

پایش ژنتیکی جایگاه‌های ایمونوژنتیک کمپلکس سازگاری بافتی کلاس-۱ در موش‌های BALB/c

• علیرضا یوسفی (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، کرج، ایران

• محمد مهدی رنجبر

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج
کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۲-۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۲-۰۸

Email: ar.yousefi@rvsri.ac.ir



چکیده

آزمایش‌های کنترل کیفیت ژنتیک حیوانات آزمایشگاهی از فرآیندهای مهم تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی است. هدف این پژوهش، پایش ژنتیکی جایگاه‌های ایمونوژنتیکی H-2K و H-2D در موش‌های همخون BALB/c مورد استفاده در ایران بود. در این آزمایش، بر اساس استاندارد FELASA از بافت طحال تعداد ۳۰ سر موش BALB/c (۱۵ نر و ۱۵ ماده) نمونه‌برداری شد. سپس با استفاده از کیت‌های اختصاصی استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. برای تعیین وضعیت ژنتیکی مارکرهای مد نظر، به ترتیب قطعات ۸۲۰ و ۲۹۵ جفت بازی از توالی ژن کدکننده H-2D و H-2K با روش PCR و پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. تفاوت‌های نوکلئوتیدی در قطعات تکثیر شده نسبت به توالی مرجع، وجه تمایز بین آلل‌ها و هاپلوتایپ‌های مختلف قرار گرفت. توالی نمونه‌های مورد آزمایش با استفاده از روش توالی‌یابی سنگر تعیین و پس از پیرایش اولیه و مقایسه با آلل‌های استاندارد موش نژاد BALB/c، وضعیت ژنتیکی برای مارکرهای مورد آزمایش تعیین شد. نتایج نشان داد که از تعداد ۳۰ سر موش مورد آزمایش، تعداد ۲۵ سر در جایگاه H-2K دارای آلل d (آلل استاندارد موش BALB/c) بود، یک سر موش آلل d جهش یافته و ۴ سر دارای آلل k بودند. همچنین از کل نمونه‌ها، تعداد ۲۵ سر در جایگاه H-2D دارای آلل d منطبق با توالی مرجع بودند. در این جایگاه، تعداد ۳ سر موش آلل d جهش یافته و ۲ سر آلل غیر از d داشتند. بین موش‌های نر و ماده از نظر فراوانی آلودگی ژنتیکی تفاوتی وجود نداشت ($P > 0.05$). از مجموع ۳۰ سر موش، ۲۵ سر هاپلوتایپ d داشتند که هاپلوتایپ استاندارد موش‌های BALB/c است. این نتایج نشان از آلودگی حدود ۱۷ درصدی در جایگاه‌های مورد مطالعه در کلنی موش‌های BALB/c داشت که احتمالاً ناشی از جهش‌های تک نوکلئوتیدی و یا آمیزش‌های کنترل نشده باشد. در کل، نتایج این پژوهش نشان داد که حداکثر حدود ۸۳٪ موش‌های BALB/c مورد آزمایش از نظر جایگاه‌های ژنی H-2D و H-2K خلوص دارند.

کلمات کلیدی: پایش ژنتیکی، کمپلکس سازگاری بافتی، مارکر ژنتیکی، موش آزمایشگاهی

● Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 87-98

Genetic monitoring of immunogenic class-I major histocompatibility complex loci in BALB/c mice

By: Yousefi, A. R., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Ranjbr, M. M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 2020-03-09 Accepted: 2020-04-27

Email: ar.yousefi@rvsri.ac.ir

Genetic quality control test is one of most important procedures in laboratory animal breeding. This study was aimed to monitor two immunogenic loci, H-2D and H-2K, in BALB/c inbred mouse strain. In this study, according to the FELASA recommendations, a total of 30 mice (15 male and 15 female) were randomly selected from the BALB/c colony. The animals were euthanized by Ketamine-Rampon, and the spleen tissue samples collected under sterile condition. Thereafter, total RNA was extracted and cDNA was synthesized using specific kits. In the current study, two DNA segments of 295 and 820 pb from H-2K and H-2D loci were amplified using specific primers and PCR method, respectively. The nucleotide differences between the sequenced samples were considered to identify alleles and haplotypes. The nucleotide sequences were determined using Sanger method and the primed sequences were then aligned and compared with the standard sequence of the BALB/c sequence as the reference. Results showed that 25 mice of 30 sampled mice had d allele in H-2K loci. In addition, four mice had sequences associated with k allele and one mouse showed mutant-d allele. Also, 25 mice of the 30 sampled mice showed complete identity with the d allele as the reference of H-2D BALB/c allele. However, three mice showed mutant-d allele, while the sequence of two mice did not show identity with d alleles. Moreover, among 30 investigated mice, 25 mice showed standard d haplotype of BALB/c strain. There was no significant difference between male and female mice regarding genetic contamination ($P < 0.05$). These findings show that about 17% genetic contamination in the H-2K and H-2D loci of BALB/c colony which is probably related to single nucleotide mutation or uncontrolled mating. In conclusion, the results of the present study showed that approximately 83% of the BALB/c mice colonies were pure in H-2K and H-2D immunogenic loci.

Key words: Genetic marker, Genetic monitoring, Laboratory mice, Major histocompatibility Complex

بزرگ و معتبری که در این زمینه‌ها فعالیت دارند، امری ضروری است (۸،۱۴).

