شناسایی چند شکلیهای آللی در جایگاه ژنی پروتئینMx در جمعیت های مختلف مرغ بومی با استفاده ازتکنیک PCR-RFLP

صدیقه ملک شاهدهی، سید حسن حافظیان، قدرت رحیمی میانجی و زربخت انصاری پیرسرائی

آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دام و آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

صدیقه ملک شاهدهی، s.malekshahdehi@gmail.com

چکیده

یکی از جدیدترین روش ها که می تواند باعث بهبود صحت پیش بینی و پاسخ به انتخاب شود، انتخاب بر اساس نشانگرهای مبتنی بر DNA است. ژن Mx دارای فعالیت آنتی ویروسی علیه خانواده ویروس های ارتومیکس از جمله ویروس آنفلوانزا می باشد. به منظور شناسایی چند شکلی های ژن Mx، ۱۰۰ قطعه مرغ به طور تصادفی از ایستگاه های گله مرغ بومی ساری و ارومیه انتخاب و استخراج دی ان ای به روش نمکی بهینه یافته انجام شد. با استفاده ازیک جفت پرایمراختصاصی قطعه ای به طول ۲۹۹ جفت باز شامل بخشی از اینترون و اگزون پایانی ژن Mx تکثیر وسپس تحت تیمار آنزیم برشی HPY8I قرار گرفت. در جمعیت مرغ های بومی ساری سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی های ۰/۴۸، ۰/۴۲۳ و ۰/۰۹۷ وفراوانی آلل مقاوم A و آلل حساس G به ترتیب به میزان ۰/۷ و ۰/۳و در مرغ های بومی ارومیه سه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی های ۰/۵۶، ۰/۳۲ و ۰/۱۲وفراوانی آلل مقاوم A و آلل حساسG به ترتیب به میزان ۰/۷۲ و ۰/۲۸برآورد شد. نتایج نشان می دهد به دلیل مشاهده چند شکلی در موقعیت ۶۳۱ پروتئین ژن Mx و نقش مهم آن در برابر مقاومت و یا حساسیت به بیماری آنفولانزا شاید بتوان در برنامه های اصلاح نژادی مرغان بومی از این جایگاه ژنی بهره گرفت.

کلمات کلیدی: مرغ بومی، ژن Mx، چند شکلی، PCR-RFLP

مقدمه

سیستم ایمنی نوعی سد دفاعی طبیعی در برابر هجوم اولیه بیماری های عفونی ازجمله باکتری ها، ویروس ها، قارچ ها و غیره می باشد. مهمترین سلول های سیستم ایمنی لنفوسیت ها می باشندکه به سلول های B و Tدسته‌بندی می شوند. لنفوسیت ها، ماکروفاژها و فیبروبلاست ها، اینترفرون تولید می کنند. اینترفرون ها پروتئین های کد شده به‌وسیله ی میزبان هستند که روند همانندسازی ویروس ها را مهار می کنند. عفونت های ویروسی یکی از عوامل قوی تولید اینترفرون می باشند. پروتئین های ژن Mx،GTP آز بوده که عامل تحریک کننده اینترفرون و فعالیت‌های آنتی ویروسی در سلول های پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها، در پاسخ به تحریک سیتوکین‌ها، بیان می شوند.پروتئین MxAانسانی می تواند از رونویسی ویروس آنفولانزا، ویروس آبسه های

مخاط دهانی[1] و چندین ویروس DNAیی دیگر جلوگیری کند. جایگاه ۶۳۱ پروتئین Mx طیور، تعیین کننده فعالیت آنتی ویروسی نسبت به ویروس های آنفلوانزا و آبسه های مخاط دهانی می باشد.مطالعات نشان می دهد اگر در جایگاه۶۳۱ ژن Mx کدون مربوط به اسید آمینه آسپاراژین جایگزین اسید آمینه سرین شود، فعالیت آنتی ویروسی افزایش و این جوجه ها نسبت به بیماری آنفلوانزا مقاومت بیشتری نشان می دهند (کو و همکاران،۲۰۰۴).این پژوهش به منظور شناسایی چند شکلی موجود در ژن Mx و برآورد وفور هر یک از آلل های مقاوم و حساس به بیماری آنفلوآنزا در این جایگاه ژنی در دو جمعیت مرغ بومی ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی ساری و ارومیه انجام گرفته است.

