شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۱۵۵-۱۴۴

بررسی ارتباط بین پلی مورفیزم تک نوکلئوتیدی(SNP) در ژن receptor like-Toll (TLR5m) با نحوه پاسخ دهی ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در برابر باکتری Aeromonas هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)

کبری رحیمی[۱]، حمید فرحمند[۲]*، علیرضا میرواقفی[۲]، باقر مجازی امیری[۲]، امیررضا عابد علم دوست[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران
۲- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۰۷/۲۸ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰**

چکیده

تی ال آر۵ ام (TLR5m) یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های گیرنده‌های تول شکل است که در سیستم ایمنی، فلاژلین موجود در ساختار اندام تحرکی بسیاری از پاتوژن‌ها را تشخیص داده و منجر به فعالسازی ایمنی اولیه و اکتسابی می‌شود. وجود چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) در این ژن در افراد مختلف می‌تواند منجر به تفاوت در نحوه پاسخ دهی ایمنی به پاتوژن‌ها گردد. در این مطالعه بخشی از ژن تی ال آر ۵ ام ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز و توالی‌یابی و انطباق توالی‌ها مورد بررسی قرار گرفت و شش چندشکلی شامل سه تفاوت تک نوکلئوتیدی (T/A ۲۴۱۲)، (T/A ۲۴۱۵)، (G/A ۲۳۸۵) و سه چندشکلی حذف و اضافه (حذف/اضافه C/T،C ۲۰۹۱)، (حذف/اضافه T ۲۵۶۶)، (حذف/اضافه C ۲۱۰۲) در توالی این ژن شناسایی شد. برای بررسی ارتباط بین این چندشکلی‌ها با نحوه پاسخ دهی ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، چالش با باکتری Aeromonas هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) بصورت درون صفاقی ترتیب داده شد و پارامترهای خونی شامل میزان فعالیت جزء سی سیستم کمپلمان، میزان لیزوزیم، میزان هماتوکریت، هموگلوبین، ام سی‌اچ سی(MCHC)، ام سی‌وی (MCV) و ام‌سی‌اچ‌سی (MCHC) مورد اندازه گیری قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی ارتباط بین پارامترهای خونی و چندشکلی‌های شناسایی شده نشان دادکه وجود دو چندشکلی (حذف/اضافه C/T 2091،C) و (حذف/اضافه T 2566) با میزان بالاتر فعالیت جزء سی کمپلمان در افراد مورد آزمون، همبستگی معنادار نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان پیشنهاد داد که چند شکلی (حذف/اضافه C/T 2091،C) و نیزحذف/اضافه T 2566 می‌توانند بعنوان نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب مولدین مقاوم در برابر باکتری *Aeromonas*، در برنامه‌های به گزینی مولدین، بکار روند.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، *Aeromonas hydrophila*، چندشکلی تک نوکلئوتیدی، گیرنده‌های تول شکل

* نویسنده مسئول: حمید فرحمند
Email: hfarahmand@ut.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 72, No. 2, Summer 2019
pp. 144-155

Correlation between SNPs in Toll-like receptor$_5$ membrane form (TLR$_5$m) gene and immune respond in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to *Aeromonas hydrophila*

K. Rahimi[1], H. Farahmand[2*], A. Mirvaghefi[2], B. Majazi Amiri[2], A.R. Abed Elm Doust[3]

1-Msc. Student, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2-professor, Department of Fisheries Faculty of Natural Resources College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
3-Assistant professor Department of Fisheries Faculty of Natural Resources College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Received: 20-Oct-2019 **Accepted: 31-Dec-2019**

Abstract
Toll-like receptors (TLRs) generally are involved in host immune responses against microbial invasions. Mono meric felagellin, the structure component of bacterial felagella is the agonist of TLR5m. After binding to felagellin, TLR5m initiates specific signal transduction pathways and triggers immune responses. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene regulate inflammatory pathways and are associated with susceptibility/resistance to infection. In this study using polymerase chain reaction, sequencing and aligning the sequences, we investigated TLR5m gene of Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) and identified 6 polymorphisms consist in 3 SNPs: (2412, T/A), (2415,T/A) and (2385, G/A) and 3 insert/deletion: (inser/dele. C, C/T, 2091), (inser/dele. T, 2566) and (inser/dele. C, 2102). A bacterial challenge was performed to explore their association with humoral immune responses such as lysozym content and complement activity levels in serum. The results show that polymorphisms (inser/dele. C, C/T, 2091) and (inserldele. T, 2566) were significantly correlated with higher complement activity levels ($p<0.05$).These results suggested that these 2 polymorphisms could be potential markers applied in future selection of Rainbow Trout with enhanced resistance to Aeromonas hydrophila.

Keywords: Single nucleotide polymorphism (SNP); Toll-like receptor (TLR); *Oncorhynchus mykiss*; *Aeromonas hydrophila*; complement, lysozyme

Corresponding author: Hamid Farahmand Emailhfarahmand@ut.ac.ir

۱. مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌عنوان یکی از شناخته شده‌ترین آبزیان پرورشی در دنیا محسوب می‌شود و در کشور ما در مقیاس گسترده آنرا تکثیر و پرورش می‌دهند و تلاش‌ها به بالاتر بردن ظرفیت پرورش و دست‌یابی به سود بالاتر معطوف شده است. اما با شیوع بیماری‌های مختلف ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی به شکل دوره‌ای یا فصلی مورد تهدید قرارگرفته است. برای فایق آمدن بر این مشکل، ایمن سازی ماهیان در برابر عوامل بیماریزا بعنوان یکی از مهمترین فاکتورهای موثر در اقتصاد تولید مطرح می‌شود (Henryon *et al*. 2005).

از آنجا که امکان استفاده از واکسن برای ماهیان که دارای سیستم ایمنی پیشرفته نیستند دور از دسترس به نظر می‌رسد و استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به مقاوم شدن سویه‌های بیماریزا و آلودگی محیط زیست می شود، تولید لاین‌های مقاوم و مناسب بعنوان راه حلی مفید مطرح است. اما مهمترین چالش در این زمینه وقت‌گیر و پرهزینه بودن این روش‌هاست. لذا روش‌های بهگزینی با استفاده از دانش مولکولی یکی از روش‌های مناسب برای انتخاب افراد که عموما مولدین هستند مدنظر قرار می‌گیرند (Gjedrem and Robinson, 2014). انتخاب به کمک مارکر یا روش‌های MAS (Marker Assisted Selection) یکی از روش‌های مولکولی است که با موفقیت در مورد جانوران پرورشی به کار رفته است (Lush, 1949).

