مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره اول (پیاپی ۶)، بهار ۱۳۸۹
صفحات ۲۳ - ۱۶

Original Article

استخراج و کلون سازی ژن اینترلوکین - ۲ جوجه پرورشی ایران

حمیده امینی*[۱]، دکتر سید داود حسینی[۲]، دکتر جمیله نوروزی[۳]، دکتر دلاور شهباززاده[۴]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار بخش مولکولی و بیوتکنولوژی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی اراک
[۳]استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، [۴]استادیار، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر سیتوکین‌های ایمنی مانند اینترلوکین - ۲ جوجه (chIL-2)، همراه با رژیم‌های واکسیناسیونی در صنعت ماکیان مورد استفاده قرار گرفته است. این سیتوکین‌ها می‌توانند به واسطه تکثیر لمفوسیت‌های T، توسعه لمفوسیت‌های B و فعال‌سازی سلول‌های کشنده ایمنی (NK) موجب افزایش کارایی واکسن‌ها گردند. این مطالعه با هدف استخراج و کلونینگ ژن اینترلوکین - ۲ جوجه پرورشی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در ابتدا برای جداسازی *chIL-2*، RNA تام به وسیله کشت سلول‌های طحال جوجه و با استفاده از فرآیند Trizol جداسازی گردید. با استفاده از تکنیک تک مرحله ای RT-PCR و پرایمرهای طراحی شده، mRNA به DNA تبدیل و تکثیر شد. سپس محصول PCR در وکتور PTZ57R/T از کیت T/A-cloning وارد و توسط شوک حرارتی به باکتری اشریشیاکلی Top10، منتقل گردید.

یافته ها: نتیجه RT-PCR نشان‌دهنده حضور یک باند ۶۶۸bp بود. درستی انجام فرآیند کلون سازی ژن در باکتری میزبان، از طریق واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برش دهنده *HindIII* و *EcoRI* و سپس انجام PCR از کلنی‌های مورد نظر و تعیین توالی ژن به دست آمده اثبات گردید.

نتیجه گیری: در این پژوهش برای اولین بار در ایران، ژن *chIL-2* جداسازی و در باکتری کلون شد و تعیین توالی و بررسی آن در سایت NCBI نیز نشان دهنده شباهت ۹۹٪ آن با توالی سایر ژن های *chIL-2* جداسازی شده در مطالعات مختلف بود.

واژگان کلیدی: IL-2 جوجه، واکسن نوترکیب، سیتوکین، ادجوانت، کلون‌سازی
دریافت مقاله: آبان ۸۸ پذیرش برای چاپ: بهمن ۸۸

مقدمه

صنعت ماکیان با تولید سالیانه تقریباً ۴۰ بیلیون پرنده، رشد قابل توجهی را در سراسر جهان داشته است. یکی از مشکلات اصلی در صنعت ماکیان، خسارت و تلفات بهره‌وری در تولید به علت وجود بیماری‌های مختلف در این صنعت است که نیازمند مدیریت دقیق و حساب شده می‌باشد (۱). پرندگان تحت شرایط تنش‌زا پرورش پیدا می‌کنند و مستعد آلوده‌شدن به بسیاری از پاتوژن‌ها می‌باشند. از این رو واکسیناسیون‌های مؤثر در جهت کاهش بیماری‌های عفونی و نیز جلوگیری از عفونت در ماکیان،

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، پاسداران، خیابان مکران جنوبی، کوچه بوستان دهم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، تلفن: ۰۲۱-۲۲۸۵۶۰۰۲
پست الکترونیک: h.amini63@gmail.com

