نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۶، بهار ۱۳۹٤
ص‌ص: ۲۵۹~۲٦٤

شناسایی دو آلل BF2*13 و BF2*21 کمپلکس اصلی سازگاری بافتی توسط روش PCR در دو توده نژادی خزک و دشتیاری

- **مسعود علی پناه** (نویسنده مسئول)

دانشیار دانشگاه تربت حیدریه.

- **عادله ایرانخواه**

دانش آموخته کارشناسی ارشد، زابل، پردیس دانشگاه زابل.

تاریخ دریافت : آبان ۸۸ تاریخ پذیرش : فروردین ۹۱

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۵۴۲۲۲۳۲۱۱۹

Email: alipanah.masoud@gmail.com

چکیده

این پژوهش به منظور شناسایی دو آلل BF2*13 و BF2*21 ژن BF2 از کلاس I کمپلکس اصلی سازگار بافتی MHC در دو توده نژادی استان سیستان و بلوچستان صورت گرفت. کمپلکس اصلی سازگار بافتی مجموعه ای ژنی می باشد که نقش تنظیمی را در سیستم ایمنی ایفا می کند. آزمایشات بسیاری ارتباط این مجموعه ژنی را با مقاومت و حساسیت در مقابل انواع بیماری ها و همچنین صفات تولیدی نشان داده است. ژن BF2 یکی از این جایگاه های مرتبط می باشد. در این تحقیق، نمونه های خون بطور تصادفی از ۷۲ قطعه مرغ بومی (۳۷ قطعه مرغ خزک و ۳۵ قطعه مرغ دشتیاری) گرفته شد. بعد از استخراج DNA از نمونه های خون با کمک کیت استاندارد، کمیت و کیفیت DNA توسط ژل آگاروز ۱٪ تعیین گردید. مرحله بعدی، طراحی پرایمرهای مناسب برای آلل های BF2*13 و BF2*21 بود. با استفاده از PCR این آلل ها تکثیر شده و محصولات PCR توسط الکتروفورز روی ژل به ترتیب ۵۲ و ۱۹۷ جفت باز رویت گردید. فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*13 در دو توده نژادی خزک و دشتیاری به ترتیب ۷۵/٦٪ و ۲۲/۸٪ به دست آمد. همچنین فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*21 در دو توده نژادی خزک و دشتیاری به ترتیب ٤۵/۹ و ۳٤/۲٪ مشاهده شد. از طرف دیگر، در توده نژادی خزک به رغم بالا بودن فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*13، فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*21 که رابطه مستقیم با مقاومت به بیماری های مارک، آنفولانزای مرغی، بورس عفونی و برخی صفات تولیدی دارد نیز در حد نسبتاً خوبی بود. بنابراین اصلاحگران می توانند این آلل ها را در برنامه های اصلاح نژاد مورد توجه قرار دهند.

واژه‌های کلیدی: کمپلکس اصلی سازگاری بافتی، BF2*13، BF2*21، توده نژادی، خزک، دشتیاری.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 106 pp: 259-264

Identification BF2*21 and BF2*13 alleles of Major Histocompatibility Complex in two Native Chickens, Khazak and Dashtiari

By: [1*]Masoud Alipanah, [2]Adeleh Irankhah
[1]Association of Professor, University of Torbat e Heydarieh
[2]Department of Animal Science University of Zabol
*Correspondent of author Email:alipanah.masoud@gmail.com,tel:+985422232119

