

بررسی تنوع ژنوتیپی MHC(B-F) در طیور گوشتی آراین با استفاده از روش تنوع شکلی DNA تک رشته ای

غلامرضا نیکبخت بروجنی* ندا برجسته

گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ شهریور ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۸۷)

چکیده

تنوع زیاد در ژن های MHC کلاس I یا B-F طیور، شناسایی تعداد زیادی از اپیتیدهای بیگانه را جهت ایجاد پاسخ ایمنی امکان پذیر می سازد. مطالعه این منابع ژنتیکی بسیار با ارزش و برای جلوگیری از حذف تنوع ژنتیکی ضروری است. تنوع ژنتیکی در سویه آراین به عنوان یک سویه داخلی مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از روش PCR-SSCP جهت مطالعه چند شکلی ژن MHC(B-F) در طیور آراین استفاده شده است. شصت و پنج نمونه DNA شامل ۲۵ نمونه متعلق به جمعیت مادر و ۴۰ نمونه از جوجه های گوشتی تجاری سویه آراین مورد بررسی قرار گرفتند. در جمعیت های مادر و جوجه های گوشتی ۷ الگوی مختلف مربوط به ژن B-F مشخص شد. ۲ الگو بین دو جمعیت مورد مطالعه مشابه بودند. ۲ الگو از مجموع الگوهای به دست آمده مشابه مطالعات قبلی بودند، در حالیکه ۵ الگو جدید به نظر می رسند. این نتایج نشان داد که طیور گوشتی آراین از تنوع ژنتیکی MHC در ناحیه B-F برخوردارند که می تواند جهت انتخاب خصوصیات مطلوب ایمنولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: MHC، طیور آراین، PCR-SSCP.

ایمونوگلوبولین ها تعلق دارند (۲۲،۲۸،۳۰). مولکولهای کلاس I همانند پستانداران در سطح همه سلولها وجود دارند و همراه با اپیتیدهای اندوژنی بیان می شوند. مولکولهای کلاس II به وسیله سلولهای عرضه کننده آنتی ژنی با آنتی ژنهای آگروژن عرضه می گردند. مولکولهای کلاس IV (B - G) به طور اختصاصی در طیور وجود دارند و در پاسخ آنتی بادی و تشخیص آنتی ژن توسط لنفوسیت های B نقش دارند (۱۱،۲۸). ۱۹ ژن رمز کننده ملکول های MHC طیور با طولی در حدود ۹۲ kb بر روی میکروکروموزوم ۱۶ قرار دارند. در مجموع MHC طیور ۲۰ برابر کوچکتر از MHC پستانداران است. این دسته ژنی بسیار متراکم بوده و تنها ژنهای ضروری را در خود جای داده است (۱،۱۸،۲۱،۲۳).

به دلیل نقش کلیدی ژن های MHC طیور در پاسخ های ایمنی، ارتباط با بیماریهای عفونی و تنوع آن ها در ارتباط با تاریخ تکامل، در دو دهه اخیر مطالعات بسیاری بر روی این ژن ها انجام شده است (۵،۶،۷،۱۶،۲۳،۳۲). در بررسی چند شکلی ناحیه ژنتیکی MHC تاکنون روشهایی مثل الکتروفورز بعدی، ساترن بلاتینگ PCR-RFLP، AFLP، PASA، SNP، Microsatellite، STS، PCR-SSCP استفاده شده اند (۶،۷،۱۰،۲۰،۲۴،۳۱). برای بررسی تنوع ژنتیکی در ناحیه B-F یا ژن های کلاس I طیور روش PCR-SSCP روشی مناسب و دقیق به نظر می رسد. این روش قادر است تنوع ژنتیکی در حد یک نوکلئوتید را مشخص نماید (۷،۱۰). تحقیق حاضر به بررسی چند شکلی ژن رمز کننده ملکول های MHC کلاس I (B-F) در طیور گوشتی آراین با روش PCR-SSCP پرداخته است.

