Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۳، ۲۰۴-۱۹۹

بررسی تنوع ژن انترفرن گاما در گوسفندان توده شال ایران

غلامرضا نیکبخت بروجنی [۱]* سید مهدی امام [۱] همایون محمود زاده [۲] ندا برجسته [۱]

۱) گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه بهداشت و تغذیه دام و طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۵ اسفند ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۱ آذر ماه ۱۳۸۷)

چکیده

انترفرن گاما سایتوکاینی است که نقش کلیدی در ایمنی ذاتی و اکتسابی دارد و توسط لمفوسیت‌های T فعال شده وسلول‌های کشنده طبیعی تولید می‌شود. ژن انترفرن گاما پلی مرف است وارتباط بین هاپلوتیپ‌های ژن مذکور درگوسفند با ایجاد حساسیت ویا مقاومت نسبت به نماتودهای دستگاه‌گوارش به اثبات رسیده است. در این مطالعه جهت ارزیابی تنوع ژن انترفرن گاما در جمعیت‌گوسفندان توده‌شال، ۱۳۶ نمونه خون کامل اخذشد. پس از استخراج DNA ژنومی، اگزون-۳ ژن مذکور با کمک PCR افزوده‌گردید. پس از افزوده‌سازی، آنالیز حرکت دورشته‌ای‌های نامتجانس وبررسی تغییرات‌ساختاری تک رشته‌ای روی نمونه‌های افزوده‌شده انجام‌گرفت. پنج الگوی متمایز در بررسی تغییرات‌ساختاری تک رشته‌ای اگزون-۳ ژن انترفرن‌گاما مشخص‌گردید که از این تعداد سه الگو نمایانگر ۳ آلل مختلف در این جمعیت بودند. اگر چه آنالیز حرکت دورشته‌ای‌های نامتجانس، تمام نمونه‌ها را بصورت هوموزیگوت نشان داد، ولی بررسی تغییرات‌ساختاری تک رشته‌ای توانست ۴۰/۴ درصد هتروزیگوتی را در جمعیت مورد مطالعه نشان دهد. نتایج این مطالعه نشان دهنده پلی مرفیسم بالای ژن انترفرن‌گاما درگوسفندان‌شال بود واین‌گوسفندان بستری مناسب جهت ادامه مطالعات بنیادین وشناسایی ردیف‌های نوکلئوتیدی آلل‌های بدست‌آمده خواهند بود تا درک کامل تری از ارتباط این ژن با آلودگی به انگل‌ها وسایر عوامل بیماریزا به دست‌آید.

واژه‌های کلیدی: انترفرن گاما، گوسفندان توده‌شال، تنوع ژنتیکی، آنالیز حرکت دورشته‌ای‌های نامتجانس، بررسی تغییرات ساختاری تک‌رشته‌ای.

مقدمه

انترفرن‌ها گروهی از سایتوکاین‌ها هستند که در پاسخ به عفونت ویروسی، تحریک ایمنی یا طیفی از محرک‌های شیمیایی، ساخته می‌شوند(۲۲،۲۱). به‌طور کلی انترفرن‌ها را به دو گروه عمده تقسیم می‌کنند: انترفرن‌های نوع I وانترفرن نوع II یا ایمن(۲۱،۱۲،۲،۱). انترفرن نوع II یا انترفرن ایمن که به آن نام انترفرن گاما نیز داده‌اند، سایتوکاین اصلی فعال کننده ماکروفاژها است و درهردو ایمنی ذاتی واکتسابی وابسته به سلول نقش اساسی ایفامی‌کند. این سایتوکاین در مقایسه با انترفرن‌های نوع I فعالیت ضد ویروسی نیز دارد ولی این اثرقوی نبوده وبصورت یک سایتوکاین عملیاتی درپاسخ‌های ایمنی عمل می‌کند(۲۱،۱۲،۲،۱).

توالی ژن‌های انترفرن و عامل نکروز تومور گوسفند در دهه گذشته طی مطالعات در زمینه شناخت ژن‌های کد کننده سایتوکاین‌ها مشخص گردید(۱۷). پژوهش‌هایی که در ادامه این تحقیقات انجام گرفت علاوه بر ساخت پروتئین‌های نوترکیب سایتوکاین‌های مذکور به بررسی تنوع در این ژن‌ها معطوف شد. Maddox و همکاران درسال ۱۹۹۹ تنوع ریزماهواره‌های اینترون پنجم ژن IL1A، Luhken و همکاران درسال ۲۰۰۰ پلی مرفیسم ژن IL2 و Varez-Busto و همکاران درسال ۲۰۰۴ تنوع ژنتیکی در ژن رمزکننده عامل نکروز تومور آلفا گوسفند را بررسی کردند(۲۳،۱۵،۱۴). پلی مرفیسم ژن انترفرن گاما نیز طی مطالعات متعددی تحت بررسی قرار گرفته وارتباط آن با ایجاد حساسیت و یا مقاومت نسبت به نماتودهای دستگاه گوارش در گوسفند نشان داده شده است(۵).

