مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره سوم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۱۳-۱۰۶

# شناسایی، همسانه‌سازی وتعیین توالی ژن MT ND2 در مرغ‌های بومی خراسان

# Indentifying, Cloning, and Determining the Sequence of MT- ND2 Gene in Khorasan's Native Chickens

حمیدرضا ایزدنیا[۱] -مجتبی طهمورث پور[۲] *-محمدرضا نصیری[۳]

Hamid Reza Izadnia[1]- Mojtaba Tahmoorespur [2]- Mohammad Reza Nassiry [3]

۱-دانشجوی دکتری پردیس بین الملل دانشگاه فردوسی مشهد و محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول ۲و۳- استاد دانشگاه فردوسی مشهد

1. PhD student, Ferdowsi University of Mashhad, International Campus and Researcher of Agriculture and Natural Resources Research Center of SafiAbad (dezful)
2 and 3. Professor, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_tahmoorespur@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۱۲)

## چکیده

**میتوکندری مسئول تولید ۹۰ درصد از انرژی مورد نیاز سلول می باشد. مقداری از تفاوت‌ها در عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی و بیان فنوتیپی راندمان غذایی ممکن است مربوط به اختلاف در راندمان عملکرد میتوکندری باشد. این پژوهش بمنظور همسانه سازی و تحلیل مرغان بومی خراسان با تاکید بر ژن ND2 به منظور بررسی جهش‌های احتمالی است. بدین منظور از نمونه خون مرغ بومی خراسان، DNA ژنومی استخراج گردید و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر ژن انجام شد، محصول واکنش بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. باندهای حاصل با استفاده از ناقل خطی pTZ57R/T در باکتری *E. coli* همسانه-سازی و توالی‌یابی شد. مقایسه نوکلئوتیدی قطعه توالی‌یابی شده با ژنوم مرجع چهار جهش را نشان داد و شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول خود با توالی کامل ژنوم میتوکندری *Gallus gallus* در توالی-های ثبت شده میتوکندری طیور با شماره دسترسی X52392.1 (ژنوم مرجع)، GU261709.1، GU261712.1، AP006746.1، KF826490.1، HQ857210.1 و AY235571.1 نشان داد. مقایسه پروتئینی نشان دهنده شباهت توالی حاصل با توالی‌های پروتئینی مربوط به ژن ND2 میتوکندری طیور در بانک اطلاعاتی بود به گونه ای که بیشترین شباهت، ۱۰۰٪ در ۱۰۰٪ طول خود متعلق به ژن ND2 در *Gallus gallus* با شماره دسترسی BAC57576.1 و کمترین شباهت متعلق به جنس ها و گونه های *Chrysolophus amherstiae* با شماره دسترسی AAF65702.1 و *Tetrastes sewerzowi* با شماره دسترسی ABH01111.1 با ۸۰٪ شباهت در ۱۰۰٪ طول خود بود. همچنین توالی اسیدآمینه‌ای مرغ بومی خراسان با توالی مرجع و سایر توالی‌ها با شماره مرجع YP272073.1، BAD11115.1، NP_006916.1، ADB06584.1 و ADW41566.1 شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول نشان داد. پس از تبدیل توالی نوکلئوتیدی بدست آمده به توالی اسیدآمینه‌ای، با توالی پروتئینی مرجع مقایسه شد. نتیجه این مقایسه تفاوت در یک اسیدآمینه را نشان داد. در اسیدآمینه ۱۳۰ لوسین که اسیدآمینه ای غیرقطبی است به اسیدآمینه غیرقطبی متیونین تبدیل شد. جهش‌های مشاهده شده در این تحقیق از آنجایی که منجر به تغییر اسید آمینه شده است می‌توان به عنوان یک پایه در بررسی‌های اختلالات سوخت وساز و صفات تحت تاثیر ژن MT-DNA در مطالعات بعدی قرار گیرد.**

