نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۹، تابستان ۱۳۹۷
ص‌ص: ۲۰۹~۲۱۸

بررسی مولکولی و بیوانفورماتیکی ساختار ژنی اینترلوکین ۲ مرغ بومی خراسان

- **رضا توحیدی** (نویسنده مسئول)
استادیار، گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت جام
- **محمد دوستی**
دانش‌آموخته دکتری ژنتیک، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
- **محمدرضا نصیری**
استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
- **آرش جوانمرد**
استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : آذر ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۵۰۰۷۴۴۳
Email: r.tohidi@tjamcaas.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22092/ asj.2017.110808.1459

چکیده

امروزه یکی از نگرانی‌های صنعت پرورش طیور در جهان، شیوع بیماری‌ها در گله‌های بزرگ است. با وجود استفاده از واکسیناسیون مناسب، مصرف آنتی‌بیوتیک و انجام ضدعفونی در سالن‌های مرغداری، ولی همچنان شیوع بیماری‌ها ضرر اقتصادی جبران ناپذیری را به این صنعت وارد می‌کند. یکی دیگر از راه‌های مؤثر افزایش مقاومت طیور به بیماری‌ها، بهبود ژنتیکی سیستم ایمنی است که می‌تواند هزینه‌های جاری مصرف واکسن و دارو را کاهش دهد. شناسایی ژن‌ها و نشانگرهای ژنی مناسب به انتخاب حیوانات برتر از لحاظ سیستم ایمنی کمک می‌کند. اینترلوکین‌ها (ILs) گروه مهمی از سایتوکین‌ها هستند که نقش مهمی در فراخوانی پاسخ‌های ایمنی مانند رشد و تحریک سلول‌های B و T ایفا می‌کنند. تعداد زیادی از ILs وجود دارند که در این میان IL-2 و IL-15 سایتوکین پیش‌تورمی هستند. با توجه به اهمیت IL-2 در سیستم ایمنی، مطالعه حاضر به منظور بررسی ساختار ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان، شناسایی جهش‌ها در جایگاه ژنی *IL-2* و بررسی تطبیقی نواحی پروموتری، اگزونی و اینترونی ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی مرجع انجام گرفت. برای انجام این تحقیق تعداد ۲۰ نمونه DNA مرغ بومی خراسان برای تکثیر و توالی‌یابی یک قطعه ۸۷۵ جفت بازی ژن *IL-2* مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه توالی‌های به دست آمده از مرغ بومی خراسان با توالی به ثبت رسیده در پایگاه داده‌های مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری وجود جهش‌هایی را در ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان نشان داد، به طوری که این جهش‌ها در ناحیه اگزون ۱ باعث تغییر اسید آمینه شده بودند. جهش‌های اگزونی در نقاط ۷۳۳، ۷۳۸، ۷٤٤ و ۷۹٤ جفت بازی به ترتیب برای جانشینی بازهای آدنین به جای سیتوزین، تیمین به جای آدنین، آدنین به جای سیتوزین و تیمین به جای سیتوزین بودند. وجود این جهش‌ها امکان استفاده از آن‌ها به عنوان نشانگر ژنی در برنامه‌های انتخاب ژنومی را فراهم می‌آورد که برای تأیید آن نیاز به بررسی فراوانی جهش‌ها در جمعیت و همچنین بررسی تأثیر آن‌ها بر عملکرد IL-2 از طریق آزمایشات پروتئومیکس است.

واژه‌های کلیدی: ژن، اینترلوکین ۲، توالی‌یابی، مرغ بومی خراسان

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 119 pp: 209-218

A molecular and bioinformatical study on genetic structure of interleukin 2 in Khorasan native chicken

By: Reza Tohidi1*, Mohammad Dousti2, Mohammadreza Nasiri2, Arash Javanmard3
1-Dept. of Animal Science, Torbat-e Jam University,
2-Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad,
3- Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

Received: May 2017 **Accepted: November 2017**

Control of diseases is one of the concerns in poultry industry worldwide. Despite the use of proper vaccines, antibiotics and sanitation in poultry farms, still disease outbreaks make irreparable economical loss. Another effective way of increasing the resistance of poultry to diseases is the genetic improvement of the immune system, which can reduce the current cost of taking vaccine and medicine. The identification of suitable genes and markers helps to select the best animals for the immune system. Interleukins (ILs) are an important group of cytokines that play a critical role in triggering immune responses such as growth and stimulation of B and T cells. There are many interleukins in which IL-2 and IL-15 are pre-inflammatory cytokines. Considering the importance of IL-2 in the immune system, the present study was conducted to investigate the structure of *IL-2* gene in Khorasan native chickens, identify mutations in the *IL-2* gene and compare the promoter, exon, and intron regions of the *IL-2* with a reference sequence. To conduct this research, 20 DNA samples from Khorasan native chickens were used to amplify and sequence of 875-base pairs from the *IL-2* gene. Comparison of the sequences obtained from the Khorasan native chickens with the sequence deposited in the NCBI showed mutations in the *IL-2* gene, so that these mutations in the exon 1 region altered the amino acids. Exon mutations at 733, 738, 744 and 794 base pairs made to replace adenine bases instead of cytosine, thymine instead of adenine, adenine instead of cytosine, and thymine instead of cytosine. Identifying these mutations can allow them to be used as a genetic marker. To confirm this, we need to investigate the frequency of mutations and also examine their effect on IL-2 performance through proteomics experiments.