در منابع مختلف، از جهش، هتروزیگوستی باقی‌مانده و آلودگی ژنتیکی (آمیزش‌های ناخواسته یا کنترل نشده) به عنوان سه منبع اصلی برای تغییر در ماده ژنتیکی و در نتیجه هموزیگوستی در نژادهای همخون یاد می‌شود. گزارش شده است که موش‌های BALB/c تجاری ممکن است در اثر بروز آلودگی ژنتیکی (آمیزش‌های کنترل نشده و تصادفی) از نظر کمپلکس سازگاری بافتی و ایزوآنزیم‌ها با یکدیگر تفاوت شایانی داشته باشند (۱۱،۱۳). این امر نشان می‌دهد که افزون بر تلاش‌های مداومی که برای کنترل آمیزش‌ها و حفظ کیفیت ژنتیکی وجود دارد، همیشه خطر کاهش کیفیت ژنتیک حیوانات همخون پا برجا است. در یک مطالعه، محققان ژاپنی گزارش دادند که موش‌های BALB/c تجاری به‌طور قابل توجهی با استانداردهای فنوتیپی نژاد BALB/c دچار تفاوت

مقدمه

با پیشرفت علم و تکنولوژی، شمار داروها، واکسن‌ها و فرآورده‌های بیولوژیک تولیدی به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است. بی‌شک تولید هر محصولی نیاز به آزمایش‌های تکمیلی دارد تا از نظر کیفیت، کنترل گشته و پس از تأیید سازمان‌های صلاحیت‌دار، برای مصرف به بازار ارائه گردد. انجام آزمایش‌های کنترل کیفی که بخش زیستی آن بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام می‌شود، بخش بی‌بدیل فرآیند تضمین کیفیت واکسن‌ها، فرآورده‌های بیولوژیک و داروهای تولیدی است. خالص بودن نژاد حیوانات مورد استفاده، پیش‌فرض انجام پژوهش‌های ایمنی‌شناسی، تولید آنتی‌بادی منوکلونال و برخی از آزمایش‌های پزشکی می‌باشد؛ این در حالی است که، ناهمگنی ژنتیکی موجب بروز پاسخ‌هایی متفاوت و غیر قابل اعتماد می‌شود. از این رو، تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دارای کیفیت ژنتیکی مناسب، در شرکت‌ها و مؤسسات

متفاوتی را در جایگاه *MHC* کلاس I دارند. برای نمونه، ICLAS آلل‌های جایگاه ژنی H-2D و H-2K را در موش‌های نژادهای C57/BL6 و BALB/c به ترتیب $H-2D^bK^b$ و $H-2D^dK^d$ معرفی کرده است در حالی که برای سایر نژادها، آلل‌های دیگری وجود دارد. تفاوت‌های آلل‌های مختلف در نژادهای موش مربوط به نوکلئوتیدهای کدکننده‌ی زنجیره‌های سنگین آلفا-۱ و آلفا-۲ می‌باشند؛ بر این اساس، می‌توان با ارزیابی توالی و تغییرات ایجاد شده در توالی این ژن‌ها، افزون بر تعیین اولیه نژاد حیوان، به خلوص این جایگاه نیز پی‌برد. با توجه به مطالب بیان شده، هدف این مطالعه پایش ژنتیکی جایگاه‌های ایمونوژنتیک H-2D و H-2K در موش‌های BALB/c مورد استفاده در مراکز پژوهشی ایران بود.

مواد و روش‌ها

گرآدوری اطلاعات و آنالیزهای بیوانفورماتیک

به منظور تعیین آلل‌ها و هاپلوتایپ‌های جایگاه‌های ژنی H-2D و H-2K، ابتدا اطلاعات آلل‌های مربوط به موش‌های BALB/c و سایر نژادهای موش آزمایشگاهی از پایگاه‌های مختلف از جمله NCBI و پایگاه Mouse Genome Informatics استخراج و آلل مربوط به موش‌های خالص نژاد BALB/c تعیین شد.

تعیین توالی نوکلئوتیدی جایگاه‌های پلی‌مورف بر روی mRNA

DNA برای جایگاه H-2D و H-2K

از آنجا که بخش‌های پلی‌مورف مولکول‌های H-2D در زنجیره‌های آلفا-۱ و آلفا-۲ قرار دارند، برای تعیین توالی دقیق نوکلئوتیدی و آمینواسیدی آن بر روی مولکول mRNA و همچنین DNA، در این آزمایش ابتدا ساختار سه بعدی مولکول *MHC* انواع آلل‌های موش در جایگاه H-2D (شکل ۱) از پایگاه‌های <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/> و <https://www.rcsb.org/> استخراج شد و سپس با نرم‌افزار UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) (نرم‌افزار UCSF Chimera) برای این منظور، توالی آمینواسیدی زنجیره‌ها تعیین شد (شکل ۲). برای این منظور، توالی آمینواسیدی سازنده‌ی زنجیره‌ی سنگین *MHC* کلاس ۱ موش (زنجیره‌ی آلفا) در دومین‌های آلفا-۱، آلفا-۲ و آلفا-۳ همراه با بتا شیت‌های آن به تفکیک مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (نسخه ۷/۰۵) و ترجمه معکوس، توالی نوکلئوتیدی جایگاه‌های مد نظر بر روی mRNA و DNA تعیین و با توالی‌های نوکلئوتیدی مرجع هم‌ردیف‌سازی شد.

در این آزمایش بر اساس مطالعه Klebs و همکاران (۱۲) برای تعیین آلل جایگاه H-2K از SNP‌های تمایز دهنده‌ی آلل‌های موش که در اگزون ۴ و ۵ این جایگاه قرار دارند، استفاده شد. موش‌های BALB/c با آلل d در جایگاه H-2K، در موقعیت ۸۴۷ توالی mRNA کدکننده زنجیره سنگین خود، باز سیتوزین دارند، درحالی که آلل‌های b و k در این موقعیت، باز تیمین دارند. همچنین، در موقعیت بازهای ۹۱۷ تا ۹۲۳ موش‌های دارای آلل d و k، بازهای TAATCA وجود دارد، در حالی که موش‌های با آلل b، در این موقعیت، بازهای CGACCG دارند (شکل ۳).

