

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط چندشکلی در اگزون ۲ ژن MHC-DMB2 با پاسخ ایمنی همورال در بلدرچین ژاپنی

حسن چنانی<sup>۱</sup>، محمود نظری<sup>۲\*</sup>، محمدتقی بیگی نصیری<sup>۳</sup>، هدایت اله روشنفکر<sup>۳</sup>، علی آقای<sup>۲</sup>

۱- دانش‌آموخته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان  
۲- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان  
۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

(تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۲۳)

چکیده

ژن DMB2 یکی از ژن‌های خوشه MHC است که در پاسخ ایمنی همورال نقش ایفا می‌کند. این تحقیق جهت شناسایی چندشکلی ناحیه اگزون ۲ ژن MHC-DMB2 و ارتباط آن با پاسخ ایمنی همورال در بلدرچین ژاپنی انجام گرفت. بدین منظور در روز ۲۸ دوره پرورش، مقدار ۰/۲ میلی لیتر محلول پنج درصد گلبول قرمز خون گوسفندی (SRBC) به عضله سینه ۱۳۰ بلدرچین ژاپنی (۶۵ نر و ۶۵ ماده) تزریق شد و هفت روز بعد در روز ۳۵ دوره پرورش، خون‌گیری جهت تعیین تیترا آنتی‌بادی علیه SRBC انجام شد. DNA ژنومی از نمونه‌های خون استخراج شد و قطعه‌ای به اندازه ۳۳۳ جفت باز از این جایگاه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر شده و محصولات PCR به وسیله آنزیم برشی Hinf I هضم شدند. نتایج حاصل حاکی از وجود دو نوع آلل C (۳۳۳ جفت بازی) و آلل G (۲۲۶ و ۱۰۷ جفت بازی) در این جایگاه بود که فراوانی آن‌ها در کل جمعیت به ترتیب ۷۴/۶ و ۲۵/۴ درصد محاسبه شد. نتایج نشان‌دهنده وجود چندشکلی و میزان هموزیگوسیتی بالا در جمعیت مورد مطالعه است. به علاوه، نتایج نشان داد که ژنوتیپ اثر معنی‌داری بر تیترا آنتی‌بادی دارد ( $P < 0.01$ ). ژنوتیپ CC بیشترین (۲/۱۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و ژنوتیپ GG کمترین تیترا آنتی‌بادی کل (۰/۳۳ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) را نشان داد. پیشنهاد می‌شود آثار منفی این چندشکلی تک نوکلئوتیدی در برنامه‌های اصلاح نژادی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: ایمنی همورال، بلدرچین ژاپنی، چندشکلی، ژن DMB2، PCR-RFLP

\* نویسنده مسئول: M.nazari@asnrukh.ac.ir

## مقدمه

DNA با وزن مولکولی بالا از اسپرم ۱۴ لاین جوجه‌های پرورشی استخراج شد که با هر کدام از آنزیم‌های محدودکننده هضم شد و کمپلکس اصلی سازگاری بافتی جوجه، هیبریداسیون شد. پرندگان هاپلو تیپ B همیشه الگوی RFLP مشابه را نشان می‌دادند. برای آزمایش توارث مندلی در الگوهای RFLP نسل F<sub>2</sub> با استفاده از نشانگر مولکولی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در نهایت، چندشکلی در ژن MHC جوجه گوشتی گزارش شد (Warner *et al.*, 1989). سپس محققین، چندشکلی در MHC کلاس‌های II و IV را با استفاده از تکنیک RFLP در مرغ مورد بررسی قرار دادند. در این آزمایش از آنزیم برشی Sac I استفاده شد. MHC کلاس II، چهار باند نشان داد، در صورتی که MHC کلاس IV، ۱۸ باند را نشان داد (Weigend and Lamont, 1999). در تحقیقی، چندشکلی در MHC بلدرچین ژاپنی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و با استفاده از هفت لاین بلدرچین مورد بررسی قرار گرفت و از آنزیم برشی PvuII استفاده شد. این محققین، ۱۶ الگوی مختلف شناسایی نمودند. الگوی شناسایی شده بین گونه‌های مختلف متفاوت بود. نتایج نشان داد که ژن MHC کلاس II در بلدرچین ژاپنی چندشکلی بالایی دارند (Ye *et al.*, 1999). محققین همچنین ساختار ژنومی قسمت‌های مختلف منطقه MHC را به طول ۱۸۰ کیلوباز در مرغ و بلدرچین تجزیه و با هم مقایسه نمودند. ژن‌های مهم MHC کلاس II شامل DMA، DMB1، DMB2 و تاپاسین بودند. یکی از قسمت‌های مهم این منطقه، DMB2 بود که شامل شش آگزون بود که جزء خانواده MHC کلاس II طبقه‌بندی شد (Shiina *et al.*, 2004). در نهایت در تحقیقی، چندشکلی در منطقه بزرگی از MHC بلدرچین و مرغ مورد بررسی قرار گرفت و تنوع ژنی MHC از نظر ساختاری و جهش‌های نوکلئوتیدی بین بلدرچین و مرغ بررسی شد. نتایج نشان داد که ژن DMB2 دارای جهش تک نوکلئوتیدی است و می‌توان آن را با استفاده از آنزیم‌های برشی Hinf I و Dra III شناسایی کرد. در تحقیق مذکور و در هنگام استفاده از آنزیم برشی Hinf I، دو نوع آلل C و G گزارش شدند (Hosomichi *et al.*, 2005). محققین نشان دادند که در پرندگان، ژن DMB2 بیشتر از سایر ژن‌های کلاس II بیان می‌شود و نقش مهم‌تری دارد (Parker and Kaufman, 2017).