فرآیندی حیاتی به شمار می‌آید. آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی برای مدت‌های طولانی به منظور غلبه بر عفونت‌ها در حیوانات مورد استفاده قرار گرفتند (۲). اما استفاده طولانی مدت از آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی در ماکیان، به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان انسانی، با افزایش بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ارتباط آن با زنجیره غذایی، وضعیت بحرانی در جوامع را ایجادکرده است. از این رو اهمیت استفاده از روش‌های واکسیناسیون به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی وجود دارد. هم‌چنین توسعه راهبردهایی به منظور ممانعت از رشد عوامل بیماری‌زا و نهایتاً کاهش انتشار چنین عفونت‌هایی توجهات زیادی را به خود معطوف کرده است. از میان راه‌کارهای موجود، گسترش واکسن‌ها در اولویت قرار دارند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سیتوکین‌های مختلفی مانند اینترلوکین ـ ۱۲ (IL-12)، فاکتور تحریک‌کنندگی کلنی گرانولوسیت ـ ماکروفاژ (GM-CSF) و اینترلوکین ـ ۲ (IL-2) در تعدیل فرایند التهاب نقش دارند (۳ و ۴). افزودن سیتوکین‌های مشتق شده از اسید نوکلئیک یا شکل نوترکیب آن به رژیم واکسیناسیونی می‌تواند پاسخ ایمنی درون‌زاد (endogenous) را علیه آنتی‌ژن واکسن افزایش دهد. از این‌رو امروزه سیتوکین‌ها کاندیدهای مناسبی برای درمان به عنوان واکسن ادجوانت می‌باشند (۵). اینترلوکین ـ ۲ به دلیل داشتن ویژگی‌های چندگانه (Pleotrophic) و نقش حیاتی در فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های T، به طور وسیعی برای استفاده به عنوان واکسن ادجوانت مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۶). امروزه مشخص شده است که این سیتوکین نه تنها تحریک کننده رشد و تمایز سلول‌های T می‌باشد، بلکه در تحریک سلول‌های NK، سلول‌های کشنده فعال شده توسط لمفوکین (LAK)، مونوسیت/ ماکروفاژ و نوتروفیل‌ها نیز نقش مهمی بر عهده دارد (۸ و ۹). بسیاری از پاتوژن‌های سرکوب کننده ایمنی ماکیان مانند IBDV (۹)، ویروس بیماری Marek (۱۰)، ویروس بیماری نیوکاسل (Newcastle) (۱۱)، ویروس آنمی جوجه (Anemia) (۱۲)، *Eimeria tenella* می‌توانند در آزمایشگاه در القا یا تولید غیرطبیعی chIL-2 دخالت کنند (۱۳). بنابراین chIL-2 می‌تواند در کنترل این بیماری‌ها نقش مهمی ایفا کند (۱۴). هدف از این پژوهش، استخراج و کلون سازی ژن IL-2 جوجه ایران بود.

مواد و روش ها

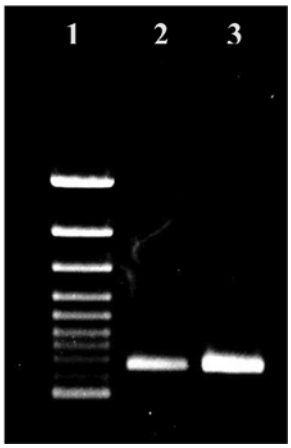
الف) نمونه مورد بررسی: گونه‌های پرورشی جوجه‌های ایران در موسسه‌رازی پرورش و نگهداری می‌شوند. این جوجه‌ها علیه ویروس بیماری IBD در زمان جوجه‌گیری (hatching) ایمن شدند. در این مطالعه از جوجه‌هایی استفاده گردید که در روز سی‌ام از تخم بیرون آمده بودند.

ب) استخراج سلول‌های تک هسته‌ای طحال (*SMC*): طحال دو جوجه پرورشی ایرانی ۴ هفته‌ای در شرایط استریل و زیر هود جداسازی و به محیط RPMI1640 (Invitrogen) منتقل شد. بافت طحال با استفاده از قیچی کاملاً ریز گردید و برای به دست آوردن سوسپانسیون سلولی هموژن و یکنواخت، از صافی استیل عبور داده شد. سلول‌ها با انجام سانتریفیوژ در ۱۳۰۰ rpm (دور در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ °C رسوب داده شدند. سپس دوبار با محیط RPMI 1640 (Gibco) شسته و EDTA ۲/۵٪ به آن‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد سوسپانسیون سلولی بر روی حجم برابر از Histopaque-1077 (sigma) اضافه شد. پس از انجام سانتریفیوژ در ۱۵۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C لایه میانی (حاوی سلول‌های تک هسته‌ای) جداسازی گردید و دوبار با محیط RPMI 1640 شستشو انجام شد. مجدداً سانتریفیوژ در ۱۳۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ °C انجام گرفت. پس از بررسی زیست پذیری سلول‌ها با استفاده از تکنیک رنگ تریبان بلو، سلول‌ها با غلظت 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر در محیط RPMI 1640 (حاوی ۱٪ L ـ گلوتامین، ۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، ۱ واحد در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر استرپتومایسین) به حالت سوسپانسیون در آمدند. سپس سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۶ تایی، کشت داده شدند. در نهایت به کمک conA با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تحریک و در دمای ۴ °C، با رطوبت ۹۰٪ و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند.