شده‌اند (۱۱). همچنین، آزمایش‌های ایزوآنزیمی و آنالیز هاپلوتایپ‌های ژن H-2 (کمپلکس سازگاری بافتی موش) نشان داده است که بیشتر موش‌های مورد آزمایش قرار گرفته با این دو روش، هتروزیگوت بوده و به‌طور پیوسته کمپلکس H-2 یا گلوکز فسفات ایزومراز را بیان نمی‌کنند. نخستین بار موضوع وجود آلودگی ژنتیکی در سال ۱۹۸۳ در سویه‌های همخون به‌عنوان یک مشکل بسیار بزرگ مطرح گشت (۱۰، ۱۵). از آن پس، مجامع علمی و بین‌المللی پذیرفتند که باید با پایش ژنتیکی حیوانات آزمایشگاهی از میزان بروز آلودگی‌های ژنتیکی اطلاع حاصل گردد و نسبت به اصلاح آن اقدام شود.

امروزه پایش ژنتیکی حیوانات آزمایشگاهی جایگاه مهمی در شرکت‌های بزرگ پرورش‌دهنده‌ی حیوانات آزمایشگاهی دارد، به‌طوری که انجمن بین‌المللی علوم حیوانات آزمایشگاهی ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science) و یا دستورالعمل‌های FELASA (Federation for Laboratory Animal Science Associations) تأکید زیادی به انجام پایش ژنتیکی دارند. همانگونه که نمی‌توان در یک آزمایش از محلول یا یک ماده‌ی آزمایشی که محصول شرکت‌های مختلف باشد استفاده کرد، نمی‌توان از موش‌های دارای تفاوت ژنتیکی نیز در یک آزمایش استفاده کرد. به‌کارگیری حیواناتی که پیوستگی (همگنی) ژنتیکی (Genetic integrity) ندارند و از نظر جایگاه‌های ژنتیکی مهم تأثیرگذار بر نتایج آزمایش‌ها، خلص‌سازی نشده‌اند، نه تنها باعث هدررفت هزینه‌ها و وقت می‌شود، بلکه اعتبار و تکرارپذیری نتایج حاصله را نیز دچار آسیب جدی می‌کند (۸).

تاکنون چندین روش برای تمایز نژادهای موش ارائه شده است؛ برای نمونه، اندازه بدن، رنگ پوشش بدن، مارکرهای بیوشیمیایی، مارکرهای ایمونولوژیکی، مدت زمان واژنش پیوند پوست، اندازه‌گیری‌های مورفولوژیکی، اثر انگشت DNA و PCR-SSLP در پاره‌ای از موارد کاربوتایپ نمودن کروموزوم‌ها و در نهایت روشی که اخیراً استفاده می‌شود، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP) است (۵، ۸، ۱۳). برای انجام پایش پروفیل ژنتیکی، ICLAS پایش تعدادی جایگاه ژنتیکی که اغلب مارکرهای ژنتیکی موثر در فرآیندهای بیوشیمیایی و یا جایگاه‌های ژنی ایمونولوژیک هستند را توصیه می‌کند. از جایگاه‌های مهمی که در این خصوص به آن اشاره شده است، جایگاه‌های مربوط به ژن کمپلکس سازگاری بافتی اصلی یا همان *MHC* می‌باشد. این جایگاه، حاوی سه ناحیه‌ی ژنی به نام‌های *MHC* کلاس I، II و III است.

ژن‌های *MHC* در موش بر روی کروموزوم ۱۷ قرار داشته و اندازه آن kb ۲۰۰۰ است و یک آنتی‌ژن گروه خونی به نام آنتی-ژن H را کد می‌کند؛ به‌همین دلیل، این ناحیه سازگاری بافتی-۲ یا به‌طور خلاصه H-2 نامیده می‌شود. سه ژن *MHC* کلاس I موش با اسامی H-2D، H-2K و H-2L، سه پروتئین مختلف به نام‌های D، K و L را کد می‌کنند. ژن‌های پلی‌مورف *MHC* کلاس I و II، ژن‌هایی هستند که در ایجاد ساختار دیواره‌ها و شیار ارائه‌ی آنتی‌ژن پروتئین *MHC* (زنجیره سنگین آلفا) نقش دارند و پلی‌مورف بودن آن‌ها منجر به تغییر اسیدهای آمینه این زنجیره‌ها می‌شود (۱، ۷).

مشخص شده است که موش‌های نژادها و سویه‌های مختلف، آلل‌های

حیوانات و نمونه‌گیری

در پژوهش حاضر، بر اساس فرمول ارائه شده توسط Fox و همکاران (۹) و مورد تایید FELASA، با فرض حداقل میزان آلودگی ژنتیکی ۱۰ درصدی جایگاه‌های مد نظر، برای تشخیص حداقل یک نمونه ناخالصی در این جایگاه‌ها با ضریب اطمینان ۹۵٪، از بافت طحال ۳۰ سر موش نژاد موش BALB/c (۱۵ نر و ۱۵ ماده) به‌طور تصادفی نمونه‌گیری شد. برای انجام نمونه‌گیری، ابتدا موش‌ها با تزریق درون بطنی کتامین و رامپون یوتانایز شدند و سپس تحت شرایط استریل، نمونه برداری از

طحال به عنوان منبع سلول‌های ایمنی بیان‌کننده‌ی MHC‌ها صورت گرفت. برای جلوگیری از تجزیه RNA، نمونه‌ها بلافاصله در کرایوتیوب قرار داده شد و تا زمان استخراج ماده ژنتیکی در ازلت مایع نگهداری شد.