مواد و روش کار

نمونه گیری و استخراج DNA: در این تحقیق ۶۵ نمونه شامل ۴۰ قطعه

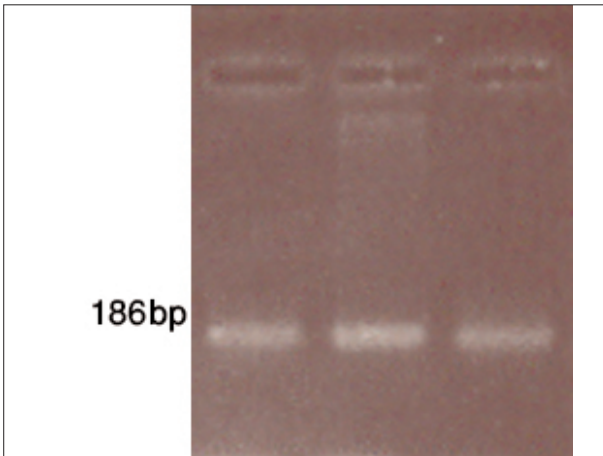
مقدمه

ناحیه ژنتیکی را که دانشمندان امروزه به عنوان مجتمع اصلی سازگاری نسجی (MHC) معرفی می کنند، توسط Peter Gorer (۱۹۳۶) در سال ۱۹۳۶ و در ارتباط با واکنشهای پذیرش بافتی شناسایی شد. در ابتدا ژنهای MHC در موش، طیور، انسان و سپس در سایر گونه ها شناسایی شدند و حتی در سایر گونه ها مثل گیاهان و بی مهرگان اورتولوگوسی از آن ها مشخص گردیده است. در طیور آنتی ژنهای گروههای خونی که در رد پیوند دخالت دارند توسط ژن های MHC رمز می شوند و به همین دلیل دستگاه MHC در طیور را سیستم B نیز می خوانند (۸،۲۲،۲۳).

MHC دسته ای از ژنها است و محصولات آن گروهی از پروتئین های سطحی سلولی هستند که به عنوان شاخص های خودی عمل می کنند. عملکرد اصلی این پروتئین ها، عرضه آنتی ژن در سطح سلول و تنظیم پاسخ های ایمنی است. مشخص شده است که ژنهای MHC با مقاومت یا حساسیت به برخی از بیماریهای خود ایمن، ویروسی، باکتریایی و انگلی مرتبط هستند. بسیاری از خصوصیات دیگر غیر وابسته به سیستم ایمنی نیز، مثل میزان تولید در دام های اقتصادی، توسط خوشه ژنی MHC کنترل می شوند. ژن های MHC به عنوان یک موضوع با ارزش برای تحلیل های متمرکز در طیور، جهت انتخاب لاین های مقاوم به بیماریها با پاسخ دهی بهتر به واکسن ها و انتخاب ویژگی های پرورشی موثر مثل تولید تخم مرغ، مورد توجه قرار می گیرند (۳،۴،۱۳،۱۵،۱۷،۱۹،۲۵،۲۶،۲۷،۲۸،۲۹).

MHC طیور، اولین MHC غیر پستانداری بود که شناسایی و توالی نوکلئوتیدی آن مشخص گردید (۲۲). مولکولهای MHC در طیور شامل ۳ کلاس I (B-F)، (B-L) و II و IV (B-G) بوده و به ابرخانواده





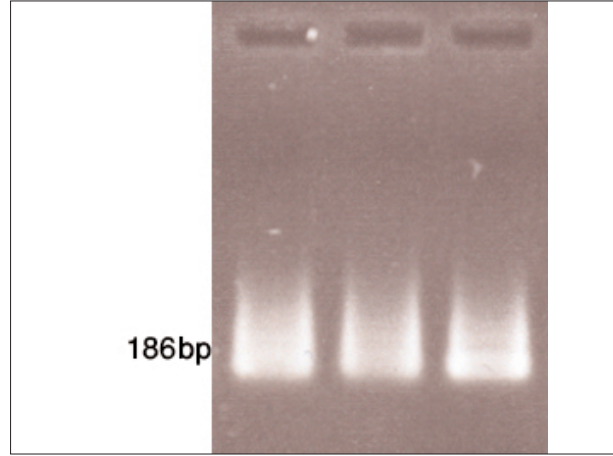
تصویر ۲- محصول افزوده سازی ژن MHC(B-F) نمونه های آرین، نتایج حاصل از روش Touch down، حذف اسمیرها برای بدست آوردن محصول خالص تر جهت آزمون SSCP.

سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه بود.

بررسی تغییرات ساختاری تک رشته ای SSCP: پس از حصول اطمینان از درستی کار در مرحله اول، جهت انجام SSCP ۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۱۲ میکرولیتر از محلول (50µl bromophenol blue, 50µl xylene cyanol, 100µl saturated Foramid dye (1ml formamide, 100µl TBE 10x, 50µl saturated مخلوط می شد و مجموعه در ۸۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و سپس سریعاً به روی یخ انتقال داده می شد. پس از گذشت زمان ۵ دقیقه نمونه ها روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت با استفاده از منبع تغذیه Consort Ev261 و بافر TBE در دمای آزمایشگاه الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. تصاویر ژل ها با دستگاه UV ترانس لومیناتور ثبت شدند. تصاویر به دست آمده از ژل ها به کمک نرم افزار Adobe Photoshop Ver. 7.0 آنالیز و الگوهای حاصل جهت مقایسه و معرفی استفاده شدند.

نتایج

از پرایمرهای OL283BF و RV290BF جهت افزوده سازی اگزون ۲ از ژن B-F استفاده شد. در افزوده سازی با روش معمول قطعات مورد انتظار با طول ۱۸۶bp حاصل شد (تصویر ۱). همانطور که نشان داده شده است محصولات PCR با روش ساده از کیفیت مناسبی برای انجام آزمون SSCP-PCR برخوردار نبودند. تصویر ۲ نتایج حاصل از روش Touch down را نشان می دهد. در مقایسه با روش معمول، روش Touch down محصولات یکنواخت و مطلوب تری را برای استفاده در مراحل بعدی به دست می دهد. در مرحله بعد با استفاده از آزمون SSCP الگوهای ژنتیکی مربوط به دو جمعیت آمیخته و مادر آرین مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بررسی و مقایسه الگوهای بدست آمده از مجموع نمونه ها در نهایت ۴ الگو در آمیخته ها و ۵



تصویر ۱- محصول افزوده سازی ژن MHC(B-F) نمونه های آرین با چرخه های استاندارد.

طحال از آمیخته های گوشتی تجاری آرین و ۲۵ نمونه خون از مادران این سوپه انتخاب شد. استخراج DNA ژنومی بر اساس روش پیشنهادی آسوبل و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت (۲).

افزوده سازی ژن MHC (B-F)

جهت بررسی دومین اگزون ژن B-F از روش پیشنهادی Iglesias و همکاران در سال ۲۰۰۳ استفاده شد (۱۰). واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۱.۵ mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 1 mM از پرایمرهای OL283BF (5'-GTG GAC GGG GAA CTC TTC-3') و RV290BF (5'-ACC GCC GGT CTG GTT GTA-3).

واحد Taq DNA Polymerase (Euroclone, Spain) و ۲ میکرو لیتر DNA بود. چرخه های حرارتی شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله ای، شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه و در انتها یک چرخه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. در نهایت ۵ میکرو لیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد تا کیفیت و طول قطعه تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گیرد (۱۰، ۷).

برای طراحی پرایمرهای مربوط به این ناحیه جهت افزونه سازی ژن مورد نظر، محدودیت هایی از جمله عدم تشابه با لوکوس کلاس I سیستم Y-Rfp، وجود ۲ لوکوس B-F (BF1 با میزان بیان کم و BF2 با میزان بیان زیاد)، طول کوتاه برای جداسازی بهتر محصول های تکثیر یافته در SSCP وجود دارد. لذا پرایمرهای پیشنهادی Iglesias و همکاران کیفیت کمی را دارا بودند. برای بدست آوردن محصول بهتر برای SSCP، در ادامه کار PCR به صورت Touch down با شرایط زیر انجام شد:

یک چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۲ چرخه سه مرحله ای، شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و ۲ چرخه سه مرحله ای، شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۶۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۰ چرخه سه مرحله ای، شامل ۹۴ درجه



جدول ۱- میزان فراوانی الگوهای SSCP در جمعیت طیور آرین. *اعداد داخل پرانتز مربوط به فراوانی هر الگو در جمعیت می باشد.