نقش کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) در کنترل بسیاری از بیماری‌ها (باکتریایی، ویروسی و انگلی) و بهبود بسیاری از صفات تولیدی و تولیدمثلی مشخص شده است (Hunt *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2010). MHC یک خوشه ژنی سازمان یافته با عملکرد ایمنولوژیکی و غیرایمنولوژیکی است. تمام مهره‌داران از ماهیان غضروفی تا پستانداران (به استثنای ماهیان فاقد آرواره) دارای ژن‌های MHC هستند. در واقع ژن‌های خوشه MHC مکان ژنی کدکننده آنتی‌ژن‌ها و پروتئین‌های سطحی لنفوسیت‌هایی است که در واکنش‌های دفاعی بدن و شناسایی پروتئین‌های خارجی دخالت دارند. ژن‌های MHC دو دسته اصلی گلیکوپروتئین‌های سطح سلولی کلاس I و II را کد می‌کنند که مسئول تحویل دادن پپتیدهای خودی و غیرخودی به لنفوسیت T هستند. مولکول‌های MHC کلاس I، پپتیدهای داخل سلولی را به سلول‌های T کشنده نوع CD8، ولی MHC کلاس II، پپتیدهای خارج سلولی را به لنفوسیت‌های کمکی نوع CD4 تحویل می‌دهد (Miller and Taylor, 2016).

تنوع بالای MHC در جمعیت‌ها، قابلیت سیستم ایمنی در پاسخ به پاتوژن‌ها را افزایش می‌دهد (Sommer, 2005). امروزه MHC به عنوان یک نشانگر مهم برای تحلیل‌های متمرکز در طیور، جهت انتخاب جمعیت‌های مقاوم به بیماری‌ها با ویژگی‌های پرورشی موثر مورد توجه قرار گرفته است (Ewald *et al.*, 2007). یکی از ژن‌های شناسایی شده در خوشه MHC بلدرچین، ژن DMB2 است که جزء خانواده MHC کلاس II است. DMB2 بین ژن DMB1 و DMA1 قرار گرفته است (Chazara *et al.*, 2011). DMB2 در پردازش آنتی ژن و بارگذاری پپتید دخالت دارد (Afrache *et al.*, 2020). DMB2 در طیور به‌طور گسترده در سطح بالایی بیان می‌شود، در حالی که DMB1 تنها در کبد و روده در سطح بالایی بیان می‌شود (Parker and Kaufman, 2017).

تحقیقات زیادی نشان داده است که قسمت‌های مختلف خوشه MHC دارای چندشکلی بالایی است (Chazara *et al.*, 2011; Afrache *et al.*, 2020). اولین تحقیقات در ارتباط با چندشکلی در MHC کلاس I پرندگان در جوجه‌های گوشتی انجام شده است. در پژوهش مذکور،

DMB2 و بررسی اثر آن بر پاسخ ایمنی همورال در بلدرچین ژاپنی اجرا شد.

### مواد و روش‌ها

تزریق محلول *SRBC* به بلدرچین‌ها: جهت انجام این آزمایش، ۱۳۰ جوجه بلدرچین ژاپنی (۶۵ نر و ۶۵ ماده) به مدت ۳۵ روز روی بستر پرورش داده شدند. در روز ۲۸ دوره پرورش، مقدار ۰/۲ میلی لیتر محلول پنج درصد *SRBC* به عضله سینه همه بلدرچین‌ها تزریق شد و هفت روز بعد در روز ۳۵ دوره پرورش، خون‌گیری جهت استخراج DNA و تعیین تیتراژ آنتی‌بادی علیه *SRBC* انجام شد (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸).

استخراج DNA و انجام واکنش *PCR* DNA نمونه‌های خون با استفاده از کیت *DIAtom DNA PREP* محصول شرکت *BIOKOM* مسکو استخراج شد. کیفیت DNA ژنومی استخراج شده با روش طیف‌سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ و کیفیت آن با الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تعیین شد. پس از استخراج DNA، یک قطعه ۳۳۳ جفت بازی با کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) و به وسیله تکنیک *PCR* تکثیر شد (Hosomichi et al., 2005).

واکنش *PCR* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۸/۵ میکرولیتر آب استریل و پرایمر رفت به مقدار یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول)، پرایمر برگشت به مقدار یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول) و دو میکرولیتر از نمونه DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. برنامه حرارتی و دوره‌های زمانی بهینه شده در شرایط آزمایشگاهی برای تکثیر جایگاه مورد مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. تعداد سیکل‌های انجام واکنش *PCR*، ۳۰ سیکل در نظر گرفته شد.