**واژه‌های کلیدی**

همسانه سازی
تعیین توالی
MT ND2
مرغان بومی خراسان

[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

## مقدمه

ژنوم میتوکندریایی در بسیاری از حیوانات از جمله پرندگان تقریبا حدود ۱۶ تا ۱۷ کیلو باز دارد و دارای ۲۲ tRNA، ۲ rRNA و ۱۳ پلی پپتید است (Chinnery and Schon, 2003). کشف توالی های موجود در میتوکندری، بررسی ژنهای کنترل کننده موجود در این اندامک را امکان پذیر ساخته است. بیان ژن‌های میتوکندری در مهره‌داران برای تولید انرژی، سوخت و ساز بدن، تعادل سلولی و مرگ سلولی ضروری است (DiMauro, 2004; Newmeyer and Ferguson-Miller, 2003). فسفوریلاسیون اکسیداتیو اصلی ترین عملکرد مرتبط با میتوکندری می‌باشد. تولید انرژی از فسفوریلاسیون اکسیداتیو از طریق تشکیل آدنوزین تری فسفات (ATP) توسط زنجیره انتقال الکترون (ETC) است که از چند کمپلکس تشکیل شده است (Ahmad and Abdullah, 2012). همچنین امکان بررسی اشتقاق گونه های مختلف از یک جد مشترک و همچنین دستیابی به راهکارهایی برای حفظ ذخایر ژنتیکی از طریق مطالعه DNA میتوکندریایی وجود دارد (Fumihito, *et al*. 1994; Brown,1980; Szalanski *et al*. 2000) . یعقوب و فتحی(۲۰۱۳)، ژن سیتوکروم b را بعنوان شاخصی برای تمایز سویه‌های مرغ‌های بومی عربستان استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که سویه‌های مرغان عربستان با هم مشابه هستند اما با گونه‌های دیگر مرغان متفاوت هستند. همچنین مشخص شد که این ژن بعنوان شاخص مناسبی جهت بررسی تفاوت بین این گونه‌ها می‌باشد (Yacoub, and Fathi, 2013). جهش‌های DNA میتوکندریایی عموما بر بافت‌هایی که احتیاج به فسفوریلاسیون اکسیداتیو سالم جهت تامین انرژی متابولیسمی دارند تاثیر می‌گذارند (Taanman, 1999).

جهش بدمعنی در ناحیه کدگذاری ژن NADH Dehydrogenase 2 (MT-ND2) می‌تواند یک تغییر در ساختار دوم پروتئین تولید کند. وانگ و همکاران نشان دادند در حالت کمبود اکسیژن فعالیت کمپلکس I کمتر از استاندارد و تولید اکسیژن فعال میتوکندری به صورت معنی‌داری در مقایسه با حالت نرمال کاهش می‌یابد، همچنین جهش بدمعنی در ژن MT-ND2 به طور قابل توجهی با تولید انواع اکسیژن فعال در میتوکندری مربوط است (Wang *et al*. 2013).

ژنوم میتوکندریایی طیور از بخش‌های مختلفی تشکیل شده است. از جمله این ژنها، ژن Mt-ND2 است که ساختاری را برای تولید پروتئینی به نام NADH Dehydrogenase 2 فراهم می‌کند. این پروتئین بخشی از کمپلکس آنزیمی بزرگ است که در فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو در مرحله ابتدایی انتقال الکترون ضروری است (Mitchell *et al*. 2006).

به دلیل هاپلوئید بودن ژنوم میتوکندری و در نتیجه انجام نشدن فرآیند میوز، ژنوم میتوکندری قابلیت بالایی در مطالعات فیلوژنتیکی دارد. هدف از این پژوهش شناسایی، همسانه سازی و تحلیل مرغان بومی خراسان با تاکید بر ژن ND2 بمنظور شناسایی جهش‌های احتمالی می باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌گیری و استخراج DNA

از تعداد ۸ قطعه مرغ بومی خراسان خون گیری بعمل آمد و نمونه خون در لوله‌های حاوی EDTA (به عنوان ماده جلوگیری کننده از انعقاد خون) نگهداری شد. استخراج DNA ژنومی از خون و با استفاده از کیت Roche ساخت کشور آلمان انجام شد. به منظور بررسی کمیت و کیفیت DNA مورد مطالعه، از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و روش طیف‌سنجی با دستگاه نانودراپ استفاده شد.