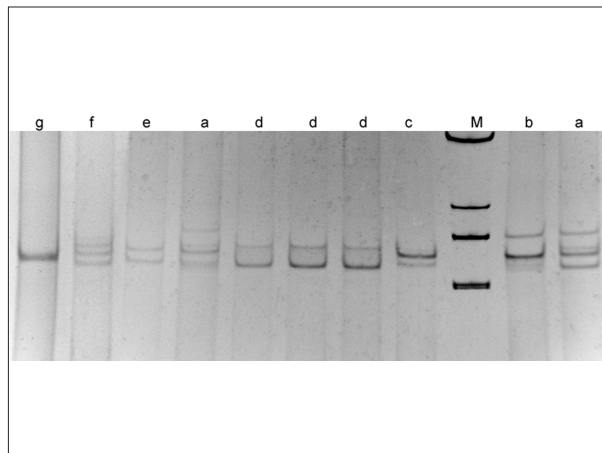
الگوهای SSCP (تعداد/فراوانی)							تعداد نمونه	جمعیت
g	f	e	d	c	b	a		
		(۴)۱	(۴۰)۱۰	(۸)۲	(۱۲)۳	×(۳۶)۹	۲۵	مادر
(۱۲/۵)۵	(۳۷/۵)۱۵	(۱۷/۵)۷				(۳۲/۵)۱۳	۴۰	آمیخته ها
۷/۷	۲۳/۰۸	۱۲/۳	۱۵/۳۹	۳/۰۸	۴/۶	۳۳/۸۵		درصد فراوانی در کل جمعیت

مناسب معرفی شده است و به عنوان یک روش بر پایه DNA توانایی مقایسه تفاوت های ژنتیکی در حد یک نوکلئوتید را دارد. علاوه بر این تایپینگ با استفاده از SSCP برای مشخص کردن تنوع ژنتیکی سایر لوکوس های MHC طیور همانند کلاس I Y-F یا سایر لوکوس های همراه MHC همانند TAP با ارزش است (۷، ۱۰).

لازم به ذکر است که در این روش الگوهای به دست آمده از تایپینگ با روش SSCP حائز اهمیت هستند و اوزان باندهای حاصله تاثیری در تفسیر نتایج ندارند. در تحقیق حاضر الگوهای a و f مشابه الگوهای معرفی شده در مطالعات قبلی بوده است. مشخص شد که الگوی a مربوط به هاپلوتیپ BA1 و الگو f مربوط به هاپلوتیپ BA4۷ هستند (۷). میزان تنوع مشاهده شده، ۴ الگو در بین ۴۰ قطعه مورد آزمایش در آمیخته ها و ۵ الگو در بین مادران بود. تنوع ژنتیکی در ناحیه B-F سویه آرین قابل توجه و مشابه با یافته های سایر محققان بر روی نژادهای دیگر است (۷، ۱۰).

در مقیاس صنعتی بحث بیماری ها، حساسیت و مقاومت نسبت به آنها اهمیت پیدا می کند. با وجود درمان، واکسیناسیون و مدیریت بهداشتی، گله های پرورشی در مقیاس صنعتی هنوز متحمل ضررهای اقتصادی چشمگیری در ابتلا به بیماری ها هستند. برای به حداقل رساندن ضررهای اقتصادی انتخاب ژنتیک مناسب در آلل های MHC ارزش بالایی برخوردار است (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۳۰).

به منظور بررسی تفاوت های ژنتیکی در سیستم B-Complex طیور گوشتی تجاری سویه آرین از روش SSCP استفاده شد. با توجه به این که طیور آرین تنها لاین داخلی محسوب می شود، بررسی تنوع ژنتیکی MHC در سطح این جمعیت از اهمیت ویژه ای برخوردار است. نتایج تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی MHC کلاس I را در طیور آرین نشان می دهد. بررسی تنوع ژنتیکی MHC در تمام سطوح این جمعیت به منظور مطالعه ارتباط این ناحیه ژنتیکی با بیماری ها و انتخاب جمعیت مناسب ضروری است. علاوه بر این MHC با بازدهی تولید در طیور ارتباط نزدیکی دارد به گونه ای که می توان به جای انتخاب بر اساس وزن لاشه از ژنوتیپ MHC بهره برد (۱۴). لازم به ذکر است که در صورت کاهش تنوع ژنی، بررسی و انتخاب هاپلوتیپ های حساس و مقاوم به بیماری ها مشکل خواهد بود. مطالعه سویه آرین از لحاظ تنوع در ناحیه ژنی B-F باید به طور مداوم و همگام با اقدامات اصلاح نژادی مدنظر قرار گیرد.