به دلیل شیوع بالای آلودگی‌های نماتودی در ایران، بررسی پلی مرفسیم ژن انترفرن گاما در توده‌های گوسفندان ایرانی ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه در نظر دارد با بررسی پلی مرفیسم اگزون-۳ ژن مذکور در توده گوسفندان شال، امکان انجام مطالعات بعدی و استفاده از روش‌های نوین در کنترل مشکل آلودگی‌های نماتودی در ایران را فراهم آورد.

مواد و روش کار

نمونه گیری و استخراج DNA: در این بررسی ۱۳۶ نمونه خون کامل (حاوی EDTA) از گوسفندان توده شال موسسه تحقیقاتی امین آباد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران شامل ۲۴ راس قوچ و ۱۱۲ راس میش اخذ گردید. نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی بر اساس روش ابداعی در بخش میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفت. ابتدا ۱۱ میلی لیتر بافر لیز کننده گلبول قرمز (۱۰ میلی مولار Tris-HCl با pH: ۷/۵، ۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۱۵ مولار NaCl و ۰/۷۵ درصد Triton x100) به ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه خون اضافه شده و سپس به مدت ۶ دقیقه با نیروی ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و ۱ میلی لیتر از بافر مذکور دوباره به نمونه اضافه گردید و به مدت ۳ دقیقه با نیروی ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. این مرحله تا زمان بدست آوردن یک پلت سفید در ته لوله تکرار می‌شد. پلت نهایی با ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیزه کننده گلبول سفید (۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۰/۱ مولار NaCl، ۲۵ میلی مولار EDTA با pH: ۸ و ۰/۵ درصد SDS) مخلوط

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۵۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱

Email: nikbakhti@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

می‌گردید و پلت کاملا در محلول یکنواخت می‌شد. ۳۰۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده (۴ مولار Guanidium thiocyanate، ۲۵ میلی مولار Sodium citrate و ۰/۵ درصد sarkosyl) به مخلوط قبلی اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد، سپس ۳۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم (۳ مولار acetate Potassium و ۱۱/۵ درصد Glacial acetic acid) به مخلوط قبلی اضافه شد. پس از یکنواخت کردن محلول جهت رسوب دادن پروتئین‌ها، نمونه به مدت ۵ دقیقه با نیروی g۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌شد. ۱ میلی لیتر از مایع رویی به یک تیوب جدید منتقل شده و ۷۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانل به آن اضافه و به مدت ۳ دقیقه با نیروی g۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده تا DNA در ته تیوب رسوب کند. مایع رویی کاملا از تیوب خارج شده و پلت DNA با ۶۰۰ میکرولیتر اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد. پلت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده می‌شد تا خشک شود. در نهایت پلت در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris-EDTA) حل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

افزوده سازی اگزون -۳ ژن انترفرن گاما: جهت بررسی تنوع سومین اگزون ژن انترفرن گاما از روشی که ژوو همکاران در سال ۲۰۰۷ ارائه کرده بودند استفاده گردید (۲۵). واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) روی ژن مذکور با استفاده از پرایمرهای ('5-ACATCAACCTCTCTTTGTGCTC-3') و ('5-GTAAGAGCCTCTGCAATGATAC-3') و چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای، شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر شامل ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرو مولار dNTP، ۰/۴ میلی مولار از پرایمرهای مذکور، ۱ واحد Taq DNA Polymerase (شرکت سینا ژن) و ۱ میکرولیتر DNA انجام گرفت. در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول مرحله دوم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد تا کیفیت و طول قطعه تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گیرد (۲۴).