ج) استخراج *RNA* و *RT*-PCR: سلول‌های کشت شده در زمان‌های ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از تحریک با conA، به‌کمک

سانتریفیوژ به صورت مجزا رسوب داده شدند و با استفاده از معرف Trizol (invitrogen)، RNA تام (TRNA) جداسازی شدند. برای بدست آوردن توالی کدکننده کامل ژن *chIL-2*، بر اساس توالی منتشر شده ژن *chIL-2* در بانک ژنی (با شماره دسترسی AF000631)، پرایمرهای F(5'-CTAGAATTCGATAAATGGACACTG-3') (همراه با جایگاه آنزیم *EcoRI*) و R(5'-GTCAAGCTTAAAGTTAAATTTTGA-3') (همراه با جایگاه آنزیم *HindIII*) طراحی گردیدند. ژن DNA مربوطه با استفاده از کیت RT-PCR تک مرحله ای (Promega) از TRNA استخراج گردید. واکنش RT-PCR ژن *chIL-2* برای هر کدام از mRNA ها (حاصل از ۴ ساعت مختلف از کشت) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۵ پیکومول پرایمر F، ۵ پیکومول پرایمر R، ۵ میکرولیتر AMV/Tf1 (۵×)، (۲۵۰ میلی‌لیتر) ۳ میکرولیتر $MgSO_4$، (۱۰میلی لیتر) ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلی مراز *Tf1*، ۱۲ میکرولیتر آب مقطر و ۳۰۰ نانوگرم mRNA انجام گرفت. برنامه تکثیر به صورت زیر انجام گرفت: شرایط دمایی ۴۵°C به مدت ۴۵ دقیقه، ۵ دقیقه در ۹۵°C، به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵°C، ۵۰ ثانیه در ۵۵°C، ۱ دقیقه در ۷۲°C و در نهایت ۱۰ دقیقه در ۷۲°C. سپس ۴ میکرولیتر از محصول مورد انتظار RT-PCR (باند ۶۶۸bp) به ژل آگارز TAE ۱ درصد منتقل و پس از الکتروفورز به‌وسیله دستگاه Gel Documentation مشاهده گردید.

د) کلون سازی ژن *chIL-2* در وکتور *TA*: قطعه ۶۶۸bp مورد انتظار در مرحله بعدی در وکتور PTZ57R/T از کیت T/A



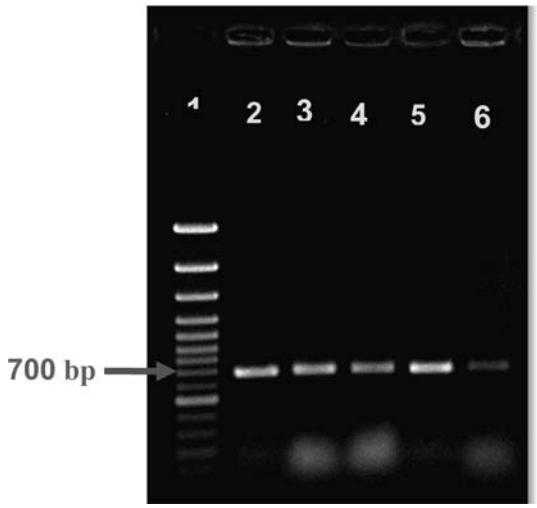
شکل ۱: RT-PCR کشت طحال با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در ۱۸ ساعت اول کشت. ستون ۱) مارکر (100 bp)، ستون‌های ۲ و ۳) باند مربوط به ژن *chIL-2*.

