



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، آستادیار بخش مولکولی و بیوتکنولوژی، موسسه واکسن و سرم سازی رازی اراک
^۲ آستاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، آستادیار، بخش بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

چکیده

سابقه و هدف: در سال های اخیر سیتوکین های ایمنی مانند اینترلوکین-۲ جوجه (chIL-2)، همراه با رژیم های واکسیناسیونی در صنعت ماکیان مورد استفاده قرار گرفته است. این سیتوکین ها می توانند به واسطه تکثیر لمفوسیت های T، توسعه لمفوسیت های B و فعال سازی سلول های کشنده ایمنی (NK) موجب افزایش کارایی واکسن ها گردند. این مطالعه با هدف استخراج و کلونینگ ژن اینترلوکین-۲ جوجه پرورشی انجام گرفت.

مواد و روش ها: در ابتدا برای جداسازی *chIL-2*، RNA تام به وسیله کشت سلول های 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 اشریشیا کلی Top10، منتقل گردید.

یافته ها: نتیجه RT-PCR نشان دهنده حضور یک باند ۶۶۸bp بود. درستی انجام فرآیند کلون سازی ژن در باکتری میزبان، از طریق واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم های برش دهنده *HindIII* و *EcoRI* و سپس انجام PCR از کلنی های 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، کلون سازی

پذیرش برای چاپ: بهمن ۸۸

دریافت مقاله: آبان ۸۸

مقدمه

اصلی در صنعت ماکیان، خسارت و تلفات بهره وری در تولید به علت وجود بیماری های مختلف در این صنعت است که نیازمند مدیریت دقیق و حساب شده می باشد (۱). پرندگان تحت شرایط تنش زا پرورش پیدا می کنند و مستعد آلوده شدن به بسیاری از پاتوژن ها می باشند. از این رو واکسیناسیون های مؤثر در جهت کاهش بیماری های عفونی و نیز جلوگیری از عفونت در ماکیان،

صنعت ماکیان با تولید سالانه تقریباً ۴۰ بیلیون پرنده، رشد قابل توجهی را در سراسر جهان داشته است. یکی از مشکلات

(* آدرس برای مکاتبه: تهران، پاسداران، خیابان مکران جنوبی، کوچه بوستان دهم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، تلفن: ۰۲۱-۲۲۸۵۶۰۰۴.

پژوهش، استخراج و کلون سازی ژن IL-2 جوجه ایران بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه مورد بررسی: گونه های پرورشی جوجه های ایران در موسسه رازی پرورش و نگهداری می شوند. این جوجه ها علیه ویروس بیماری IBD در زمان جوجه گیری (hatching) ایمن شدند. در این مطالعه از جوجه هایی استفاده گردید که در روز سی ام از تخم بیرون آمده بودند.

ب) استخراج سلول های تک هسته ای طحال (SMC):
طحال دو جوجه پرورشی ایرانی ۴ هفته ای 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. سلول ها با انجام سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ 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 آن ها 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 سلول های تک هسته ای) 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 سلول ها با استفاده از تکنیک رنگ تریبان بلو، سلول ها با غلظت ۱۰^۷ سلول در هر میلی لیتر در محیط RPMI 1640 (حاوی ۱٪ L-گلوتامین، ۲ میلی گرم در هر میلی لیتر آلبومین سرم گاوی، ۱ واحد در هر میلی لیتر پنی سیلین و ۱ میلی گرم در هر میلی لیتر استرپتومایسین) به حالت سوسپانسیون در آمدند. سپس سلول ها در پلیت های کشت ۶ تایی، کشت داده شدند. در نهایت به کمک conA با غلظت ۱۰ میلی گرم در هر میلی لیتر تحریک و در دمای ۴ °C، با رطوبت ۹۰٪ و ۵٪ CO₂ کشت داده شدند.