مطالعات زیادی در مورد چندشکلی در قسمت‌های مختلف *MHC* و ارتباط آن با تولید و ایمنی انجام گرفته است (Afrache et al., 2020). مطالعات مختلف نشان داده است که چندشکلی در قسمت‌های مختلف *MHC* بر تولید و ایمنی اثرگذار است (Liu et al., 2009). بعضی از این چندشکلی‌ها دارای آثار مثبت بر تولید و ایمنی هستند و به عنوان ژن کاندیدا معرفی شده‌اند (محمدآبادی و سولیمووا، ۱۳۸۳; Nikbakht and Esmailnejad, 2015; Liu et al., 2009)، و برخی از این چندشکلی‌ها دارای آثار منفی بر پاسخ ایمنی همورال هستند و سبب کاهش ایمنی می‌شوند (الکار اوقلو و همکاران، ۱۳۹۷). اگر جهش‌ها آثار مثبتی داشته باشند از این جایگاه‌ها می‌توان به عنوان نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت افزایش مقاومت به بیماری‌ها استفاده نمود. انتخاب افراد حامل این جهش‌ها سبب پیشرفت ژنتیکی خواهد شد. اگر این جهش‌ها آثار منفی داشته باشند، در هنگام اصلاح نژاد بر مبنای شاخص ژنتیکی، باید این موضوع لحاظ شود. اگر جهش‌ها دارای آثار منفی بر صفات تولیدی و ایمنی باشند با اجرای برنامه‌های اصلاح‌نژادی مناسب مثل انتخاب و یا حذف افراد حامل این جهش می‌توان انتظار داشت پس از چند نسل، این جهش از جمعیت حذف شود. تحقیقات نشان داده است که ژن *DMB2* در بلدرچین دارای چندشکلی است، ولی تاکنون در خصوص ارتباط میان چندشکلی در ژن *MHC-DMB2* و آثار مثبت یا منفی آن بر صفت ایمنی در بلدرچین تحقیقی صورت نگرفته است. با توجه به اینکه ژن *DMB2* یکی از ژن‌های مهم و موثر خوشه *MHC* کلاس II بوده و بیشتر از بقیه ژن‌های کلاس II در طیور بیان می‌شود و نقش مهمی در ایمنی ایفا می‌کند، این آزمایش جهت تعیین چندشکلی در ژن

جدول ۱- توالی و خصوصیات پرایمر استفاده شده در این مطالعه

Table 1. The sequence and characteristics of the primer used in this study

Name	Primer sequence 5' → 3'	Annealing temperature (°C)	Product size (base pair)
MHC-DMB2	F: 5'-GGAGTGCATCCCCATTGCT-3' R: 5'-GCTCACTCTTGCGCAGTGC-3'	62	333

جدول ۲- دستورالعمل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز  
Table 2. Polymerase chain reaction protocol

Number of cycles	Temperature (°C)	Time	Description
1	95	5 min	Primary Denaturation
30	95	45 s	Denaturation
	62	60 s	Annealing
	70	45 s	Extension
1	72	10 min	Final extension

ساعت، ۵۰ میکرولیتر PBS به بقیه چاهک‌ها اضافه شده و سپس رقت‌های ۱/۲-۱/۴۹۶ میکرولیتر تهیه شد. پس از تهیه این رقت‌ها، ۲۵ میکرولیتر محلول SRBC یک درصد به هر چاهک اضافه شد. پلت به مدت ۳۰ دقیقه دیگر انکوبه شده و پس از آن، شماره اولین چاهک لیز شده یادداشت شد. تیتراها بر اساس  $\log_2$  به عنوان بیشترین رقتی که آگلوتیناسیون کامل را نشان می‌دهد بیان شد (Grasman, 2010)

تجزیه و تحلیل آماری: جهت بررسی ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژن MHC-DMB2 با صفت ایمنی همورال از مدل ثابت خطی و رویه GLM نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + SX_i + G_j + e_{ij}$$

که،  $Y_{ij}$  مقدار مشاهده برای ایمنی همورال،  $\mu$  میانگین کل،  $SX_i$  اثر زمین جنسیت ( $i = 1$  برای نر و  $2$  برای ماده)،  $G_j$  اثر زمین ژنوتیپ ( $j = 1, 2, 3$ ) و  $e_{ij}$  خطای باقیمانده است. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد.

### نتایج و بحث

با توجه به اینکه در تحقیقات مختلف، ارتباط چندشکلی آگزون ۲ ژن MHC با صفات تولیدی در حیوانات و پرندگان مختلف به عنوان مهم‌ترین پاسخ برای مقابله با بیماری‌های عفونی بررسی شده است، در این تحقیق به بررسی ارتباط چندشکلی در این ژن و تیترا آنتی‌بادی کل در بلدرچین ژاپنی پرداختیم. برای تعیین کیفیت DNA حاصل از ژل آگارز یک درصد استفاده شد. وجود باندهای کاملاً تمیز و بدون کمترین کشیدگی حاکی از بهترین کیفیت است. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نمونه‌های استخراج شده از خون تنها یک باند واضح را

برش آنزیمی: قطعات ۳۳۳ جفت بازی ناحیه آگزون ۲ ژن MHC-DMB2 به وسیله آنزیم اندونوکلاز Hinf I با سرعت هضم سریع (Thermofisher, ER0801) هضم شدند. واکنش هضم آنزیمی در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر حاوی ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر، یک میکرولیتر بافر هضمی، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Hinf I و پنج میکرولیتر محصول PCR آماده شد. مراحل هضم آنزیمی بدین شرح بود: ابتدا انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و سپس با قراردادن نمونه در بن‌ماری در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه.

بعد از هضم، محصولات برش داده شده با استفاده از ژل آگارز دو درصد، الکتروفورز شدند. مقدار پنج میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر بافر بارگذاری به خوبی مخلوط شده و در چاهک‌ها ریخته شد. الکتروفورز محصولات PCR به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۱۰ ولت انجام شد. در نهایت برای مشاهده باندها، از دستگاه ژل داک استفاده شد. پس از اتمام کارهای آزمایشگاهی و تعیین ژنوتیپ تمام نمونه‌ها، کلیه داده‌ها به وسیله برنامه اکسل مرتب شدند، سپس وارد نرم‌افزار GENALEX 6.3 شده و سپس فراوانی آلی، ژنوتیپی و وجود تعادل هاردی وینبرگ مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه SRBC: برای اندازه‌گیری تیترا آنتی‌بادی علیه SRBC در سرم حاصله، از روش سنجش مستقیم هم‌آگلوتیناسیون استفاده شد. ابتدا ۵۰ میکرولیتر سرم به داخل اولین چاهک پلت ۹۶ تایی الایزا اضافه شده و پلت در داخل انکوباتور در دمای ۵۶ درجه سلسیوس برای مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. پس از نیم ساعت، ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) به چاهک اول اضافه شد و در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. پس از نیم