کلونینگ (Fermentas) کلون گردید. این واکنش شامل ۳ میکرولیتر وکتور PTZ57R/T، ۶ میکرولیتر بافر (۵×) (۳۰ میلی لیتر Tris-HCL(pH ۷/۸)، ۱۰ میلی لیتر $MgCl_2$، ۱۰ میلی لیتر DTT، ۲۰۰ میکرومول ATP، ۵٪ پلی اتیلن گلیکول)، ۱ میکرولیتر DNA لیگاز T4 (promega)، ۱۸ میکرولیتر آب مقطر و ۲۰۰ نانوگرم محصول PCR بود. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از مخلوط الحاق به ۱۵۰ میکرولیتر سلول‌های باکتری اشریشیا کلی Top10 پذیرای ژن اضافه شد. سپس در سطح پلیت محیط LB آگار (Merck) واجد ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین، ۱۰۰ میلی‌مولار IPTG، ۲۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر X-Gal پخش و در دمای ۳۷ °C گرماگذاری گردید.

ه) غربالگری کلنی های ترانسفورم شده: کلنی‌های سفید (نشان دهنده باکتری‌های ترانسفورم شده) پس از گرم‌خانه‌گذاری برای بررسی حضور ژن مورد نظر در وکتور T/A با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر بافر Tf1، ۳ میکرولیتر $MgSO_4$، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۵ پیکومول از هریک از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلی مراز *Tf1* و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. کلنی‌های دارای واکنش مثبت PCR، به مدت یک شب در ۴ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شدند. پلاسمید TA/IL-2 با استفاده از کیت Bioneer و دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و خالص سازی گردید. هم‌چنین کلنی‌های ترانسفورم شده با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده *EcoRI* و *HindIII* در ۳۷ °C به مدت ۵ ساعت تحت تأثیر هضم آنزیمی قرار گرفتند و نتایج آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب TA/IL-2 برای تعیین توالی به شرکت Millegene (فرانسه) ارسال گردید. سپس از طریق BLAST ژن مورد نظر با توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به ژن *chIL-2* در سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شد.

نتایج

الف) استخراج *SMC*، *RNA* و *RT-PCR*: بر اساس توالی ژن *chIL-2* پیشنهاد شده به وسیله Gill-Dixon و Sundick در



شکل ۲: PCR چند نمونه از کلنی‌های ترانسفورم شده. ستون ۱) مارکر (100 bp)، ستون‌های ۲ تا ۶) نشان دهنده حضور یک قطعه ژن ۶۶۸bp.

سال ۱۹۹۷، دو پرایمر اختصاصی با جایگاه آنزیم‌های برش دهنده طراحی گردید. پس از انجام کشت و تحریک سلول‌های طحال، استخراج RNA تام و واکنش RT-PCR انجام گرفت که باند ۶۶۸bp مورد انتظار مربوط به ژن *chIL-2*، تنها در ۱۸ ساعت اول پس از کشت و انجام الکتروفورز قابل مشاهده بود (شکل ۱).

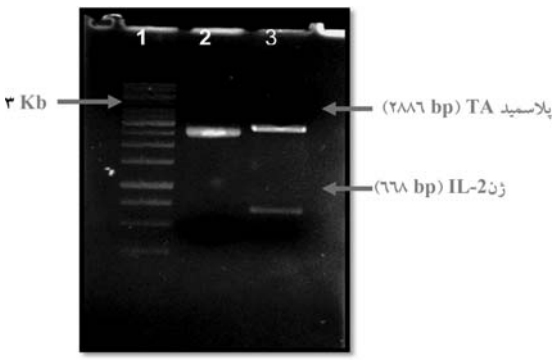
ب) غربالگری کلنی‌های ترانسفورم شده: محصول PCR تکثیر شده، در وکتور T/A کلون و سپس به باکتری اشریشیا کلی Top 10 منتقل گردید. نتایج آزمایش کلون سازی، در ابتدا به واسطه رنگ سفید کلنی‌های ترانسفورم شده از رنگ آبی کلنی‌های ترانسفورم نشده بررسی شد. کلنی‌های سفید ترانسفورم شده به عنوان نمونه DNA در نظر گرفته شدند. در شکل ۲ نتایج PCR حاصل از کلنی‌های سفید نشان داده شده است. این نتایج، نشان دهنده حضور یک قطعه ژن ۶۶۸pb مربوطه در تمام نمونه‌ها بود.