### طراحی آغازگر اختصاصی

ژنوم کامل میتوکندریایی *Gallus gallus* با شماره دسترسی X52392.1 به عنوان ژنوم مرجع، به منظور تکثیر ژن MT ND2 مورد بررسی قرار گرفت. به سبب طول ۱۵۸۳ جفت‌بازی ژن MT ND2 و ناحیه‌های مربوط به tRNA و نیز در نظر گرفتن توانایی توالی‌یابی در هر بار خوانش، این ژن به سه بخش تقسیم شد و



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

آغازگرها با در نظر گرفتن ناحیه‌ای هم‌پوشان به طول ۷۰ و ۸۳ جفت‌باز با استفاده از نرم‌افزار (Integrate DNA Technology IDT) به نشانی اینترنتی https://www.idtdna.com/ طراحی و ساخت آن‌ها به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شد (جدول ۱).

**غلظت مواد موجود در واکنش PCR و شرایط واکنش:**

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) در حجم ۲۵ میکرولیتر و بر اساس شرایط مندرج در کیت *Taq* Polymerase شرکت Jena Bioscience و با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرها انجام شد. واکنش PCR در سه مرحله صورت پذیرفت. مرحله اول، واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. مرحله دوم حاوی ۳۵ چرخه دمایی بود که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. مرحله آخر، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

**الکتروفورز محصول PCR، خالص‌سازی آن از ژل و درج در ناقل خطی pTZ57R/T:** محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج از ژل آگارز شرکت Gene All خالص گردید. قطعه بازیابی شده از ژل به منظور درج در ناقل خطی pTZ57R/T طبق شرایط مندرج در کیت شرکت Thermo SCIENTIFIC کشور امریکا و نیز رعایت نسبت ۱ به ۳ بین ناقل و قطعه بازیابی شده با هم مخلوط شدند. همچنین به منظور برقراری پیوند فسفودی‌استری بین قطعه بازیابی شده و ناقل خطی از آنزیم $T_4$ DNA Ligase استفاده شد.

**تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد، انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری و غربالگری کلونی‌های نوترکیب:**

کشت شبانه (Over Night) باکتری *Escherichia coli* سویه DH5α با هدف تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد صورت پذیرفت. آماده‌سازی سلول‌های باکتریایی کشت شبانه به روش شوک حرارتی و به منظور ترانسفورماسیون انجام شد. پس از ترانسفورماسیون و کشت باکتری در محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس شناسایی کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (ناقل pTZ57R/T و قطعه تکثیر و بازیابی شده) به روش PCR کلونی‌های مقاوم صورت گرفت (Sambrook et al., 2003) ، غلظت مواد مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش مطابق با بخش‌های پیشین بود..

**جدول ۱**- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن MT ND2

**Table 1.** The sequence of specific primers of MT ND2 gene

| Primer | ناحیه دسترسی | توالی /sequence | طول قطعه تکثیر شده PCR Product |
|---|---|---|---|
| ND1 Part B. F | ۴۶۲۷-۵۴۳۷ | CATCTCTACCCTTGCTGAAACC | ۸۱۰ |
| ND1 Part B. R | | GCAGTTGATTGGGTGAGGAA | |
| ND2 Part A. F | ۵۳۶۷-۶۱۷۹ | CTCATCTCCAAGTCACACCAC | ۸۱۲ |
| ND2 Part A. R | | TTTATGTGGTTTGATGAGTTGGG | |
| ND2 Part B. F | ۶۰۹۶-۶۸۹۴ | CACTCCTAAGCCTATTCTTCTACC | ۷۹۸ |
| ND2 Part B. R | | CTA GTC AGT TTC CGA AGC CA | |



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

پس از ترانسفورماسیون و کشت باکتری در محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین ، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد نگهداری شد. سپس شناسایی کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (ناقل pTZ57R/T و قطعه تکثیر و بازیابی شده) به روش PCR کلونی‌های مقاوم صورت گرفت (Sambrook et al., 2003) ، غلظت مواد مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش مطابق با بخش‌های پیشین بود..