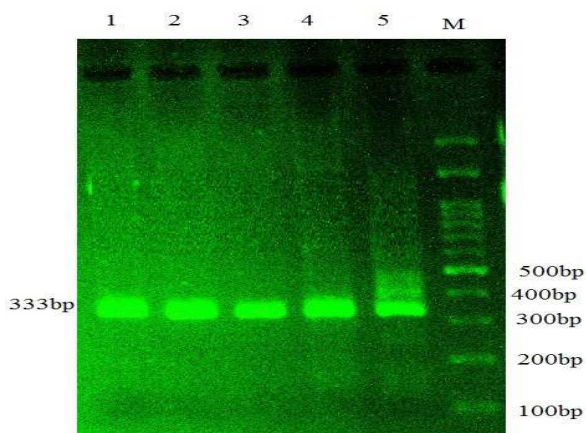


Fig. 2. Amplified product of 333 bp of MHC-DMB2 in Japanese quail loaded on 2% agarose gel. M: Molecular marker 100 bp (From top to bottom, respectively, include bands of size 3000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 and 100)

شکل ۲- محصول PCR تکثیر شده ۳۳۳ جفت بازی اگزون ۲ ژن MHC-DMB2 بارگذاری شده روی ژل آگارز دو درصد. چاهک M: نشانگر مولکولی ۱۰۰bp (به ترتیب از بالا به پایین شامل باندهای با اندازه ۳۰۰۰، ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۹۰۰، ۸۰۰، ۷۰۰، ۶۰۰، ۵۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰)

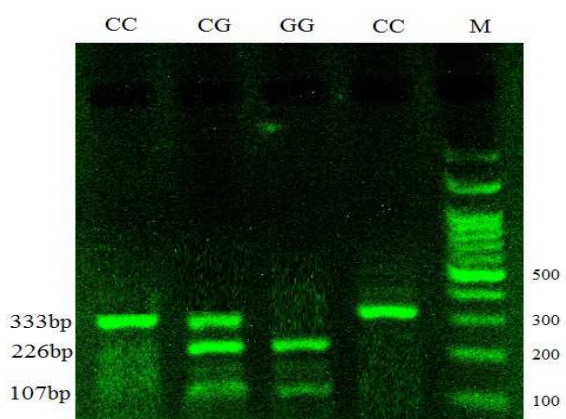


Fig. 3. PCR-RFLP patterns of the MHC-DMB2 gene in Japanese quail digested by Hinf I enzyme  
شکل ۳- الگوهای RFLP حاصل از هضم محصولات PCR ژن MHC-DMB2 به وسیله آنزیم برشی Hinf I

در تعداد زیادی از گزارشات، چندشکلی در ژنهای منطقه MHC در گاو (محمدآبادی و سولیمووا، ۱۳۸۳، نیکبخت بروجنی و همکاران، ۱۳۹۱)، گاو میش (رحیم نهال و همکاران، ۱۳۹۱)، گوسفند (اشرفی و همکاران، ۱۳۹۱)، بز (محمدآبادی و دست افکن، ۱۳۹۱)، مرغ (Afanassieff, Nikbakht and Esmailnejad, 2015; and Goto, 2001

نشان می‌دهد. الکتروفورز محصولات تکثیر شده ژن MHC-DMB2 روی ژل آگارز دو درصد نشان داد که قطعه ۳۳۳ جفت‌بازی به خوبی و بدون هیچ‌گونه باند غیراختصاصی تکثیر شد (شکل ۲). وجود یک نوار روی ژل آگارز نشان می‌دهد که پرایمرهای استفاده شده دارای یک قطعه هدف روی DNA بودند.

در روش RFLP، ابتدا قطعه حاوی جایگاه چندشکلی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و استفاده از پرایمر مخصوص (که به همین منظور طراحی شده) تکثیر شده و پس از هضم آنزیمی، الکتروفورز می‌شود. بعد از تکثیر قطعه مورد نظر، جهت تعیین چندشکلی این ژن از روش هضم آنزیمی با آنزیم Hinf I استفاده شد. نمونه‌ای از تصاویر الگوهای حاصل از برش آنزیمی Hinf I در شکل ۳ ارائه شده است. نتایج حاصل حاکی از وجود دو نوع آلل C و G در این جایگاه بود که فراوانی آن‌ها در کل جمعیت به ترتیب ۷۴/۶ و ۲۵/۴ درصد محاسبه شد. تعداد سه ترکیب ژنوتیپی CC، CG و GG شناسایی شدند که فراوانی ژنوتیپی محاسبه شده آن‌ها در جمعیت به ترتیب برابر با ۶۲/۳۲، ۲۴/۶۱ و ۱۳/۰۷ درصد بودند (شکل ۳). آلل C و ژنوتیپ CC دارای بیشترین فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی بودند. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات دیگر روی بلدرچین ژاپنی هم-خوانی دارد (Hosomichi *et al.*, 2005). میزان فراوانی آلل C در جایگاه اگزون ۲ ژن MHC-DMB2، ۶۲/۰۶ و فراوانی آلل G برابر با ۳۸/۰۴ گزارش شده است (Hosomichi *et al.*, 2005)، که با نتایج این تحقیق یعنی ۷۴/۶ و ۲۵/۴ هم-خوانی دارد.