Received: November 2009 **Accepted: March 2012**

The aim of this research was to study two alleles BF2*13, BF2*21 of BF2 gene in Class I MHC in two population at Sistan and Baluchestan Province. MHC is a gene cluster that play regulation role in immune system. Many experiments showed association between the gene cluster and resistance and sensitiveness against different diseases and, also productivity traits. BF2 gene is among associated loci. In the research, blood samples were collected randomly from 72 native chickens (37 Khazak and 35 Dashtiari chickens). After DNA extraction from blood samples with standard kit, the quantitative and quality of DNA were determined by gel agarose 1%. Next stage would be designing appropriate primers for BF2*13 and BF2*21 alleles. Using PCR this alleles were amplified and PCR product observed by gel electrophoresis which were 52bp and 197 bp, respectively. Frequency of samples contain BF2*13 allele in two populations Khazak and Dashtiari observed 75.6 and 22.8%, respectively. Also frequencies of samples contain BF2*21 allele in two populations Khazak and Dashtiari were 45.9 and 34.2%, respectively. In other hand, in Khazak population that frequency samples contain BF2*13 alleles is high, allele frequency samples contain BF2*21 allele that associated with resistance to Marek disease and in flu and IBD and some productive traits, is relative property, then animal breeders could be use allele frequency of these alleles in breeding programming.

Key words: Major Histocompatibility Complex, BF2*13, BF2*21, Native chickens.

مقدمه

یکی از موضوعات مهم در صنعت طیور، بیماری‌های عفونی می باشد. این بیماری ها علاوه بر ضررهای اقتصادی که برای پرورش دهندگان به همراه دارد، موضوع مهمی برای بهداشت جمعیت های انسانی محسوب می‌شود.

ابزارهای مهم برای مبارزه با این بیماری ها، آنتی بیوتیک ها و واکسن ها می باشند. با این وجود، استفاده از این دو راهکار در طول زمان ممکن است باعث ایجاد سویه های بیماری زای مقاوم گردد که مقابله با آن ها نیاز به واکسن های جدید با کارآیی بالاتر دارد (Juul-Madsen و همکاران، ۲۰۰۴).

با توجه به این که در طیور، تنوع زیادی در حساسیت ژنتیکی در مقابل بیماری های عفونی وجود دارد، لذا بررسی ژن های موثر در مقاومت به این بیماری ها مورد توجه قرار گرفته است (Bumstead، ۱۹۹۸).

گاورا و اسپنسر (۱۹۸۳) تفاوت های بین افراد و نژادها را در گونه های حیوانات اهلی از نظر مقاومت ژنتیکی به بیماری ها بررسی کردند. همچنین رامنس و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که تنوع ژنتیکی تنها محدود به حساسیت در مقابل بیماری ها نمی باشد و در مورد پاسخ ایمنی در مقابل واکسن ها نیز وجود دارد. بنابراین تعدادی از ژن ها در مقاومت به بیماری ها دخالت دارند.

ژن های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی اولین ژن هایی بودند که در این رابطه شناخته شدند. اما مقاومت به طور کلی، پدیده ای پلی ژنیک می باشد (Rammenssee و همکاران، ۱۹۹۳).

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC[1])، مجموعه ای از ژن ها می باشند که نقش تنظیمی را در سیستم ایمنی ایفا می کنند و در تمام مهره داران از ماهی تا پستانداران وجود دارد (Dunnington et و همکاران، ۱۹۹۶).

مطالعات اولیه روی MHC طیور، ابتدا به عنوان جایگاهی که گروه های خونی را کنترل می کند، مورد توجه قرار گرفت. کمپلکس اصلی سازگاری بافتی مرغ دارای چندین خصوصیت

[1] Major Histocompatibility Complex

ویژه است که آن را از MHC پستانداران متمایز می کند . ژن های MHC در مرغ از دو مجموعه مستقل به اسامی B و RFP-Y تشکیل شده که روی یک میکروکروموزوم قرار گرفته‌اند (Briles و همکاران، ۱۹۵۰).

ارتباط کمپلکس اصلی سازگاری بافتی با صفات مهم اقتصادی مثل میزان باروری، میزان مرگ و میر جنینی، میزان مرگ و میر دوره بلوغ، وزن بدن، قابلیت هچ شدن و تولید تخم مرغ به اثبات رسیده است که اهمیت این مجموعه ژنی را نشان می دهد. برخی آزمایشات، ارتباط بین کمپلکس اصلی سازگاری بافتی حیوان و مقاومت نسبت به بیماری ها را نشان داده است که دلیلی دیگر بر اهمیت این مجموعه ژنی می باشد (Dietert و همکاران، ۱۹۹۶؛ Dunnington و همکاران، ۱۹۹۶).