ج) استخراج RNA و RT-PCR: سلول های کشت شده در زمان های ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از تحریک با conA، به کمک

فرآیندی حیاتی به شمار می آید. آنتی بیوتیک های خوراکی برای مدت های طولانی به منظور غلبه بر عفونت ها در حیوانات مورد استفاده قرار گرفتند (۲). اما استفاده طولانی مدت از آنتی بیوتیک های خوراکی در ماکیان، به ویژه آنتی بیوتیک های مورد استفاده در درمان انسانی، با افزایش بروز مقاومت آنتی بیوتیکی و ارتباط آن با زنجیره غذایی، وضعیت بحرانی در جوامع را ایجاد کرده است. از این رو اهمیت استفاده از روش های واکسیناسیون به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک های خوراکی وجود دارد. هم چنین توسعه راهبردهایی به منظور ممانعت از رشد عوامل بیماری زا و نهایتاً کاهش انتشار چنین عفونت هایی توجهات زیادی را به خود معطوف کرده است. از میان راه کارهای موجود، گسترش واکسن ها در اولویت قرار دارند. مطالعات مختلف نشان داده اند که سیتوکین های مختلفی مانند اینترلوکین-۱۲ (IL-12)، فاکتور تحریک کننده گلی کلنی گرانولوسیت-ماکروفاژ (GM-CSF) و اینترلوکین-۲ (IL-2) در تعدیل فرایند التهاب نقش دارند (۳) و افزودن سیتوکین های مشتق شده از اسید نوکلئیک یا شکل نو ترکیب آن به رژیم واکسیناسیونی می تواند پاسخ ایمنی درون زاد (endogenous) را علیه آنتی ژن واکسن افزایش دهد. از این رو امروزه سیتوکین ها کاندیدهای مناسبی برای درمان به عنوان واکسن ادجوانت می باشند (۵). اینترلوکین-۲ به دلیل داشتن ویژگی های چندگانه (Pleotrophic) و نقش حیاتی در فعال سازی و تکثیر سلول های 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 سلول های T می باشد، بلکه در تحریک سلول های NK، سلول های کشته کننده فعال شده توسط لمفوکین (LAK)، مونوسیت/ ماکروفاژ و نوتروفیل ها نیز نقش مهمی بر عهده دارد (۸ و ۹). بسیاری از پاتوژن های سرکوب کننده ایمنی ماکیان مانند IBDV (۹)، ویروس بیماری Marek (۱۰)، ویروس بیماری Newcastle (۱۱)، ویروس آنمی جوجه (Anemia) (۱۲)، *Eimeria tenella* می توانند در آزمایشگاه در القا یا تولید غیرطبیعی chIL-2 دخالت کنند (۱۳). بنابراین chIL-2 می تواند در کنترل این بیماری ها نقش مهمی ایفا کند (۱۴). هدف از این

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، ۰/۵ 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 سلول های باکتری اشریشیا کلی Top10 پذیرای ژن اضافه شد. سپس در سطح پلیت محیط LB آگار (Merck) واجد ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین، ۱۰۰ میلی مولار IPTG، ۲۰ میلی گرم در هر میلی لیتر X-Gal پخش و در دمای ۳۷ °C گرماگذاری گردید.

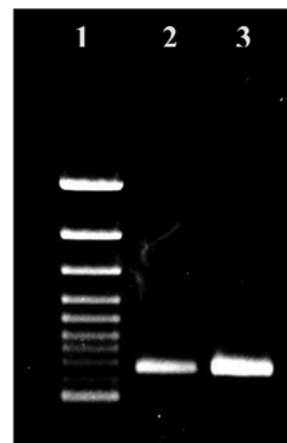
۵) غربالگری کلنی های ترانسفورم شده: کلنی های سفید (نشان دهنده باکتری های ترانسفورم شده) پس از گرم خانه گذاری برای بررسی حضور ژن مورد نظر در وکتور T/A با استفاده از تکنیک PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر بافر Tfi، ۳ میکرولیتر $MgSO_4$ ، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۵ پیکومول از هریک از پرایمرها، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلی مرز Tfi و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. کلنی های دارای واکنش مثبت PCR، به مدت یک شب در ۴ میلی لیتر محیط LB مایع حاوی ۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شدند. پلاسمید TA/IL-2 با استفاده از کیت Bioneer و دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و خالص سازی گردید. هم چنین کلنی های ترانسفورم شده با استفاده از آنزیم های برش دهنده *HindIII* و *EcoRI* در ۳۷ °C به مدت ۵ ساعت تحت تأثیر هضم آنزیمی قرار گرفتند و نتایج آن ها مورد بررسی قرار گرفت. پلاسمید نو ترکیب TA/IL-2 برای تعیین توالی به شرکت Millegene (فرانسه) ارسال گردید. سپس از طریق BLAST ژن مورد نظر با توالی های 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