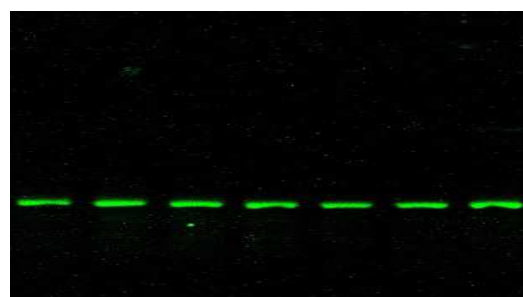


Fig. 1. DNA extracted from blood samples of Japanese quail  
شکل ۱- DNA استخراج شده از نمونه خون بلدرچین ژاپنی

جدول ۳ ارائه شده است. هتروزیگوسیتی مشاهده شده (تنوع ژنی) برای جایگاه اگزون ۲ ژن DMB2 در جمعیت بلدرچین ژاپنی برابر با ۰/۲۴ و اندازه موثر آلی هم به میزان ۱/۶۱ محاسبه شد. محققین دیگر نیز تنوع ژنی را برای بلدرچین ژاپنی پرورش یافته در شرایط ایران، کم گزارش کردند (لوچ ملکی و همکاران، ۱۳۹۶). شاخص شانون برای این جایگاه برابر با ۰/۵۶ بود (جدول ۳)، که تنوع اندک این جایگاه در جمعیت بلدرچین ژاپنی را تایید می‌کند. در تحقیقی که چندشکلی هورمون رشد در بلدرچین ژاپنی را بررسی نمود، شاخص شانون را به میزان ۰/۵۶ (Nasirifar *et al.*, 2018) و در تحقیق دیگری که چندشکلی اگزون ۲ ژن پرولاکتین را مطالعه می‌کردند شاخص شانون را برابر با ۰/۲۳ گزارش نمودند (لوچ ملکی و همکاران، ۱۳۹۶). همه این نتایج نشان‌دهنده تنوع کم جمعیت بلدرچین ژاپنی است و نتایج این تحقیق را تایید می‌کند.

به منظور بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در یک جمعیت روش‌های مختلفی وجود دارد که در این تحقیق از روش آزمون کای مربع استفاده شد. آزمون کای مربع انجام شده عدم برقراری تعادل هاردی-واینبرگ را نشان داد. مقدار کای مربع برابر ۱۵/۹۴۲ محاسبه شد که در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۴).

پیش جنگ آقاجری و همکاران، ۱۳۹۸) و بوقلمون (آلکار اوقلو و همکاران، ۱۳۹۷) به اثبات رسیده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که تکنیک PCR-RFLP برای مطالعه چندشکلی اگزون ۲ ژن DMB2 مناسب است. چندین مطالعه جهت بررسی چندشکلی در ژن‌های گیرنده پرولاکتین (لوچ ملکی و همکاران، ۱۳۹۶)، هورمون رشد (Nasirifar *et al.*, 2018) و آپولیپوپروتئین (محمدی ساردو و همکاران، ۱۳۹۱) در جمعیت بلدرچین ژاپنی پرورش یافته در ایران با استفاده از تکنیک RFLP انجام شده است که نتایج این مطالعات، وجود چندشکلی در این ژن‌ها را نشان داده است.

در شکل ۴ محل اتصال پرایمرها و جایگاه برش Hinf I ارائه شده است. انتظار داریم آنزیم Hinf I با شکست پیوند بین سیتوزین و آدنین در توالی پنج نوکلئوتیدی CANTC (در نوکلئوتید ۲۲۶ از قطعه ۳۳۳ جفت بازی) سبب شکستن قطعه ۳۳۳ جفت بازی به دو قطعه ۲۲۶ و ۱۰۷ جفت بازی شود (Hosomichi *et al.*, 2005). این جهش تک نوکلئوتیدی (تبدیل سیتوزین به گوانین) در جایگاه ۳۶۱ این ژن (G>C) باعث تبدیل اسید آمینه ترئونین به آرژنین در موقعیت ۸۳ پروتئین DMB2 بلدرچین ژاپنی می‌شود.

تنوع درون جمعیتی با تعیین شاخص‌هایی همچون هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، شاخص شانون و شاخص تثبیت (F) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج محاسبه شده برای هر شاخص در

### Primer forward

```
GGAGTGCATCCCCATTGCTGTGCCCACCCCGTGCCCCAA
ATACAGGCGCCTTCGTGTTGCACATGGCCAGCTCCTGCC
CGCTGCTGGCCAATGGCTCCCTGGGGGGCTATGAGTTCA
CCGTGGCCTTCAACAAGAACCCTGCTGTGCTACGACC
CCGATGTCCAGCGCTTCATTGCCTGCGATTGGGGGCTGC
TGCATGAGTTTGCCATTTTTCTGGCTGCTACAATCAATG
ATTACACCACCTTGGTGCAGCGTGCAGAGGCGCGGAGAC
AGGCGTGACCGAGCTGGCTACACAGTTCTGGACACACA
CAGCACTGCGCAAGAGTGAGC
```

Restriction Site  
for Hinf I  
enzyme

### primer reverse

Fig. 4. Nucleotide sequence of exon 2 of the MHC-DMB2 gene. Primer complementary regions are indicated in bold type while the Hinf I sites are highlighted

شکل ۴- توالی نوکلئوتیدی اگزون ۲ ژن MHC-DMB2. محل اتصال پرایمرها به صورت برجسته و جایگاه برش Hinf I به صورت هایلایت شده روی شکل مشخص شده است



جدول ۳- تنوع درون جمعیتی برای ژن DMB2 در بلدرچین ژاپنی

Table 3. Intra-population diversity for the MHC-DMB2 gene in Japanese quail

Location	Observed number of alleles (Na)	Effective number of alleles (Ne)	Expected heterozygosity (He)	Observed heterozygosity (Ho)	Shannon's Information Index (I)	Fixation Index (F)
MHC-DMB2	2	1.61	0.379	0.246	0.56	0.35

دو آلل سیتوزین و تبدیل شدن آن‌ها به گوانین به شدت ایمنی همورال را کاهش داد، به طوری که تیترا آنتی‌بادی کل از ۲/۱۳ در ژنوتیپ CC به ۰/۳۳ در ژنوتیپ GG رسید.