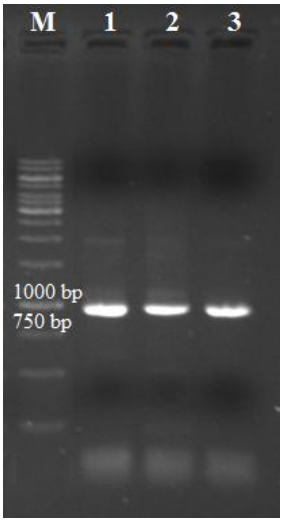
**استخراج پلاسمید، PCR روی پلاسمیدهای استخراج شده و توالی‌یابی**

استخراج پلاسمید از کلونی مقاوم (مثبت)، پس از کشت شبانه با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Gene All انجام شد. به منظور تأیید حضور قطعه در پلاسمیدهای استخراجی، پس از تعیین غلظت پلاسمیدهای استخراج شده با دستگاه نانودراپ به نسبت ۱:۲۰ رقیق شدند و به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت مواد مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش PCR مطابق با بخش‌های پیشین بود. پلاسمیدهای استخراج شده به منظور توالی‌یابی با آغازگرهای رفت و برگشت M13، به شرکت Macrogene ارسال شدند. سپس توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده به کمک نرم‌افزارهای Vector NTI، MEGA5، Bio Edit و CLC Workbench5 مورد بررسی قرار گرفتند و با استفاده از برنامه BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) به نشانی اینترنتی http://www.ncbi.nlm.nih.gov با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

در طی طراحی آغازگرها بر اساس مکان قرارگیری هر جفت آغازگر، مشاهده باندی به طول ۸۱۰، ۸۱۲ و ۷۹۸ جفت‌باز در اثر تکثیر در هر کدام از واکنش‌های PCR انتظار می‌رفت. پس از انجام PCR و الکتروفورز محصول واکنش، مشاهده قطعه ۸۱۰ جفت‌بازی در واکنش اول، قطعه ۸۱۲ جفت‌بازی در واکنش دوم و قطعه ۷۹۸ جفت‌بازی در واکنش سوم نشان‌دهنده صحت واکنش ها بود. همچنین وجود تنها یک باند در هر کدام از واکنش‌ها مشخص کرد که جایگاه نشست دیگری برای آغازگرهای طراحی شده در سایر مکان‌های ژنوم وجود ندارد (شکل ۱).

پس از اطمینان از اختصاصی بودن تکثیر، توالی‌یابی صورت گرفت. خواندن توالی از دو انتها و با آغازگرهای عمومی $M_{13}$-F و $M_{13}$-R تعبیه شده در ناقل T/A صورت گرفت. نتیجه توالی‌یابی با نرم‌افزار Bio Edit خوانده شد و با حذف توالی‌های مربوط به ناقل قطعات ۸۱۰، ۸۱۲ و ۷۹۸ جفت‌بازی متعلق به ژن هدف بدست آمد. وجود توالی آغازگرهای طراحی شده در دو انتهای توالی، صحت توالی‌یابی را ثابت نمود. پس از مشخص شدن ناحیه‌های هم‌پوشان سه قطعه تکثیری با هم ادغام شدند و توالی ژن ND2 مرغ بومی خراسان حاصل آمد. سپس توالی حاصل با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از برنامه BLAST مقایسه شد.




**شکل ۱**- الکتروفورز محصول واکنش PCR قطعه 1 (۸۱۰ bp)، 2 (۸۱۲ bp) و3 (۷۹۸bp ) ، M ) سایز مارکر ۸۱۰ bp

**Figure 1:** Electrophoresis of PCR products : 1 (810 bp), 2 (812 bp), 3 (798 bp).



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

در مقایسه نوکلئوتیدی توالی حاصل شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول خود با توالی کامل ژنوم میتوکندری *Gallus gallus* در توالی‌های ثبت شده میتوکندری طیور با شماره دسترسی X52392.1 (ژنوم مرجع)، GU261709.1، GU261712.1، AP006746.1، KF826490.1، HQ857210.1 و AY235571.1 نشان می‌دهد. کمترین شباهت نیز مربوط به FJ752429.1، JF921875.1، KF027439.1 و HQ221859.1 با ۸۷٪ در ۱۰۰٪ طول خود بود. همچنین توالی حاصل با توالی‌های مربوط به ژن NADH dehydrogenase subunit 2 gene (ND2) در میتوکندری طیور با شماره دسترسی‌های JQ970529.1 و EU845754.1 شباهت ۱۰۰٪ در ۱۰۰٪ طول خود را نشان داد (شکل۲).