مواد وروش ها

در این پژوهش ۱۰۰ قطعه از مرغ ازایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی استان ساری و ارومیه انتخاب و خونگیری از سیاهرگ زیر بال انجام شد. نمونه های گرفته شده بلافاصله با حفظ شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته انجام و جهت تکثیر قطعه مورد نظر از یک جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱:توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای تکثیر ژن مورد نظر

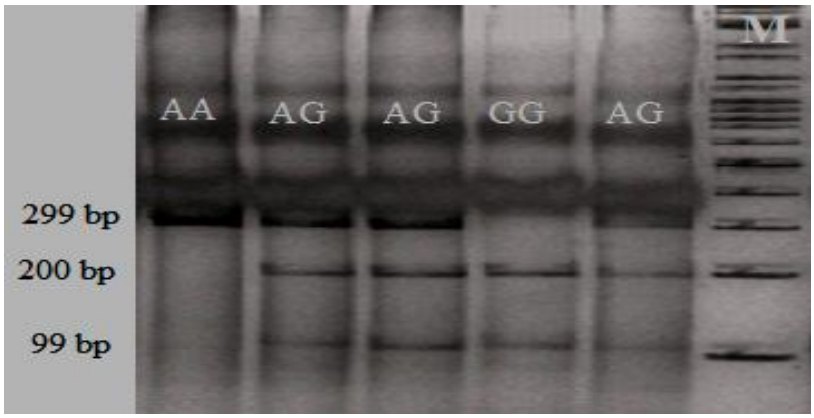
ژن	توالی آغازگر (۳'.....۵')	اندازه قطعه تکثیری
Mx	F: GCACTGTCACCTCTTAATAGA R: GTATTGGTAGGCTTTGTTGA	۲۹۹

برای تعیین چند شکلی ژن مورد نظر در این آزمایش از تکنیک PCR-RFLP و برای جداسازی آلل های مختلف از آنزیم اختصاصی Hpy8I استفاده شد. بعد از تیمار آنزیمی، وجود یک قطعه ۲۹۹ جفت بازی به دلیل عدم برش آنزیم ژنوتیپ هموزیگوتAA، وجود دو قطعه ۲۰۰ و ۹۹ جفت بازی ژنوتیپ هموزیگوتGG و برای ژنوتیپ هتروزیگوت AGسه قطعه ۲۹۹، ۲۰۰ و ۹۹ جفت بازی شناسایی شد.شناسایی ژنوتیپ ها از طریق مشاهده مستقیم باند ها روی ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ انجام شد.

نتایج وبحث

1-Vesicular Stomatitis Virus

در این پژوهش یک قطعه ۲۹۹ جفت بازی از ژن Mx توسط یک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر و سپس محصول PCR با استفاده از تیمار آنزیمیHpy8I مورد بررسی قرار گرفت (نگاره ۱).آنالیز نتایج نشان داد که فراوانی سه ژنوتیپ AA، AG و GGدر جمعیت مرغ های بومی ساری به ترتیب برابر با ۰/۴۸، ۰/۴۲۳ و ۰/۰۹۷،فراوانی آلل مقاوم A و آلل حساس G به ترتیب برابر با۰/۷ و ۰/۳ و در مرغ های بومی ارومیه نیزسه ژنوتیپ AA، AG و GG به ترتیب با فراوانی های ۰/۵۶ ، ۰/۳۲ و ۰/۱۲وآلل مقاوم A و آلل حساس G به ترتیب با فراوانی های۰/۷۲ و ۰/۲۸ شناسایی شد.



