

تعیین توالی و جهش‌های تک نوکلئوتیدی پرموتور و ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ‌های بومی خوزستان

محمود نظری^{۱*}، فاطمه ثعلبی^۲ و سوسن رادپور^۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۳

چکیده

پروتئین شوک حرارتی ۷۰ یک چاپرون است که در پاسخ به استرس بیان می‌شود. هدف از این تحقیق تعیین توالی و جهش‌های تک نوکلئوتیدی پرموتور و ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ و بررسی اثر جهش‌های تک نوکلئوتیدی بر ساختار سه بعدی و عملکرد پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ بومی استان خوزستان با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی بود. جهت انجام این تحقیق از ۲۰ قطعه مرغ بومی از مناطق مختلف استان خوزستان خون‌گیری انجام شد. پس از استخراج DNA، با استفاده از چندین پرایمر، پرموتور و ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ تکثیر گردیده و توالی‌یابی شد. سه جهش در طول کامل ژن پروتئین شوک حرارتی مشاهده گردید. اولین جهش در جایگاه نوکلئوتید ۲۵۹ (A259G) مشاهده شد که گوانین جایگزین آدنین شده بود. جهش دوم در جایگاه نوکلئوتید ۲۷۷ (C277G) اتفاق افتاده بود که گوانین جایگزین سیتوزین شده بود. جهش سوم در جایگاه نوکلئوتید ۱۷۴۹ (C1749G) اتفاق افتاده که گوانین جایگزین سیتوزین شده بود. در جهش اول و دوم تغییری در اسید آمینه ایجاد نمی‌شود اما جهش در جایگاه ۱۷۴۹ سبب تبدیل شدن اسید آمینه‌ی سرین به تریپتوفان می‌شود. این جهش در جایگاه ۵۸۳ اسید آمینه پروتئین شوک حرارتی رخ داده اما تغییری در ساختمان سه بعدی و عملکردش ایجاد نمی‌کند. این تغییر اسید آمینه سبب پایداری بیشتر در پروتئین شوک حرارتی ۷۰ شده و ممکن است یکی از علل مقاومت مرغان بومی به گرما باشد.

کلمات کلیدی: تعیین توالی، جهش تک نوکلئوتیدی، پرموتور، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، مرغ بومی

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها، کاهش فعالیت لئوسیت‌های T و B و افزایش مرگ و میر در مرغ‌های تحت استرس گرمایی اشاره کرد (Mashaly et al. 2004). در غالب گزارشات بیان شده است که وجود شرایط استرس، بیان اغلب ژن‌ها را به شدت سرکوب می‌کند به استثنای مجموعه‌ی خاصی از ژن‌ها که ژن‌های شوک حرارتی (Heat shock genes) نامیده می‌شوند (Morimoto et al. 1986). ژن شوک حرارتی ۷۰ مرغ بر روی کروموزوم ۵ قرار گرفته است و دارای ۱۹۰۴ جفت باز می‌باشد. این ژن از یک آگزون

بخش اعظم تولیدات طیور در دنیا به مناطق خشک و گرمسیری اختصاص دارد که این مناطق عمدتاً طول روز بلند با دمای بیش از ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد دارند. بدیهی است که در چنین شرایطی، یکی از مهم‌ترین مشکلات صنعت طیور استرس گرمایی بوده که از یک طرف کاهش تولید و از طرف دیگر افزایش مرگ و میر گله را در پی خواهد داشت. در اثر استرس گرمایی علاوه بر کاهش عملکرد، اعمال ایمنی بدن هم مختل می‌شود، به طوری که می‌توان به کاهش محتوای گلبول‌های سفید خون،

*۱ استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

E-mail: m.nazari@asnruk.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

۲ استادیار گروه جانوران سمی و تولید پادزهر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اهواز، اهواز، ایران

۳ دانشجوی دکتری اصلاح نژاد دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاتانی، ایران

به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش نمکی بهینه یافته انجام گرفت. کیفیت DNA استخراجی به روش الکتروفورز در ژل آگارز و نانودراپ سنجیده شد. جهت تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از چندین آغازگر استفاده گردید که در تعدادی از آن‌ها جهشی مشاهده نشد در نتیجه در این مقاله تنها دو پرایمری که جهش در آن قسمت مشاهده گردید آورده شده است (جدول ۱).