تصویر ۳- الگوهای بدست آمده از آزمون SSCP طیور آرین بر روی ژل اکرلامید ۱۰ درصد: ستون های a-g؛ الگوهای متفاوت بدست آمده از آزمون SSCP؛ M: مارکر. ستون های d جهت مشخص نمودن تکرارپذیری آزمون SSCP. ستون های a برای حصول اطمینان از الگوی بدست آمده از یک نمونه است.

الگوی مختلف در مادران به طور مجزا به دست آمد (تصویر ۳). تکرارپذیری الگوهای بدست آمده در آزمون های مکرر SSCP به اثبات رسید. به طوری که الکتروفورز مکرر نمونه ها نتایج مشابهی بر روی ژل اکرلامید داشتند (تصویر ۳ ستون های d). علاوه بر این، برای حصول اطمینان از الگوی بدست آمده از یک نمونه، ۲ بار بر روی آن آزمون SSCP انجام گرفت و الگوی یکسانی مشاهده شد (تصویر ۳ ستون های a).

در مجموع ۷ الگوی متفاوت (a-g) در دو جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. الگوهای a، b، c، d و e بدست آمده از مادران به ترتیب با فراوانی ۱۲، ۳۶، ۸، ۴۰ و ۴ درصد، الگوهای a، e، f و g مشخص شده در آمیخته ها به ترتیب با فراوانی ۱۲/۵، ۳۷/۵، ۱۷/۵، ۳۲/۵ درصد مشخص شده اند (جدول ۱). در کل جمعیت الگوهای a، b، c، d، e، f و g به ترتیب با فراوانی ۳۳/۸۵، ۳۳/۰۸، ۴/۶، ۱۲/۳، ۱۵/۳۹ و ۲۳/۰۸ مشخص شده اند (جدول ۱). الگوی SSCP، a و e بین دو جمعیت مشابه بودند. در مجموع دو گله، الگوی a بیشترین فراوانی را با ۳۳/۸۵ درصد و الگوی c کمترین فراوانی را با ۳/۰۸ درصد نشان دادند.

بحث

در طیور جایگاه ژنی B-F در آگزون ۲، ناحیه کد کننده محل اتصال مولکول MHC به آنتی ژن همانند سایر حیوانات و انسان تنوع قابل ملاحظه ای داشته تا عرضه آنتی ژن های مختلف امکان پذیر گردد (۷، ۳۰). در مولکول های MHC انتخاب طبیعی از این تنوع حمایت می کند و در نتیجه چند شکلی MHC به طور انتخابی بقا یافته است. این ناحیه همچنین در بین آلل های B-F حراست شده است و طی روندی که انتخاب ابر غالب نامیده می شود بقای آن تضمین می گردد. آگزون ۲ از B-F برای بررسی چند شکلی MHC در سطح جمعیت ناحیه ژنتیکی مناسبی محسوب می شود (۷، ۳۰). روش SSCP برای تایپینگ ژن های B-F و B-L به عنوان یک روش