استخراج RNA و واکنش RT

برای استخراج RNA و واکنش RT به ترتیب از کیت‌های تجاری شرکت QIAGEN و کیت‌های تجاری Viva 2-step RT-PCR شرکت بایونیر



شکل ۱- ساختار سه بعدی مولکول H-2D2. الف) ساختار کامل مولکول H-2D2 (زنجیره سنگین آلفا و بتا-۲ میکروگلوبولین) همراه با پپتید آنتی‌ژنی که در شیار آنتی‌ژنی قرار گرفته است؛ ب) ساختار سه بعدی زنجیره سنگین مولکول H-2D2 شامل آلفا-۱، آلفا-۲ و آلفا-۳؛ ج) زنجیره آلفا-۱ مولکول H-2D2؛ د) زنجیره آلفا-۲ مولکول H-2D2؛ ه) زنجیره آلفا-۳ مولکول H-2D2؛ و) ساختار پلی‌مورف مولکول H-2D2 متشکل از مارپیچ آلفا-۱، مارپیچ آلفا-۲ و بتاشیت کف شیار آنتی‌ژنی؛ ز) مارپیچ آلفا-۱ مولکول H-2D2؛ ح) مارپیچ آلفا-۲ مولکول H-2D2؛ ت) صفحات بتاشیت سازنده کف شیار آنتی‌ژنی مولکول H-2D2.

۴۵ ثانیه، پلیمریزاسیون یا تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل تکثیر پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

برای تکثیر قطعه‌ی مد نظر توالی H-2K، از یک جفت پرایمر معرفی شده توسط Kelbs و همکاران (۱۲) استفاده شد. محصول PCR این جایگاه، یک قطعه قطعه ۲۹۵ جفت بازی از روی RNA بود. توالی پرایمرهای رفت و برگشت برای این جایگاه به صورت زیر بود:

'F:3'- CCTGGGCTTCTACCCTGCT-5

'R:3'-CCACCACAGCTCCAGTGAC-5

برنامه دمایی مورد استفاده برای تکثیر توالی مد نظر شامل یک سیکل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، و در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، پلیمریزاسیون یا تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. واکنش PCR برای هر دو جایگاه در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده از ۴ میکرولیتر تمپلت، ۲/۵ میکرولیتر پرایمر مستقیم (۱۰ پیکومول/میلی‌لیتر)، ۲/۵ میلی‌لیتر پرایمر معکوس (۱۰ پیکومول/میلی‌لیتر)، ۲۵ میکرولیتر ۲X Master Mix (امپلیکون، دانمارک)، و ۱۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد.

محصول PCR هر دو جایگاه در ژل آگارز ۱٪/۷ حاوی رنگ سایبرگرین (شرکت سیناکلون) توسط دستگاه الکتروفورز (BioRad) به مدت ۴۵

کره استفاده شد. برای خالص‌سازی RNA استخراج شده از آلودگی احتمالی با DNA، پیش از سنتز cDNA از کیت DNase شرکت سیناکلون ایران طبق دستورالعمل شرکت سازنده و همچنین برای پیشگیری از تجزیه RNA استخراج شده نیز از RNA Inhibitor (بایونیر کره جنوبی) استفاده شد. پیش از سنتز cDNA، کیفیت و کمیت ماده ژنتیکی استخراج شده با روش اسپکتوفتومتری و دستگاه نانودراپ، بررسی شد.

تکثیر و توالی‌یابی جایگاه H-2K و H-2D

برای تعیین آلل جایگاه H-2D موش‌های مورد آزمایش، بر اساس روش Cao و همکاران (۶)، روش مشابهت توالی با توالی‌های مرجع انتخاب شد. برای این منظور، توالی‌های تعیین‌کننده آلل‌های این جایگاه از پایگاه NCBI استخراج و پس از همردیف کردن توالی‌ها، پرایمرهایی انتخاب شد که از گزون‌های ۵-۲ توالی ژن H-2D، شامل یک قطعه‌ی ۸۲۰ جفت بازی از توالی کدکننده زنجیره‌ی سنگین H-2D را تکثیر کند.

توالی پرایمرهای رفت و برگشت برای این جایگاه به صورت زیر بود:

'F:3'-TCGGCTAYGTGGACAACAMGG-5

'R:3'-GRCCAYAGCTCCAAGGACAMC-5

(R=G/A; Y=T/C; M=C/A; M=A/C)

برنامه دمایی مورد استفاده برای تکثیر توالی مد نظر شامل یک سیکل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت

```
5kd7 (2).pdb (#0) chain A -23 MGAMAPRTLLLLAAALGPTQTRAGSHSLRYFVTAVSRPGFGEPRYMEVG
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 27 YVDNTEFVRFDSDAENPRYEPRARWTEGPEYWERETRRAKGNEQSFVRV
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 77 DLRTALRYYNQSAGGSHTLQWMAGCDVESDGRLLRGYWQFAYDGC DYIAL
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 127 NEDLKTWTAADMAAQITRRKWEQAGAAERDRAYLEGECEVWLRRLKNGN
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 177 ATLLRTDPPKAHVTHHRPEGDVTLRCWALGFYPADITLWQLNGEELTQ
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 227 EMELVETRPAGDGTQKQWASVVVPLGKEQKYTCHVEHEGLPEPLTLRWGK
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 277 EEPSSSTKNTVTI AVPVVLGAVVILGAVMAFVMKRRRNTGGKGGDYALA
5kd7 (2).pdb (#0) chain A 327 PGSQSSDMSLPDCKV
```

شکل ۲- توالی آمینواسیدی سازنده مولکول H-2D^۴ در موش (بخش‌های که با کادر سبز و زرد مشخص شده‌اند توالی آمینواسیدی زنجیره سنگین مولکول H-2D را می‌سازند).