جهت طراحی پرایمر از توالی ثبت شده در NCBI استفاده شد (J02579). منابع بعضی از پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است و طراحی بقیه‌ی پرایمرها توسط محققین این مطالعه به وسیله‌ی نرم‌افزار 11 vector NTI انجام شده است. با استفاده از تکنیک PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) تکثیر قطعه‌ی مورد نظر انجام شد. برنامه‌ی حرارتی اسفاده شده در این تحقیق برای PCR در جدول ۲ ارائه شده است. نمونه‌های PCR (برای هر پرایمر ۵ نمونه) جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

توالی پروموتور توسط نرم‌افزار آنالین TFBIND (<http://tfbind.hgc.jp>) مورد آنالیز قرار گرفت و جایگاه اتصال عوامل رونویسی مشخص گردیدند. توالی‌های به دست آمده به وسیله‌ی نرم‌افزار وکتور NTI هم‌ردیف و به توالی آمینو اسیدی تبدیل شدند و جهش‌ها شناسایی شدند. جهت بررسی اثر جهش بر پایداری و عملکرد پروتئین از سه نرم‌افزار آنالین I-mutant و Provean و Sift استفاده گردید. جهت بررسی اثر جهش بر ساختار سه بعدی پروتئین از سایت آنالین Swiss-model استفاده گردید. در نهایت خصوصیات ساختمانی مدل با استفاده از نقشه‌های رامانچاندران ارزیابی گردید (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

در این روش از مدل‌های کامپیوتری پلی‌پپتیدهای کوچک برای تغییر سیستماتیک زوایا فی و سای با هدف پیدا کردن ترکیب پایدار استفاده شد (Ramachandran et al. 1963).

تشکیل شده است و اینترون ندارد (Masodi et al. 2012). پروتئین شوک حرارتی (Hsp) بر اساس وزن مولکولی زیر واحدهای آن در خانواده‌های متفاوتی شامل پروتئین شوک حرارتی ۹۰، ۷۰، ۶۰ و ۴۰ تقسیم می‌شود. پروتئین شوک حرارتی عملکردی مانند چاپرون‌های مولکولی دارند و برای تا خوردگی صحیح، سر هم شدن و انتقال بین سلولی پروتئین‌ها در شرایط رشد طبیعی ضروری هستند (Santoro 2007). در حالی که وجود شرایط استرس به مدت طولانی مضر بوده و ممکن است به مرگ سلول و یا بافت منجر شود، القاء سنتز پروتئین شوک حرارتی می‌تواند باعث افزایش مقاومت نسبت به تنش و ایجاد فرآیند سیتوپروتکشن در برابر آسیب‌های ایجاد شده از تنش گردد (Mezquita et al. 2010). از طرف دیگر، پرورش مرغ بومی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد آن از جمله مقاومت در برابر شرایط سخت محیطی مخصوصاً آب و هوای گرم و خشک، هزینه‌ی پایین نگهداری و پرورش، بازار پسندی و کیفیت مطلوب تولیدات از دیر باز مورد توجه بوده است. به ویژه از زمانی که برنامه‌ی اصلاح‌نژاد با پنج مرکز اصلی تولید مرغ بومی اصلاح شده در کشور آغاز شد، تأثیر به سزایی در میزان تولید پروتئین و حفظ ذخایر ژنتیکی گذاشت (Azarbayejani et al. 2014). حفظ این ذخایر به علت مزایایی که مرغ‌های بومی کشور در سازگاری با شرایط محیطی، مدیریتی، بهداشتی و تغذیه‌ای دارند امر مهمی است. با توجه به این که مرغان بومی استان خوزستان نسبت به شرایط آب و هوایی گرم سازگاری یافته‌اند نیاز است که توالی پروموتور و ژن شوک حرارتی و جهش‌های موجود در این مرغ‌ها شناسایی شوند.

مواد و روش کار

در این پژوهش ۲۰ قطعه مرغ بومی از مناطق مختلف استان خوزستان (ملاثانی-شوش-رامهرمز-اندیمشک) انتخاب و خون‌گیری از سیاهرگ زیر بال انجام گرفت. نمونه‌ها شماره‌گذاری شده و سپس در ظرف حاوی یخ

جدول ۱: خصوصیات پرایمرها جهت تکثیر منطقه‌ی پروموتور و توالی ژن کدکننده‌ی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (J02579)