آنالیز حرکت دو رشته‌ای‌های نامتجانس (HMA): جهت انجام آزمون HMA محصولات PCR که کیفیت آنها در مرحله قبل تایید شده بود انتخاب گردیدند. ۵ میکرولیتر از هر نمونه به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها سریعا به روی یخ منتقل شده و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری روی یخ بلافاصله روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد در بافر TBE (۹ میلی مولار Tris، ۹ میلی مولار Boric acid، ۲ میلی مولار EDTA) به مدت ۹۰ دقیقه با اختلاف پتانسیل ۱۲۰ ولت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد الکتروفورز گردیدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل‌ها بوسیله bromide Ethidium رنگ آمیزی شده و در نهایت تصاویر با دستگاه ترانس لومیناتور ماوراء بنفش ثبت شدند (۱۳، ۸).

آزمون بررسی تغییرات ساختاری تک رشته‌ای (SSCP): پس از حصول اطمینان از صحت کار در مرحله افزوده سازی، جهت انجام SSCP از روشی که ژوو همکاران در سال ۲۰۰۷ ارائه کرده بودند استفاده گردید (۲۵). ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲۰ میکرولیتر از محلول فرمامید (۵۰ µl bromophenol blue, ۵۰µl saturated xylene cyanol, ۱۰۰µl TBE 10x, formamide Foramid dye (۱ml) مخلوط شد و مجموعه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و سپس سریعاً به روی یخ انتقال داده شد. پس از گذشت زمان ۵ دقیقه نمونه‌های تک رشته‌ای شده، روی ژل اکریلامید ۱۰ درصد به مدت ۲ ساعت با اختلاف پتانسیل ۱۵۰ ولت در بافر TBE الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. لازم به ذکر است شرایط الکتروفورز برای ژل با ارتفاع ۸/۵ سانتیمتر و ضخامت ۰/۵ میلی متر، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بهینه سازی گردید. تصاویر ژل‌ها با دستگاه UV ترانس لومیناتور ثبت شدند. تصاویر به دست آمده از ژل‌ها به کمک نرم افزار (Photoshop Ver. 7. 0) Adobe) آنالیز شد و الگوهای حاصل از آزمون SSCP، با هم مقایسه و نمونه‌های مشابه مشخص گردیدند (۲۵، ۱۶).

آنالیز ژنتیکی جمعیت: فراوانی ژنوتیپ‌ها بوسیله شمارش مستقیم محاسبه شدند. میزان هوموزیگوتی و هتروزیگوتی منتظره بر مبنای مدل ارائه شده توسط لوین برآورد گردید. همچنین انحراف از تعادل هاردی - وینبرگ با محاسبه میزان FIS بررسی شد. از نرم افزار (Popgene Ver. 1. 32) جهت محاسبه مقادیر فوق استفاده شد. پیش بینی وضعیت فراوانی آلل های بدست آمده در نسل های بعدی جمعیت مورد مطالعه توسط نرم افزار (Populus Ver. 5. 4) محاسبه گردید.

نتایج

نتایج حاصل از افزوده سازی اگزون- ۳ ژن انترفرن گاما با استفاده از پرایمرهای معرفی شده توسط Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۷ در تصویر ۱ نشان داده شده است. باند حاصل با کیفیت مطلوب و با وزن ۲۶۵ جفت باز بدون پرایمر دایمر در تصویر مشخص است.

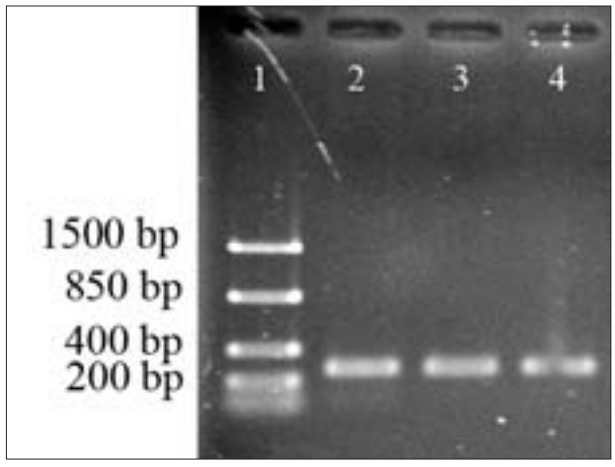
با استفاده از آزمون آنالیز حرکت دو رشته‌ای های نامتجانس، باند اضافه تری در تصاویر بدست آمده از نمونه‌ها دیده نشد (تصویر ۲)، در حالی که اگر نمونه‌ای هتروزیگوت باشد دو باند در بالای محصولات PCR قابل رؤیت است. با توجه به تصاویر بدست آمده تمام نمونه‌های تحت بررسی در این مطالعه از نظر این آزمون هموزیگوت هستند.