طراحی درخت فیلوژنی توالی حاصل با توالی مرجع و سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی شباهت بالای ژن ND2 در مرغ بومی خراسان را با توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی تأیید نمود. ژن ND2 در ژنوم مرجع از نوکلئوتید ۵۲۴۱ تا ۶۲۸۱ را شامل می‌شود، در مقایسه‌ای که بین توالی حاصل با ژنوم مرجع صورت گرفت تفاوت در نوکلئوتیدهای چهار جایگاه وجود داشت که فقط جهش اول در ناحیه مربوط به ژن ND2 واقع است. در جایگاه ۵۹۲۸ نوکلئوتید C (پیریمیدین) به نوکلئوتید A (پورین) تغییر یافت و جهش جابجایی (Transvertion) صورت گرفت، همچنین در هر سه جایگاه ۶۴۷۷، ۶۷۵۸ و ۶۸۰۰ نوکلئوتید T (پیریمیدین) به نوکلئوتید C (پیریمیدین) تبدیل شده است و جهش جابجایی (Transition) رخ داده است. مطالعات مختلفی بر روی ژنوم میتوکندریایی طیور صورت گرفته است که برخی از آنها بر روی تنوع در DNA میتوکندریایی طیور و دامهای اهلی است. کواب و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی تنوع ژنتیکی مرغان بومی لائوس از طریق آنالیز چندشکلی توالی DNA میتوکندریایی پرداختند. در کل ۲۹ هاپلوتیپ شناسایی شد و همچنین نتایج نشان داد که منشا مادری این مرغان از لائوس بوده، علاوه بر این دو منشا دیگر در چین و آسیای جنوب شرقی وجود دارد . در این تحقیق ناحیه ۵۰۰ باز تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج بدست آمده ۲۶ جهش جایگزینی در سویه بومی و ۱۲۰ جهش در سایر سویه‌ها را نشان داد. همچنین توالی تکراری ۱۴ جفت باز در هر دو نسخه در کل جمعیت شناسایی شد این در حالی است که در سویه بومی توالی تکراری ۴۲ جفت باز در دو نسخه موجود بود (Kawabe *et al.* 2014). مایو و همکاران مطالعه کاملی بر روی اهلیت مرغ بر پایه ژنوم میتوکندریایی داده و تاریخچه اهلی شدن مرغان آسیای جنوب شرقی و جنوب غرب چین را مشخص کردند (Miao *et al.* 2013).

در توالی نوکلئوتیدی حاصل، توالی مربوط به tRNA میتوکندریایی نیز وجود داشت به همین دلیل پس از حذف این نواحی، توالی حاصل به وسیله برنامه Translate tool موجود در پایگاه ExPASY به نشانی اینترنتی http://web.expasy.org/translate به ۳۴۶ اسیدآمینه برگردانده شد. در مقاسیه نوکلئوتیدی ارائه شده، جهش در چهار جایگاه رخ داده بود که سه جهش انتهایی آن در ناحیه خارج از ژن ND2 اتفاق افتاده بود و در ترجمه ژن ND2 وارد نشده‌اند. پس از تبدیل توالی نوکلئوتیدی بدست آمده به توالی اسیدآمینه‌ای، با توالی پروتئینی مرجع مقایسه گردید (شکل ۳). نتیجه این مقایسه تفاوت در قرارگیری یک اسیدآمینه را نشان داد. در اسیدآمینه ۱۳۰ لوسین که اسیدآمینه‌ای غیرقطبی است به اسیدآمینه غیرقطبی متیونین تبدیل شد. جهش بدمعنی در ناحیه کد گذاری ژن NADH دهیدروژناز ۲ (MT-ND2) می تواند یک تغییر در ساختار دوم پروتئین تولید کند. جهش بدمعنی در ژن MT-ND2 به طور قابل توجهی با تولید اکسیژن فعال درمیتوکندری مربوط بود (Wang *et al.* 2013). با توجه به غیر قطبی بودن هر دو اسید آمینه به نظر می رسد این تفاوت در قرارگیری اسید آمینه ها تغییر زیادی در کارکرد پروتئین ایجاد نخواهد کرد. با این حال با توجه به شباهت بیش از ۹۹ درصدی این دو توالی می‌توان گفت که این دو پروتئین احتمالاً از نظر پیکربندی و کارکرد مشابه می‌باشند.