References

1. Afanassieff, M., Goto, R.M., Ha, J., Sherman, M.A., Zhong, L., Auffray, C., Coudert, F., Zoorob, R., Miller, M. M. (2001) At least one class I gene in restriction fragment pattern-Y (Rfp-Y), the second MHC gene cluster in the chicken, is transcribed, polymorphic, and shows divergent specialization in antigen binding region. *J. Immunol.* 166: 3324-33.
2. Ausubel, F.M., Kingstone, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. pp. 102 - 109.
3. Bacon, L.D., Witter, R.L. (1992) Influence of turkey herpesvirus vaccination on the B-haplotype effect on Marek's disease resistance in 15.B-congenic chickens. *Avian Dis.* 36: 378-85.
4. Bacon, L.D., Witter, R.L. (1993) Influence of B-haplotype on the relative efficacy of Marek's disease vaccines of different serotypes. *Avian Dis.* 37: 53-9.
5. Emara, M.G., Kim, H., Zhu, J., Lapierre, R.R., Lakshmanan, N., Lillehojt, H.S. (2002) Genetic diversity at the major histocompatibility complex (B) and microsatellite loci in three commercial broiler pure lines. *Poult. Sci.* 81: 1609-17.
6. Fulton, J.E., Juul-Madsen, H.R., Ashwell, C.M., McCarron, A.M., Arthur, J.A., O'Sullivan, N.P., Taylor, R.L., Jr. (2006) Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 58: 407-421.
7. Goto, R.M., Afanassieff, M., Ha, J., Iglesias, G.M., Ewald, S.J., Briles, W.E., Miller, M. M. (2002) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poult. Sci.* 81: 1832-41.
8. Hess Ch.M. (2002) The Evolution of the Major Histocompatibility Complex in Birds. *Bio Sci.* 52: 423-431
9. Hunt, H.D., Lupiani, B., Miller, M.M., Gimeno, I., Lee, L.F., Parcels, M.S. (2001) Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. *Virol.* 282: 198-205.
10. Iglesias, G.M., Soria, L.A., Goto, R.M., Jar, A.M., Miquel, M.C., Lopez, O.J., Miller, M.M. (2003) Genotypic variability at the major histocompatibility complex (B and Rfp-Y) in Camperos broiler chickens. *Anim. Genet.* 34: 88-95.
11. Joiner, K.S., Hoerr, F.J., Van, S.E., Ewald, S.J. (2005) The avian major histocompatibility complex influences bacterial skeletal disease in broiler breeder chickens. *Vet. Pathol.* 42: 275-281.
12. Juul-Madsen, H.R., Nielsen, O.L., Krogh-Maibom, T., Rontved, C.M., Dalgaard, T.S., Bumstead, N., Jorgensen, P.H. (2002) Major histocompatibility complex-linked immune response of young chickens vaccinated with an attenuated live infectious bursal disease virus vaccine followed by an infection. *Poult. Sci.* 81: 649-656.
13. Lakshmanan, N., Gavora, J.S., Lamont, S.J. (1997) Major histocompatibility complex class II DNA polymorphisms in chicken strains selected for Marek's disease resistance and egg production or for egg production alone. *Poult. Sci.* 76: 1517-1523.
14. Lamont, S.J., Hou, Y.H., Young, B.M., Nordskog, A. W. (1987) Research note: differences in major histocompatibility complex gene frequencies associated with feed efficiency and laying performance. *Poult. Sci.* 66: 1064-1066.
15. Levy, A.M., Davidson, I., Burgess, S.C., Dan, H.E. (2003) Major histocompatibility complex class I is downregulated in Marek's disease virus infected chicken embryo fibroblasts and corrected by chicken interferon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 189-198.
16. Liu, W., Miller, M.M., Lamont, S.J. (2002) Association of MHC class I and class II gene polymorphisms with vaccine or challenge response to *Salmonella enteritidis* in young chicks. *Immunogenetics.* 54: 582-590.

در مجموع چنین به نظر می‌رسد که از این روش به دلیل دقت و حساسیت بالا در تشخیص انواع ال‌های MHC طیور بتوان در کنترل روند اصلاح نژاد و حفظ ذخایر ژنتیکی و همچنین انتخاب لاین‌های مقاوم به بیماری بهره برد.