مطالعات زیادی در مورد چندشکلی در قسمت‌های مختلف MHC و ارتباط آن با تولید و ایمنی انجام گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده است که چندشکلی در قسمت‌های مختلف MHC بر تولید و ایمنی اثرگذار است. برخی از این جهش‌ها آثار مثبتی بر عملکرد و ایمنی داشته‌اند و برخی هم آثار منفی داشته‌اند. در تحقیقی نشان داده شد که میان چندشکلی در ژن MHC و مقاومت به بیماری مارک در مرغ ارتباط وجود دارد (Vallejo *et al.*, 1997). در مطالعه‌ای، ارتباط چندشکلی بین آلل‌های MHC و صفات تولیدی مرغ بومی خراسان بررسی شد و گزارش نمودند که ارتباط معنی‌داری بین آلل‌های MHC و صفات تولیدی مانند وزن بلوغ جنسی، وزن بدن و وزن تخم مرغ وجود داد (Nikbakht and Esmailnejad, 2015). در تحقیقات متعددی، رابطه بین چندشکلی ژن DRB3 و لکوز، تب برفکی و ورم پستان مورد بررسی قرار گرفته است (Garcia-Briones *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2009). نتایج نشان داده که بعضی از آلل‌های مشاهده شده مقاومت بیشتری در مقابل بیماری‌های لکوز، تب برفکی و ورم پستان دارند. لذا پیشنهاد شده است که از این آلل‌ها جهت انتخاب دام‌های مقاوم استفاده شود و در برنامه‌های اصلاح نژادی مورد توجه قرار گیرند (نیکبخت بروجنی و همکاران، ۱۳۹۱). در مطالعه‌ای، چندشکلی در جایگاه‌های مختلف MHC مرغ‌های تجاری گوشتی و تخم‌گذار با استفاده از تکنیک RFLP مورد تایید قرار گرفت و نتایج نشان داد که از این جایگاه‌ها می‌توان به عنوان نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی جهت افزایش مقاومت به بیماری‌ها استفاده نمود (پیش جنگ آقاجری و همکاران، ۱۳۹۸).

عدم تعادل در گله نشان‌دهنده حضور بعضی عوامل برهم زننده تعادل از جمله انتخاب و مهاجرت است. عدم تعادل در جمعیت بلدرچین به وسیله محققین ایرانی دیگر نیز گزارش شده است (لوچ ملکی و همکاران، ۱۳۹۶; Nasirifar *et al.*, 2018). با توجه به اینکه پرندگان مورد مطالعه از مراکز پرورشی خریداری شده‌اند و در این مراکز، یک سیستم بسته اصلاح نژادی صورت می‌گیرد، عدم تعادل هاردی-واینبرگ دور از ذهن نیست.

جدول ۴- مقایسه میانگین تیترا آنتی‌بادی کل برای ژنوتیپ‌های مختلف

Table 4. Means comparison of total antibody titer (mg/dL) for different genotypes

Genotype	Mean $\pm$ Standard deviation
CC	2.13 <sup>a</sup> $\pm$ 0.09
CG	0.84 <sup>b</sup> $\pm$ 0.15
GG	0.33 <sup>c</sup> $\pm$ 0.21

ارتباط الگوهای ژنوتیپی جایگاه ژن MHC-DMB2 با صفت تیترا آنتی‌بادی کل (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) بررسی شد. نتایج بررسی آثار عوامل ثابت موجود در مدل نشان داد که عوامل ثابت اثر معنی‌داری بر تیترا آنتی‌بادی کل دارند. تاثیر جنس بر تیترا آنتی‌بادی کل معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). مطابق با این نتایج، در تحقیقی که به مطالعه پیش‌بینی پاسخ ایمنی همورال بر علیه SRBC در بلدرچین ژاپنی پرداخته بود نشان داده شد که اثر جنس (نر و ماده) بر پاسخ ایمنی همورال معنی‌دار نیست (اصغری اسفدن و همکاران، ۱۳۹۵). اثر ژنوتیپ بر تیترا آنتی‌بادی معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین تیترا آنتی‌بادی کل مربوط به ژنوتیپ CC (۲/۱۳) و کمترین تیترا آنتی‌بادی کل مربوط به ژنوتیپ GG (۰/۳۳) بود (جدول ۴).

به نظر می‌رسد وقوع جهش در جایگاه سیتوزین و تبدیل شدن آن به گوانین در اگزون ۲ ژن MHC-DMB2 مطلوب نیست و سبب کاهش ایمنی همورال می‌شود. جهش در هر

را در بلدرچین گزارش می‌کند. با توجه به اینکه جهش در اگزون ۲ ژن MHC-DMB2 بلدرچین ژاپنی سبب کاهش ایمنی همورال شده است پیشنهاد می‌شود هنگام اجرای برنامه‌های اصلاح نژادی، این ارتباط منفی در نظر گرفته شود. همچنین پیشنهاد می‌شود آزمایش دیگری جهت بررسی ارتباط این جهش با صفات تولیدی انجام شود.

### تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل تامین بودجه این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

مطابق با نتایج این تحقیق، در بررسی تنوع ژنتیکی MHC و ارتباط آن با پاسخ ایمنی همورال در بوقلمون نشان داده شد که سه آلل شناسایی شده در MHC بوقلمون سبب کاهش پاسخ ایمنی همورال می‌شود. در نتیجه، محققین پیشنهاد نمودند به دلیل این ارتباط منفی، در هنگام اصلاح نژاد بر مبنای شاخص ژنتیکی، باید این موضوع لحاظ شود (الکار اوقلو و همکاران، ۱۳۹۷).