مقایسه پروتئینی شباهت توالی حاصل با توالی‌های پروتئینی مربوط به ژن ND2 میتوکندری طیور در بانک اطلاعاتی را نشان داد و بیشترین شباهت، ۱۰۰٪ در ۱۰۰٪ طول خود متعلق به ژن ND2 در *Gallus gallus* با شماره دسترسی BAC57576.1 بود و کمترین شباهت ۸۸٪ در ۱۰۰٪ طول به متعلق به ژن ND2 در *Chrysolophus Amherstiae* با شماره دسترسی AAF65702.1 و



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Gallus gallus breed Huang Lang chicken mitochondrion, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | KF954727.1 |
| Gallus gallus mitochondrion, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | KF825490.1 |
| Gallus gallus isolate yin109 mitochondrion, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | HQ357210.1 |
| Gallus gallus isolate YP20320 breed Yenwu mitochondrion, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | GU261712.1 |
| Gallus gallus murghi isolate ggm1 breed Red jungle fowl mitochondrion, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | GU261709.1 |
| Gallus gallus isolate YP20548 breed Autochthonic chicken mitochondrion, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | GU261694.1 |
| Gallus sonnerati mitochondrial DNA, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | AP005746.1 |
| Gallus sonnerati mitochondrial DNA, complete genome | 2817 | 2817 | 100% | 0.0 | 99% | AP003320.1 |

**شکل۲**- نتیجه هم‌ردیفی نوکلئوتیدی قطعه تکثیر شده با سایر توالی‌های ثبت شده

**Figure 2.** The results of nucleotide comparison between our fragment and other registered sequences.

```
1    MNPHAKLICTVSLIMGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLISKSHHPRAIEATIKYF  60
     MNPHAKLICTVSLIMGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLISKSHHPRAIEATIKYF
1    MNPHAKLICTVSLIMGTSITISSNHWILAWTGLEINTLAIIPLISKSHHPRAIEATIKYF  60

61   LTQSTASALILFSSMTNAWSTGQWDITQLNHPTSCLMLTMAIAIKLGLVPFHFWFPEVLQ  120
     LTQSTASALILFSSMTNAWSTGQWDITQLNHPTSCLMLTMAIAIKLGLVPFHFWFPEVLQ
61   LTQSTASALILFSSMTNAWSTGQWDITQLNHPTSCLMLTMAIAIKLGLVPFHFWFPEVLQ  120

121  GSSLITALLLSTLMKLPPITLLLLTSQSLNTTLLTLLAISSTLIGGWMGLNQTQTRKILA  180
     GSSLITALLLSTLMKLPPITLLLLTSQSLNTTLLTLLAISSTLIGGWMGLNQTQTRKILA
121  GSSLITALLLSTLMKLPPITLLLLTSQSLNTTLLTLLAISSTLIGGWMGLNQTQTRKILA  180

181  FSSISHLGWMIMIISYNPQLTILTFILYTIMTSTVFLSLAQIKVLKLSTMLISWTKTPML  240
     FSSISHLGWMIMIISYNPQLTILTFILYTIMTSTVFLSLAQIKVLKLST+LISWTKTPML
181  FSSISHLGWMIMIISYNPQLTILTFILYTIMTSTVFLSLAQIKVLKLSTLLISWTKTPML  240

241  NATVMLTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMTPMATIITMLSLLSLFFYLRLAYHS  300
     NATVMLTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMTPMATIITMLSLLSLFFYLRLAYHS
241  NATVMLTLLSLAGLPPLTGFMPKWLIIQELTKQEMTPMATIITMLSLLSLFFYLRLAYHS  300

301  TITLPPNSSNHMKLWRTNKTLNTPTAILTALSTTLLPLSPLIITML  346
     TITLPPNSSNHMKLWRTNKTLNTPTAILTALSTTLLPLSPLIITML
301  TITLPPNSSNHMKLWRTNKTLNTPTAILTALSTTLLPLSPLIITML  346
```