درحالی‌که مطالعات زیادی روی تاثیر چندشکلی‌ها بر استعداد به ابتلا یا مقاومت به بیماری در انسان، موش و سایر جانوران (Zaccone *et al*., 2005) انجام شده است، در مورد ماهیان نیاز به این گونه مطالعات به شکل جدی احساس می‌شود. با اینکه ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی و پروتئین‌های متناظر در ماهیان تا حد زیادی شناخته شده‌اند، اما چندشکلی آنها به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته است. چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) جهش های نقطه‌ای یا تغییر تک نوکلئوتیدی در یک جایگاه خاص در توالی DNA هستند که از نسلی به نسل بعد منتقل می‌شوند (Lewis and Knight, 2012) جهش های تک نوکلئوتیدی یکی از متداولترین انواع جهش‌ها در توالی ژنوم‌اند تا جاییکه در نتایج بد ست آمده در پروژه بین المللی هاپ مپ (HapMap) که توالی‌یابی تمامی ژنوم انسان را در بر می‌گیرد، بیش از یک میلیون چندشکلی تک نوکلئوتیدی (یک اسنیپ به ازای هر کیلو باز) در ژنوم انسان مشخص شده است (The International HapMap Project, 2003).

بسته به محل وقوع، چندشکلی‌های تک نوکلوتیدی می‌توانند اثرات متفاوتی را در سطوح مختلف زیستی ایجاد نمایند و الل‌های مختلفی برای یک صفت در جاندار ایجاد کنند که در افراد مختلف یک جمعیت باعث بروز تفاوت‌های فردی در صفات مختلف می‌شود. از آنجا که این تفاوت‌ها قابلیت به ارث رسیدن را دارند، در پرورش گونه‌های مهم اقتصادی می‌توانند در انتخاب دقیق تر افراد (مولدین) تاثیر مهمی داشته باشند. زیرا، وجود چندشکلی های تک نوکلئوتیدی در ژن های مرتبط با سیستم ایمنی می‌تواند به تفاوت در میزان و نحوه بیان آن ژن در فرد انجامد و متعاقبا بر میزان و نحوه ایجاد پاسخ ایمنی تاثیر گذارد. به این ترتیب افراد متفاوت دارای استعداد ابتلا یا مقاومت متفاوتی در شرایط مشابه خواهند بود (Cole *et al*., 2009).

موارد متعددی در منابع علمی به بررسی وجود ارتباط بین وجود چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن‌های مرتبط با ایمنی مثل ام اچ سی (Seiki *et al*., 2018) و همینطور پی آر ان پی (PRNP) (Ogorelkova *et al*., 2001) پرداخته اند چراکه ژن‌های درگیر در پاسخ ایمنی گزینه مناسبی بعنوان نشانگرهای مقاومت به عوامل بیماریزا هستند و چندشکلی‌های آنها می‌تواند ظرفیت ایمنی افراد را تغییر دهند. تحقیقات نشان می‌دهند که برخی از این ژن‌ها در مهره‌داران و بی مهرگان چندشکلی بالایی دارند و تفاوت در ژینوتایپ آن ها تاثیر زیادی بر مقاومت به بیماری دارد که می‌تواند به عنوان ژن‌های کاندید انتخاب و در جمعیت‌های مورد مطالعه مورد مقایسه قرار گیرند

(Kongchum *et al*., 2010).

از میان ژن های مرتبط با ایمنی تی ال آر ها TRLs (Medzhitov, 2001) و ام اچ سی‌ها (Kurtz *et al*., 2004) با کد کردن مولکول های پروتئینی ویژه نقش مهمی در تشخیص پاتوژن و تولیدات حاصل در آن از بدن برعهده دارند. این مولکول‌های شناساگر بعد از تشخیص پاتوژن با آن کمپلکس تشکیل می‌دهند و به این شکل طی مسیرهای بیوشیمیایی، سیستم دفاعی اولیه را برای مبارزه با عوامل مهاجم بر می‌انگیزند. انواع مختلف مولکول های تی ال آر بر اساس نوع پروتئینی که باند شدن با آنها اختصاصی شد وجود دارد و به چند گروه تقسیم و از یک تا ۱۳ شماره‌گذاری شده‌اند. برخی از آنها در مواجهه با تولیدات ویروسی و برخی دیگر در برابر باکتری ها واکنش نشان می‌دهند (Hayashi *et al*., 2001). با این وصف با اثبات رابطه بین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های درگیر در سیستم ایمنی می‌توان به یک شاخص ارزشمند در این زمینه دست یافت. در این مطالعه، در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده با *Aeromonas hydrophila*، تفاوت‌های ژنتیکی ماهیان و ارتباط چندشکلی‌های بدست آمده در ژن تی ال آر با نحوه و میزان پاسخ‌های ایمنی افراد بررسی شد تا با استفاده از نتایج این پژوهش و با غربالگری افراد به مولدینی دست یافت که پتانسیل ایمنی مناسب‌تری دارند و برای ایجاد یک نسل برتر برای پرورش مورد استفاده قرارگیرند. امتیاز این روش در مقایسه با روش‌های دیگر مورد استفاده در بهگزینی مولدین، کاهش قابل توجه در زمان انجام آن است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. آماده سازی ماهیان مورد تحقیق

در این طرح دو دسته ۴۰ تایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی از دو کارگاه متفاوت پرورشی (گروه اول از مجتمع پرورشی ماهی‌سرای کرج وگروه از دوم مزرعه پرورش ماهی نظر آباد - هشتگرد) با وزن متوسط ۲۰۰±۲۰ گرم و با متوسط طول کل ۴±۲۱ cm سانتیمتر خریداری شد و بصورت تصادفی به مخازن ۱۰۰۰ لیتری با آب تازه منتقل شدند. مخازن یک هفته قبل از ورود ماهی‌ها شستشو و ضدعفونی شد و بعد از آبگیری، سیستم‌های هوادهی و تهویه برای هر مخزن راه اندازی گردید. غذادهی در حد مصرف ماهیان یکبار در روز صورت گرفت و روزانه ۱۰ در صد از آب مخازن تعویض شد و دمای در آب حد ^{o}C ۱۶-۱۴ درجه سانتیگراد کنترل گردید.