محدودیت اتصال آنتی ژن به MHC یکی از عوامل محدود کننده در برابر عفونت تلقی می شود، در نتیجه هر چه تنوع کمپلکس اصلی سازگاری بافتی زیادتر باشد، پپتید هایی که می توانند به آن ها متصل شوند، بیشتر و در نتیجه مقاومت در برابر تعداد بیشتری از عوامل عفونی، امکان پذیر خواهد بود.

ژن های کمپلکس اصلی سازگاری بافتی می توانند به عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای بهبود مقاومت به بیماری در مرغ مورد استفاده قرار گیرند. در این راستا به منظور بهبود ژنتیکی صفات مهم اقتصادی و مقاومت به بیماری ها، اصلاحگران باید هاپلوتایپ های موثرکمپلکس اصلی سازگاری بافتی را مورد شناسایی قرار دهند (Nishibori و همکاران، ۲۰۰۱).

در مطالعات جدید گزارش شده است که آلل BF2*21 از کلاس I کمپلکس اصلی سازگار بافتی مرغ با بیماری مارک مرتبط می باشد .علاوه بر این، بررسی ارتباط کمپلکس اصلی سازگاری بافتی مرغ با بیماری ویروسی بورس عفونی، نشان داده که آلل BF2*21 از ژن BF2 کلاس I کمپلکس اصلی سازگاری بافتی در مقایسه با دیگر آلل ها، رابطه بیشتری با این بیماری داشته است (Ewal و همکاران، ۲۰۰۷؛ Dunnington و همکاران، ۱۹۹۶ و Qian Yan و همکاران، ۲۰۰۵).

در مطالعه دیگری، تاثیر هاپلوتایپ های کلاس I کمپلکس اصلی سازگاری بافتی روی بیماری ویروسی آنفولانزای مرغی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد، در نمونه هایی که برای آلل B21 هموزیگوت بوده اند، میزان زنده مانی ۱۰۰٪ بود و در مقابل در ژنوتیپ های هموزایگوت برای B13، ۱۰۰٪ مرگ و میر وجود داشته است(Boonyanuwat و همکاران، ۲۰۰۶).

لیوانت و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که ژن BF2 بسیار پلی مورفیک بوده که بیشترین چند شکلی در ناحیه اگزون ۲ و ۳ این ژن وجود دارد. در بررسی که توسط میلرو همکاران (۲۰۰۴) و همچنین لیوانت و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد، ناحیه اگزون ۲ و ۳ از ژن BF2 تعیین توالی گردید و ۲۱ آلل متمایز در لاین های لگهورن سفید و گوشتی تجاری تشخیص داده شد. لیوانت و اوالد (۲۰۰۵)در تحقیق دیگری که با روش SBT[2] انجام دادند، ۲۱ آلل ژن BF2 را گزارش کردند.

مرغ خزک یکی از مرغ های بومی منطقه سیستان در شمال استان سیستان و بلوچستان می باشد و بیشتر تیپ مرغان تخم گذار می باشد. مرغ دشتیاری که پراکندگی آن بیشتر در جنوب استان سیستان و بلوچستان می باشد، از نظر شکل ظاهری شبیه توده نژادی لاری بوده و تیپ گوشتی دارد. هم اکنون این دو توده نژادی در پژوهشکده دام های خاص دانشگاه زابل تحت برنامه های نگهداری و اصلاح نژادی قرار دارند.

با توجه به این که ارتباط دو آلل BF2*13 و BF2*21 با برخی بیماری ها در طیور نشان داده شده است، هدف این تحقیق، شناسایی دو آلل BF2*13 و BF2*21 توسط روش PCR و تعیین فراوانی نمونه های دارای این دو آلل در دو توده نژادی خزک و دشتیاری می باشد.