Key words: gene, interleukin 2, sequencing, Khorasan native chicken.

مقدمه

مقاومت به بیماری‌ها یک صفت چند ژنی به حساب می‌آید که تحت تأثیر بسیاری از عوامل فیزیولوژیکی و محیطی است (Zakarias و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین، انتخاب ژنتیکی برای بهبود پاسخ‌های سیستم ایمنی می‌تواند باعث کاهش هزینه‌های پرورش و حفظ سلامت مصرف کننده گردد (Lamont, 1998). مقاومت ژنتیکی در برابر عوامل بیماری‌زا و یا عوارض بیماری تحت کنترل ژن یا یک گروه ژنی است. بعضی از این ژن‌ها شامل ژن‌های تطابق پذیری بافتی MHC[1] یا مجموعه B، ژن‌های گیرنده سلول T، ژن‌های ایمونوگلوبولین و ژن‌های سایتوکین هستند (Kuby,1997). چند شکلی نوکلئوتیدی چنین ژن‌هایی باعث تفاوت افراد در میزان مقاومت به بیماری‌ها می‌گردد.

اینترلوکین‌ها (ILs) گروه مهمی از سایتوکین‌ها هستند که نقش مهمی در فراخوانی پاسخ‌های ایمنی ایفا می‌کنند. اینترلوکین ۲ و ۱۵ سایتوکین‌های پیش‌تورمی هستند که تقریباً عملکرد زیستی مشابهی دارند (Estess و همکاران، ۱۹۹۹). ساختار ژنومی *IL-2* طیور مشابه پستانداران و شامل چهار اگزون و سه اینترون است با این تفاوت که اگزون ۲ و اینترون ۲ و ۳ در طیور کوتاه‌تر از پستانداران هستند (Kaiser و Mariani، ۱۹۹۹).

[1] Major histocompatibility complex

فن‌آوری‌های با قدرت آشکارسازی بالا مانند نسل جدید توالی‌یابی (Next Generation Sequencing) می‌توانند تعداد زیادی از SNPها را همزمان تشخیص دهند (Szmolka و همکاران، ۲۰۱۵). با استفاده از این فن‌آوری‌ها بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌ها آسان‌تر شده است. تنوع ژنتیکی در مرغ‌ها بیشتر از انسان است به طوری که پنج SNP به ازای هر ۱۰۰۰ جفت باز در کل ژنوم درون و بین لاین‌های طیور مشاهده می‌گردد (Van Hemert, 2007).

حفظ و شناخت دقیق ذخایر ژنتیکی دام‌های اهلی در سطح جهانی حائز اهمیت است زیرا این ذخایر می‌توانند در برنامه‌های اصلاح نژادی آینده مورد استفاده قرار گیرند. از طرف دیگر، هزاران سال انتخاب طبیعی باعث افزایش سازگاری محیطی دام‌های بومی شده است. مرغ بومی خراسان نیز از این قاعده مستثنی نبوده و از آن جایی که این حیوان در بین روستاییان توزیع می‌گردد و نحوه نگهداری آن در روستا به صورت همراه با سایر پرندگان و نژادهاست لذا، نژاد خالص آن فقط در ایستگاه تحقیقاتی یافت می‌شود (نیکبختی و همکاران، ۱۳۸۸).

مطالعه ژنتیکی سیستم ایمنی طیور با توجه به نقش مهم ژن‌های ایمنی در حفظ سلامت دام و اهمیت پرورش طیور به عنوان یک منبع اصلی تأمین پروتئین برای انسان، ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تجزیه و تحلیل ساختاری ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان، شناسایی جهش‌ها در جایگاه ژنی *IL-2*، و مقایسه نواحی اگزونی ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی مرجع انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

برای انجام پژوهش حاضر، نمونه خون از سیاهرگ بال تعداد ۲۰ قطعه خروس ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی خراسان به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه خون با ونوجکت در تیوب حاوی ماده ضد انعقاد EDTA دریافت شد. نمونه‌های خون به سرعت درون یخ به آزمایشگاه منتقل شده و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA با استفاده از روش خروج نمکی تغییر یافته برای طیور (Miller و همکاران، ۱۹۸۸) انجام گرفت. ابتدا پروتئین‌های خون به وسیله پروتوکیناز K هضم شدند و سپس از فنل کلروفرم برای خالص‌سازی DNA استفاده شد. کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر و مشاهده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. خلوص DNA از طریق محاسبه نسبت چگالی نوری (OD) ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر به دست آمد. نمونه‌هایی با نسبت OD بین ۱/۷ تا ۱/۹ مورد استفاده قرار گرفتند. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در یک حجم نهایی ۵۰ مایکرولیتر انجام شد. محتوی تیوب PCR شامل ۳۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میلی مول $MgCl_2$، ۲۰۰ مایکرومول از هر dNTP، بافر (Promega 10X) با رقت 1X، ۲ واحد Taq DNA Polymerase (Promega) و یک مایکرومول از هر آغازگر بود.