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 5'-CTAGAATTCGATAAATGGACTG-3' (همراه با جایگاه آنزیم *EcoRI*) و 5'-GTCAAGCTTAAAGTTAAATTTGA-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/Tfi (۵×)، (۲۵۰ میلی لیتر) ۳ میکرولیتر $MgSO_4$ (۱۰ میلی لیتر) ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلی مرز Tfi، 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، 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 ۶۶۸ bp) به ژل آگارز ۱ TAE درصد منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه Gel Documentation مشاهده گردید.

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

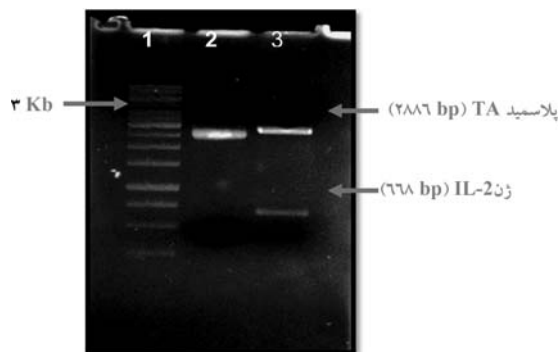


شکل ۱: RT-PCR کشت طحال با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در ۱۸ ساعت اول کشت. ستون (۱) مارکر (100 bp)، ستون های ۲ و ۳) باند مربوط به ژن *chIL-2*.

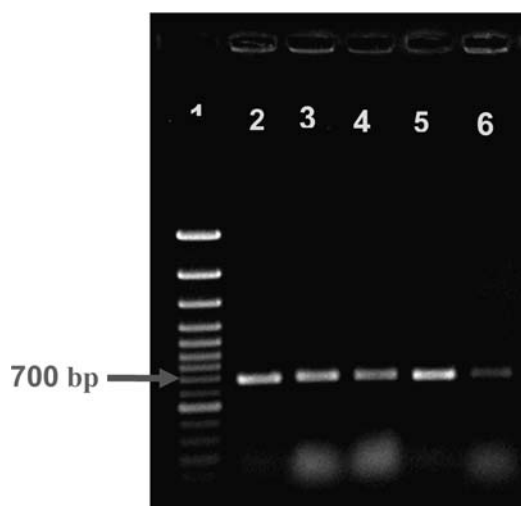
۹۹٪ می باشد. ژن *chIL-2* تعیین توالی شده ایران در شکل ۴ نشان داده شده است.

بحث

استفاده از سیتوکین های ایمنی می تواند افزایش عملکرد واکسن را به دنبال داشته باشد (۱۵). *chIL-2* یک لمفوکین غیر آنتی ژنی اختصاصی است که به دنبال تحریک، توسط لمفوسیت های T تولید می شوند (۱۶). این لمفوکین در تکثیر لمفوسیت T (۱۷)، تمایز لمفوسیت های B سلول های پلاسما (۱۸) و کلونینگ لمفوسیت های T اختصاصی آنتی ژن نقش مهمی ایفا می کنند (۱۹). امروزه *IL-2* با توجه به عمل کردهای مختلفی که دارد به عنوان یکی از مهم ترین مولکول های تنظیم کننده ایمنی شناسایی شده است (۱۶). در دهه های گذشته تلاش هایی در زمینه استخراج و تشخیص این مولکول از گونه های مختلف حیوانی انجام شده است. *IL-2* از حیواناتی مانند گاو (۲۰)، گوسفند (۲۱)، بز (۲۲) و سگ از طریق تحریک لمفوسیت ها جدا سازی شده است. اما مطالعات محدودی در مورد استخراج *IL-2* توسط تحریک میتوزی لمفوسیت ها از جوجه گزارش شده است (۲۳). ادجوانت های شیمیایی نظیر لیپوزوم و دی متیل سولفوکسید (DMSO) موجب افزایش کارایی DNA واکسن ها می شوند (۲۴). اما استفاده از این ادجوانت ها در صنعت ماکیان گران و مشکل می باشد. از این رو ضرورت تولید ادجوانت های مؤثرتر و مقرون به صرفه تر احساس می شود. در مطالعات مختلف ثابت شده است که کارایی DNA واکسن ها