### نتیجه‌گیری کلی

تاکنون گزارشی در خصوص ارتباط چندشکلی در ژن MHC-DMB2 و صفات ایمنی در بلدرچین ژاپنی مشاهده نشده است و این مطالعه اولین گزارشی است که این ارتباط

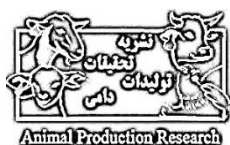
### فهرست منابع

- اشرفی ف، هاشمی ع، مردانی ک، و خاکپور ک. ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی جایگاه اگزون دوم MHC-DRB1 در گوسفندان نژاد ماکوئی. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.
- اصغری اسفدن ب، زره داران س، جعفری آهنگری ی، حسنی س، و لطفی ا. ۱۳۹۵. پیش بینی پاسخ ایمنی همورال بر علیه گلبول قرمز گوسفندی بر اساس شمارش گلبول‌های سفید خونی در بلدرچین ژاپنی. محیط زیست جانوری، ۸(۱): ۱۷-۲۲.
- الکار اوقلو ح، نیکبخت بروجنی غ، و اسماعیل نژاد ع. ۱۳۹۷. تنوع ژنتیکی MHC کلاس ۲ بوقلمون و ارتباط با پاسخ ایمنی همورال. طب دامی ایران، ۱۲(۴): ۳۴۷-۳۵۶.
- پیش جنگ آقاجری ج، رحیمی میانجی ق، حافظیان س. ح، و قلی زاده م. ۱۳۹۸. مطالعه چندشکلی تک نوکلئوتیدی ناحیه مجتمع عمده پذیرش بافتی مرتبط با سیستم ایمنی در مرغ تجاری گوشتی و تخمگذار. تحقیقات دامپزشکی، ۷۴(۴): ۵۸۴-۵۹۲.
- حیدری م، محمدی م، و محیطی اصلی م. ۱۳۹۸. اثر مکمل غنی از نوکلئوتید بر عملکرد رشد و پاسخ های ایمنی جوجه های گوشتی. تحقیقات تولیدات دامی، ۸(۳): ۱-۱۱.
- رحیم نهال س، فیاضی ج، میرزاده خ، بیگی نصیری م. ت، و روشنفکر ه. ۱۳۹۱. بررسی چندشکلی اگزون ۲ ژن BoLA-DRB3 در جمعیت گاو میش های خوزستان با استفاده از روش PCR-RFLP. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، ۱(۲): ۱۲۱-۱۲۸.
- لوچ ملکی ا، هاشمی ع، الیاسی زرین قبایی ق، فرهادیان م، و عرفانی اصل ز. ۱۳۹۶. بررسی چندشکلی اگزون ۲ ژن گیرنده پرولاکتین در بلدرچین ژاپنی و مرغان مروارید. پژوهش های تولیدات دامی، ۸(۱۶): ۱۷۲-۱۷۶.
- محمدآبادی م. ر، و دستافکن ک. ۱۳۹۱. چندشکلی اگزون ۲ ژن MHC-DRB3 در بز سرخ جبال بارز. تحقیقات تولیدات دامی، ۱(۲): ۱-۸.
- محمدآبادی م. ر، و سولیمووا گ. ۱۳۸۳. تعیین تنوع آلی ژن Bola-DRB3 در نژاد Yaroslavl گاو های روسیه به روش PCR-RFLP. مجموعه مقالات اولین کنگره علوم دامی و آبزیان کشور، تهران.
- محمدی ساردو خ، اسماعیلی زاده کشکوییه ع، و محمدآبادی م. ر. ۱۳۹۱. مطالعه چندشکلی ژن های آپولیپوپروتئین B1 و B2 در یک جمعیت آزمایشی بلدرچین ژاپنی با استفاده از تکنیک PCR-RFLP و PCR-SSCP. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه باهنر کرمان.