ج) استخراج پلاسمید *TA/IL-2*: الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید TA/IL-2 از کلنی، یک باند را نشان داد. از طرفی هضم آنزیمی این پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم‌های برش دهنده دو باند مجزا از هم، یکی مربوط به ژن TA/IL-2 و دیگری مربوط به پلاسمید T/A را نشان داد (شکل ۳).

تعیین توالی و مقایسه ژن مورد نظر با سایر توالی‌های ثبت شده در NCBI و توالی با شماره دسترسی AF000631 اثبات کرد که ژن یادشده متعلق به ژن اینترلوکین ـ ۲ جوجه است و دارای شباهت ۹۹٪ می‌باشد. ژن *chIL-2* تعیین توالی شده ایران در شکل ۴ نشان داده شده است.

بحث

استفاده از سیتوکین‌های ایمنی می‌تواند افزایش عملکرد واکسن را به دنبال داشته باشد (۱۵). chIL-2 یک لمفوکین غیر آنتی‌ژنی اختصاصی است که به دنبال تحریک، توسط لمفوسیت‌های T تولید می‌شوند (۱۶). این لمفوکین در تکثیر لمفوسیت T (۱۷)، تمایز لمفوسیت‌های B سلول‌های پلاسما (۱۸) و کلونینگ لمفوسیت‌های T اختصاصی آنتی‌ژن نقش مهمی ایفا می‌کنند (۱۹). امروزه IL-2 با توجه به عمل کردهای مختلفی که دارد به عنوان یکی از مهم‌ترین مولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی شناسایی شده است (۱۶). در دهه‌ی گذشته تلاش‌هایی در زمینه استخراج و تشخیص این مولکول از گونه‌های مختلف حیوانی انجام شده است. IL-2 از حیواناتی مانند گاو (۲۰)، گوسفند (۲۱)، بز (۲۲) و سگ از طریق تحریک لمفوسیت‌ها جداسازی شده است. اما مطالعات محدودی در مورد استخراج IL-2 توسط تحریک میتوژنی لمفوسیت‌ها از جوجه گزارش شده است (۲۳). ادجوانت‌های شیمیایی نظیر لیپوزوم و دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) موجب افزایش کارایی DNA واکسن‌ها می‌شوند (۲۴). اما استفاده از این ادجوانت‌ها در صنعت ماکیان گران و مشکل می‌باشد. از این رو ضرورت تولید ادجوانت‌های مؤثرتر و مقرون به صرفه تر احساس می‌شود. در مطالعات مختلف ثابت شده است که کارایی DNA واکسن‌ها



شکل ۳: هضم آنزیمی پلاسمید TA/IL-2. ستون ۱) مارکر (1 kb)، ستون ۲) پلاسمید TA/IL-2 هضم آنزیمی نشده، ستون ۲) پلاسمید نوترکیب هضم شده توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *HindIII* با ایجاد دو باند ۲۸۸۶bp (پلاسمید T/A) و ۶۶۸bp (ژن IL-2).

NNNNNNNGGATCCGATTCTA**GAATTC**GATAACTGGGACACTGCC**ATG**ATGTGCAAAGTACTGATCTTTGGCT-
GTATTTCGGTAGCAATGCTAATGACTACAGCTTATGGAGCATCTCTATCATCAGCAAAAAGGAAAC-
CTCTTCAAACATTAATAAAGGATTTAGAGATATTGGAAAATATCAAGAACAAGATTCATCTCGAGCTCTACACAC-
CAACTGAGACCCAGGAGTGCACCCAGCAAACTCTGCAGTGTTACCTGGGAGAAGTGGTTACTCTGAAGAAA-
GAAACTGAAGATGACACTGAAATTAAAGAAGAATTTGTAACTGCTATTCAAAATATCGAAAAGAACCTCAA-
GAGTCTTACGGGTCTAAATCACACCGGAAGTGAATGCAAGATCTGTGAAGCTAACAACAAGAAAAAATTTCCT-
GATTTTCTCCATGAACTGACCAACTTTGTGAGATATCTGCAAAAA**TAA**GCAACTAATCATTTTTATTTTACTGC-
TATGTTATTTATTTAATTATTTAATTACAGATAATTTATATATTTTATCCCGTGGCTAACTAATCTGCTGTC-
CATTCTGGGACCACTGTATGCTCTTAGTCTGGGTGATATGACGTCTGTTCTAAGATCATATTTGATCCTTTCTG-
TAAGCCCTACGGGCTCAAAATGTACGTTG**AAGCTT**ACAATCTAGATGCNNNNNNNNNNNN

شکل ۴: توالی ژن اینترلوکین۲ جوجه پرورشی ایران. جایگاه آنزیم‌های برش‌دهنده به صورت پررنگ و کدون آغاز ATG و پایان TAA به صورت زیر خط نشان داده شده است.