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



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

سال ۱۹۹۷، دو پرایمر اختصاصی با جایگاه آنزیم های برش دهنده طراحی گردید. پس از انجام کشت و تحریک سلول های 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 کلی های 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 کلی های ترانسفورم شده از رنگ آبی کلی های ترانسفورم نشده بررسی شد. کلی های سفید ترانسفورم شده به عنوان نمونه DNA در نظر گرفته شدند. در شکل ۲ نتایج PCR حاصل از کلی های سفید نشان داده شده است. این نتایج، نشان دهنده حضور یک قطعه ژن ۶۶۸pb مربوطه در تمام نمونه ها بود.

ج) استخراج پلاسمید *TA/IL-2*: الکتروفورز محصول استخراج پلاسمید *TA/IL-2* از کلی، یک باند را نشان داد. از طرفی هضم آنزیمی این پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم های 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 توالی های ثبت شده در NCBI و توالی با شماره دسترسی AF000631 اثبات کرد که ژن یاد شده متعلق به ژن اینترلوکین-۲ جوجه است و دارای شباهت

```
NNNNNNNGGATCCGATTCTAGAAATTCGATAACTGGGACACTGCCATGATGTGCAAAGTACTGATCTTTGGCT-  
GTATTTTCGGTAGCAATGCTAATGACTACAGCTTATGGAGCATCTCTATCATCAGCAAAAAGGAAAC-  
CTCTTCAAACATTAATAAAGGATTTAGAGATATTGGAAAATATCAAGAACAAGATTCATCTCGAGCTCTACACAC-  
CAACTGAGACCCAGGAGTGCACCCAGCAAACTCTGCAGTGTACCTGGGAGAAGTGGTTACTCTGAAGAAA-  
GAAACTGAAGATGACACTGAAATTAAGAAGAATTTGTAAGTCTATTCAAATATCGAAAAGAACCTCAA-  
GAGTCTTACGGGTCTAAATCACACCGGAAGTGAATGCAAGATCTGTGAAGCTAACAACAAGAAAAAATTTCTT-  
GATTTTCTCCATGAACTGACCAACTTTGTGAGATATCTGCAAAAATAAGCAACTAATCATTTTTATTTTACTGC-  
TATGTTATTTATTTAATTATTTAATTACAGATAATTTATATTTTATCCCGTGGCTAACTAATCTGCTGTC-  
CATTCTGGGACCACTGTATGCTCTTAGTCTGGGTGATATGACGCTGTTCTAAGATCATATTTGATCCTTTCTG-  
TAAGCCCTACGGGCTCAAAATGTACGTTGAAGCTTACAATCTAGATGCNNNNNNNNNNNNNN
```

شکل ۴: توالی ژن اینترلوکین ۲ جوجه پرورشی ایران. جایگاه آنزیم‌های برش دهنده به صورت پررنگ و کدون آغاز ATG و پایان TAA به صورت زیر خط نشان داده شده است.

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 *morghhi* 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.

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 هم‌زمان پلاسمیدهای کدکننده 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 کدکننده 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 DNA ۶۶۸ جفت بازی شد که توسط الکتروفورز 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 بانندی مشاهده نشد. کلون‌سازی ژن *chIL-2* ایران نشان داد که قطعه کامل ۶۶۸ bp ژن

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 *Eimeria acervulina*-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 Interleukin 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 humoral 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.



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

Hamideh Amini¹, Seyed Davoud Hoseini²,
Jamileh Nowroozi³, Delavar shahbazzadeh⁴

¹M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Razi Vaccination and Serum Research Institute, Arak, Iran

³Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

⁴Assistant 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