منابع	اندازه محصول (جفت باز)	موقعیت بر روی توالی مرجع	دمای اتصال (سانتی‌گراد)	پرایمر ۵ → ۳
Mazzi et al. (2003)	۳۶۴	۱۸ ۳۸۲	۶۰	F1: 5' -GAGTGGCGCAGCGTAGAAAG-3' R1: 5' -TTCTCTTGGTCAGTCAGCC -3'
Mazzi et al. (2003)	۲۷۱	۲۰۸ ۴۷۹	۶۵	F2: 5' -GATTGGTCCTTAGCGTTCTGGC -3' R2: 5' -TGATCTCCACTTTGCCATGCTG -3'
Mazzi et al. (2003)	۳۵۹	۴۹۷ ۸۵۶	۶۴	F3: 5' -AACCGCACCACCCAGCTATG -3' R3: 5' -CTGGGAGTCGTTGAAGTAAGCG -3'
-	۳۹۵	۸۵۵ ۱۲۵۰	۶۰	F4: 5' -AGCGCCAGGCCACCAAAGAT -3' R4: 5' -CTCAATGCTGGCTTGCCTGGG-3'
-	۳۹۳	۱۲۳۱ ۱۶۲۴	۵۶	F5: 5' -CACGCAAGCCAGCATTGAGA R5: 5' -TCCACCAGCTGTCTCGATGC
-	۳۹۲	۱۶۰۶ ۱۹۹۸	۵۲	F6: 5' -CATCGAGACAGCTGGTGGAG R6: 5' -CTGTTGGCTTCATCCTCTGC
Mazzi et al. (2003)	۴۳۳	۱۹۹۳ ۲۴۲۶	۶۱	F7: 5' -CAACAGAGATAGGGTGGGAG-3' R7: 5-TGCCTTTATACACACCCAACAG-3'

جدول ۲: برنامه‌ی حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

زمان	درجه حرارت	سیکل مراحل PCR
۲ دقیقه	۹۵	واسرشته سازی
۱ دقیقه	۹۵	واسرشته سازی
۱ دقیقه	متغیر (متناسب با پرایمر)	اتصال آغازگر
۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه	۷۲	بسط
۱۰ دقیقه	۷۲	بسط نهایی
۵ دقیقه	۴	نگهداری

قرارگرفتن پرایمرها جعبه TATA جعبه CAAT، جعبه GC، جعبه Sp1، جعبه ETS، عناصر شوک حرارتی ۱ و ۲ (HSEs 1,2) و جایگاه شروع رونویسی (ATG) مشخص شده است.

نتایج

آنالیز توالی پروموتور

نتایج آنالیز پروموتور پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ بومی در تصویر ۱ آورده شده است. در شکل ۱ محل



تصویر ۱: محل قرارگرفتن پرایمرها، جعبه TATA، جعبه CAAT، جعبه GC، جعبه Sp1، جعبه ETS، عناصرهای شوک حرارتی ۱ و ۲ (HSEs 1,2) و جایگاه شروع رونویسی (ATG) پروموتور پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ بومی

G در موقعیت ۲۱۸- یک نوکلئوتید C در موقعیت ۲۱۴-
 دو نوکلئوتید A در موقعیت ۸۱- و ۱۶- حذف گردیده و
 دو نوکلئوتید G در موقعیت ۱۲۳- و ۱۱۸- یک نوکلئوتید
 در موقعیت ۱۱۷- اضافه گردیده است.

جایگاه پلی مورفسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در
 پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ شناسایی شد.
 تعداد جهش‌ها و نوع آن‌ها در جدول ۳ آورده شده است.
 همان طور که در تصویر ۲ مشاهده می‌گردد یک نوکلئوتید

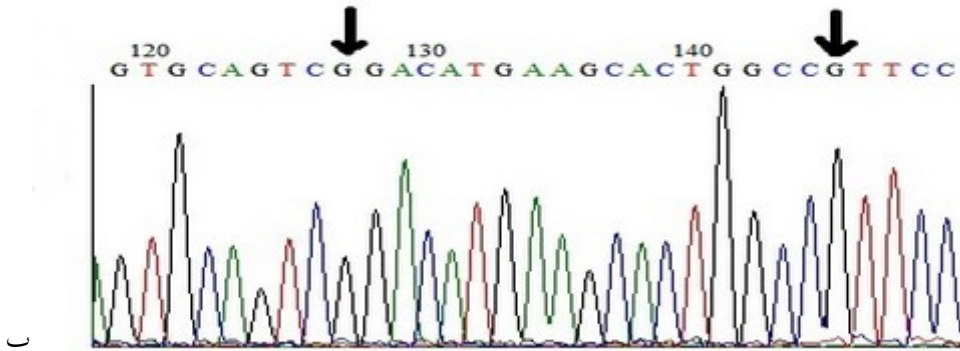
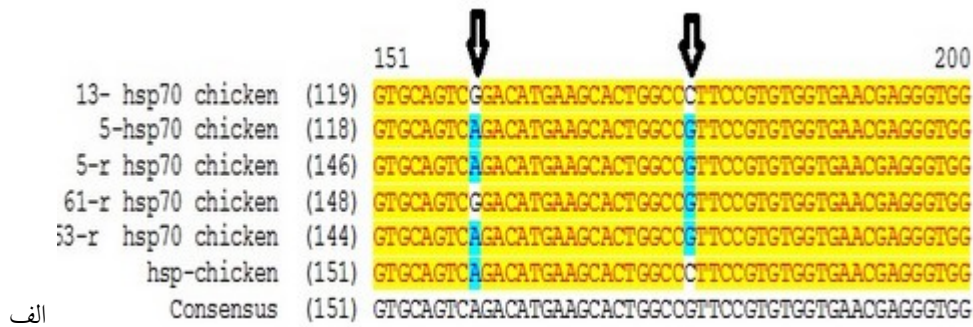
جدول ۳: پلی مورفسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) شناسایی شده در پروموتور ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰

جایگاه	تعداد	نوع تنوع	جایگاه اتصال فاکتور رونویسی
A-308 G	۵	transition	-
G-285 A	۵	transition	-
G-251 A	۵	transition	-
A-174 T	۱	transversion	Heat stress Factor (HSF)
A-154 T	۱	transversion	Heat stress Factor (HSF)
G-142 C	۳	transversion	-

آنالیز ژن پروتئین شوک حرارتی

در اسید آمینه پروتئین ایجاد نمی‌کند چرا که هر دو کدون
 (TCA و TCG) کدون مربوط به سرین هستند. دومین
 جهش تغییر باز سیتوزین C به باز گوانین G در موقعیت
 نوکلئوتید ۲۷۷+ است که تغییری در اسید آمینه پروتئین
 ایجاد نمی‌کند چرا که هر دو کدون (CCC و CCG)
 کدون مربوط به پرولین هستند (تصویر ۲).

توالی ژن پروتئین شوک حرارتی مرغ بومی به دست
 آمده در این تحقیق با شماره دسترسی MH422508،
 MH422507، MH422506 در سایت NCBI ثبت گردید.
 سه جهش در نوکلئوتیدهای پروتئین شوک حرارتی ۷۰
 تشخیص داده شد. اولین جهش تغییر نوکلئوتید آدینین A
 به نوکلئوتید گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹+ تغییری



تصویر ۲: الف) هم‌ردیف‌سازی چندتا از نمونه‌های مرغ بومی ایران با ژن رفرنس (J02579) جهش سبب تغییر نوکلئوتید آدنین A به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۵۹+ و همچنین تغییر سیتوزین C به باز گوانین G در موقعیت نوکلئوتید ۲۷۷+ شده است. ب) محل جهش بر روی نمودار کروماتوگرام نشان داده شده است.

توالی پروتئینی جدید در سایت NCBI بلاست شد که در تصویر ۳ ارائه شده است و مشخص شد که این جهش در نژادهای دیگری هم قبلاً در چین (با شماره‌های دسترسی ACE79190.1, AY288300) در هند (با شماره دسترسی AFX69291.1) در برزیل (AY143692.1) گزارش شده است.

سومین جهش تغییر نوکلئوتید سیتوزین C به باز گوانین G در موقعیت باز ۱۷۴۹+ تغییری در اسیدآمینة پروتئین ایجاد می‌کند چرا که کدون TCG کدون مربوط به سرین است و کدون TGG مربوط به تریپتوفان (Trp) است. این جهش سبب تبدیل شدن اسیدآمینة سرین (S) در موقعیت اسیدآمینة ۵۸۳ به تریپتوفان (W) می‌شود که به صورت S583W نشان داده می‌شود.

	549	560	570	580	590	604
iranian chicken (549)	TYNMKQTVEDEKLGKISDQDKQKVLDKCQEVISW	LD	RN	QMAEKEEYEHKQKELEK		
AAA 48825.1 (549)	TYNMKQTVEDEKLGKISDQDKQKVLDKCQEVISW	LD	RN	QMAEKEEYEHKQKELEK		
NP_001006686.1 (549)	TYNMKQTVEDEKLGKISDQDKQKVLDKCQEVISW	LD	RN	QMAEKEEYEHKQKELEK		
ACE 79190.1 (549)	TYNMKQTVEDEKLGKISDQDKQKVLDKCQEVISW	LD	RN	QMAEKEEYEHKQKELEK		
AFX 69291.1 (549)	TYNMKQTVEDEKLGKISDQDKQKVLDKCQEVISW	LD	RN	QMAEKEEYEHKQKELEK		
Consensus (549)	TYNMKQTVEDEKLGKISDQDKQKVLDKCQEVISW	LD	RN	QMAEKEEYEHKQKELEK		

تصویر ۳: بلاست نمودن توالی امینواسیدی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ با توالی‌های موجود در NCBI

آنالیز I-mutant و Provean و Sift در جدول ۴ ارائه شده است.