- نیکبخت بروجنی غ، رنجبر م. ه، قاسمی ف، و اسدیان ف. ۱۳۹۱. شناسایی چندشکلی آللهای اگزون دو از ژن BoLA-DRB3 در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران. تحقیقات تولیدات دامی، ۱(۲): ۳۳-۴۱.
- Afanassieff M. and Goto R. 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 polymorphism and shows divergent specialization in antigen binding region. *Journal of Immunology*, 166(5): 3324-3333.
- Afrache H., Tregaskes C. and Kafmane J. 2020. A potential nomenclature for the Immuno Polymorphism Database (IPD) of chicken MHC genes: progress and problems. *Immunogenetics*, 72: 9-24.
- Chazara O., Tixier-Boichard M., Morin V., Zoorob R. and Bed-Home B. 2011. Organisation and diversity of the class II DM region of the chicken. *Molecular Immunology*, 48 (9-10): 1263-1271.
- Ewald S. J., Ye X., Avendano S., McLeod S., Lamont S. J. and Dekkers J. C. 2007. Associations of BF2 alleles with antibody titres and production traits in commercial pure line broiler chickens. *Animal Genetics*, 38: 174-176.
- Garcia-Briones M. M., Russell G. C., Oliver R. A., Tami C., Taboga O., Carrillo E., Palma E. L., Sobrino F. and Glass E. J. 2000. Association of bovine DRB3 alleles with immune response to FMDV peptides and protection against viral challenge. *Vaccines*, 19: 1167-1171.
- Grasman K. A. 2010. *In vivo* functional test for assessing immune toxicity in birds (Ed.), *Immunotoxicity testing: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Humana Press. pp. 387-397.
- Hosomichi K., Shiina T., Suzuki S., Tanaka M., Shimizu S., Iwamoto S., Hara H., Yoshida Y., Kulski J., Inoko H. and Hanzawa K. 2005. Development of polymorphic genetic markers in the quail MHC (Coja) region. *Major Histocompatibility Complex*, 11 (3): 241-251.
- Hunt H. D., Jadhao S. and Swayne D. E. 2010. Major histocompatibility complex and background genes in chickens influence susceptibility to high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Disease*, 54: 572-575.
- Liu L. B., Wu C. M., Wen J., Chen J. L., Zheng M. Q. and Zhao G. P. 2009. Association of SNPs in exon 2 of the MHC B-F gene with immune traits in two distinct chicken populations: Chinese Beijing-You and White Leghorn. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A*, 59(1): 4-11.
- Miller M. M. and Taylor R. L. 2016. Brief review of the chicken Major Histocompatibility Complex: the genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance. *Poultry Science*, 95: 375-392.
- Nasirifar E., Talebi M., Esmailzadeh A., Askari N., Sohrabi S. S. and Moradian H. 2018. Genetic variability in growth hormone gene and association between RFLP pattern and quantitative variation of live weight, carcass, behavior, heterophil and lymphocyte trait in Japanese quails. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 8(1): 147-152.
- Nikbakht G. and Esmailnejad A. 2015. Chicken MHC polymorphism and its association with production traits. *Immunogenetics*, 67: 247-252.
- Parker A. and Kaufman J. 2017. What chickens might tell us about the MHC class II system. *Current Opinion in Immunology*, 46: 23-29.
- Rammensee H. G. 1995. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Current Opinion in Immunology*, 7(1): 85-96.
- Shiina T., Shimizu S., Hosomichi K., Kohara S., Watanabe S., Hanzawa K., Beck S., Kulski J. and Inoko H. 2004. Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions. *Journal of Immunology*, 172(11): 6751-6763.
- Sommer S. 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*, 2(16): 2005.
- Suzuki K., Matsumoto T., Kobayashi E., Uenishi H., Churkina I., Plastow G., Yamashita H., Hamasima N. and Mitsuhashi T. 2010. Genotypes of chicken major histocompatibility complex B locus associated with regression of Rous sarcoma virus J-strain tumors. *Poultry Science*, 89: 651-657.
- Ye X., Zhu J., Vellemanm S. G., Bacon W. L. and Nestor K. E. 1999. Analysis of genetic polymorphisms in the major histocompatibility complex of Japanese quail. *Poultry Science*, 78(1): 8-11.
- Yoshida T., Mukoyama H., Furuta H., Kondo Y., Takeshima S., Aida Y., Kosugiyama M. and Tomogane H. 2009. Association of the amino acid motifs of BoLA-DRB3 alleles with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Animal Science Journal*, 80(5): 510-519.
- Vallejo R. L., Pharr G. T., Liu H. C., Cheng H. H., Witter R. L. and Bacon L. D. 1997. Nonassociation between Rfp-Y major histocompatibility complex-like genes and susceptibility to Marek's disease virus-induced tumours in 6(3) x 7(2) F<sub>2</sub> intercross chickens. *Animal Genetics*, 28(5): 331-337.
- Warner C., Gerndt B., Xu Y., Bourlet Y., Auffray C., Lamont S. and Nordskog A. 1989. Restriction fragment length polymorphism analysis of major histocompatibility complex class II genes from inbred chicken lines. *Animal Genetics*, 20: 225-231.

Weigend S. and Lamont S. J. 1999. Analysis of MHC Class II and Class IV restriction fragment length polymorphism in chicken lines divergently selected for multi trait immune response. Poultry Science, 78: 982-973.



Research paper

## Investigation of the relationship between exon 2 of MHC-DMB2 polymorphism and humoral immune response in Japanese quail

H. Chenani<sup>1</sup>, M. Nazari<sup>2\*</sup>, M. T. Beigi Nassiri<sup>3</sup>, H. Roshanfekr<sup>3</sup>, A. Aghaei<sup>2</sup>

1. MSc Student of Animal Breeding and Genetics, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 02-03-2020 – Accepted: 14-10-2020)

### Abstract

The DMB2 gene is one of the MHC cluster genes that plays a role in the humoral immune response. This study was performed to identify the polymorphism of exon 2 of the MHC-DMB2 gene and its association with the humoral immune response in Japanese quail. For this purpose, on day 28, 0.2 mL of 5% saline suspension of sheep red blood cell (SRBC) was injected into 130 quail's breast muscle (65 males and 65 females). Seven days later, cervical vein blood sampling was performed on the 35<sup>th</sup> day. Afterward, the anti-SRBC titer antibody was determined using a micro hemagglutination technique. Also, genomic DNA was extracted from blood samples and a 333bp fragment of exon 2 was amplified using polymerase chain reaction and PCR products were digested by Hinf 1 restriction enzyme. The results showed that there were two types of C (333bp) and G (226, 107bp) alleles in this region with a frequency of 74.6% and 26.4% in the whole population, respectively. The results indicate high polymorphism and high homozygosity in the studied population. In addition, the results showed that genotype had a significant effect on antibody titers ( $P<0.01$ ). The CC genotype showed the highest total antibody titer (2.13 mg/dL) and the GG genotype showed the lowest total antibody titer (0.33 mg/dL). It is suggested that the negative effects of this single nucleotide polymorphism be considered in breeding programs.

**Keywords:** Humoral immunity, Japanese quail, Polymorphism, DMB2 gene, PCR-RFLP

\*Corresponding author: M.nazari@asnrukh.ac.ir