	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920
J00402.1 H-2K(d)	GGAAGGAGCAGAAATACACATGCCATGTG	CACTAAGGGGCTGCCTGAGCCTCTCACCCCTGAGATGGAAGCTTCCTCCATCCACTGTCTCCACACGGTAATCATTTG									
U47330.1 H-2K(k)	T.....G.....C.....	C.....C.....C.....									
U47328.1 H-2K(b)	T.....T.....C.....	C.....C.....C.....									T.....CG.C.G.....

شکل ۳- مقایسه توالی اسیدهای نوکلئیک آلل‌های مختلف H-2K در موش بین اسیدهای آمینه ۸۴۰ تا ۹۳۰ مربوط به ازگون‌های ۴ و ۵.

سازنده‌ی مولکول MHC را نشان می‌دهد. بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی توالی آمینواسیدی و پروتئینی مولکول H-2D، زنجیره‌ی سنگین مولکول H-2D از ۲۷۳ اسید آمینه تشکیل شده است که اسیدهای آمینه‌ی ۲۷ تا ۲۹۸ حاصل از ترجمه mRNA این مولکول را در بر می‌گیرد.

توالی نواحی پلی‌مورف آمینواسیدی و نوکلئوتیدی H-2D

بررسی توالی نوکلئوتیدی mRNA نشان داد که کل ساختار زنجیره‌ی سنگین H-2D از اسیدهای نوکلئیک شماره ۸۷ تا ۲۹۸ به تعداد ۸۱۹ اسیدنوکلیک تشکیل شده است. ژن H-2D از ۸ اگزون و حدود ۴۰۰۰ جفت باز تشکیل شده است. اگزون‌هایی از این ژن که در ساخت محصول نهایی شرکت دارند، شامل اگزون‌های ۲، ۳ و ۴ می‌باشند. همچنین، ارزیابی ساختار سه بعدی کریستالی مولکول H-2D نشان داد که دومین آلفا-۱ از ۸۴ اسید آمینه تشکیل شده است که در ساختار حاصل از ترجمه mRNA، اسیدهای آمینه‌ی ۲۶-۱۰ را شامل می‌شود؛ که معادل بازهای شماره ۳۲۷-۷۶ مولکول mRNA می‌باشد. اگزون شماره ۲، تنها اگزونی از ژن H-2D است که در ساخت این زنجیره شرکت دارد. نوکلئوتیدهای ۵۲۸-۲۷۷ از توالی ژن کدکننده‌ی H-2D در ساخت دومین آلفا-۱ نقش دارند. دومین آلفا-۲ از ۹۰ اسید آمینه تشکیل شده است که در توالی ترجمه شده‌ی mRNA بالغ، باقی‌مانده‌های شماره

دقیقه الکتروفورز شدند. سپس تصویر نمونه‌ها با دستگاه ژل‌داک ثبت شد. پس از تایید تکثیر، ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه به شرکت بایوسنس سوئد ارسال و پس از توالی‌یابی به روش سنگر، پیک‌های حاصل از خوانش رفت و برگشت هر نوکلئوتید از توالی تکثیر شده، به دقت بررسی شد. پس از بررسی اولیه و پیرایش نمونه‌ها، توالی‌ها با نرم‌افزار Finch TV و BioEid مورد بررسی قرار گرفت و توالی مربوط به هر نمونه به صورت مجزا ثبت و جهش‌های تک نوکلئوتیدی و آلل‌های هر یک از جایگاه‌ها تعیین شد.

نتایج

ژنوتیپ استاندارد جایگاه H-2K و H-2D نژادهای مهم موش

آزمایشگاهی

بر اساس بررسی‌های انجام شده، ژنوتیپ استاندارد موش‌های BALB/c به صورت H-2D^d و H-2K^d بود. همچنین، هاپلوتا‌یپ مربوط به موش‌های BALB/c^d است، یعنی در تمام جایگاه‌های MHC، ژنوتیپ موش‌های خالص باید به صورت d باشد (جدول ۱).

مطالعه ساختار سه بعدی مولکول H-2D

ساختار سه بعدی مولکول H-2D در شکل (۱) نشان داده شده است. همچنین، شکل ۲ نشان دهنده‌ی توالی اسید آمینه‌ای بخش‌های مختلف

جدول ۱- آلل‌های شناخته شده برای جایگاه H-2K و H-2D در برخی از نژادهای مهم موش آزمایشگاهی.

نژاد موش	جایگاه H-2K	جایگاه H-2D	نژاد موش	جایگاه H-2K	جایگاه H-2D
AKR/J	k	k	C57BR/cdJ	b	b
BALB/cAnN	d	d	C57L/J	k	k
BALB/cBy	d	d	C58/J	b	b
BALB/cBy	d	d	C57BL/10	b	b
BALB/CJ	d	d	CBA/Ca	k	k
BDP/J	p	p	CBA/J	k	k
BUB/BnJ	q	q	CBA/N	k	k
BXSB/Mp	b	b	CE/J	k	k
C3H/Bi	k	k	DBA/1	q	q
C3H/He	k	k	DBA/2	d	d
C3HeB/FeJ	k	k	NOD	b	b
C57BL/6	b	b	SWR/J	q	q

می‌باشد.