مواد و روش ها

در این تحقیق، ابتدا تعداد ۷۲ قطعه مرغ بومی (۳۷ تا خزک و ۳۵ تا دشتیاری) از پژوهشکده دام های خاص دانشگاه زابل به صورت تصادفی انتخاب شدند و به منظور استخراج DNA ، خونگیری از ناحیه مثلثی زیر بال مرغان انجام گرفت. سپس استخراج DNA با استفاده از کیت استاندارد دیاتوم (سیناژن، ایران) صورت گرفت و

[2] Sequence-based Typing

بـرای تعیـین کمیـت و کیفیـت آن از دسـتگاه اسـپکتوفتومتر و نیـز بررسی روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

درمرحله بعد، توالی نوکلئوتیدی مربـوط بـه دو آلـل BF2*21 و BF2*13 از ژن BF2 کلاس I کمپلکس اصـلی سـازگار بـافتی مـرغ کـه در بانـک ژن گـزارش شـده اسـت، مـورد بررسـی قـرار گرفت. سپس توالی های نوکلئوتیـدی مناسـب بـرای آغازگرهـای مـورد نظـر انتخـاب شـد. در مرحلـه بعـد بـا اسـتفاده از نـرم افـزار Primer Premier (Singh و همکـاران، ۱۹۹۸) پارامترهـای مرتبط با آغازگرها، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در زیر، توالی های نوکلئوتیدی آغازگرهای انتخاب شده نشان داده شده است.

پرایمر برای آلل BF2*21

Forward primer:
AGACGCAGATCGTACAGGGCAGT
Reverse primer:
TATGTCCAGGTTCTCGCGGTTAA

پرایمر برای آلل BF2*13

Forward primer:
TGGTTCGTGACTGTGGGGTATGTGG
Reverse primer:
TGTAGCGCCGCTGCCGTATGCC

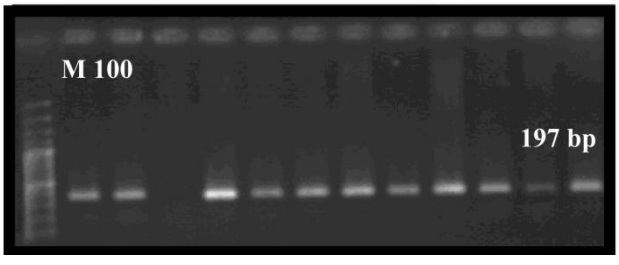
پـس از طراحـی آغازگرهـای مناسـب، دو آلـل BF2*13 و BF2*21 بـا واکـنش PCR، تکثیـر شـدند. واکـنش PCR در حجـم ۲۵ میکـرو لیتـر شـامل کلریـد منیـزیم ۱/۵ میلـی مـولار، ۰/۲میکرومولار از هر پرایمر، ۰/۲میلی مـولار نوکلئوتیـدها، یـک واحد Taq، ۵۰ نانوگرم DNA، ۲/۵ میلی مـولار بـافر (۱۰X) و آب مقطر بود و محصول PCR به ترتیب به طـول ۱۹۷ bp و ۵۲ bp توسط الکتروفورز بـا ژل آگـارز ۱/۲ ٪ و ۱/۵ ٪ مشـاهده شـد. چرخه حرارتی واکنش PCR به صورت زیـر مـورد اسـتفاده قـرار گرفت و تعداد ۳۵ چرخه های PCR انجام شد. در انتهـا داده هـا با نرم افزار Popgene3.2 مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- چرخه های حرارتی واکنش PCR

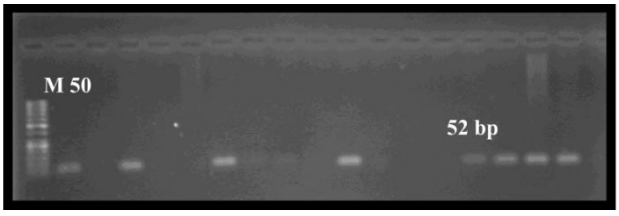
مرحله	زمان	دما
واسرشته سازی اولیه	۵ دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد
واسرشته سازی ثانویه	۱ دقیقه	۹۴ درجه سانتی گراد
اتصال	۳۰ ثانیه	۵۸ درجه سانتی گراد
بسط	۱ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد
بسط نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه سانتی گراد