۲.۲. آماده سازی باکتری

سوش استاندارد باکتری *Aeromonas hydrophila* بصورت اسلنت از موسسه تحقیقات و سرم‌سازی رازی تهیه گردید. سپس در محیط کشت مایع تی اس بی (شرکت Merck۱۰۱۰۲۸۵) رشد داده شدند. تهیه محیط کشت با توجه به پروتکل موجود در محصول انجام شد و پس از آماده‌سازی در اتوکلاو استریل شد. سپس زیر هود در کنار شعله، باکتری به محیط کشت مایع اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا باکتری رشد کند. بعد از ۲۴ ساعت در کنار شعله، ۷۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تی اس بی حاوی باکتری درون میکروتیوب ۱/۵ استریل وارد شد و ۳۰۰ میکرولیتر گلیسرول ۸۷ درصد به آن افزوده شد. سپس درب میکروتیوب با پارافیلم به دقت مسدود شد و با استفاده از ورتکس محلول درون میکروتیوب بخوبی همگن گردید. نمونه های باکتری به تعداد کافی به روش گفته شده تهیه و در دمای ۷۰- ذخیره گردید.

۲.۳. رقیق سازی باکتری و تزریق

نمونه‌ها به روش سریالی رقیق شدند و نهایتا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده بر محیط کشت تی اس ای (شرکت M290. Himedia) کشت داده شد. پلت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا کلونی‌های باکتری رشد کنند. کلونی‌ها بر اساس واحد تشکیل دهنده سی اف یو شمارش گردیدند و غلظت $۱۰^{۷}$ CFU/mg از باکتری تهیه شد . این غلظت بر اساس

LD50 باکتری مورد تحقیق انتخاب شد و بهمراه ۱ cc سرم فیزیو لوژی استریل برای تزریق به ماهیان آماده شد (Yin *et al*., 2009). تیمار آزمایشی در این تحقیق شامل چهار گروه ۲۰ تایی از ماهیان بود که سه گروه مورد تزریق با باکتری قرار گرفت و گروه چهارم به عنوان شاهد بدون مجاورت با باکتری در نظر گرفته شد. باکتری با غلظت تعیین شده بصورت درون صفاقی به ماهیان تزریق شد و بعد ماهیان علامت گذاری و بلافاصله به مخازن آزمایشی وارد شدند.

۲.۴. نمونه برداری

بعد از تزریق همچنان غذادهی در حد اشتهای ماهیان ادامه یافت و روزانه ۱۰درصد آب مخازن تعویض گردید. نمونه برداری ازخون ماهیان تمام گروه‌ها اعم از تیمار و کنترل قبل از تزریق باکتری و ۴۸ ساعت بعد از تزریق انجام شد و برای تعیین موارد مختلف شامل میزان لیزوزیم، جزءC3 از کمپلمان و دیگر فاکتورهای خونی از قبیل هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز و سفید استفاده شد. ماهیان مرده روی سینی‌های استریل تشریح و با استفاده از تجهیزات استریل از بافت کلیه نمونه برداری گردید تا روی محیط کشت بلاد آگار تست بتا همولیز انجام گیرد. نمونه‌های باله و بافت نیز از ماهیان بیمار با ثبت زمان دقیق مرگ برای آزمایش های ژنتیکی گرفته شد و در الکل ۹۰ درصد تثبیت گردید. الکل نمونه‌های گرفته شده بعد ۲۴ ساعت تعویض شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا مراحل بعدی ذخیره گردید.

۲.۵. تحقیقات مولکولی

بر اساس توالی شناخته شده برای ژن تی ال آر ام ۵، پرایمرهای اختصاصی طراحی شد و بعد از اطمینان از اختصاصی بودن توالی‌های مربوطه با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی موجود نظیر ان سی بی آی برای ساخت به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند (جدول ۱).

برای استخراج DNA ژنومیک از کیت تجاری شرکت سیناکلون (DNA EXTRACTION Kit DNP EX6071) استفاده شد. کیفیت DNAهای استخراج شده با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت و برای تعیین کمیت محصول استخراج شده از دستگاه طیف سنج نانودراپ (NanoDrop- ND1000) در طول موج ۲۶۰میکرومتر استفاده شد. بعد از استخراج DNA و رقیق‌سازی آن برای تکثیر قطعه مورد نظر (ژن تی ال آر۵) از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه اختصاصی مندرج در جدول ۲ استفاده شد. این برنامه با توجه به میزان پیوندهای CG و دمای ذوب پرایمرها تنظیم و با استفاده از کیت تجاری PCR (شرکت سیناژن) اجرا گردید.

پس از پایان عملیات تکثیر قطعه مورد نظر، موفقیت این عمل بواسطه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. سپس نمونه‌ها (۴۰ نمونه)از محصولات PCR به منظور توالی یابی به شرکت فزاپژوه منتقل شد و نتایج آن با استفاده از نرم افزار X- Clustal برای آنالیز چندشکلی تک نوکلئوتیدی، مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. ازآنجا که داده‌های حاصل، از نوع دورشته ای بود برای تعیین معنادار بودن ارتباط بین وجود چندشکلی تک نوکلئوتیدی در ژن تی ال آر۵ ام با نحوه پاسخ‌دهی ایمنی در ماهی از روش آماری همبستگی بای سریال (Biserial correlation) و برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های تیمار و شاهد از روش t-TEST استفاده گردید.

جدول ۱ -پرایمر طراحی شده برای ژن تی ال آر ۵ام قزل‌آلای رنگین‌کمان.

Forward primer	5’- CTCCGTGGATTCCTCTTCA<A >- 3’
Reverse primer	5’-CCTTAAGAATCTTGGACATGAG <C>-3’

جدول ۲ -مراحل واکنش زنجیره ای پلیمراز.