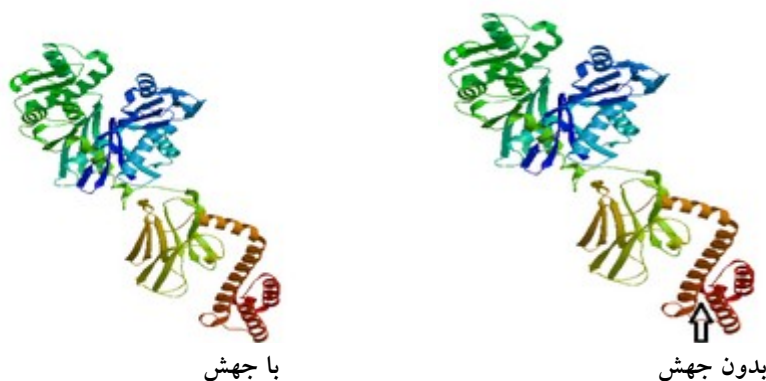
اثرات جهش S583W بر عملکرد و پایداری پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ بومی ایران توسط سه نرم‌افزار

جدول ۴: نتایج پیش‌بینی شده برای جهش در اسیدآمینو سرین و جایگزینی آن با تریپتوفان (S583W) توسط سه نرم‌افزار: SIFT,

PROVEAN, I-MUTANT					
نتایج I-MUTANT		نتایج PROVEAN		نتایج SIFT	
عملکرد	مقدار پارامتر	عملکرد	مقدار پارامتر	عملکرد	مقدار پارامتر
طبیعی	۱۵/۰	طبیعی	۸۳۲/۸	قابل تحمل	۱

که جهش در انتهای پروتئین اتفاق افتاده است و تأثیری بر ساختار پروتئین نداشته است.

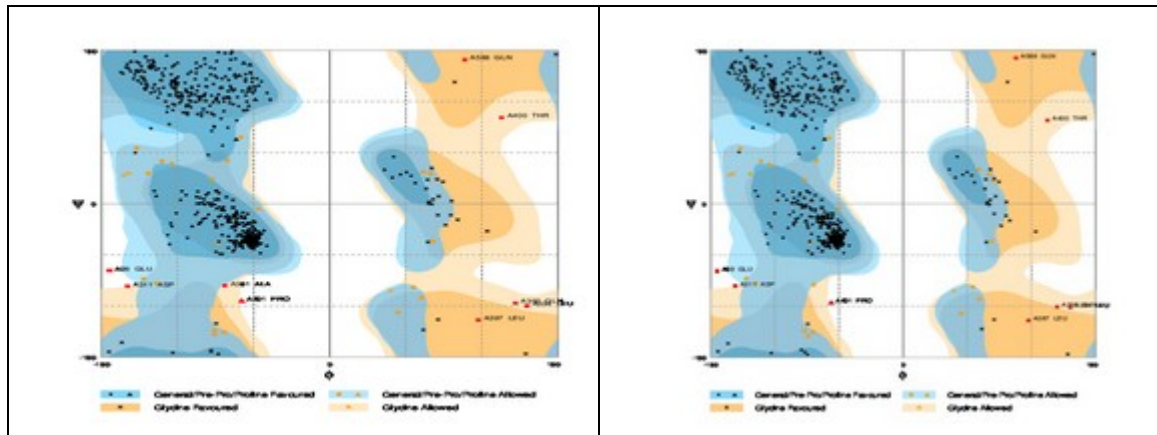
جهت بررسی اثر جهش S583W بر ساختار سه بعدی پروتئین از سایت آن‌لاین Swiss-model استفاده گردید. نتایج آن در تصویر ۴ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد



تصویر ۴: ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده توسط سایت Swiss-model در اسیدآمینوی ۵۸۳ پروتئین شوک حرارتی ۷۰ مرغ بومی ایران. محل جهش با پیکان مشخص شده است.

غیرمجاز می‌باشد. نتایج ارزیابی مدل ساخته شده برای پروتئین دارای جهش (S583W) با نقشه‌های رامچاندرا نشان می‌دهد که ۹۴/۶ از مدل ساخته شده در منطقه ایده‌آل و ۴ درصد در منطقه مجاز و ۵/۱ درصد در منطقه غیرمجاز می‌باشد.

ارزیابی ساختار سه بعدی پیشنهاد شده توسط نقشه‌ی رامچاندرا انجام گرفت و نتایج آن در تصویر ۵ ارائه گردیده است. نتایج ارزیابی مدل ساخته شده برای پروتئین بدون جهش با نقشه‌های رامچاندرا نشان می‌دهد که ۹۴/۶ از مدل ساخته شده در منطقه ایده‌آل و ۱/۴ درصد در منطقه مجاز و ۳/۱ درصد در منطقه



(ب) مدل جهش یافته (دارای جهش)

(الف) مدل طبیعی (بدون جهش)

تصویر ۵: نقشه رامچاندرا (الف) مدل طبیعی پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (ب) مدل جهش یافته (دارای جهش).

بحث

مناسب قرار می‌دهد و بنابراین رونویسی از نقطه‌ی صحیح آغاز می‌گردد (Lewin 1994).