می‌تواند در نتیجه همراهی با ژن‌های سیتوکینی مختلف افزایش یابد (۲۵). شاید IL-2 سیتوکینی باشد که روی آن بیشتر از سایر سیتوکین‌ها به عنوان ادجوانت مطالعه شده باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که می‌توان پاسخ‌های ایمنی در DNA واکسن‌ها را با تجویز هم زمان پلاسمیدهای کد کننده ژن IL-2، افزایش داد. نمونه‌ای از این پدیده، در واکسن‌هایی علیه هرپس ویروس ۱ گاوی (۲۶)، ویروس هپاتیت C (۲۷)، ویروس هپاتیت B (۲۸ و ۲۹)، ویروس اسهال گاوی (۳۰)، HIV (۲۴)، بیماری پا و دهان (۳۱) و ویروس سرخک (۳۲) مشاهده شده است. در مجموع نتایج این مطالعات نشان می‌دهد که استفاده سیستمیک IL-2، به طور قابل توجهی می‌تواند با تقویت محافظت و ایمنی موجب افزایش بیشتر پاسخ‌های ایمنی سلولی نسبت به ایمنی خونی گردد. در مطالعه حاضر، بر اساس توالی منتشر شده *chIL-2* توسط Gill Dixon و Sundick (۱۹۹۷)، دو پرایمر اختصاصی طراحی شد که ناحیه کد کننده ژن *chIL-2* را پوشش می‌دادند. برای این منظور، لمفوسیت‌ها از طریق کشت سلول‌های طحال استخراج شدند. اما در برخی از پژوهش‌های دیگر، از کشت خون جوجه‌های ۸ هفته‌ای واجد هپارین استفاده شده است (۱۵). نقطه مشترک تمام پژوهش‌های انجام شده در این مورد استفاده از کاناکاوالین (canA) برای تحریک اختصاصی لمفوسیت‌ها می‌باشد (۱۱، ۱۴ و ۱۵).

استخراج RNA تام (TRNA) با استفاده از روش Trizol انجام شد که در ادامه RT-PCR، منجر به سنتز یک قطعه DNA۶۶۸ جفت بازی شد که توسط الکتروفوز مشاهده و تأیید گردید. این قطعه فقط از ۱۸ ساعت اول کشت به دست آمد، اما در سایر زمان‌ها (۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) هیچ باندی مشاهده نشد. کلون سازی ژن *chIL-2* ایران نشان داد که قطعه کامل ۶۶۸bp ژن *chIL-2*، یک پروتئین ۱۴۳ اسید آمینه ای را کد می کند. تجزیه و تحلیل توالی مورد نظر در بانک ژنی، ثابت کرد که این توالی نوکلئوتیدی شباهت‌هایی با توالی‌های نوکلئوتیدی شناخته شده دارد. در این بررسی نشان داده شد که *chIL-2* عضوی از سوپر فامیلی IL-15 است. مقایسه و بررسی توالی‌ها اثبات کرد که *chIL-2* ایران شباهت ۵۸٪ با IL-2 اردک، ۸۰٪ با IL-2 بوقلمون و ۴۱٪ با IL-2 پستانداران دارد. مقایسه ای بین ژن استخراج شده در مطالعه حاضر با سایر ژن‌های *chIL-2* منتشر شده در NCBI نیز صورت گرفت. نتایج، شباهت ۱۰۰٪ بین ژن *chIL-2* ایران و نژاد پرورشی چین و ترکیه را نشان داد. هم‌چنین شباهت ۹۹٪ با آمریکا و نژاد chengren چین و لگهورن، شباهت ۹۸٪ با نژاد های Xian ju چین و morghi هند و شباهت ۹۷٪ با نژاد silky چین را نشان داد. بررسی و تجزیه و تحلیل اسید آمینه، اشاره به ساختار حفاظت شده کل پروتئین دارد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر برای اولین بار ژن *chIL-2* پرورشی ایران جداسازی و شباهت‌ها و تفاوت‌های آن مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. از این رو در آینده می‌توان مطالعات بیشتری بر روی تولید و استخراج پروتئین نوترکیب ژن یاد شده و بررسی قابلیت ایمنی‌سازی آن در هر دو فرم DNA واکسن و واکسن‌های نوترکیب انجام داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از ریاست محترم موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مرکزی اراک به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی اعلام می‌دارند.