مراحل	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)
واسرشت اولیه	۹۶	۱۰
واسرشت ثانویه	۹۴	۱
اتصال آغازگر	۶۱/۵	۱
توسعه اولیه	۷۲	۱
توسعه ثانویه	۷۲	۱۰

۳. نتایج

۳,۱. نتایج حاصل از تعیین فاکتورهای خونی

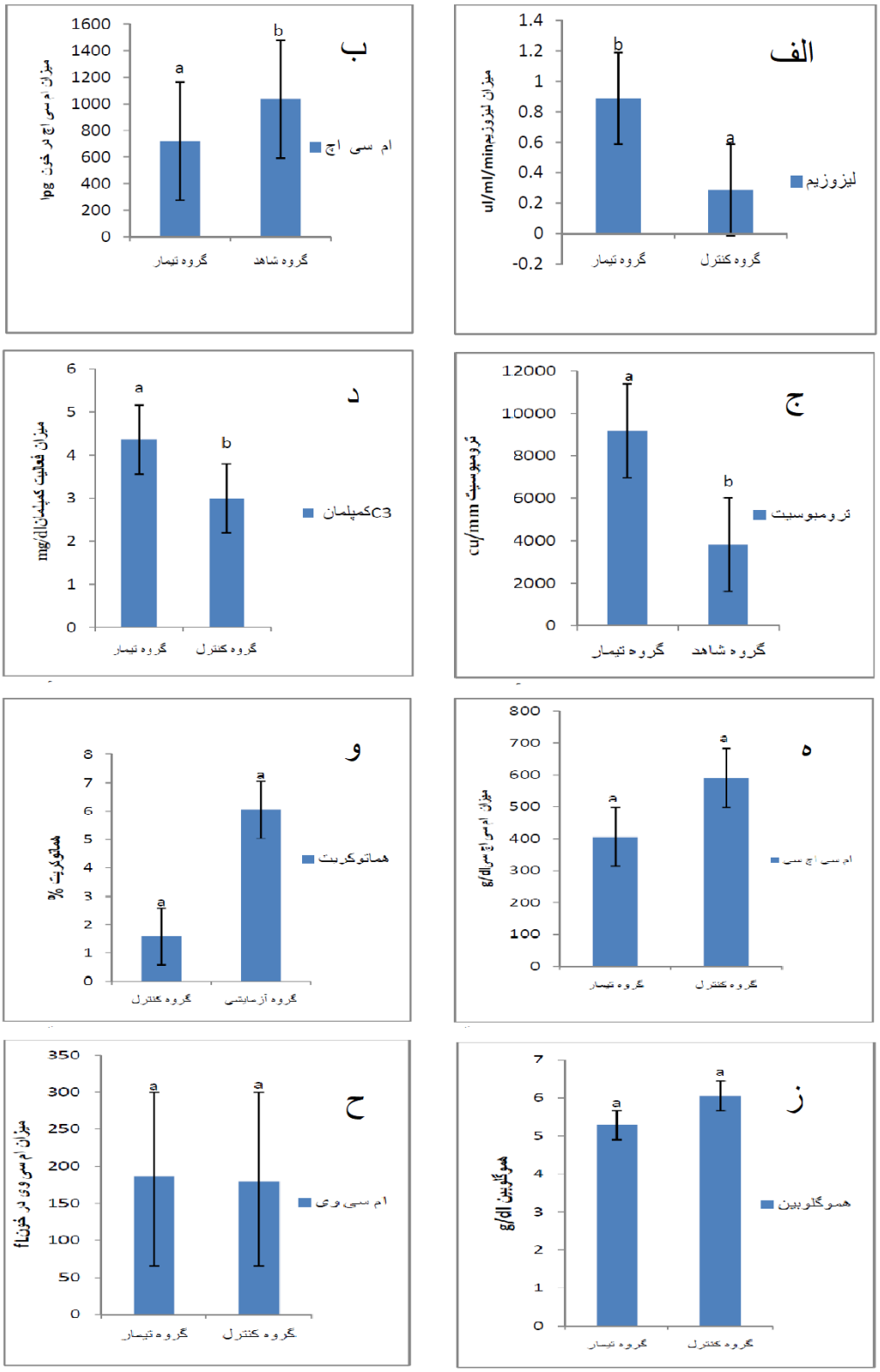
نتایج حاصل از تعیین فاکتورهای خونی در گروه ماهیان مواجه شده با باکتری و گروه شاهد در نمودارهای شکل ۱ نمایش داده شده است. میزان لیزوزیم در خون ماهیانی که تزریق باکتری را دریافت کرده‌اند به طور معنا داری بالاتر از گروه شاهد (تزریق شده با سرم فیزیولوژی) بود ($p<۰/۰۵$). شاخص ام سی اچ (HMC) نیز بین دو گروه شاهد و تیمار اختلاف معنادار نشان داد، بطوریکه ماهیان گروه تیمار میزان کمتری از ام سی اچ را (HMC) نشان می‌دهند. میزان ترومبوسیت اندازه گیری شده در گروه شاهد به صورت معنی داری بیشتر از گروه تیمار بود($p<۰/۰۵$). میزان فعالیت جزءC3 از سیستم کمپلمان در ماهیان مواجه شده با باکتری در مقایسه با ماهیان گروه شاهد افزایش معنادار داشت. فاکتورهای خونی دیگری که در میان گروه‌های ماهیان مقایسه شد عبارت بودند از میزان هماتوکریت، ام سی اچ سی (MCHC)، ام سی وی (MCV) و میزان هموگلوبین که تفاوت معناداری بین گروه‌ها نداشتند ($p>۰/۰۵$).