طراحی آغازگر

یک جفت آغازگر با استفاده از توالی ثبت شده برای *Gallus gallus* در پایگاه بانک اطلاعاتی داده‌ها (NCBI) به شماره ثبت AJ224516 و با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) طراحی گردید. این آغازگر جهت تکثیر بخشی از ژن *IL-2* به اندازه ۸۷۵ جفت باز به صورت موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات کامل آغازگر در جدول (۱) آورده شده است.

برنامه چرخه‌های PCR

برنامه حرارتی چرخه‌های PCR شامل دمای واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد در ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۳۳ چرخه شامل واسرشت در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. قطعات ۸۷۵ جفت بازی حاصل PCR با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده و با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد جداسازی و زیر اشعه ماورای بنفش مشاهده شدند (شکل ۱).

توالی‌یابی و بررسی جهش‌ها

تعداد ۱۵ نمونه حاصل از PCR جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer, South Korea) ارسال شدند. بررسی

کیفیت توالی‌های ارسالی با استفاده از نرم‌افزار (Hall, 1999) BioEdit انجام گرفت و صحت توالی‌ها با کمک ابزار BLAST در پایگاه NCBI تأیید شد. سپس مقایسه توالی‌ها برای ارزیابی جهش‌های ژنی با استفاده از نرم‌افزار (https://www.qiagenbioinformatics.com/) CLC Main Workbench, V. 5.5 انجام شد.

نتایج و بحث

ژن *IL-2* در مرغان دارای ۳۸۱۸ جفت باز است که چهار اگزون و سه اینترون را شامل می‌گردد. این ژن در مرغ و همچنین انسان روی کروموزوم ۴ قرار دارد (Kaiser و Mariani، ۱۹۹۹). نواحی ژنومی توالی‌یابی شده مرغ بومی خراسان با توالی مرجع موجود در پایگاه NCBI برای نواحی پروموتر، اگزون ۱ و ۲، اینترون ۱ و بخشی از اینترون ۲ مقایسه شدند. نتایج مقایسه توالی‌های ژنومی در جدول (۲) نشان داده شده است. نتایج مقایسه وجود جهش‌هایی را در مرغ بومی خراسان نشان داد که این جهش‌ها در ناحیه اگزونی باعث تغییر اسید آمینه شده بودند.

نتایج مقایسه نشان داد که ناحیه پروموتری ژن *IL-2* تمامی نمونه‌های DNA مرغ بومی خراسان با توالی مرجع شباهت کامل دارد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ناحیه کاملاً حافظت شده بوده و دستخوش تغییرات ناشی از جهش نشده است (شکل ۲). هرچند، تنها بخشی از پروموتر (۷۰ جفت باز) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت زیرا ناحیه پروموتری ژن *IL-2* در مرغان شامل ۶۵۹ جفت باز است و مطالعات گذشته وجود چند شکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در این ناحیه را تأیید کرده‌اند (Zhou و همکاران، ۲۰۰۱؛ قاسمیان سوربنی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Tohidi و همکاران، ۲۰۱۲).

بررسی ناحیه اگزون ۱ با توالی مرجع نشان داد که در شش نمونه از ۱۵ نمونه توالی‌یابی شده جهش وجود دارد (شکل ۳). جهش‌ها در نقاط ۷۳۳، ۷۳۸، ۷۴۴ و ۷۹۴ جفت باز به ترتیب برای جانشینی بازهای آدنین به جای سیتوزین، تیمین به جای آدنین، آدنین به جای سیتوزین و تیمین به جای سیتوزین بودند. در ناحیه اگزون ۲ جهشی مشاهده نشد که نشان دهنده ناحیه کاملاً حافظت شده است (شکل۴).

برای ناحیه اینترون ۱ در نقاط ۸۲۰، ۸۳۸ و ۸۴۰ جفت بازی به ترتیب آدنین به جای گوانین، تیمین به جای گوانین و تیمین به جای گوانین جانشین شده بودند. با توجه به آن که اینترون نقش تنظیمی در فعالیت ژن دارد (Chorev و Carmel، ۲۰۱۲)، بنابراین ممکن است این جانشینی باعث تغییر فعالیت ژن *IL-2* در مرغان بومی خراسان گردد (شکل ۵). حذف و جایگزینی نوکلئوتیدی جدیدی در ناحیه اینترونی *IL-2* جوجه‌های بومی و تجاری شش کشور شامل چین، کامبوج، مصر، فیجی، لائوس و اوگاندا توسط Zhang و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است.

ژن *IL-2* دارای نقش حیاتی در پاسخ‌های ایمنی از جمله تکثیر و تنظیم فعالیت سلول‌های T، رشد سلول‌های B و تولید ایمونوگلوبولین‌ها است. ناحیه پروموتری ژن بر میزان بیان آن اثر دارد و از طرفی ساختار اگزونی بر عملکرد پروتئین تأثیر می‌گذارد (Zhou و همکاران، ۲۰۰۱). در بخشی از ناحیه پروموتری *IL-2* که در این مطالعه بررسی شد جهشی مشاهده نگردید که منطبق با گزارش Kaiser و Mariani (۱۹۹۹) بود. هرچند وجود جهش در ناحیه پروموتری *IL-2* در مطالعاتی که کل ناحیه را مورد بررسی قرار داده‌اند، گزارش شده است (Zhou و همکاران، ۲۰۰۱؛ قاسمیان سوربونی و همکاران، ۱۳۹۱؛ Tohidi و همکاران، ۲۰۱۲).