با استفاده از آزمون SSCP پنج الگوی متفاوت در جمعیت مورد مطالعه شناسایی گردید. پروفایل A، C و E با تعداد ۲ باند و پروفایل B و D با تعداد ۳ باند در آزمون SSCP مشخص گردیدند. در تصویر ۳ انواع الگوهای بدست آمده نشان داده شده است. الگوهای A، C و E به دلیل هموزیگوت بودن نمایانگر ۳ آلل (a، c و e) هستند، الگوی B هتروزیگوتی از دو آلل a و c است و الگوی D نیز از دو آلل a و e تشکیل شده است. آنالیز آماری حاصل از یافته‌های این مطالعه نشان دهنده ۵۹/۶ درصد هموزیگوتی ۴۰/۴ درصد هتروزیگوتی در سطح جمعیت مورد مطالعه است. آلل a با ۷۴/۶ درصد و آلل e با ۷/۷ درصد دارای بیشترین و کمترین فراوانی هستند.

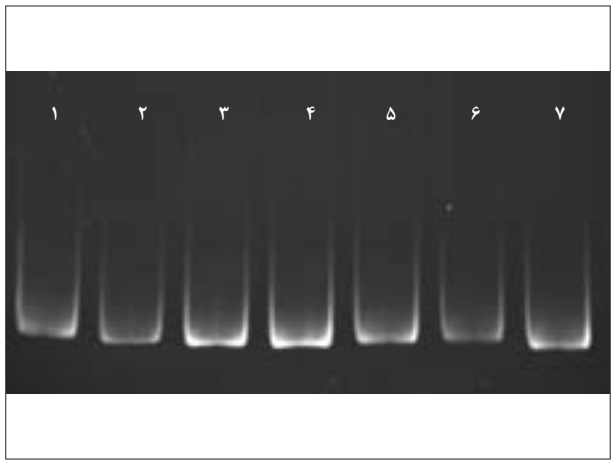
آنالیز آماری نشان داد که جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی - وینبرگ

www.SID.ir

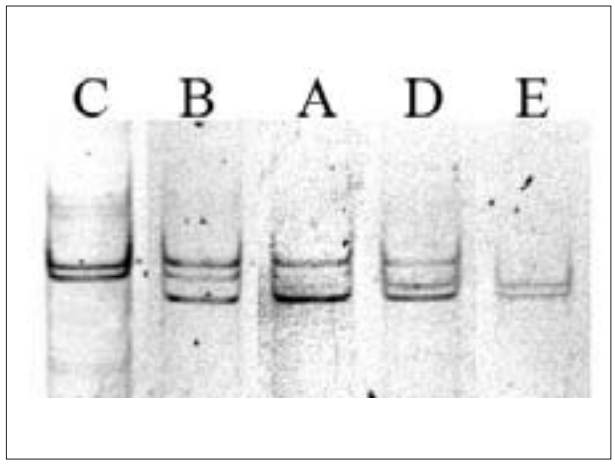
Archive of SID



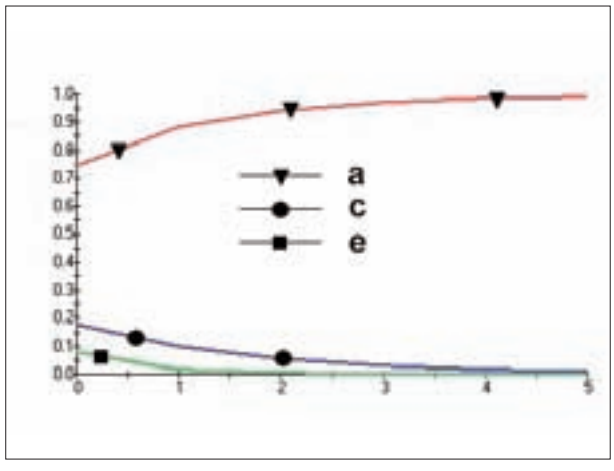
تصویر۱- الکتروفورز محصولات بدست آمده از روش PCR (ستون ۲ الی ۸) در کنار مارکر (ستون ۱) (Fast Ruler ,Low Range ,Fermentase Co .).



تصویر۲- نتایج بدست آمده از آزمون آنالیز حرکت دو رشته‌ای‌های نامتجانس روی محصولات PCR (ستون ۱ الی ۷).



تصویر۳- الگوهای بدست آمده از آزمون SSCP.