**شکل۳**- نتیجه هم‌ردیفی متنی قطعه پروتئینی توالی‌یابی شده با توالی مرجع

**Figure 3**. The results of a comparison between our protein sequence and reference sequence

*Tetrastes Sewerzowi* با شماره دسترسی ABH01111.1 تعلق داشت. همچنین توالی اسیدآمینه‌ای مرغ بومی خراسان با توالی مرجع و سایر توالی‌ها با شماره مرجع YP272073.1، BAD11115.1، NP_006916.1، ADB06584.1 و ADW41566.1 شباهت ۹۹٪ در ۱۰۰٪ طول نشان داد (شکل۴). همچنین این نتایج نشان‌دهنده ناحیه‌های حفاظت شده NADH2 و Oxidored q1 بود که در زنجیره انتقال الکترون و انتقال پروتون‌ها به غشا شرکت دارند (شکل ۵). جهش‌های مشاهده شده در این تحقیق از آنجائیکه منجر به تغییر اسید آمینه شده است می‌توان به عنوان یک پایه در بررسی‌های اختلالات سوخت وساز و صفات تحت تاثیر ژن Mt –ND2 در مطالعات بعدی قرار گیرد. به منظور بدست آوردن اطلاعات بیشتر، مطالعات تکمیلی به ویژه بررسی ارتباط بین جهش‌ها و تاثیر آنها در فنوتیپ توصیه می‌شود.

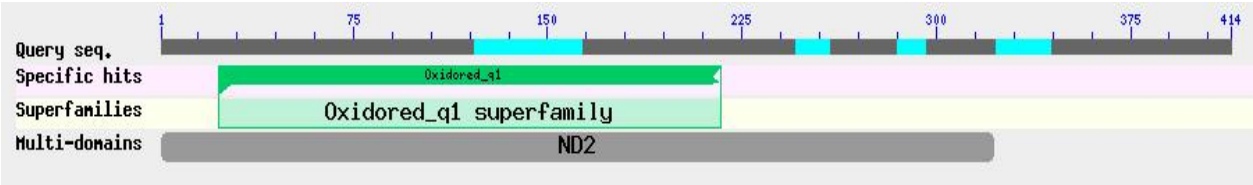


[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus] | 663 | 663 | 83% | 0.0 | 100% | BAC57573.1 |
| NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus bankiva] | 662 | 662 | 83% | 0.0 | 99% | YP_272073.1 |
| NADH dehydrogenase subunit II [Gallus gallus] | 662 | 662 | 83% | 0.0 | 99% | BAD11115.1 |
| NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus] | 661 | 661 | 83% | 0.0 | 99% | NP_006916.1 |
| NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus] | 661 | 661 | 83% | 0.0 | 99% | ADB07104.1 |
| NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus] | 661 | 661 | 83% | 0.0 | 99% | ADB06584.1 |
| NADH dehydrogenase subunit 2 [Gallus gallus spadiceus] | 660 | 660 | 83% | 0.0 | 99% | YP_272047.1 |

**شکل ۴**- نتیجه هم‌ردیفی توالی اسیدآمینه‌ای قطعه تکثیر شده با سایر توالی‌های پروتئینی ثبت شده

**Figure 4.** The results of comparison between our sequence and the registered protein sequences




**شکل۵**- نواحی حفاظت شده در قطعه توالی‌یابی شده

**Figure 5.** The conserved region in our sequenced fragment

**تشکر و قدردانی**

از واحد بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول تشکر و قدردانی می‌شود.

## منابع

**DiMauro S. 2004.** Mitochondrial diseases. Biochemical et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1658:80-88.

**Fumihito A, Miyake T, Sumi S, Takada M, Ohno S, Kondo N. 1994.**One subspecies of the red junglefowl (Gallus gallus gallus) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, 91(26): 12505–12509.

**Kawabe K, Worawut R, Taura S, Shimogiri T, Nishida T, Okamoto S. 2014.** Genetic Diversity of mtDNA D-loop Polymorphisms in Laotian Native Fowl Populations. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27(1):19-23.

**Ahmad IM, Abdallah MY.2012.** Mitochondria-mediated oxidative stress and cancer therapy. In: Spitz, DR, Dornfeld, KJ, Krishnan, K, Gius, D, editors. Oxidative Stress in Cancer Biology and Therapy. Humana Press, p.3-19.

**Brown WM.1980.** Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, 77(6): 3605–3609.

**Chinnery PF, Schon EA. 2003.** Mitochondria. Journal of neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 74, 1188-1199.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

**Mitchell AL. 2006.** Sequence variation in mitochondrial complex I genes: Mutation or polymorphism? , Journal of Medical Genetics, 43, 175-179.