توالی دیگر جعبه‌ی CAAT می‌باشد، که نام جعبه بر اساس توالی آن تعیین شده است. توالی همسان این ناحیه GGNCAATCT می‌باشد. اگر چه این توالی حالت متقارن ندارد ولی این توالی از هر دو طرف ممکن است در ژن‌ها وجود داشته باشد (Emtiazi 2007). دو جعبه‌ی CAAT به صورت معکوس در پروموتور ژن Hsp70 در موقعیت ۱۸۳- و ۲۶۲- شناسایی شد (تصویر ۱). جعبه‌ی CAAT نقش بسیار مهمی در تعیین کارایی پروموتور دارد، ولی بر اختصاصی بودن آن تأثیری ندارد (Lewin 1994).

جایگاه ETS که در موقعیت ۳۳۲- قرار گرفته است (تصویر ۱) یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های فاکتورهای رونویسی است. توالی همسان این ناحیه GGA(A/T) است. این خانواده در تکثیر و رشد و تمایز سلولی، مرگ سلولی، مهاجرت سلول، چرخه‌ی سلولی و در سرطان اهمیت دارند (Sharrocks 2001). شناسایی این جایگاه در پروموتور HSP70 نشان‌دهنده‌ی اهمیت این ژن در مراحل سلولی ذکر شده است.

در این تحقیق پروموتور شوک حرارتی ۷۰ جهت تعیین توالی، پلی‌مورفیسمی تک نوکلئوتیدی و تعیین جایگاه‌های اتصال عناصر رونویسی مورد آنالیز قرار گرفت. جعبه‌ی TATA یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده‌ی مکان شروع رونویسی در ناحیه‌ی بالادست ژن‌های یوکاریوتی است. همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده این جعبه در موقعیت ۱۳۶- قرار گرفته است. این توالی، جعبه‌ی TATA و یا جعبه‌ی هوگنس نامیده می‌شود و به عنوان محلی که مارپیچ DNA در شروع کپی‌برداری باز می‌شود، به شمار می‌رود.

این توالی جزء مشترک بسیاری از پروموتورهای مربوط به RNA پلیمراز II است و شامل یک توالی غنی از A و T است. توالی آن به صورت TATAAA می‌باشد. توالی جعبه‌ی TATA توسط توالی‌های غنی از G و C احاطه شده است، که برای فعالیت آن می‌باشد. فاکتور نسخه‌برداری TFIID که یک فاکتور نسخه‌برداری عمومی است به چارچوب TATA متصل می‌شود و این اولین مرحله‌ی شروع رونویسی است (Emtiazi 2007). سایر فاکتورها به ترتیب خاصی به کمپلکس متصل می‌شوند و ناحیه‌ی بزرگ‌تری از DNA را می‌پوشانند. جعبه‌ی TATA، آنزیم RNA پلیمراز II را در محل

HSE مشاهده گردید که این موضوع عمومیت ندارد و احتمالاً اثری نداشته باشد.

پس از بررسی و آنالیز پروموتور به بررسی جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن پروتئین شوک حرارتی و تأثیرات این جهش‌ها بر ساختار پروتئین اقدام نمودیم. از میان قطعات مورد بررسی قطعه‌ی اول ژن (۳۵۹ نوکلئوتیدی) تکثیر شده توسط پرایمر F3 و قطعه‌ی آخر ژن (۴۳۳ نوکلئوتیدی) تکثیر شده توسط پرایمر F7 جهش را نشان دادند. جهش‌های نوکلئوتید +۲۵۹ و +۲۷۷ تغییری در ساختار ایجاد نکردند. پلی‌مورفیسمی در مرغ در تحقیقات زیادی گزارش شده است (Mazzi et al. 2003, Morimoto et al. 1986). Mazzi و همکاران نیز نشان دادند که جهش در موقعیت نوکلئوتید +۲۵۹ و +۲۷۷ مشاهده شده است و تغییری در عملکرد و ساختار پروتئین ندارد (Mazzi et al. 2003).

جهش S583W سبب تغییراتی در ساختار می‌گردد. اثرات این جهش که توسط برنامه‌های آنالیز I-mutant و Provean و Sift آنالیز و نتایج آن در جدول ۴ ارایه گردیده است. امتیاز خروجی داده شده توسط برنامه‌ی Sift دامنه‌ای از صفر تا یک را در بر می‌گیرد. محدوده‌ی صفر نشان‌دهنده‌ی مخرب بودن و عدد یک نشان‌دهنده‌ی واریانت طبیعی می‌باشد. امتیاز Sift برای جهش S583W برابر با یک است که نشان‌دهنده‌ی این است که این جهش قابل تحمل است (جدول ۴). امتیاز برآورد شده توسط برنامه‌ی Provean برای جهش S583W برابر با ۸۳/۸ است. این عدد نشان‌دهنده‌ی این است که جهش اثری نداشته است. این برنامه نتایج بزرگ‌تر از ۵/۲- را طبیعی پیش‌بینی می‌کند. نتایج برنامه‌ی I. Mutant مقدار پایداری را به سه دسته: خنثی با دامنه‌ی $0.5 < DDG < 0.5$ و کاهش شدید با دامنه‌ی $DDG < -0.5$ و افزایش شدید با دامنه‌ی $DDG > 0.5$ تقسیم می‌نماید. اگر مثبت باشد سبب افزایش و اگر منفی باشد سبب کاهش پایداری می‌گردد. در آزمایشات اخیر نشان داده شده است که این