تصویر۴- برآورد فراوانی آلل‌های مشخص شده در این مطالعه تا نسل پنجم.

e c a

خارج شده است. فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌ها در جدول ۱ و ۲ و میزان مشاهده شده و منتظره از هتروزیگوتی و هوموزیگوتی جمعیت گوسفند توده شال که در این مطالعه تحت بررسی قرار گرفتند در جدول ۳ آمده است. همچنین مدل نرم افزاری از فراوانی آلل‌ها در نسل‌های بعدی، چنین نشان داد که فراوانی آلل e در نسل دوم تقریبا معادل صفر شده و چنین حالتی برای آلل c نیز در نسل پنجم حادث خواهد شد. آلل a تنها آلل موجود در نسل ششم از جمعیت مورد مطالعه خواهد بود (تصویر ۴).

بحث

بالا بودن هزینه درمان و تحقیقات جهت ساخت دارو و واکسن، متفاوت بودن نتایج استفاده از یک دارو در آزمایشگاه و بالین، مقاومت انگل‌ها و میکروب‌ها نسبت به داروها به دلیل استفاده مکرر از دارو، حساسیت نسبت به واکسن‌ها و داروها موجب شده که امروزه کنترل ژنتیکی بیماری‌ها یکی از مباحث عمده علوم پزشکی و دامپزشکی باشد(۴). مبحث کنترل ژنتیکی بیماری‌ها با مشاهده افراد و یا جمعیت‌هایی که نسبت به برخی عوامل بیماریزا مقاوم بودند شکل گرفت(۴). در این راستا جستجو جهت شناسایی ژن‌هایی که دارای ارتباط با پاتوژن‌ها هستند در دهه هشتاد میلادی آغاز شد(۷). ژن‌های پاسخ دهنده در سیستم ایمنی از ابتدا به عنوان یکی از عوامل دخیل در ایجاد حساسیت و یا مقاومت نسبت به بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. با پیشرفت‌هایی که تاکنون بدست آمده نقش این ژن‌ها در ارتباط با بسیاری از بیماری‌ها به اثبات رسیده و هنوز مطالعات در مورد ژن‌های پاسخگو در سیستم ایمنی جریان دارد. ارتباط ژن انترفرن گاما با بیماری‌ها، در پزشکی و دامپزشکی موضوع تحقیقات بسیاری بوده است و ارتباط آن با ایجاد حساسیت و یا مقاومت نسبت به بعضی بیماری‌ها به اثبات رسیده است (۳،۴،۹،۱۰،۱۱،۱۸،۲۰،۲۴).

آلودگی‌های نماتودی به خصوص در گوسفند عامل ایجاد بیشترین میزان ضرر اقتصادی است و استفاده از داروهای ضد کرمی، هزینه بر و همراه با ایجاد مقاومت دارویی در انگل‌ها است. در همین راستا شناسایی ژن‌هایی که باعث ایجاد مقاومت نسبت به عفونت‌های انگلی می‌شوند جهت استفاده در برنامه‌های اصلاح نژادی و بدست آوردن نژادهای مقاوم تر یکی از بهترین و

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- فراوانی الگوهای بدست آمده از آزمون SSCP.

ژنوتیپ	B	A	E	D	C	جمع کل
فراوانی مطلق (رأس)	۷۴	۴۰	۴	۱۵	۳	۱۳۶
درصد فراوانی (درصد)	۵۴/۴	۲۹/۴	۳	۱۱	۲/۲	۱۰۰

جدول ۲- فراوانی آلل های بدست آمده از گوسفندان توده شال.

آلل	c	a	e	جمع کل
فراوانی مطلق (رأس)	۲۰۳	۴۸	۲۱	۲۷۲
درصد فراوانی (درصد)	۷۴/۶	۱۷/۶	۷/۷	۹۹/۹

جدول ۳- میزان مشاهده شده و منتظره از هتروزیگوتی و هوموزیگوتی جمعیت گوسفند توده شال. *هوموزیگوتی و هتروزیگوتی منتظره بر مبنای مدل ارائه شده توسط لوین (۱۹۷۳). ** سطح معنی داری نشان می دهد جمعیت مورد مطالعه از تعادل هاردی - وینبرگ خارج شده است.

نام جایگاه ژنی	هوموزیگوتی (درصد)	هتروزیگوتی (درصد)	*هوموزیگوتی منتظره (درصد)	*هتروزیگوتی منتظره (درصد)	**سطح معنی داری (p Values)
اگزون - ۳ ژن انترفرن گاما	۵۹/۶	۴۰/۴	۵۹/۳	۴۰/۷	۰/۰۱

مقرون به صرفه ترین روش‌های کنترل آلودگی‌های نماتودی محسوب می‌شود(۴).