۳.۲. نتایج بررسی‌های مولکولی

کیفیت و کمیت نمونه‌های استخراج DNA در شکل ۲ قابل مشاهده است. بخشی از ژن تی ال آر که توسط پرایمرهای اختصاصی که از ژنوم قزل‌آلای رنگین کمان طراحی شده‌اند، دارای دو باند نزدیک به هم بود (شکل ۳) که این دو باند روی ژل متافور (با درصد تفکیک بالاتر نسبت به ژل آگارز) بهتر نمایان شدند (شکل ۴). بعد از جداکردن باندهای متناظر برای هر نمونه توالی‌های بدست آمده از نمونه‌های آزمایشی با (تی ال آر۵ اس) با میزان۹۸ درصد همسانی در فضای Blast در پایگاه داده‌های ژنتیکی (ان سی بی آی) تایید شد و سپس با استفاده از نرم افزار Clustal X1.83 توالی‌های مورد نظر با یکدیگر تطابق داده شدند تا چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی در افراد مورد بررسی مشخص گردند. ازمیان داده های نرم افزار و اسنیپ‌ها ی مشخص شده بعد از مشاهده دقیق کروماتوگراف توالی یابی، چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی که در اثر خطای نرم افزاری مشخص شده بودند از بین نتایج حذف شدند تا نهایتا شش چندشکلی که شامل سه چندشکلی تک نوکلئوتیدی و سه حذف/اضافه بود، در میان توالی‌ها تایید شوند. چندشکلی‌های تایید شده به ترتیب زیر نامگذاری شدند:

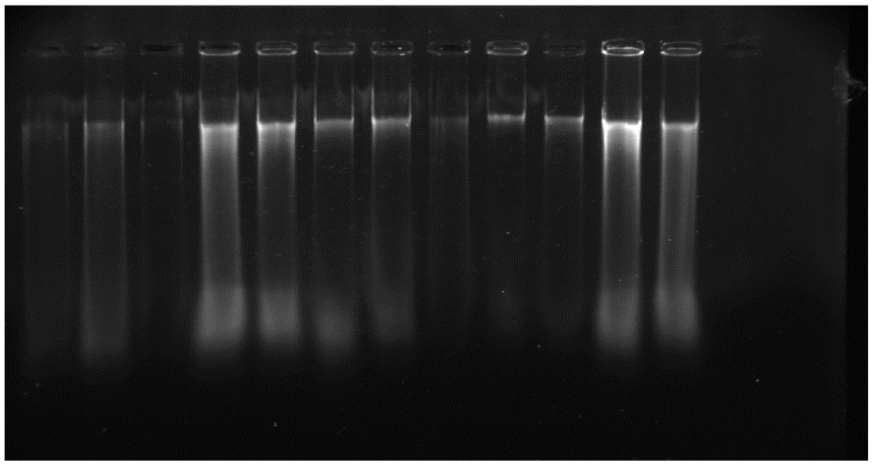
چندشکلی شماره یک: (حذف/اضافه ۲۵۶۶،T)
چندشکلی شماره دو: (A/T, ۲۴۱۲)
چندشکلی شماره سه: (A/T, ۲۴۱۵)
چندشکلی شماره چهار: (A/G, ۲۳۸۵)
چندشکلی شماره پنج: (حذف/اضافه ,C,T/C۲۰۹۱)
چندشکلی شماره شش: (حذف/اضافه C، ۲۱۰۲)

برای بررسی ارتباط بین وجود چندشکلی یافت شده با داده‌های حاصل از تغییرات پاسخ‌دهی ایمنی (شامل پارامترهای خونی: لیزوزیم و کمپلمان) از ضریب همبستگی بای سریال (Biserial correlation) استفاده گردید و نتایج آن در نمودار ۹ و ۱۰ قابل مشاهده است.

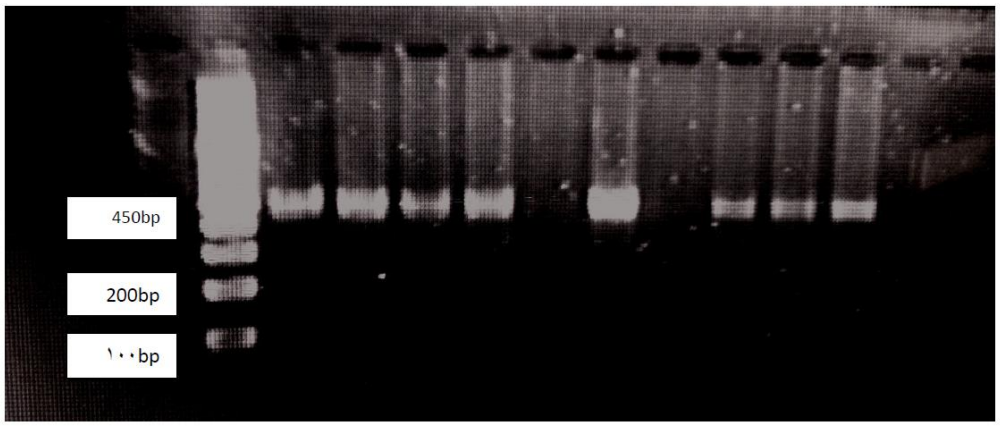


شکل ۱- نمودارهای فاکتورهای خونی اندازه‌گیری شده در ماهیان مواجه با باکتری و گروه شاهد.

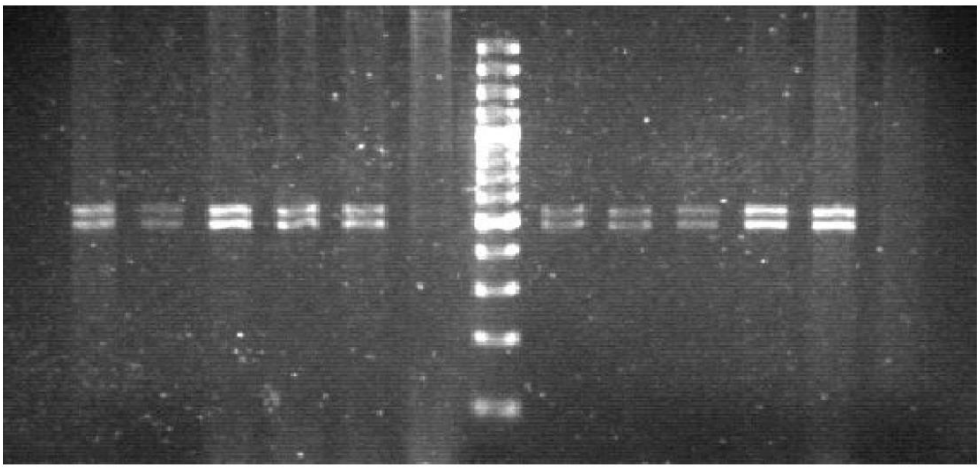
الف) لیزوزیم، ب) ام‌سی‌اچ، ج) ترومبوسیت، د) کمپلمان C3، ه) ام‌سی‌اچ‌سی، و) هماتوکریت، ز) هموگلوبین و ح) ام‌سی‌وی.