References

1. Bowersock TL. Evolving importance of biologics and novel delivery systems in the face of microbial resistance. AAPS Pharm. Sci. 2002; 4:1-7.
2. Iovine NM, Blaser MJ. Antibiotics in animal feed and spread of resistant *Campylobacter* from poultry to humans. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10:1158-1159.
3. Heath, WW, Playfair, JHL. Cytokines as immunological adjuvants. Vaccine. 1992; 10:427-434.
4. Hughes, HPA, Babiuk LA. The adjuvant potential of cytokines. Biotechnol Therapeut. 1992; 3:101-117.
5. Husband AJ, Bao S, Muir W, Ramsay AJ, Ramshaw IA. Cytokine regulation of mucosal responses: a rational basis for new vaccine delivery strategies. Reprod Fertil Dev. 1994; 6:381-388.
6. Sundick RS, Gill-Dixon C. A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. J. Immunol. 1997; 159:720-725.
7. Schumann R, Nakaral T, Gruss HJ, Brach MA, Vanm AU, Kirschning C. Transcript synthesis and surface expression of the interleukin-2 receptor (alpha, beta, and gamma chain) by normal and malignant myeloid cells. Blood. 1996; 87:2419-2427.
8. Bartlett Y. Potential monitoring value of functional interleukin-2 receptors on human neutrophils. Clinic. Diagnos. Lab. Immunol. 1998; 5:270.
9. Wu CC, Dorairajan T, Lin TL. Effect of ascorbic acid supplementation on the immune response of chickens vaccinated and challenged with infectious bursal disease virus. Vet. Immunol. Immunopathol. 2000; 749:145-152.
10. Xing Z, Schat KA. Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. Immunology. 2000; 100:70-76.
11. Thiagarajan D, Ram GC, Bansal MP. Optimum conditions for in vitro chIL-2 production and in vivo role in Newcastle disease vaccinated chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 67:79-91.
12. Markowski-Grimsrud CJ, Schat KA. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. Immunology. 2003; 109:283-294.
13. Chio KD, Lillehoj HS. Role of chIL-2 on gamma delta T-cells and *Eimeriaacervulina*-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gamma delta T-cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 2000; 73:309-321.
14. Jianrong L, Xueya L, Yaowei H, Songshu M, Ronghui X, Ruitang D, Lian Y. Enhancement of the immunogenicity of DNA vaccine against infectious bursal disease virus by co-delivery with plasmid encoding chicken interleukin 2. Virology. 2004; 329:89-100.
15. Diane H, Carlos R. Partial protection against infectious bursal disease virus through DNA-mediated vaccination with the VP2 capsid protein and chicken IL-2 genes. Vaccine. 2004; 22:1249-1259.
16. Robb RJ. Interleukin-2: The molecule and its function. Immunol. 1984; 5:203-209.
17. Gillis S, Smith KA. Long term culture of tumor specific cytotoxic T cells. Nature. 1977; 268:154-156.
18. Howard M, Matis L, Malek TR, Shevach R, Kell W, Cohen D, Nakamishi K, Paul WF. Interleukin-2 induces antigen-reactive T-cell lines to secrete BCGF-I. J.Exp. Med. 1983; 158:2024-2039.
19. Gillis S, Watson J. Interleukin-2 induction of hapten specific cytolytic T-cells in nude mice. J. Immunol. 1981; 126:1245-1248.
20. Arunachalam, B, Subba Rao MV, Ram GC. Bovine Interleuke 2: Biochemical and biological characterization. Vet. Immunol. Immunopatho. 1989; 23:377-383.
21. English LS, Latta H, Whitehurst M. Initial characterization of sheep T-cell growth factor and its species restricted activity on human, rat and mouse cells. Cellular Immunol. 1985; 90:314-321.
22. Ram GC, Subba Rao MV, Singh VP, Bansal MP. Isolation and characterization of goat interleukin 2. Indian J. Exp. Biol. 1987; 25:589-591.
23. Schnetzler M, Ocmen A, Nowak JS, Franklin RM. Characterization of chicken T cell growth factor. Eur. J. Immunol. 1983; 13:560-566.
24. Heckert RA, Elankumaran S, Oshop GL, Vakharia VN. A novel transcutaneous plasmid-dimethylsulfoxide delivery technique for avian nucleic acid immunization. Vet. Immunol. Immunopatho. 2002; 89:67-81.
25. Moore AC, Kong WP, Chakrabarti BK, Nabel GJ. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. J. Virol. 2002; 76:243-250.
26. Kuhnle G, Collins RA, Scott JE, Keil GM. Bovine interleukins 2 and 4 expressed in recombinant bovine herpesvirus 1 are biologically active secreted glycoproteins. J. Gen. Virol. 1996; 77:2231-2240.
27. Geissler M, Gisien A, Tokushige K, Wands JR. Enhancement of cellular and hurmoral immune responses to hepatitis C virus core protein using DNA-based vaccines augmented with cytokine-expressing plasmids. J. Immunol. 1997; 158:1231-1237.