ریز ماهواره‌های مشخص شده در اینترون یک ژن انترفرن گاما توسط Coltman و همکاران درسال ۲۰۰۱ و Sayers و همکاران درسال ۲۰۰۱ در نژادهای مختلف گوسفند مورد مطالعه قرار گرفته اند. نتایج این بررسی ها نیز در روشن نمودن تنوع ژن و ارتباط برخی از هاپلوتیپ‌های آن با ایجاد مقاومت نسبت به آلودگی های نماتودی مورد استفاده قرار گرفته است(۱۹،۵).

نتایج بررسی تنوع ژنتیکی اگزون-۳ ژن انترفرن‌گاما با روش SSCP-PCR توسط Zhou و همکاران درسال۲۰۰۷ در جمعیتی شامل ۳۱۰ راس گوسفند از پنج نژاد گوناگون مرینو، کوریدال، رامنی، پل دورست و نژادی مخلوط، ۹ پروفایل متمایز را نشان داده که شامل ۴ الگوی هتروزیگوت و ۵ الگوی هموزیگوت است(۲۵). نامبردگان پس از تعیین ردیف‌های نوکلئوتیدی مربوط به هر الگو، در مجموع چهار ناحیه پلی مرف را نشان دادند که هر کدام واجد یک SNP است. نتایج حاصل از تحقیق مذکور نیز مؤید توان بالای SSCP در تشخیص موارد هتروزیگوتی است.

در مطالعه حاضر که بر روی گوسفند توده شال انجام گرفت ۵ پروفایل متمایز شناسایی شد. از مجموعه اطلاعات بدست آمده، این ۵ پروفایل مربوط به ۳ آلل متفاوت بوده اند چرا که پروفایل B مجموعه‌ای از باندهای دو پروفایل دیگر (A ,C) است(تصویر۳). پروفایل D نیز مجموعه‌ای از دو پروفایل A و E است (تصویر۳). در نتیجه الگوهای A، C و E نشان دهنده نمونه‌های هموزیگوت و الگوهای B و D نشان دهنده نمونه‌های هتروزیگوت هستند. به علت کاهش فراوانی آلل e در وضعیت هموزیگوت و هتروزیگوت با آلل c این جمعیت از نظر ژن انترفرن گاما از تعادل هاردی- وینبرگ خارج شده، که نشان می‌دهد، این ژن به شدت تحت تاثیر فشار انتخابی در برنامه‌های اصلاح نژاد است.

اگرچه آنالیز دورشته‌ای‌های نامتجانس تمامی نمونه‌ها را بصورت هموزیگوت نشان داده ولی در واقع نتوانسته هترزیگوتی را در سطحی که SSCP نشان داده است تأیید نماید. این عدم تطبیق بر این حقیقت استوار است که موتاسیون های تک نوکلئوتیدی در آنالیز دورشته‌ای نامتجانس قابل تشخیص نبوده و تنوع آللیک در چنین سطوحی را مشخص نمی نماید. بنابراین با آنالیز SSCP به گونه‌ای تمایز هتروزیگوتی با دقت بیشتر و قدرت تفکیکی بالاتر صورت خواهد گرفت.

در مجموعه مطالعات انجام شده که تاکنون با موضوع حساسیت و یا مقاومت نسبت به آلودگی های نماتودی انجام شده، هیچ یک به چگونگی تاثیر ژن انترفرن گاما در ایجاد حساسیت و یا مقاومت اشاره‌ای نکرده و تنها بر اساس یافته‌های آماری بعضی از هاپلوتیپ‌ها را به عنوان عامل خطر معرفی می‌کنند. در عین حال این تحقیقات تاکنون محدود به بررسی تنوع ردیف‌های نوکلئوتیدی در اینترون‌ها بوده، یعنی بخش‌هایی از ژنوم که ترجمه نمی شوند و شامل اگزون‌ها یا بخش‌های قابل ترجمه نبوده است(۴). از آنجایی که فعالیت‌های شناخته شده انترفرن گاما بیشتر در ارتباط با عفونت‌های میکروبی بوده و از ایجاد پاسخ‌هایی که منجر به تولید IgE و فعالیت ائوزینوفیل‌ها می‌شوند جلوگیری می‌کند، احتمال دخالت مستقیم پروتئین انترفرن گاما در ایجاد مقاومت و یا حساسیت نسبت به آلودگی‌های نماتودی کم است. با این وجود می‌توان یافته‌های فوق را از طریق تاثیر بخش‌های همجوار ژنومی (پایین رو یا بالا رو) بر میزان بیان ژن انترفرن گاما و یا ژن‌های ناشناخته دیگری که دارای تاثیرگذاری مستقیم هستند و با بعضی از هاپلوتیپ‌ها همزمان به ارث می‌رسند توجیه نمود. البته با توجه به وجود پلی مرفیسم در اگزون-۳ ژن انترفرن گاما که در این مطالعه نیز به اثبات رسید، بررسی ارتباط آماری آلل های شناسایی شده در این ناحیه که دارای تظاهرات فنوتیپی متفاوت نیز می باشند با میزان آلودگی نماتودی در گوسفند و همچنین بررسی همزمانی حضور آلل‌های مذکور باهاپلوتیپ‌های مربوط به اینترون‌ها تا حدود زیادی چگونگی تاثیرات مستقیم و یا غیر مستقیم این ژن و پروتئین حاصل از آن در ایجاد حساسیت و یا مقاومت نسبت به آلودگی های نماتودی را روشن خواهد نمود.