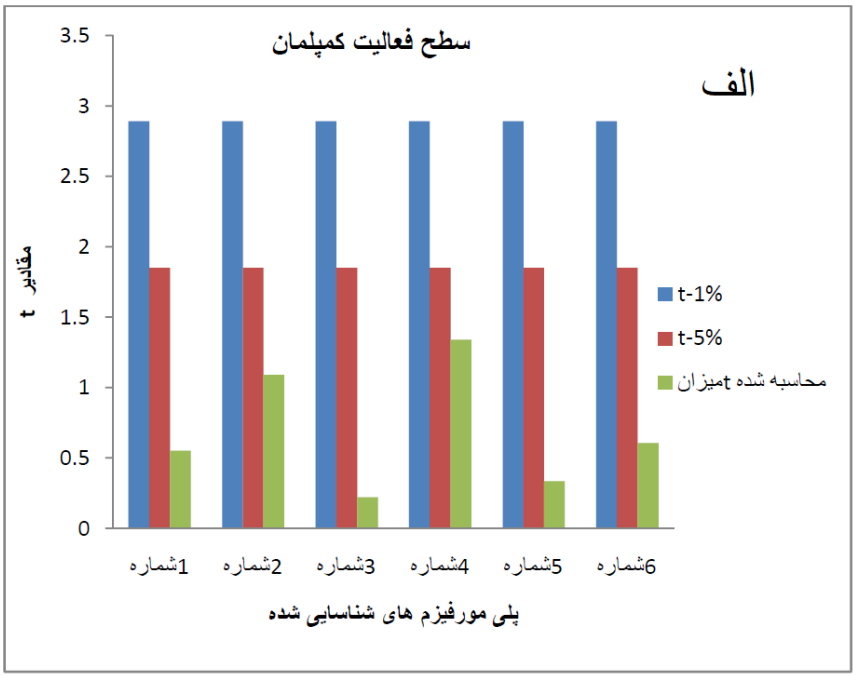
شکل ۲ -تصویر نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات حاصل از استخراج DNA بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

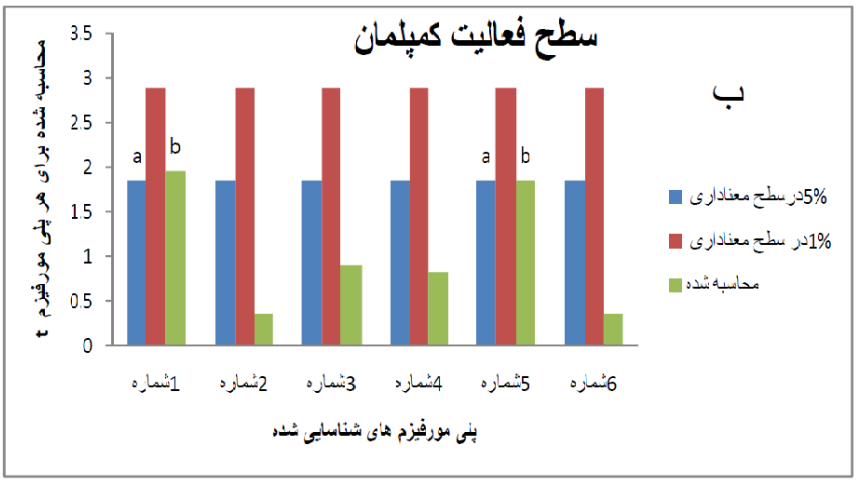


شکل ۳- تصویر نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز بر روی ژل آگارز ۲ درصد.



شکل ۴- تصویر نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز بر روی ژل متافور. باندهای متناظر بخوبی تفکیک شده اند .





شکل ۵- الف) نتایج حاصل ازبررسی معناداری همبستگی بین سطح فعالیت C ۳ و پلی مورفیزم‌های شناسایی شده.
همانطور که در شکل پیداست t محاسبه شده برای هیچ یک از پلی‌مورفیزم‌ها بیشتر ازمقادیر جدول نبوده و بنابراین این همبستگی معنادار نیست،
ب) مقایسه میزان معناداری همبستگی بین سطح لیزوزیم و پلی مورفیزم.

۴. بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی ارتباط بین چندشکلی‌های شناسایی شده با نحوه پاسخ‌دهی ایمنی در ماهیان آزمایشی که در مواجهه با دوز بیماریزای باکتری *Aeromonas hydrophila* قرارداده شده بودند نشان داد که هیچ یک از این چندشکلی‌ها با میزان تغییرات لیزوزیم در خون ماهیان ارتباط معناداری ندارد . می‌توان گفت که شاید چندشکلی‌های شناسایی شده در ژن (تی ال آر۴ ام) با تغییرات لیزوزیم در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بی‌ارتباط بوده است . عدم وجود ارتباط بین چندشکلی‌های مورد تحقیق با صفات مورد نظر در مطالعات علمی نتیجه‌ای دور از ذهن نیست. برای مثال نشان داده شده