نتایج و بحث

محصول PCR برای آلل های BF2*13 و BF2*21 به ترتیـب در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. محصول تکثیر DNA الگو با پرایمر مورد اسـتفاده پـس از انجـام PCR و الکتروفـورز، در هـر دو گروه مـورد آزمـایش فقـط یـک بانـد تولیـد کـرد کـه نشـان دهنـده اختصاصی عمل کردن پرایمر می باشد. همان طـور کـه در شـکل هـا مشخص است، محصولات PCR کاملاً شفاف و بدون هیچ آلودگی می باشد. محصولات تولید شده در برابر محلی از نشانگر قـرار گرفتـه اند که نشان دهنده اندازه قطعه مورد نظر (۱۹۷ جفت باز بـرای آلـل BF2*13و ۵۲ جفـت بـاز بـرای آلـل BF2*21) مـی باشـد. طـول قطعات تکثیر شده صحت آغازگر طراحی شده برای این آلل را تایید می کند.



شکل ۱- باند مشاهده شده برای آلل BF2*13 پس از الکتروفورز محصولات PCR



شکل ۲- باند مشاهده شده برای آلل **BF2*21** پس از الکتروفورز محصولات **PCR**

تکثیر دو آلل BF2*13 و BF2*21 با قطعات مورد نظر، نشان دهنده صحت طراحی آغازگرهای مورد نظر بوده و امکان بررسی آلل های این ژن را به سادگی توسط روش PCR میسر می سازد. در حالی که پیش از این تنها از روش توالی یابی برای تعیین آلل های این ژن استفاده می گردیده است (Livant و همکاران، ۲۰۰۴؛ Miller و همکاران، ۲۰۰۴ و Livant و همکاران، ۲۰۰۵) دو آلل مورد بررسی در توده نژادی خزک، در۷۵/۶٪ جمعیت و در توده نژادی دشتیاری در ۳۴/۲٪ جمعیت مشاهده گردید که نشان می دهد فراوانی نمونه های دارای این دو آلل در توده نژادی خزک بیشتر از دشتیاری می باشد. درصد کم این دو آلل در توده نژادی دشتیاری بیانگر این مطلب است که احتمالاً سایر آلل های ژن BF2 در این جمعیت وجود دارد. در نتیجه می توان گفت که تنوع بیشتری برای ژن BF2 در این توده نژادی وجود دارد. در حالی که در توده نژادی خزک این دو آلل با فراوانی بالایی مشاهده گردید بنابراین می توان گفت احتمال وجود سایر آلل های ژن BF2 کم بوده و تنوع ژنتیکی برای این جایگاه در این جمعیت، پایین است. مقایسه فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*13 در این دو جمعیت نشان می دهد که در توده نژادی دشتیاری، فراوانی نمونه های دارای این آلل بسیار کمتر از توده نژادی خزک می باشد. در نتیجه با توجه به بررسی بونیانووات و همکاران (۲۰۰۶)، می توان گفت که توده نژادی دشتیاری نسبت به خزک آسیب پذیری و حساسیت کمتری در مقابل بیماری ویروسی آنفولانزای مرغی از خود نشان می دهد. به رغم بالا بودن فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*13 در توده نژادی خزک، فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*21 نیز که مطالعات، رابطه مستقیم آن را با مقاومت به بیماری های مارک، آنفولانزای مرغی، بورس عفونی[3] (گامبورو) و برخی صفات تولیدی نشان دادند (Dunnington و همکاران، ۱۹۹۶؛ Qian Yan و همکاران، ۲۰۰۵؛ Boonyanuwat و همکاران، ۲۰۰۶ و Ewald و همکاران، ۲۰۰۷)، در حد نسبتاً خوبی است. بنابراین در توده نژادی خزک، می توان با برنامه های اصلاحی مناسب از فراوانی آللی BF2*13 کاست. همچنین در توده نژادی دشتیاری با توجه به پایین بودن فراوانی آلل BF2*13، به نظر می رسد انتخاب در جهت افزایش فراوانی آلل BF2*21 موثر خواهد بود.