بین اینترلوکین مرغان و گاو حدود ۴۴ تا ۴۶ درصد شباهت وجود دارد (Sundick و Gill-Dixon، ۱۹۹۷) . در مطالعه حاضر نیز شباهت کمی (۸ درصد) بین قطعه توالی‌یابی شده ژن *IL-2* مرغان و انسان مشاهده شد. بررسی توالی ناحیه اگزون ۱ وجود سه جهش را نشان داد که سبب تغییر سه اسیدآمینه شده بودند. تغییر توالی اسیدآمینه یک پروتئین می‌تواند بر عملکرد آن تأثیرگذار باشد. بر اساس بررسی منابعی که در این مطالعه انجام شد، مشخص شد که این جهش‌ها برای اولین بار گزارش می‌گردند.

اگر جهش‌های ژنومی در جمعیت از فراوانی بالایی برخوردار باشند می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی برای انتخاب حیوانات استفاده گردند. بررسی قطعه ۶۵۹ جفت بازی ناحیه پروموتر *IL-2* مرغ بومی مازندران وجود یک جهش A/G را نشان داد که با استفاده از آنزیم برشی *Mnl*I سه ژنوتیپ برای این ناحیه مشاهده شد (قاسمیان سوربنی و همکاران، ۱۳۹۱). جهش

فوق مطابق گزارش Zhou و همکاران (۲۰۰۱) بود.

هر نوع تغییر در ساختار ژنی *IL-2* می‌تواند منجر به تغییر در عملکرد آن گردد. جهش مشاهده شده در ناحیه پروموتری *IL-2* در مطالعه Zhou و همکاران (۲۰۰۱) با تیتر آنتی‌بادی خون مرغان لگهورن و فایومی (Fayoumi) ارتباط معنی‌داری داشت. بررسی توالی کدکننده *IL-2* نژادهای تجاری توسط Amini و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که این ژن عضوی از خانواده بزرگ *IL-15* است و ٪۵۸ با *IL-2* اردک، ٪۸۰ با بوقلمون و ٪۴۱ با پستانداران شباهت دارد. پروتئین کد شونده توسط ژن *IL-2* پرندگان ۱۴۳ اسیدآمینه دارد. شباهت IL-2 پرندگان به IL-2 گاوی بیشتر از IL-15 گاوی است، ولی مانند IL-15 دارای چهار مولکول سیستئین است که ایجاد دو پیوند دی سولفیدی درون زنجیره‌ای می‌نماید (Wigley و Kaiser، ۲۰۰۳). هرچند در ناحیه رمزگذارنده ژن *IL-2Rγ* مرغان بومی هند نیز جهش گزارش شده است، به طوری که این جهش‌ها با شاخص‌های ایمنی خون ارتباط معنی‌داری داشتند از جمله که میزان لیزوزیم و IgG هموزیگوت‌ها کمتر از هتروزیگوت‌ها بود (Jaiswal و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی توالی DNA مرغان بومی چین وجود ۷۱۷۵ چندشکلی تک نوکلئوتیدی را در ژن‌های ایمنی مانند *IL-4I1*، *CD1b* و *CD1c* نشان داد، به طوری که تعدادی از آن‌ها با تیتر آنتی‌بادی خون ارتباط معنی‌داری نشان دادند. در ناحیه اینترونی ژن *IL-4* نیز چندشکلی تک نوکلئوتیدی مشاهده شد (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵). چندشکلی‌های مشاهده شده با تیتر آنتی‌بادی و میزان لنفوسیت‌ها ارتباط معنی‌داری داشتند. تغییرات ایجاد شده در ساختار ژن‌های ایمنی میزان حساسیت حیوان به بیماری را تغییر می‌دهد. افزایش میزان کورتیزول و افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های ایمنی از جمله این اثرات هستند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵).