توده گوسفند شال یکی از با ارزش ترین توده‌های گوسفند ایرانی است و برنامه‌های اصلاح نژاد روی این گوسفند در حال انجام است. از سوی دیگر، پرورش گوسفند در ایران بیشتر بصورت غیر متمرکز و مرتعی می‌باشد یا به عبارتی با زندگی کوچ نشینی همراه است و در چنین شکلی از پرورش دام میزان آلودگی نماتودی بالا است و شیوع برخی از نماتودهای گوسفند مثل اوسترتاژیا سیرکومسینکتا در ایران به ۸۴درصد نیز می رسد(۸). نتایج این مطالعه نشان دهنده پلی مرفیسم بالای ژن انترفرن گاما در گوسفندان شال بوده و این گوسفندان بستری مناسب جهت ادامه مطالعات بنیادین و شناسایی ردیف‌های نوکلئوتیدی آلل های بدست آمده خواهند بود تا درک

www.SID.ir

Archive of SID

کامل تری از ارتباط این ژن با آلودگی های انگلی و سایر پاتوژن ها به دست آید.

References

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (2004) Basic Immunology, Saunders, Philadelphia, USA. pp. 35-37, 95-97, 112-118.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (2006) Cellular and Molecular Immunology, Saunders, Philadelphia, USA. pp. 243-274.
3. Cabantous, S., Poudiougou, B., Traore, A., Keita, M., Cisse, M. B., Doumbo, O., Dessein, A. J., Marquet, S. (2005) Evidence that interferon-gamma plays a protective role during cerebral malaria. J. Infect. Dis. 192: 854-860.
4. Charon, K. M. (2004) Genes controlling resistance to gastrointestinal nematodes in ruminants. Anim. Sci. Pap. Rep. 22: 135-139.
5. Coltman, D. W., Wilson, K., Pilkington, J. G., Stear, M. J., Pemberton, J. M. (2001) A microsatellite polymorphism in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. Parasitology. 122: 571-582.
6. De, S., Singh, R. K., Butchaiah, G. (2002) MHC-DRB exon 2 allele polymorphism in Indian river buffalo (Bubalus bubalis). Anim. Genet. 33: 215-219.
7. Dukkipati, V. S. R., Blair, H. T., Garrick D. J., Murray A. (2006) 'Ovar-Mhc'-ovine major histocompatibility complex: structure and gene polymorphisms. Genet. Mol. Res. 5: 581-608.
8. Eslami, A. (2007) Veterinary Helmintology. University of Tehran Publication, Tehran, Iran. pp. 316- 397.
9. Etokebe, G. E., Bulat-Kardum, L., Johansen, M. S., Knezevic, J., Balen, S., Matakovic-Mileusnic, N., Matanic, D., Flego, V., Pavelic, J., Beg-Zec, Z., Dembic, Z. (2006) Interferon-gamma gene (T874A and G2109A) polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. Scand. J. Immunol. 63: 136-141.
10. Henri, S., Stefani, F., Parzy, D., Eboumbou, C., Dessein, A., Chevillard, C. (2002) Description of three new polymorphisms in the intronic and 3'UTR regions of the human interferon gamma gene. Genes Immun. 3: 1-4.
11. Jahromi, M., Millward, A., Demaine, A. (2000) A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. J. Interferon Cytokine Res. 20: 187-190.
12. Janeway, A. C. Travers, P. Walport, M., Shlomchik, M. J. (2005) Immunobiology. (6th ed.) Garland Science Publishing, NY. USA. pp. 347-351
13. Langerak, A. W., Szczepanski, T., van der Burg, M., Wolvers-Tettero, I. L., van Dongen, J. J. (1997) Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. Leukemia. 11: 2192-2199
14. Luhken, G., Hiendleder, S., Prinzenberg, E. M., Erhardt, G. (2000) Rapid communication: a single-strand conformation polymorphism in the ovine interleukin-2 (IL-2) gene. J. Anim Sci. 78: 2754-2755.
15. Maddox, J. F., Hawken, R. J., Matthew, P., Davies, K. P. (1999) Single strand conformational polymorphisms (SSCPs) in the ovine IL1A and IL6 genes. Anim Genet. 30: 317-318.
16. Nikbakht, Gh. Barjeste. (2008) N. A study of the genotypic variability at the MHC (B - F) in Arian broiler chickens by PCR-SSCP. J. Vet. Res. 64:63-69.