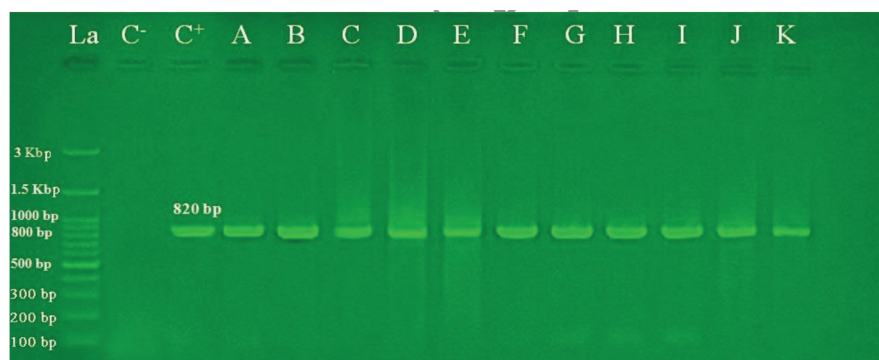
آشکارسازی باندهای تکثیر شده

نتایج مربوط به الکتروفورز محصول PCR مولکول‌های H-2K و H-2D به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. نمونه‌ها در کنار نشانگر وزن مولکولی (مارکر) ۱۰۰ bp، کنترل منفی و مثبت و نمونه‌های آزمایشی الکتروفورز شدند. نتایج نشان از تکثیر باند ۸۲۰ bp و حدود ۳۰۰ bp به ترتیب برای جایگاه‌های H-2D و H-2K داشت.

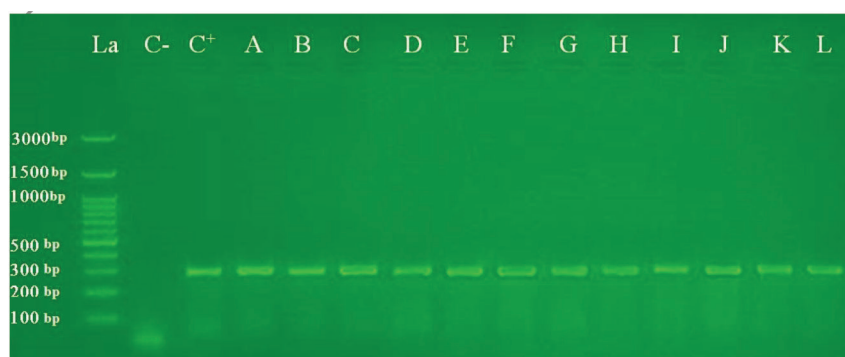
تعیین ژنوتیپ موش‌ها در جایگاه H-2D

پس از هم‌ردیف‌سازی توالی اسیدهای نوکلئیک نمونه‌های آزمایشی با

۱۱۰ تا ۱۹۲ و اسیدهای نوکلئیک شماره ۳۲۸ تا ۵۹۷ که بخشی از اگزون ۲ و ۳ توالی کد کننده این ژن است را در بر می‌گیرد. معادل این توالی‌ها بر روی DNA، اسیدهای نوکلئیک شماره ۵۲۹-۵۴۴ از اگزون-۲ و اسیدهای نوکلئیک شماره ۷۳۶-۹۸۹ از اگزون-۳ می‌باشد. ساختار دومین آلفا-۳ شامل ۹۳ اسید آمینه می‌باشد که از اسیدهای آمینه ۲۷۲-۲۰۰ و mRNA ۲۷۹-۲۹۸ کد کننده زنجیره‌ی سنگین H-2D را شامل می‌شود. نوکلئیک اسیدهای متناظر در mRNA، شامل بازهای ۵۹۸-۸۱۶ و ۸۹۴-۸۳۵ که بخشی از اگزون ۳ و بخشی عمده‌ای از اگزون-۴ می‌باشد. توالی ژنومی بازهای سازنده‌ی دومین آلفا-۳ شامل اسیدهای نوکلئیک شماره ۹۹۰-۱۰۱۱ از اگزون-۳، بازهای ۲۶۸۱-۲۸۷۷ و ۲۸۹۶-۲۹۵۵ از اگزون-۴