مقایسه ساختار ژنومی *IL-2* مرغان با بلدرچین و انسان در مطالعه حاضر نشان داد که شباهت زیادی بین مرغ و بلدرچین مخصوصاً در ناحیه اگزون ۲ وجود دارد (۱۰۰ درصد شباهت با اگزون ۲) در حالی که تفاوت زیادی با انسان دیده شد (شکل ۶). بنابراین بین پرندگان و پستانداران از لحاظ ساختار ژنی فاصله زیادی به وجود آمده است. بعضی از ساختارهای IL-2 مرغان و گیرنده آن (IL-2Rα) در انسان مشاهده نشد (Dijkstra و همکاران، ۲۰۱۴). تجزیه و تحلیل SNPها نشان داده است که حدود ۷۰ درصد SNPها بین همه نژادهای مرغ شامل نژادهای تجاری و مرغ جنگلی به عنوان نزدیکترین جد مرغان اهلی مشترک است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیشتر جهش‌ها قبل از اهلی شدن مرغ‌ها اتفاق افتاده است (Wong و همکاران، ۲۰۰۴). ژنوم پرندگان نسبت به ژنوم پستانداران طی پدیده تکامل بیشتر حفاظت شده‌اند. فراوانی "انواع تعداد کپی" (CNV) نیز در پرندگان نسبت به انسان حدود یک سوم است که ممکن است به دلیل فشردگی بیشتر ژنوم پرندگان باشد (Griffin و همکاران، ۲۰۰۸). مقایسه توالی اسیدآمینه به دست آمده در این مطالعه با توالی اسیدآمینه مرجع نشان داد که در سه موقعیت، اسیدآمینه جدیدی جایگزین شده است. این جایگزینی‌ها شامل گلوتامیک اسید به جای آلانین، تریپتوفان به جای آرژنین و ترئونین به جای پرولین بودند. با استفاده از تکنیک‌های پروتئومیکس و آزمایش‌های درون‌تنی و برون‌تنی می‌توان میزان اثرگذاری این جهش‌های نوکلئوتیدی را روی پروتئین ارزیابی نمود. نتیجه مطالعه Koldsick و همکاران (۲۰۰۱) روی IL-2 مرغان نشان داد که جایگزینی اسیدآمینه لوسین ۱۷ با آسپاراژین و والین فعالیت زیستی و توانایی اتصال به گیرنده را در IL-2 به شدت کاهش داد، در حالی که جایگزینی آسپارتات ۲۰ با گلوتامات تأثیری ایجاد نکرد. با انجام مطالعات مقایسه‌ای روی توالی‌های پروتئینی و بررسی اثر جهش‌ها بر فعالیت پروتئین‌ها می‌توان نقاط فعالیت را در ساختمان اینترلوکین تعیین نمود. ایجاد جهش در ساختار ژن *IL-1β* مرغان باعث شناسایی نقاط فعالیت این سایتوکین شد که مشابه آن نیز در انسان گزارش شده است (Chen و همکاران، ۲۰۱۶).

نتیجه‌گیری

از آن جایی که طیور بومی در معرض شرایط محیطی متنوع قرار دارند، از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار هستند. یافتن تنوع ژنی برای صفات مقاومت در برابر بیماری عامل مهمی در حفظ و توسعه نژادها است. افزایش اطلاعات ژنتیکی در خصوص پاسخ‌های ایمنی به شناسایی نشانگرهای معتبر در طراحی برنامه‌های مؤثر انتخاب کمک می‌نماید. در مطالعه حاضر جهش‌های مؤثری در ناحیه اگزونی ژن *IL-2* مرغان بومی خراسان شناسایی شد. شناسایی SNPها برای این ژن در این جمعیت سبب معرفی نشانگرهای جدیدی برای استفاده در انتخاب به کمک نشانگر خواهد شد. در صورتی که این جهش‌ها در ناحیه اگزون *IL-2* باعث بهبود عملکرد پروتئین گردد، می‌توان از طریق معرفی ژن به جمعیت‌های دیگر اثر آن را گسترش داد. نتیجه تحقیق حاضر انجام مطالعات پروتئومیکس و ژنومیکس در مورد *IL-2* را برای آینده ضروری می‌سازد.

سپاسگزاری

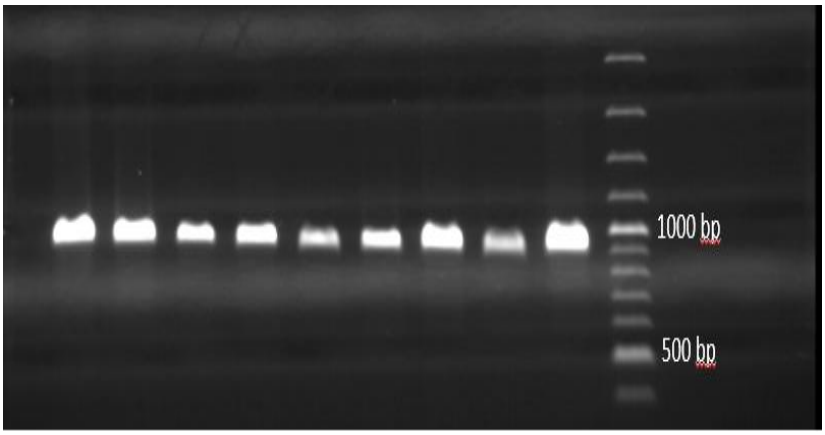
این طرح به شماره مصوب TP13947 با حمایت مالی مجتمع آموزش عالی تربت جام انجام پذیرفت.