17. Macklin, K.S., Ewald, S.J., Norton, R.A. (2002) Major histocompatibility complex effect on cellulitis among different chicken lines. *Avian Pathol.* 31: 371-376.
18. Masabanda, J.S., Burt, D.W., O'Brien, P.C., Vignal, A., Fillon, V., Walsh, P.S., Cox, H., Tempest, H.G., Smith, J., Habermann, F., Schmid, M., Matsuda, Y., Ferguson-Smith, M.A., Crooijmans, R.P., Groenen, M.A., Griffin, D.K. (2004) Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian karyotype. *Genetics.* 166: 1367-1373.
19. Mays, J.K., Bacon, L.D., Pandiri, A.R., Fadly, A.M. (2005) Response of White Leghorn chickens of various B haplotypes to infection at hatch with subgroup J. avian leukosis virus. *Avian Dis.* 49: 214-219.
20. Miller, M.M., Goto, R., Abplanalp, H. (1984) Analysis of the B-G antigens of the chicken MHC by two-dimensional gel electrophoresis. *Immunogenetics.* 20: 373-85.
21. Miller, M. M., Goto, R.M., Taylor, R.L., Jr., Zoorob, R., Auffray, C., Briles, R.W., Briles, W.E., Bloom, S.E. (1996) Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 3958-3962.
22. Miller, M.M., Bacon, L.D., Hala, K., Hunt, H.D., Ewald, S.J., Kaufman, J., Zoorob, R., Briles, W.E. (2004) 2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. *Immunogenetics.* 56: 261-279.
23. Muir, W.M., Aggrey, S.E. (2003) *Poultry Genetics, Breeding and Biotechnology.* CABI Publishing, UK. pp.293-315.
24. Nishibori, M., Nakaki, S., Tsudzuki, M., Yamamoto, Y. (2000) Utility of three restriction fragment length polymorphism probes for genotyping of the chicken major histocompatibility complex class IV region. *Poult. Sci.* 79: 305-11.
25. Pinard-van der Laan, M.H., Monvoisin, J.L., Pery, P., Hamet, N., Thomas, M. (1998) Comparison of outbred lines of chickens for resistance to experimental infection with coccidiosis (*Eimeria tenella*). *Poult.Sci.* 77: 185-191.
26. Siegel, P.B., Larsen, A.S., Larsen, C.T., Dunnington, E. A. (1993) Research note: Resistance of chickens to an outbreak of necrotic enteritis as influenced by major histocompatibility genotype and background genome. *Poult.Sci.* 72: 1189-1191.
27. Tadjbakhsh, H. (1995) *Essential Immunology.* 6th ed. University of Tehran publications. Tehran, Iran. pp. 325-342.
28. Tizard, I. R. (2004) *Veterinary Immunology* 7th ed. SAnders. Philadelphia, USA. pp. 68-77.
29. Uni, Z., Sklan, D., Haklay, N., Yonash, N., Heller, D. (1995) Response of three class-IV major histocompatibility complex haplotypes to *Eimeria acervulina* in meat-type chickens. *Br. Poult. Sci.* 36: 555-561.
30. Zekarias, B., Ter Huurne, A.A., Landman, W.J., Rebel, J. M., Pol, J.M., Gruys, E. (2002) Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet. Res.* 33: 109-125.
31. Zhou, H., Lamont, S.J. (1999) Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Anim. Genet.* 30: 256-264.
32. Zhou, H., Lamont, S.J. (2003) Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens. *Immunogenetics.* 55: 133-140.



A STUDY OF THE GENOTYPIC VARIABILITY AT THE MHC (B - F) IN ARIAN BROILER CHICKENS BY PCR-SSCP

Nikbakht Brujeni, Gh.* , Barjesteh, N.

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

(Received 23 August 2007 , Accepted 17 March 2009)

Abstract:

The extreme polymorphism in MHC B-F genes enables the chickens to recognize enormous numbers of foreign peptides to trigger an immune reaction. Study of this genetic resources is very important and it is essential to avoid the loss of genetic variability. Genetic polymorphism among Arian strain, an endogenous broiler chicken in Iran, was investigated. In this study PCR-SSCP was carried out for revising the polymorphism in MHC (B-F) in Arian broiler chicken. 65 samples of chicken DNA belonged to 2 groups of parents (25) and hybrids (40) were analyzed. 7 distinct profiles have been demonstrated for two groups. Two profiles were identical between two groups. Two of all profiles have been demonstrated by previous studies and 5 were new in this study. From this study it was concluded that MHC (B-F) diversity exists within Arian broiler chicken that might be useful for selecting desirable immunological traits.

Key words: MHC, Arian broiler chicken, PCR-SSCP.

*Corresponding author's email: nikbakht@ut.ac.ir, Tel: 021-61117057, Fax: 021-66933222