**Miao YW, Peng MS, Wu GS, Ouyang YN, Yang, ZY, Yu N , Liang JP, Pianchou G, Beja-Pereira A, Mitra B, Palanichamy MG, Baig M, Chaudhuri TK, Shen YY, Kong QP, Murphy RW, Yao YG, Zhang YP. 2013.** Chicken domestication: an updated perspective based on Mitochondrial Genomes.The Journal of Heredity, 110: 277-282.

**Newmeyer DD, Ferguson S. 2003.** Mitochondria: Releasing Power for Life Review and Unleashing the Machineries of Death. Cell, 112: 481–490.

**Sambrook JG, Campbell RD, Elgar G. 2003.**Characterisation of a gene cluster in Fugu rubripes containing the complement component C4 gene. Gene, 312, 73-83.

**Szalanski AL, Bischof R, Mestl G. 2000**. Population Genetic Structure of Nebraska Based on Mitochondrial DNA Variation. Transactions of the American Fisheries Society, 129:1060–1065.

**Taanman JW.1999.** The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1410(2): 103-123.

**Wang XY, He Y, Li JY, Bao HG, Wu Ch. 2013.** Association of a missense nucleotide polymorphism in the MT-ND2 gene with mitochondrial reactive oxygen species production in the Tibet chicken embryo incubated in normoxia or simulated hypoxia. Animal Genetics, 44(4):472-5.

**Yacoub HA, Fathi MM. 2013.** Phylogenetic analysis using d-loop marker of MtDNA of Saudi native chicken strains, Mitochondrial DNA, 24(5): 538-551.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]

*Genetic Engineering and Biosafety Journal*

*Vol3, Number2, Fall 2014 and Winter 2015, Bi-seasonal*

# Indentifying, Cloning, and Determining the Sequence of MT-ND2 Gene in Khorasan's Native Chickens

Hamid Reza Izadnia[1]- Mojtaba Tahmoorespur [2]- Mohammad Reza Nassiry [3]

1. PhD student, Ferdowsi University of Mashhad, International Campus and Researcher of Agriculture and Natural Resources Research Center of SafiAbad (dezful)
2 and 3. Professor, Ferdowsi University of Mashhad

* Corresponding Author, Email: m_tahmoorespur@yahoo.com

## A B S T R A C T

Discovering the sequences of mitochondrion has made it possible to study the presence of controlling genes in this organelle. Mitochondrion is responsible for producing 90 percent of the energy that the cell needs. Some differences in the broiler chicken growing function and the resulting phenotype and food efficiency may be related to differences in mitochondrion function. The aim of this study was to clone and to analyze the ND2 gene among Khorasan's native chickens in order to investigate possible mutations. To this end, genomic DNA was extracted from blood sample taken from this population. Then, using ND2 specific primers, PCR was conducted in order to multiply this gene. The PCR product was cloned into pTZ57R/T linear vector and sequenced. Comparison between the sequenced fragments and the registered gene revealed four mutations. A similarity of 99% was observed between them and the complete mitochondrial genome sequence of *Gallus gallus* with the accession numbers of X52392.1 (reference), GU261709.1, GU262712.1, AP006746.1, KF826490.1, HQ857210.1, and AY23557.1. Comparison between proteins showed that the resulting sequence was similar to protein sequences related to mitochondrial ND2 gene of the poultry in the data bank. The maximum similarity (100% similarity) was with the ND2 gene in *Gallus gallus* with the accession number of BAC57576.1. The minimum similarity (88% similarity) was with the ND2 gene in *Chrysolophus amherstiae* with the accession number of AAF65702.1 and *Tetra stessewerzowi* with the accession number of ABH01111.1. Also, the amino acid sequences of Khorasan's native chicken had 99% similarity with reference sequence and other sequences with the accession numbers of YP272073.1, BAD11115.1, NP_006916.1, ADB06584.1, and ADW41566.1. After translating the obtained nucleotide sequence to the amino acid sequence, it was compared with the reference proteins sequence. The result of this comparison showed a difference in one amino acid. The amino acid Leucine 130 was changed to Methionine.

## Key Words

Chickens- Mitochondrial Genes- Cloning- MT-ND2



[ Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1393.3.2.1.4 ]