است که بین چندشکلی در ژن لپتین و میزان چربی موجود در گوشت گوساله هیچ ارتباط معناداری وجود ندارد (Pannier *et al.* 2009). این درحالی بود که پیش از آن وجود ارتباط بین همین چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی با میزان چربی در شیر گاو معنادار نشان داده بود (Fitzsimmons *et al*. 1998). از طرف دیگر باید توجه داشت که بسیاری از چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی مرتبط با استعداد ابتلا یا مقاومت به بیماری وجود دارند که خودشان به تنهایی در تغییر و تنظیم فنوتیپ تاثیر نمی‌گذارند ولی در عین حال در ارتباط بسیار نزدیکی با دیگر چندشکلی‌های موجود در ژنوم عمل می‌کنند که اصطلاحا به این ارتباط پیوستگی گفته می‌شود. به این ترتیب کاملا محتمل است که دلیل واقعی ایجاد یک فنوتیپ، نه به یک چندشکلی خاص بلکه به مشارکت چندین چندشکلی در جایگاه‌های ژنی متفاوت و متنوع مربوط باشد. برای مثال چندشکلی C/T ۲- در ژن لیپاز که با بیماری عروق کرنری در ارتباط است در منطقه تنظیمی شناخته شده قرار نگرفته است ولی ثابت شده است که این چندشکلی تک نوکلئوتیدی در پیوستگی عملکردی قوی با G/A ۸۸۶+ است (Su *et al*., 2003). گزارش دیگری وجود دارد که چند شکلی ZNRD1-C2 با بیماری ایدز در ارتباط است. این در حالیست که الل ZNRD1-C اثر مستقلی ندارد و تاثیر آن در پیشرفت بیماری به دلیل پیوستگی با چندشکلی HLA-A10 است (Catano *et al*., 2008). بنابر این یک توضیح احتمالی دیگر برای دیده نشدن ارتباط بین میزان لیزوزیم با چندشکلی تی ال آرn مربوط به وجود پیوستگی بین این جایگاه با چندشکلی دیگری باشد که در تظاهر فنوتیپی تغییر ایجاد کرده است. دلیل اصلی و مهم انتخاب تی ال آرn برای بررسی حاضر، به نقش پررنگ این خانواده در سیستم ایمنی ماهیان باز می‌گردد. تی ال آرها خانواده‌ای از پروتئین‌های غشایی هستند که ساختارهای حفظ شده پاتوژن‌ها را تشخیص می‌دهند و مولکول‌های موثر در سیستم ایمنی اولیه را تحریک می‌کنند (Rødland *et al*., 2011). بنابراین می‌توانند در مطالعات ژنتیکی مربوط به مقاومت به بیماری‌ها بعنوان ژن‌های کاندید در نظرگرفته شوند. تحقیقات روی نقش تی ال آرn در بیماری‌های باکتریایی از زمان شناخته شدن اورتولوگهای تی ال آر دروزوفیلا در دیگر جانداران آغاز شد. در میان این خانواده، تی ال آرn بعنوان گیرنده غشایی با لیگاند اختصاصی فلاژلین شناخته شده است و مطالعات زیادی در مورد مسیرهای فعال شدن این گیرنده توسط فلاژلین و به دنبال آن مسیرهای سیگنالینگ و علامت‌دهی سلولی صورت گرفت. نشان داده شده است که تی ال آرn فلاژلین باکتریایی را تشخیص می‌دهد و در تولید سیتوکین‌های ضروری برای ایجاد یک پاسخ ایمنی موثر را واسطه گری می‌کند (Hayashi *et al*., 2001). هم در باکتری‌های گرم منفی و هم در باکتری های گرم مثبت فاکتورها ی ۵ فلاژلین آر هسته‌ای شناسایی شده و kB-NF را راه اندازی کرده و تولید α-TNF را تحریک می‌کند (Kaisho and Akira, 2001).

بررسی‌های ژنتیکی روی اعضای خانواده تی ال آر در میان تحقیقات گرچه زیاد به چشم می‌خورد، اما بیشتر این مطالعات بر میزان و نحوه بیان این ژن‌ها و مولکول محصولات پایین دستی آنها متمرکز شده‌اند و کمتر به ساختار و ماهیت خود این ژن‌ها پرداخته شده است. برای مثال در مطالعه‌ای در اندام‌های لنفوئیدی ماهی قزل آلا نشان داده شد که بیان تی ال آر در ماهی که در مقابل آلودگی باکتریایی مقاومت بیشتری نشان می‌دهد از دیگران بیشتر است (Zhang *et al*., 2011). در بررسی دیگری روی گربه ماهی روگاهی مواجه با باکتری ادواردزیلا ایکتالوری دیده شد که بیان ژن تی ال آر طی روزهای سه تا پنج بعداز مواجهه به اوج میزان خود رسید و سپس در روز ۲۱ به نزدیک میزان نرمال بازگشت. این الگو با زمان لازم برای توسعه و فعالیت سیستم ایمنی اختصاصی در توافق است (Baoprasertkul, 2006). نکته مهم در مورد تفسیر نتایج حاصل از q-PCR در مورد ماهی قزل آلا و درکل آزاد ماهیان لزوم توجه به تاثیرات حاصل از رویداد داپلیکیشن در ژنوم این موجودات در زمان محاسبه میزان بیان ژن در این ماهیان است. روش‌های طراحی شده برای اندازه گیری میزان بیان ژن

باید بقدر کافی حساس باشند تا بتوانند تعیین کنند که اختلاف مشاهده شده در مقادیر ام آر ان ای ژن‌ها آیا واقعا در اثر بالارفتن میزان رونویسی اتفاق افتاده است یا اینکه به دلیل دو نسخه‌ای بودن آن ژن خاص در ژنوم مشاهده شده است (Palti, 2011). بررسی‌های تکاملی نشان داده است که خانواده ژن های تی ال آر قبل از اینکه جد پستانداران از جد ماهیان بدون آرواره جدا شود ظاهر شده‌اند (Oshiumi *et al.*, 2008). توالی نوکلئوتیدی مربوط به تی ال آر ۵ قزل‌آلای رنگین‌کمان در پایگاه‌های داده‌های ژنتیکی موقت ثبت شده است و هرچند این ژن در انسان به خوبی مورد مطالعه قرار گرفته و تعداد بسیار زیادی چندشکلی تک نوکلئوتیدی در این ژن شناسایی و ثبت شده است (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/). اما تا امروز هیچ چند شکلی تک نوکلئوتیدی برای این ژن درماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شناسایی و ثبت نشده است. در مورد مهره‌داران دیگر نظیر سگ، جوجه و موش نیز تعداد کمی چندشکلی تک نوکلئوتیدی در این ژن ثبت شده است. به‌هرحال در تحقیق حاضر سعی شد تا با استفاده از روش‌های توالی‌یابی و تطابق‌دهی چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی موجود در بخشی از ژن تی ال آر۵ قزل‌آلای رنگین‌کمان کشف گردد. در این مطالعه برای کشف چندشکلی تک نوکلئوتیدی از توالی‌یابی استفاده شد. گرچه این روش یکی از روش‌های پرهزینه برای تعیین چند شکلی تک نوکلئوتیدی به شمار می‌رود، اما در عین حال دقیق ترین روش شناخته شده نیز هست و گفته می‌شود درصد خطا در این روش چیزی کمتر از ۵ در صد است (Liao and Lee, 2010). البته به دلیل اینکه در این مطالعه تعداد ژن‌های محدودی مورد استفاده قرار گرفت و مقاومت به بیماری بعنوان یک ویژگی کمی احتمالا تحت تأثیر ژن‌های زیادی است، پیشنهاد می شود از سایر رویکردها مثل توالی یابی نسل جدید (NGS) که می‌تواند صدها تا هزاران جهش تک نوکلئوتیدی را در یک واکنش برای هر فرد شناسایی کند به عنوان روشی مناسب برای شناسایی جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی مرتبط با مقاومت به بیماری و شناسایی محل فیزیکی و ژن های مرتبط با آن‌ها برای قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شود.

