. نتیجه مشابهی نیز در گاوهای شیری استرالیا گزارش شده است (Hill 1981). در آن تحقیق میانگین وراثت‌پذیری برآورد شده برای مدل رگرسیون تصادفی پدر و مدل رگرسیون تصادفی حیوان و مدل چند صفتی پدر در اولین دوره شیردهی به ترتیب ۰/۰۹، ۰/۰۹ و ۰/۰۸ و برای شکم دوم و سوم زایش ۰/۰۹ و ۰/۱۱ بود و این در حالی است که در پژوهش حاضر نیز وراثت‌پذیری برای سلول‌های سوماتیک ۰/۰۹۳ برآورد شده است.

<sup>1</sup> Longitudinal data

<sup>2</sup> Progeny test

جدول ۲- الگوهای ژنتیکی و برآورد همبستگی‌های ژنتیکی آنها با ارزش‌های اصلاحی و تعداد سلول‌های سوماتیک و همچنین واریانس ژنتیکی تعداد سلول‌های سوماتیک

P	V <sub>g</sub> SCC	V <sub>r</sub> SCC	R SCC of patern	R <sub>g</sub> BV of patern	h <sup>2</sup>	میانگین SCC	ژنوتیپ‌های <i>TLR4</i>
۰/۰۰۸۸	۸۱۵/۸۵	۷۹۹۱	۰/۲۲۴	۰/۲۶۴		۶۲/۳ <sup>a</sup>	الگوی A
						۱۰۹/۳ <sup>b</sup>	الگوی B
					۰/۰۹۳		SCC

<sup>a, b</sup> نمادهای متفاوت نشان دهنده معنی دار بودن است ( $P < 0.03$ ).

SCC (تعداد سلول‌های سوماتیک؛  $h^2$ ) وراثت‌پذیری تعداد سلول‌های سوماتیک؛ (R<sub>g</sub> BV of pattern) همبستگی ژنتیکی سلول‌های سوماتیک با الگوی ژنتیکی؛ R (SCC of pattern) همبستگی تعداد سلول‌های سوماتیک با الگوی ژنتیکی؛ (V<sub>r</sub> SCC) واریانس باقیمانده تعداد سلول‌های سوماتیک و (V<sub>g</sub> SCC) واریانس ژنتیکی تعداد سلول‌های سوماتیک.

گاوهای نر برتر و پایین آوردن تعداد سلول‌های سوماتیک استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از شرکت کشت و دام قیام وابسته به بنیاد مستضعفان و جانبازان استان اصفهان و همچنین آقایان دکتر شادپرور، مهندس چگینی، مهندس لعالیون و مهندس اسدیان به خاطر همکاری‌های موثر کمال سپاسگزاری و تشکر را دارند.

ارتباط چندشکلی ژن *TLR4* با SCC ممکن است به همبستگی ژنتیکی بالای بین SCC و وقوع ورم پستان بالینی نسبت داده شود (Shook and Schutz 1993) لذا به دلیل بالا بودن همبستگی ژنتیکی بین SCC و وقوع ورم پستان، می‌توان از این الگوهای ژنتیکی در تشکیل یک شاخص انتخاب به همراه صفات تولیدی و اقتصادی دیگر (نظیر تولید شیر و صفات تولیدمثل) جهت انتخاب

#### منابع

Beecher C, Daly M, Childs S, Berry DP, Magee DA, McCarthy TV, Giblin L (2010) Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *BMC Genetics* 11:99.

Goldammer T, Zerbe H, Molenaar A, Schubert HJ, Brunner RM, Kata SR, Seyfert HM (2004) Mastitis increases mammary mRNA abundance of  $\beta$ - defensin 5, Toll-like receptor 2 (TLR2) and *TLR4* but not TLR9 in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11:174-185.

Gulhane AB, Sangwan ML (2012) Polymorphism in *TLR4* gene and its association with mastitis in Murrah buffaloes. *Indian Journal Biotechnology* 11:330-332.

Hill AW (1981) Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Research in veterinary science* 31:107-112.

Kasravi R (2008) Trouble shooting contagious mastitis in dairy herds. *Proceedings of 15<sup>th</sup> Iranian Veterinary International Convention*. Tehran, Iran. 33-37. (In Farsi).

Koivula M, Mantysaari EA, Negussie E, Serenius T (2005) Genetic and phenotypic relationship among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. *Journal Dairy Science* 88:827-833.

Mesquita AQ, Rezende CSM, de Mesquita AJ, da Veiga Jardim EAG, Kipnis APJ (2012) Association of *TLR4* polymorphisms with subclinical mastitis in Brazilian Holstein. *Brazilian Journal Microbiology* 43:

Sabroe I, Read RC, Whyte MK, Dockrell DH, Vogel SN, Dower S (2003) Toll-like receptors in health and disease: Complex questions remain. *Journal Immunology* 171:1630-1635.

Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA (2006) Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal Dairy Science* 89:3626-3636.

Shook GE, Schutz MM (1993) Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. *Journal Dairy Science* 77: 648-658.

Sordillo LM, Streicher KL (2002) Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal Mammary Gland Biology* 7:135-146.

Wakchaure RS, Gupta ID, Verma A, Kumar D, Rajesh Kumar S, Soumya NP (2012) Genetic polymorphism in *TLR4* and its association with incidences of mastitis in Sahiwal cattle. *Wayamba Journal Animal Science* 4: 291-295.

Wang X, Xu S, Goa X, Ren H, Chen J (2007) Genetic polymorphism of *TLR4* gene and correlation with mastitis in cattle. *Journal of Genetics and Genomics* 34: 406-412.