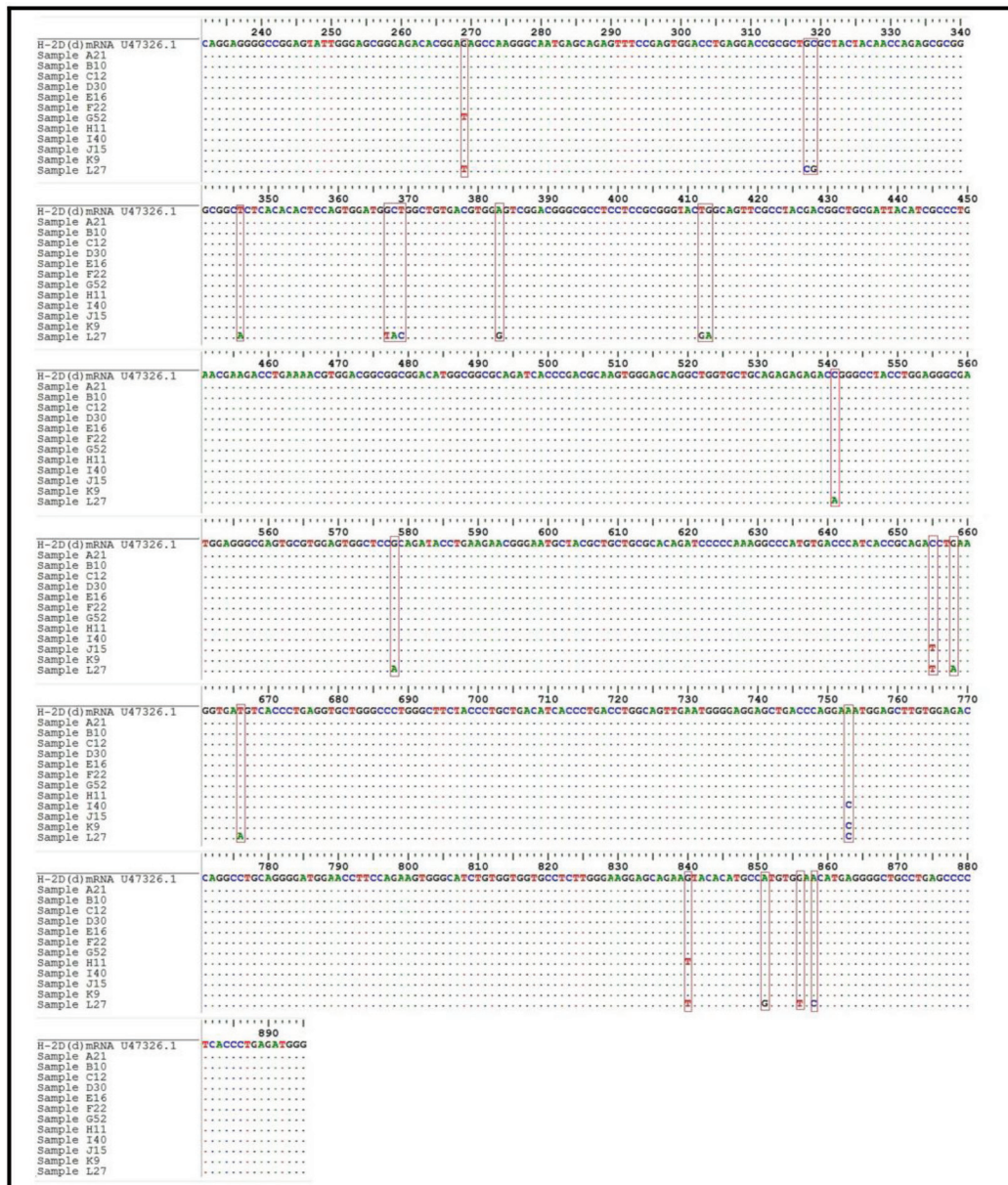
شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های تکثیر شده ژن H-2D موش‌های BALB/c؛ La: نشانگر مولکولی 100bp؛ C⁻: کنترل منفی؛ C⁺: کنترل مثبت (نمونه مربوط به موش BALB/c خالص)؛ A-K: تعدادی از نمونه‌های آزمایشی.



شکل ۵- تکثیر قطعه ۲۹۵ جفت بازی از اگزون شماره ۴ و ۵ ژن H-2K نشانگر مولکولی La؛ C⁻: کنترل منفی؛ C⁺: کنترل مثبت (نمونه مربوط به موش BALB/c خالص)؛ A-L: تعدادی از نمونه‌های آزمایشی.

مطالعه ۲ مورد ناهمگونی نوکلئوتیدی وجود داشت و در کل ۲۵ مورد به طور کامل با توالی مرجع H-2D موش‌های BALB/c مشابهت ۱۰۰٪ داشت. در شکل (۶) توالی مرجع ژن H-2D برای موش‌های BALB/c، همراه با توالی‌های جهش‌یافته و چند نمونه از توالی‌های با مشابهت کامل گزارش شده است.

توالی‌های مرجع، آلل هر یک از جایگاه‌های مورد آزمایش برای موش‌های BALB/c تعیین شد. سایر توالی‌ها دارای عدم انطباق نوکلئوتیدی برای بررسی بیشتر از نظر تغییر در نقاط پلی‌مورف ساختار شیر آنتی‌ژنی مولکول H-2D مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. نتایج نشان داد که از تعداد ۱۵ موش در مورد مطالعه، ۳ مورد و از تعداد ۱۵ موش ماده مورد



شکل ۶- مقایسه توالی آمینواسیدی جایگاه H-2D حاصل از ترجمه توالی‌های موش‌های BALB/c نسبت به توالی‌های مرجع