نگاره ۱ : ژنوتیپ های حاصل از تیمار آنزیمی جایگاه ژنی Mx: Mخط کش مولکولی SM0331

پژوهش های مختلف نشان داد پروتئین های Mx می توانند از همانندسازی انواع ویروس ها جلوگیری کنند (لی و همکاران،۲۰۰۲). تغییر در موقعیت نوکلوتیدی ۲۰۳۲ از ژن Mx (G بهA) سبب تبدیل اسید آمینه سرین به آسپاراژین و در نتیجه مقاومت طیور نسبت به بیماری های ویروسی از جمله آنفلوانزا افزایش می یابد. در پژوهش حاضرفراوانی آلل مقاوم در هر دو جمعیت مرغ بومی بسیار بیشتر از فراوانی آلل مستعد بوده است که با نتایج بالکیسون وهمکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. همچنین بیشترین فراوانی مربوط به ژنوتیپ مقاوم AA می باشد که با نتایج لی و همکاران (۲۰۰۶) که فراوانی آلل A را در نژادهای بومی۰/۷۲۴۱ تا ۰/۹۵۵۴ برآورد نموده بود، مطابقت دارد. طبق نتایج این پژوهش فراوانی ژنوتیپ AA که از مقاومت بیشتری برخوردار است، دارای فراوانی نسبتا بالایی می‌باشد که می توان احتمالا دلیل آن را به کار گیری استراتژی انتخاب برای صفات تولیدی در این جمعیت ها دانست.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش میزان مقاومت در برابر بیماری ویروسی آنفلوانزای طیور در مرغ های ایستگاه اصلاح نژاد مرغ بومی ساری و ارومیه مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق بالاترین وفور آلل یرای آلل مقاوم A در هر دو جمعیت مورد نظر برآورد شده است. با توجه به نقش این جایگاه ژنی در افزایش مقاومت و یا حساسیت به بیماری های ویروسی، در صورت انجام این تحقیق

در مقیاس بزرگتر شاید بتوان در برنامه های اصلاح نژاد مرتبط به مرغ های بومی کشوراز این جایگاه به عنوان نشانگر ژنتیکی موثر استفاده نمود.

منابع

1- Ko, JH,Takada A,Mitsuhashi T,Agui T and Watanabe T. 2004. Native antiviral specificity of chicken Mx protein depends on amino acid variation at position 631. Animal Genetics, 35: 119-122.
2- Li XY, QuLJ, Yao JF,Yang N. 2006. Skewed alleleof an Mx gene mutation with potential resistance to Avian Influenza Virus in Different Chicken Populations. Poultry Science, 85: 1327-1329.
3- Balkissoon D, StainesK, CauleyMc J, Wood J, Young J, Kaufman J. 2007. Low frequency of the Mx allele for viral resistance predates recent intensive selection in domestic chickens. Immunogenetics, 59: 687-691.

Detection of allelic polymorphisms of Mx protein gene in different populations of native fowls using PCR-RFLP technique

Sedigheh malekshahdehi, Seyed Hasan Hafezian, Ghodrat Rahimi Mianji, Zarbakht Ansari Pirsaraei

Laboratory for Molecular genetics and Animal Biotechnology, Faculty of Animal and Aquatic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

s.malekshahdehi@gmail.com

Abstract

One of the newest methods that can improve the selection response and accuracy of prediction is selection based on molecular DNA markers. Mx proteins have antiviral activity against orthomyxovirus infection such as influenza virus.In order to identify gene polymorphism, 100 chickens randomly were collected from Mazandaran and Oromie native fowls breeding station. DNA was extracted using modified salting out methodand a fragment with the length of 299 bp from the last intron and exon of the Mx gene was amplified by a specific primer pairs. The obtained PCR products were digested with restriction enzyme HPY8I. In Mazandarn native fowls population, there were three genotypes of AA, AG and GG with a frequency of 0/48, 0/423 and 0/097 and the frequencies of the resistant A and the sensitive G alleles were 0/7 and 0/3, respectively. In Oromie native fowls population, there were three genotypes of AA, AG and GG with a frequency of 0/56, 0/32, 0/12 and the frequencies of the A and the G alleleswere 0/72 and

0/28, respectively. It can be concluded that as a result of observed polymorphism at position 631 of the Mx protein gene which has an important role in the susceptibility or resistant to influenza infection probably this marker gene can be used in native fowls breeding program.

Keywords: Native fowls, Mx gene, polymorphism, PCR-RFLP