جدول ۱- مشخصات و توالی آغازگر استفاده شده جهت تکثیر قطعه ژن *IL-2*

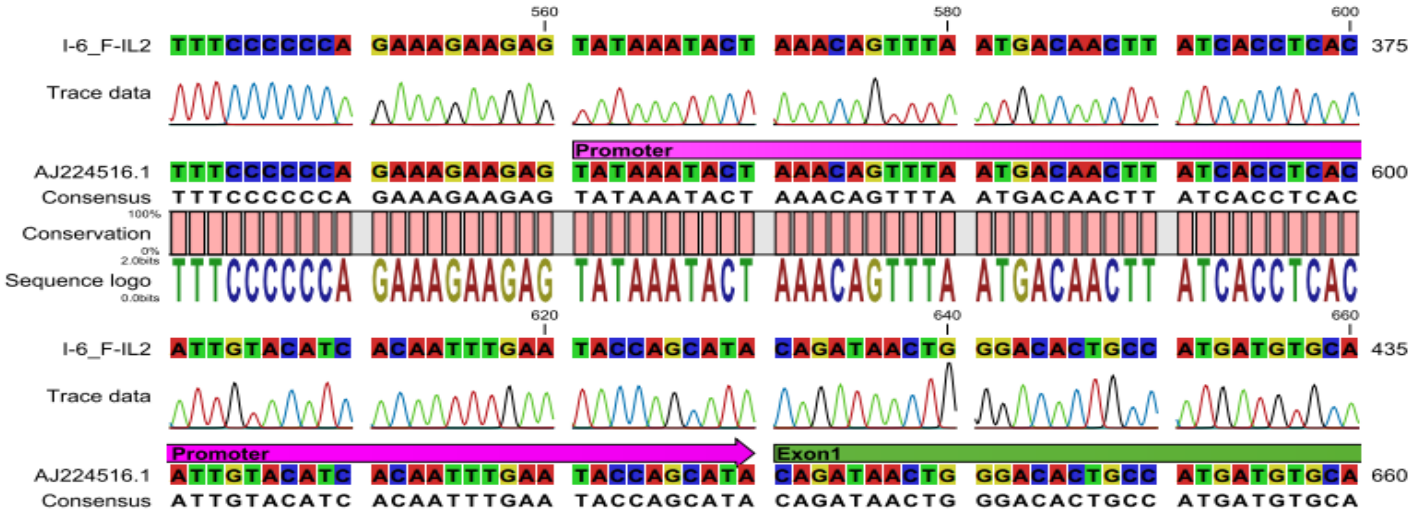
نوع	توالی نوکلئوتیدی	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (Ta)
رفت	5' GCAGGAGGACAAACATACACCAGTA 3'	۸۷۵	۶۴° C
برگشت	3' GGAAACCATCCTACCCTCACACTG 5'		

جدول ۲- جهش‌های موجود در قطعه توالی‌یابی شده ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان

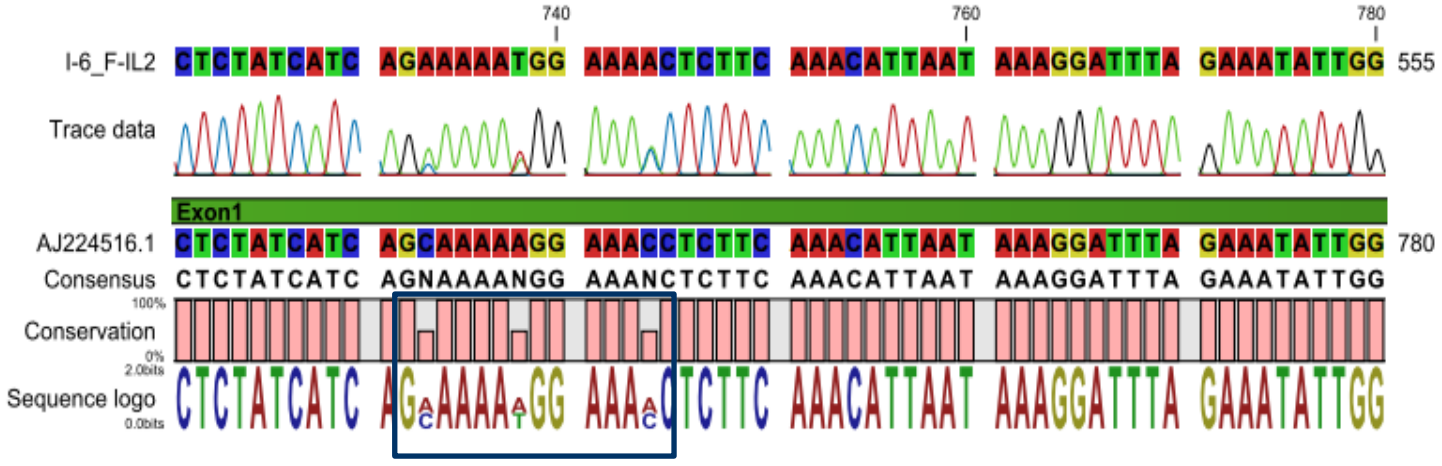
نوع جهش	محل تعیین نوکلئوتیدی	ناحیه ژنی
A/G	۸۲۰	اینترون یک
T/G	۸۴۰/۸۳۸	اینترون یک
A/C	۷۳۳	اگزون یک
T/A	۷۳۸	اگزون یک
A/C	۷۴۴	اگزون یک
T/C	۷۹۴	اگزون یک