17. Piper, L., Ruvinsky A. (1997) The Genetics of Sheep. Cabi Publishing. Oxford shire, UK. pp. 183-193
18. Saha, A., Dhir, A., Ranjan, A., Gupta, V., Bairwa, N., Bamezai, R. (2005) Functional IFNG polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer. Immunogenetics. 57: 165-171.
19. Sayers, G., Good, B., Hanrahan, J. P., Ryan, M., Sweeney, T. (2005) Intron 1 of the interferon gamma gene: Its role in nematode resistance in Suffolk and Texel sheep breeds. Res. Vet. Sci. 79: 191-196.
20. Schrijver, H. M., Hooper-van, V. T., van Belzen, M. J., Crusius, J. B., Pena, A. S., Barkhof, F., Polman, C. H., Uitdehaag, B. M. (2004) Polymorphisms in the genes encoding interferon-gamma and interferon-gamma receptors in multiple sclerosis. Eur. J. Immunogenet. 31: 133-140.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Tadjbakhsh, H. (1995) Essential Immunology. University of Tehran Publication, Tehran, Iran. pp. 495- 497.
22. Tizard, I. R. (2004) Veterinary Immunology. (7^{th}ed.) Sunders. Philadelphia. USA. pp. 133-144.
23. varez-Busto, J., Ruiz-Nunez, A., Mazon, L. I., Jugo, B. M. (2004) Detection of polymorphisms in the tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep. Eur. J. Immunogenet. 31: 155-158.
24. Yu, H., Zhu, Q. R., Gu, S. Q., Fei, L. E. (2006) Relationship between IFN-gamma gene polymorphism and susceptibility to intrauterine HBV infection. World J. Gastroenterol. 12: 2928-2931.
25. Zhou, H., Hickford, J. G., Fang, Q. (2007) Polymorphism report: Allelic polymorphism of the ovine interferon gamma (IFNG) gene. Mol. Cell Prob. 21: 76-77.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Vet. Res. 64, 3:199-204, 2009

STUDY ON INTERFERON GAMMA GENE POLYMORPHISM IN SHAUL SHEEP

Nikbakht Brujeni, GH.[1]*, Emam, M.[1], Mahmoodzadeh, H.[2], Barjesteh, N.[1]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

[2]*Department of Animial and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

(Received 6 March 2008, Accepted 12 December 2008)

Abstract:

Interferon gamma (IFN-γ) is a cytokine produced by activated T lymphocytes and natural killer cells. It plays an important role in innate and adaptive immunity. IFN-γ gene is polymorphic and its haplotype has been associated with resistance to nematode infestations which are the most important parasites of domestic sheep worldwide. To evaluate IFN-γ polymorphism in Iranian Shaul sheep population, 136 blood samples were collected. Genomic DNA were extracted and amplified by PCR using specific primers for exon 3 of IFN-γ gene. After gene amplification, SSCP and Heteroduplex mobility analysis carried out on polyacrylamid gel. Five unique SSCP patterns were detected in this population which 3 of them represent 3 alleles. Although heteroduplex mobility analysis demonstrated that all samples were homozygous, SSCP could reveal heterozygosity at frequency of 40. 4% in the studied population. Data obtained from the present study have revealed that IFN-γ gene was a highly polymorphic in Iranian Shaul ecotype. This will be useful to study host-pathogen interaction and to evaluate association between resistance or susceptibility to disease with IFN-γ in this ecotype.

Key words: interferon gamma, Shaul sheep, gene polymorphism, heteroduplex mobility analysis, single strand conformation polymorphism analysis.

***Corresponding author's email: nikbakht@ut. ac. ir, Tel: 021-661117053, Fax: 021-66427517**

www.SID.ir