دو جعبه‌ی GC (GC box) در موقعیت ۱۲۹- و ۲۴۴- شناسایی شدند توالی همسان این ناحیه 5'-3' (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) است که فاکتور رونویسی Sp1 آن را شناسایی و به آن متصل می‌گردد (شکل ۱). پروتئین Sp1 از خانواده‌ی Sp/KLF است و ۷۸۵ اسیدآمینو دارد. این پروتئین شامل یک موتیف پروتئین انگشت روی می‌باشد که می‌تواند توالی جعبه‌ی GC را در پروموتور شناسایی و با اتصال مستقیم به DNA سبب افزایش رونویسی شود. این پروتئین در بسیاری از مراحل سلولی مانند تکثیر و رشد و تمایز سلولی، مرگ سلولی، پاسخ ایمنی و پاسخ به تخریب DNA دخالت دارد (Rettino 2009). این موضوع نشان‌دهنده‌ی این است که ژن HSP70 در مراحل سلولی ذکر شده در بالا دخالت دارد و حائز اهمیت است.

عناصر شوک حرارتی ۱ (HSE1) و عناصر شوک حرارتی ۲ (HSE2) که به ترتیب در موقعیت ۱۴۹- تا ۱۶۱- و ۱۵۷- تا ۱۷۱- قرار گرفته‌اند و توسط نرم‌افزار شناسایی شدند از مهم‌ترین عناصر تأثیرگذار در بیان ژن شوک حرارتی است که توسط پروتئین HSFs (فاکتورهای رونویسی شوک حرارتی) شناسایی می‌شوند. HSFs ترکیبات کلیدی مهمی هستند و در تنظیم بیان ژن پروتئین شوک حرارتی نقش مهمی دارند. HSFs با وصل شدن به HSEs باعث فعال شدن سریع رونویسی می‌گردد (Whitley 1999).

جهش‌های مشاهده شده در ناحیه‌ی پروموتور ژن hsp70 زمانی که با توالی مرجع مقایسه می‌شوند در هیچ‌کدام از نواحی تنظیمی بحرانی مانند عناصر شوک حرارتی (HSE 1 و HSE 2) که فاکتورهای رونویسی (HSFs) در طول فعال شدن ژن به آن‌ها متصل می‌شوند و همچنین روی نواحی CAAT و TATA box تأثیری ندارند و احتمالاً تأثیری بر بیان ژن پروتئین شوک حرارتی نخواهند داشت. البته در دو پرنده تنها جهش در ناحیه‌ی

ندارد و با توجه به اینکه جایگاه اتصال این پروتئین به لیگاندش (ADP) در ناحیه‌ی ابتدایی می‌باشد (اسیدآمین‌های ۲۷۲ و ۳۳۹ و ۳۶۶) (Wegele 2004) به نظر می‌رسد این جهش که در انتهای پروتئین اتفاق افتاده تأثیری در عملکرد نخواهد داشت. ارزیابی مدل توسط نقشه‌های رامچاندوران (تصویر ۷) نشان داد که مدل دارای جهش نسبت به مدل طبیعی در منطقه‌ی ایده‌آل تغییری ندارد و تغییرات منطقه‌ی مجاز و غیرمجاز بسیار ناچیز است. این موضوع تأیید کننده‌ی این است که این جهش (S583W) تأثیری در ساختار سه بعدی ندارد.

برنامه بهترین و قابل اطمینان‌ترین برنامه جهت پیش‌بینی جهش‌های ناپایدارکننده می‌باشد. جهش S583W دارای DDG=۱۵/۰ می‌باشد که سبب افزایش ناچیز پایداری می‌گردد (جدول ۴). این تغییر اسیدآمین که سبب پایداری بیش‌تر پروتئین شوک حرارتی ۷۰ شده ممکن است یکی از علل مقاومت مرغان بومی به گرما باشد. این نوع جهش قبلاً در مناطق گرمسیری و استوایی جهان همچون چین و هند و برزیل گزارش شده است (Mazzi et al. 2003). همان طور که نتایج برنامه‌ی Swiss-model نشان می‌دهد (شکل ۶) این جهش تأثیری بر ساختار سه بعدی

تشکر و قدردانی

بودجه‌ی این پروژه از طرح شماره‌ی ۴۷-۹۴۱ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تأمین گردیده است لذا از کلیه‌ی مسئولین پژوهشی دانشگاه به دلیل همکاری صمیمانه‌شان تشکر به عمل می‌آید.