جدول ۲- فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*13 و BF2*21در دو توده نژادی

نام توده نژادی	تعداد نمونه های دارای آلل BF2*13	فراوانی نمونه های دارای آلل BF2*21
خزک	٪۷۵/۶	٪۴۵/۹
دشتیاری	٪۲۲/۸	٪۳۴/۲

منابع

Boonyanuwat, K., Thummabutra, S., Sookmanee, N., Vatchavalkhu, V. and Siripholvat, V. 2006. Influences of major histocompatibiliy complex class I heliotypes on avian influenza virus disease traits in Thai indigenous chicken. Animal Science, 77: 285-289.

Briles, W. E., McGibbon, W. H. and Irwin, M. R. 1950. On multiple alleles affecting cellular antigens in the chicken. Genetics, 35: 633-652.

Bumstead, N. 1998. Genetic resistance to avian viruses. Rev. ci. Tech, 17: 249–255.

Dietert, R. R., Taylor, J. r. and Dietert, M. F. 1991. Biological function of the chicken major histocompatibility complex. Crit. Rev. Poult. Biol, 3:111–129.

Dunnington, E. A., Briles, W. E., Briles, R. E. and Siegel, P. B. 1996. Immunoresponsiveness in chickens: association of antibody production and the B system of the major histocompatibility complex. Poult. Sic., 75: 1156-1160.

Ewald, S. J., Avendano, S., Mcleod, S., Lamont, S. J. and Dekkers, J. C. M. 2007. Associations of BF_2 alleles with antibody titres and production traits in commercial pure line broiler chickens. Animal. Genetics, 38: 174-176.

[3] Infectiuos bursal diseases

Gavora, J. S., Simonsen, M., Spencer, J. F., Fairful, R.W. and Gowe, R. S. 1986. Changes in the frequency of major histocompatibility haplotypes in chickens under selection for both high egg production and resistance to Marek's disease. Z. Tierzucht Zuchtungsbiol, 103:218–226.

Juul-Madsen, HR., Dalagard, T. S., Salomonsen, J. Heller D. E. 2004. Genetic resistance with focus on Major Histocompatibility Complex.

Livant E.J., Brigati J.R. and Ewald S. J. 2004. Diversity and locus specificity of chicken MHC class I sequences. Animal Genetics, 35: 18–27.

Livant, E. J. and Ewald, S. J. 2005. High-resolution typing for chicken BF2 (MHC Class I) alleles by automated sequencing. Animal Genetics, 36: 432- 434.

Miller, M. M., *et al.* 2004. Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. Immunogenetics, 56: 261–79.

Nishibori, M., Hayashi T., Tsudzuki M., Yamamoto, Y. and Yasue, H. 2001. Complete sequence of the Japanese quail (Coturnix japonica) mitochondrial genome and its genetic relationship with related species. Animal Genetics, 32: 180-185.

Qian Yan, R., Shengli, X., Yao Yang, T. and Xia, C. 2005. Characterization of BF2 and B2m in three Chinese Chicken lines. Immunology and Immunopathology, 108: 417-425.

Rammenssee, H.G., Falk, K. and Rotzsche, O. 1993. MHC molecules as peptides receptors. Curr.Opin.Immunol., 5: 35-44.

Sander, J. F. 1993. The major histocompatibility complex and its role in poultry production. World's Poult. Sci. J., 49: 132–138.

Singh, V. K., Mangalam, A. K., Dwivedi, S., Naik, S. 1998. Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. Biotechniques, 24:318-319.