28. Chow YH, Huang W, Chi W, Chu Y, Tao M. Improvement of Hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids co-expressing Hepatitis B surface antigen and interleukin-2. J. Virol. 1997; 71:169-178.
29. Chow YH, Chiang BL, Lee YL. Development of Th1 and Th2 population and the nature of immune response to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by co-delivery of various cytokine genes. J. Immunol. 1998; 160:1320-1329.
30. Nobiron I, Thompson I, Brownlie J, Collins ME. Cytokine adjuvancy of BVDV DNA vaccine enhances both humoral and cellular immune responses in mice. Vaccine. 2001; 19:4226-4235.
31. Wong HT, Cheng SC, Sin FW, Chan EW, Sheng ZT, Xie Y. A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in swine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. Vaccine. 2002; 20:2641-2647.
32. Premenko-Lanier M, Rota PA, Rhodes G, Verhoeven D, Barouch DH, Lerche NW, Letvin NL, Bellini WJ, Mc Chesney MB. DNA vaccination of infants in the presence of maternal antibody: a measles model in the primate. Virol. 2003; 307:67-75.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 1, May 2010

Extraction and cloning of interleukine-2 gene from the Iranian chicken

Hamideh Amini[1], Seyed Davoud Hoseini[2],
Jamileh Nowroozi[3], Delavar shahbazzadeh[4]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Razi Vaccination and Serum Research Institute, Arak, Iran
[3]Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Pasteur institute, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives: Nowadays, the immune cytokines, such as the chicken IL-2 (chIL-2) gene are incorporated into vaccination regimens used by the poultry industry. The cytokines can potentially enhance the efficiency of vaccines according to increase T lymphocyte proliferation, B lymphocyte development and natural killer cell (NK) activation. The aim of this study was extraction and cloning of Iranian chicken interleukine-2 (chIL-2).

Materials and Methods: First of all, in order to extract chIL-2 gene, total cell RNAs were isolated by culturing the harvested splenocytes and using Trizol reagent. The chIL-2 specific mRNA was converted into cDNA using reverse Transcriptase (RT) and specific designed primers. Then, The PCR product was ligated into the PTZ57R/T plasmid (TA-cloning kit) and was transformed into the competent Top10 *E. coli* using heat shock method.

Results: A unique band of 668-bp was obtained after RT-PCR amplification. The results of restriction enzyme, colony PCR from transformed colonies and also gene sequencing confirmed the existence of desired gene in transformants bacteria.

Conclusion: For the first time in Iran we could extract and clone the chIL-2 gene in bacteria and gene alignment. A direct sequencing test showed 99% similarity between this gene and the established data in NCBI

Keywords: Chicken IL-2, recombinant vaccine, cytokine, adjuvant, cloning

Correspondence to: Hamideh Amini
E-mail: h.amini63@gmail.com
Tel: +982122856002
Journal of Microbial World 2010 3(1): 16-23