منابع

- Azarbayejani, A.; Gheisari, A. and Nabinejad, A. (2014). Evaluation of native chicken performance in rural areas of Isfahan province. *Animal Science Journal*, 28(1): 147-156.
- Emtiazi, G. (2007). *The Basics of biomolecular and genetic engineering*. Manny Publishing. Isfahan, P: 490. (In persian).
- Lewin, B. (1994). *GENES V* (Oxford University Press, New York), Pp: 850-851.
- Mashaly, M.M.; Hendricks, G.L.; Kalama, M.A.; Gehad, A.E.; Abbas, A.O. and Patterson, P. H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83(6): 889-894.
- Masodi, A.; Maridi, M.; Ahmad Panah, J. and Vaeze Tarshizi, R. (2012). Molecular study; evolution and classification of thermal shock protein of 70 in cows. *Iranian Journal of Animal Science*, 42(2): 187-189. (In persian)
- Mazzi, C.M.; Ferro, J.A.; Ferro, M.I.T.; Savino, V.J.M.; Coelho, A.A.D. and Macari, M. (2003). Polymorphism analysis of the hsp70 stress gene in broiler chickens (*Gallus Gallus*) of different breeds. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (3): 275-281.
- Mezquita, B.; Mezquita, J.; Durfort, M. and Mezquita, C. (2010). Constitutive and heat-shock induced expression of Hsp70 mRNA during chicken testicular development and regression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(3): 480-490.
- Morimoto, R.I.; Hunt, C.; Huang, S.Y.; Berg, K.L. and Banerji, S.S. (1986). Organization, nucleotide sequence, and transcription of the chicken HSP70 gene. *Journal of Biological Chemistry*. 261(27): 12692-12699.
- Ramachandran, G.N.; Ramakrishnan, C. and Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1): 95-99.
- Rettino, A.; Rafanelli, F.; Genovese, G.; Goracci, M.; Cifarelli, R.A.; Cittadini, A. and Sgambato, A. (2009). Identification of Sp1 and GC-boxes as transcriptional regulators of mouse *Dag1* gene promoter. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 297(5): C 1113-1123.
- Santoro, M.G. (2007). Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochemical Pharmacology*, 59(1): 55-63.

Sharrocks, A.D. (2001). "The ETS-domain transcription factor family". *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11): 827-37.

Whitley, D.; Goldberg, S.P. and Jordan, W.D. (1999). Heat shock proteins: a review of the

molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, 29(4): 748-751.

Wegele, H.; Müller, L. and Buchner, J. (2004). "Hsp70 and Hsp90 – a relay team for protein folding". *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 151: 1-44.

Sequencing and single nucleotide mutations for promotor region and heat shock protein 70 (HSP70) gene in Khuzestan native chickens

Nazari, M.¹; Salabi, F.² and Radpoor, S.³

Received: 18.06.2018

Accepted: 23.01.2019

Abstract

Heat shock protein 70 (Hsp70) is a chaperone that is expressed in response to stress. The purpose of this study was to determine sequences and single nucleotide promotor mutations and heat shock gene 70 and to investigate the effect of single nucleotide mutations on the three-dimensional structure and thermal shock protein function of Khuzestan native chicken strain using bioinformatics methods. To do this research, 20 native blood samples were taken from different locations of Khuzestan province. After DNA extraction, using several primers, promoter and heat shock protein 70 gene were amplified and sequenced. Three mutations were observed throughout the complete heat shock protein 70 gene. The first mutation in nucleotide position 259 (A259G) was observed, which guanine replaced adenine. The second mutation occurred at the nucleotide position of 277 (C277G), where guanine was replaced by cytosine. The third mutation occurred at the nucleotide position of 1749 (C1749G), where guanine was replaced by cytosine. In the first and second mutations, there is no change in the amino acid, but the mutation at position 1749 causes the serum amino acid to become tryptophan. The mutation occurred at the position of 583 amino acid heat shock protein but did not change the 3D building and its performance. This amino acid change causes more stability in the heat shock protein 70 and maybe one of the reasons for the resistance of the native to the heat.

Keywords: Sequencing, Single nucleotide mutation, Promotor, Heat shock protein 70, Native chicken

1- Assistant Professor, 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 Venomous Animals and Anti-venom Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

3- PhD Student of Animal Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Corresponding Author: Nazari, M., E-mail: m.nazari@asnrukh.ac.ir