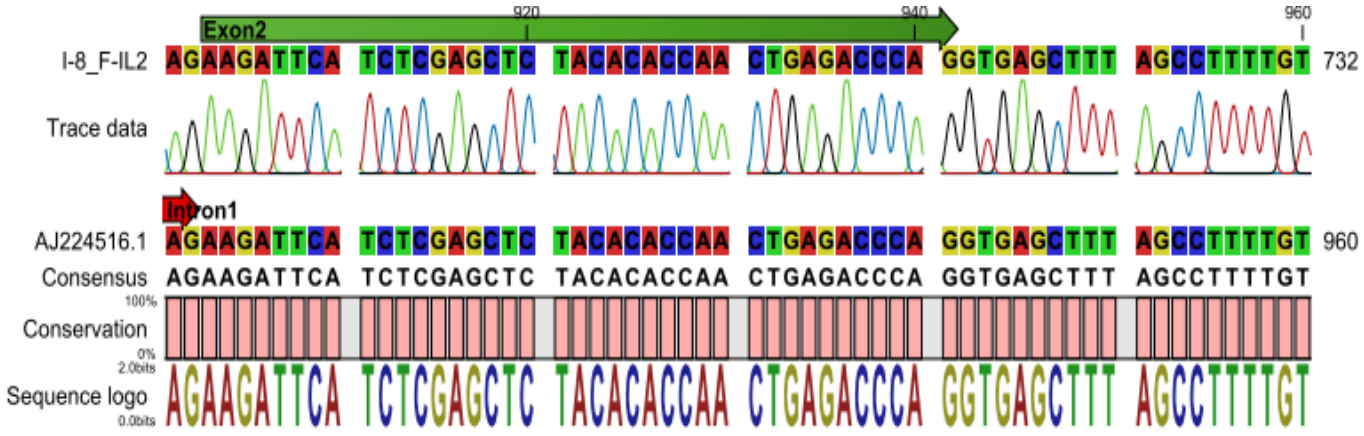
شکل ۱- الکتروفورز قطعه تکثیر شده ۸۷۵ جفت بازی ژن *IL-2*



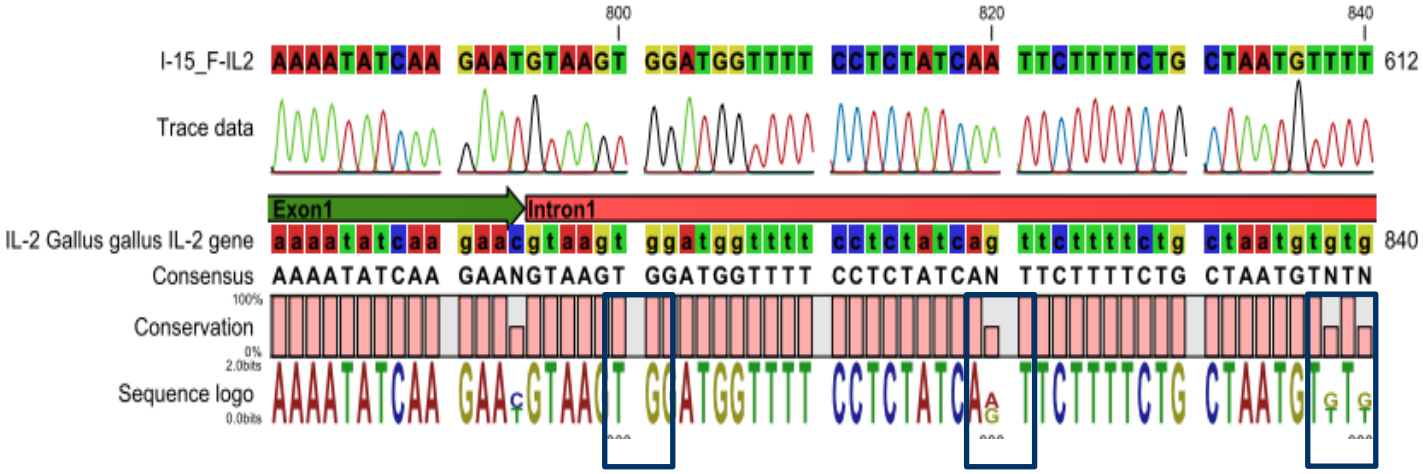
شکل ۲- مقایسه ناحیه پروموتر ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی مرجع



شکل ۳- مقایسه ناحیه اگزون ۱ ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی مرجع



شکل ٤- مقایسه ناحیه اگزون ۲ ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی مرجع



شکل ٥- مقایسه ناحیه اینترون ۱ ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی مرجع

(**a**)

actgccatgatgtgcaaagtactgatctttggctgtatttcggtagcaatgctaatgactacagcttatggagcatctct
---------ATGTGCAAAGTACTGATCTTCGCCTGCATTTCAGTAGCAATGCTTATGACTACAGCTTATGGAGCAACTCT

atcatcagcaaaa-aggaaacctcttcaaacattaataaaggatttagaaatattggaaaatatcaagaac
ACCGCCAAAAGAACAGGATAT-TCTTCCAACATTAATTTCGGACTTAGAATTACTGGAAAAGAGCAAGAAT

(**b**)

-aagattcatctcgagctctacacaccaactgagacccag-
TAAGATTCATCTCGAGCTCTACACACCAAGTGAGACCCAGG

شکل ٦- مقایسه ناحیه اگزون ۱ (a) و اگزون ۲ (b) ژن *IL-2* مرغ بومی خراسان با توالی mRNA **بلدرچین (توالی با حروف کوچک مربوط به مرغ بومی خراسان و حروف بزرگ مربوط به بلدرچین با شماره دسترسی** AY386204 **است)**

منابع

قاسمیان سوربنی، الف.، رحیمی میانجی، ق.، انصاری پیرسرایی، ز.، کاظمی، ح. و رضایی، م. (۱۳۹۱). شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی در ناحیه پروموتر ژن اینترلوکین-۲ در مرغ‌های مولد ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی مازندران. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، شهریور ۱۳۹۱.