References

Baoprasertkul, P., 2006. Characterization of Innate Immune Genes of Catfish: CXC Chemokines and Toll-Like Receptors.

Catano G, Kulkarni H, He W, et al (2008) HIV-1 Disease-Influencing Effects Associated with ZNRD1, HCP5 and HLA-C Alleles Are Attributable Mainly to Either HLA-A10 or HLA-B*57 Alleles. PLoS One 3:e3636. doi: 10.1371/journal.pone.0003636.

Cole JB, VanRaden PM, O'Connell JR, et al (2009) Distribution and location of genetic effects for dairy traits. J Dairy Sci 92:2931–2946. doi: 10.3168/JDS.2008-1762.

Fitzsimmons CJ, Schmutz SM, Bergen RD, McKinnon JJ (1998) A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. Mamm Genome 9:432–434. doi: 10.1007/s003359900791

Gjedrem T, Robinson N (2014) Advances by Selective Breeding for Aquatic Species: A Review. Agric Sci 05:1152–1158. doi: 10.4236/as.2014.512125.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature 410:1099–1103. doi: 10.1038/35074106.

Henryon M, Berg P, Olesen NJ, et al (2005) Selective breeding provides an approach to increase resistance of rainbow trout (Onchorhynchus mykiss) to the diseases, enteric redmouth disease, rainbow trout fry syndrome, and viral haemorrhagic septicaemia. Aquaculture 250:621–636. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2004.12.022

Kaisho T, Akira S (2001) Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. Trends Immunol 22:78–83. doi: 10.1016/S1471-4906(00)01811-1.

Kongchum P, Palti Y, Hallerman EM, et al (2010) SNP discovery and development of genetic markers for mapping innate immune response genes in common carp (Cyprinus carpio). Fish Shellfish Immunol 29:356–361. doi: 10.1016/J.FSI.2010.04.013.

Kurtz J, Kalbe M, Aeschlimann PB, et al (2004) Major histocompatibility complex diversity influences parasite resistance and innate immunity in sticklebacks. Proc R Soc London Ser B Biol Sci 271:197–204. doi: 10.1098/rspb.2003.2567.

Lewis CM, Knight J (2012) Introduction to genetic association studies. Cold Spring Harb Protoc 2012:297–306. doi: 10.1101/pdb.top068163.

Liao P-Y, Lee KH (2010) From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. Biochem Eng J 49:149–158. doi: 10.1016/J.BEJ.2009.12.021

LUSH JL (1949) Heritability of quantitative characters in farm animals. Heritability Quant characters farm Anim

Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol 1:135–145. doi: 10.1038/35100529.

Ogorelkova M, Kraft HG, Ehnholm C, Utermann G (2001) Single nucleotide polymorphisms in exons of the apo(a) kringles IV types 6 to 10 domain affect Lp(a) plasma concentrations and have different patterns in Africans and Caucasians. Hum Mol Genet 10,815–824. doi: 10.1093/hmg/10.8.815.

Oshiumi H, Matsuo A, Matsumoto M, Seya T (2008) Pan-Vertebrate Toll-Like Receptors During Evolution. *Curr Genomics* 9,488–493. doi: 10.2174/138920208786241234.

Palti Y (2011) Toll-like receptors in bony fish: From genomics to function. *Comparative Immunology* 35:1263–1272. doi: 10.1016/J.DCI.2011.03.006.

Pannier L, Sweeney T, Hamill RM, et al (2009) Lack of an association between single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin gene and intramuscular fat in Bos taurus cattle. *Meat Science* 81,731–737. doi: 10.1016/J.MEATSCI.2008.11.014.

Rødland EK, Ager-Wick E, Halvorsen B, et al (2011) Toll like receptor 5 (TLR5) may be involved in the immunological response to *Aspergillus fumigatus in vitro*. Med Mycol 49:375–379. doi: 10.3109/13693786.2010.531772

Seiki T, Naito M, Hishida A, et al (2018) Association of genetic polymorphisms with erythrocyte traits: Verification of SNPs reported in a previous GWAS in a Japanese population. Gene 642:172–177. doi: 10.1016/J.GENE.2017.11.031

Su Z-G, Zhang S-Z, Zhang L, et al (2003) A novel polymorphism A(+884)-->G in the hepatic lipase gene and its association with coronary artery disease. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai) 35:606–10

Yin G, Ardó L, Thompson KD, et al (2009) Chinese herbs (Astragalus radix and Ganoderma lucidum) enhance immune response of carp, Cyprinus carpio, and protection against Aeromonas hydrophila. Fish Shellfish Immunol 26:140–145. doi: 10.1016/J.FSI.2008.08.015

Zaccone P, Phillips J, Conget I, et al (2005) IL-18 binding protein fusion construct delays the development of diabetes in adoptive transfer and cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mouse. Clin Immunol 115:74–79. doi: 10.1016/J.CLIM.2004.11.007

Zhang Z, Niu C, Storset A, et al (2011) Comparison of Aeromonas salmonicida resistant and susceptible salmon families: A high immune response is beneficial for the survival against Aeromonas salmonicida challenge. Fish Shellfish Immunol 31:1–9. doi: 10.1016/J.FSI.2010.12.019