نیکبختی، م.، میرزایی، ح.ر.، افشاریان شاندیز، م.، محمدآبادی، م.ر. و ساقی، د.ع. (۱۳۸۸). بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله پژوهشهای علوم دامی ایران. جلد (۱)، شماره (۲). صفحه: ۲۵-۱۹.

Amini, H., Hoseini, S.D., Nowroozi, J. and Shahbazzadeh, D. (2012). Cloning and sequencing of Iranian chicken interleukine-2 gene. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 5: 502-506.

Chen, W.T., Huang, W.Y., Chen, T., Salawu, E.O., Wang, D., Lee, Y.Z., Chang, Y.Y., Yang, L.W., Sue, S.C., Wang, X. and Yin, H.S. (2016). Structure and function of chicken interleukin-1 beta mutants: uncoupling of receptor binding and in vivobiological activity. *Scientific Reports*. 6: 27729.

Chorev, M., and Carmel, L. (2012). The Function of introns. *Frontiers in Genetics*. 3: 55.

Dijkstra, J.M., Takizawa, F. and Fischer, U. (2014). Identification of a gene for an ancient cytokine, interleukin 15-like, in mammals; interleukins 2 and 15 co-evolved with this third family member, all sharing binding motifs for IL-15Rα. *Immunogenetics*. 662: 93-103.

Estess, P., Nandi, A., Mohamadzadeh, M. and Siegelman, M.H. (1999). Interleukin 15 induces endothelial hyaluronan expression in vitro and promotes activated T cell extravasations through a CD44-dependent pathway in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 190: 9-19.

Griffin, D.K., Robertson, L.B., Tempest, H.G., Vignal, A., Fillon, V., Crooijmans, R.P.M.A., Groenen, M.A.M., Deryusheva, S., Gaginskaya, E., Carre, W., Waddington, D., Talbot, R., Volker, M., Masabanda, J.S. and Burt, D.W. (2008). Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. *BMC Genomics*. 9: 168.

Hall, T. (1999). A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.

Jaiswal, G., Kumar, S., Prasad, Y. and Singh, D.P. (2009). PCR-RFLP analysis of IL-2Rγ and IL-15Rα genes in kadakanath native chicken. *Journal of Applied Animal Research*. 36: 239-242.

Kaiser, P. and Mariani, P. (1999). Promoter sequence, exon:intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T-cell proliferative activity is IL2 and not IL15. *Immunogenetics*. 49: 26–35.

Kolodsick, J.E., Stepaniak, J.A., Hu, W. and Sundick, R.S. (2001). Mutational analysis of chicken interleukin 2. *Cytokine.*13: 317-324.

Kuby, J. (1997). Pages 326–328 in: Immunology. W. H. Freeman and Company, New York, NY.

Lamont, S.J. (1998). Impact of genetics on disease resistance. *Poultry Science*. 77: 1111-1118.

Miller, S.A., Dykes, D.D. and Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215.

Sundick, R.S. and Gill-Dixon, C. (1997). A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *The Journal of Immunology*. 159: 720-725.

Szmolka, A., Wiener, Z., Matulova, M.E., Varmuzova, K. and Rychlik, I. (2015). Gene expression profiles of chicken embryo fibroblasts in response to *Salmonella enteritidis* infection. *PLoS ONE*. 10: e0127708.

Tohidi, R., Idris, I., Malar Panandam, J. and Hair Bejo, M. (2012). The effects of polymorphisms in *IL*-2, *IFN*g, *TGF-β*2, *IgL*, *TLR*-4, *MD*-2, and *iNOS* genes on resistance to *Salmonella enteritidis* in indigenous chickens. *Avian Pathology*. 41: 605–612.

Van Hemert, S.V. (2007). Gene expression profiling of chicken intestinal host responses [PhD thesis]. Wageningen (Netherland): Wageningen University. ISBN 90-8504-581-9.

Wigley, P. and Kaiser, P. (2003). Avian cytokines in health and disease. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 5: 1-14.

Wong, G.K., Liu, B., Wang, J., Zhang, Y., Yang, X., Zhang, Z., Meng, Q., Zhou, J., Li, D., Zhang, J., et al. (2004). A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. *Nature*. 432: 717–722.

Zakarias, B., Ter Huurne, A.A.H.M., Landman, W.J.M., Rebel, J.M.J., Pol, J.M.A. and Gruys, E. (2002). Immunological basis of differences of disease resistance in the chicken. *Veterinary Research*. 33: 109-125.

Zhang, D.P., Zhao, H.J., Luo, Y.Z. and Han, J.L. (2011). Characterization of haplotype diversity defined by discontinuous insertions/deletions within the intron 2 of interleukin 2 in different domestic chicken populations. *Journal of Biological Sciences*. 11: 261-267.

Zhang, L., Li, P., Liu, R., Zheng, M., Sun, Y., Wu, D., et al. (2015). The identification of loci for immune traits in chickens using a genome-wide association study. *PLoS ONE*. 10: e0117269.

Zhou, H., Buitenhuis, A., Weigend, S. and Lamont, S. (2001). Candidate gene promoter polymorphisms and antibody response kinetics in chickens: interferon-gamma, interleukin-2, and immunoglobulin light chain. *Poultry Science*. 80: 1679-1689.