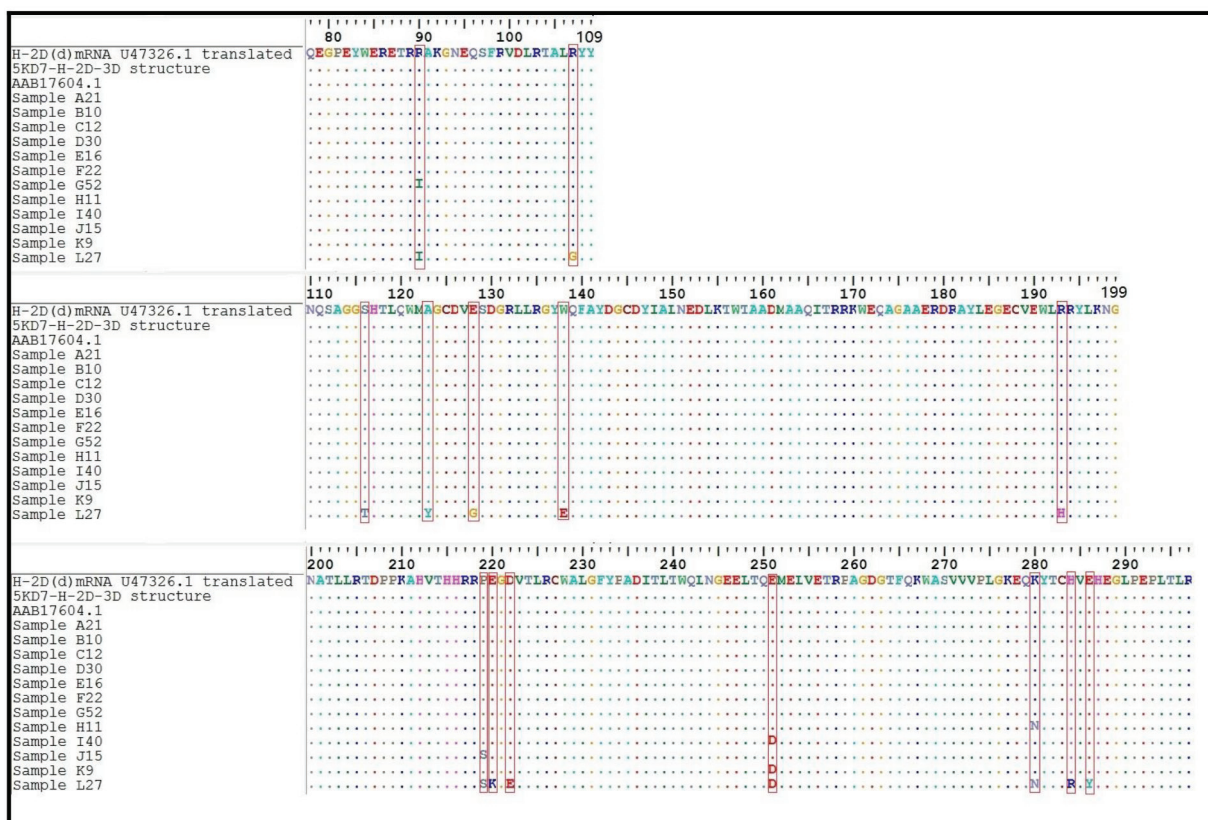
موش با توالی مرجع H-2K^d تطابق کامل نداشت. نتایج حاصل از پایش ژنتیکی H-2K و H-2D در موش‌های BALB/c در موش‌های BALB/c (۳) گزارش شده است. بر اساس نتایج، از تعداد ۳۰ موش مورد آزمایش، ۲۵ مورد در هر دو جایگاه خلوص کامل داشتند که معادل ۸۳/۵ درصد می‌باشد. از ۵ مورد دارای توالی جهش‌یافته، یک موش در جایگاه H-2D، ۴ موش در جایگاه H-2K دارای آلل مشخص k بودند که مخصوص موش‌های BALB/c نیست، اما سایر حیوانات جهش‌یافته‌های آلل رفرنس بودند. برخی از توالی‌های حاصل از این آزمایش در پایگاه NCBI با شماره دسترسی MH57817۰، MH57817۱، MH578172، MH559113 و MH559112 قابل جستجو هستند.

بحث

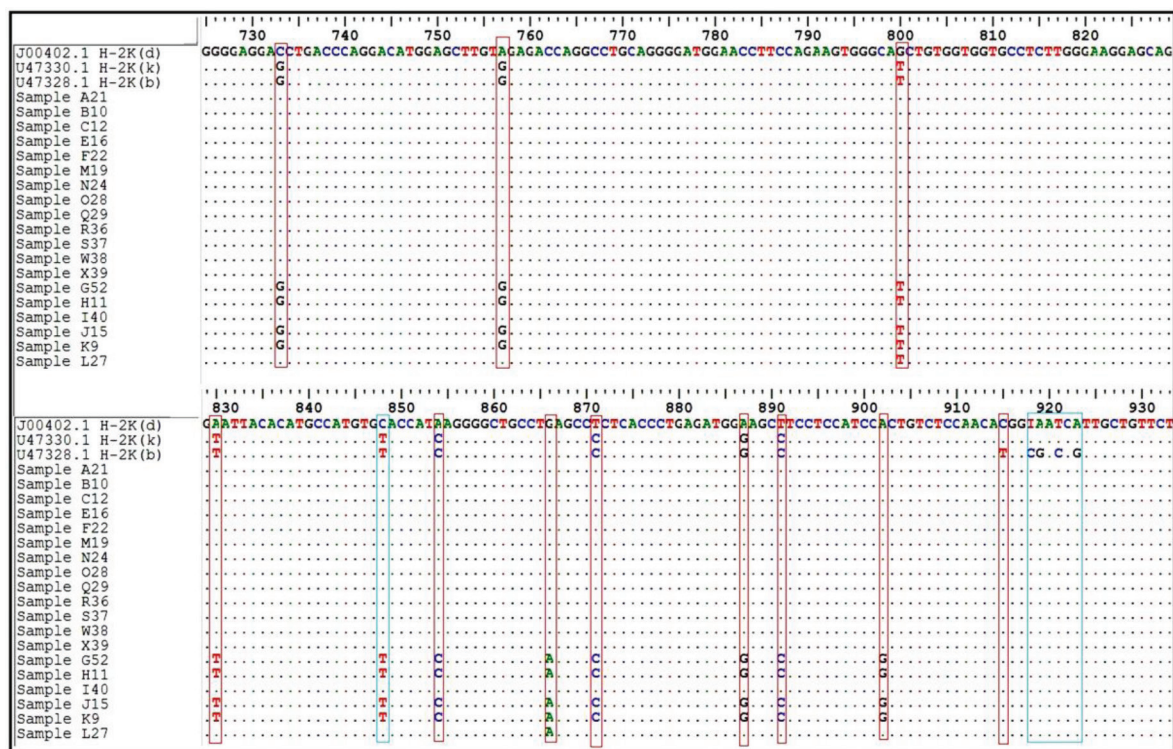
مقایسه توالی مرجع ژن H-2D برای موش‌های BALB/c، با توالی‌های موش‌های مورد آزمایش (شکل ۶) نشان داد که در موش شماره G52، نوکلئوتید شماره ۲۶۹ باز آدنین به تیمین جهش یافته بود. در موش

نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های آمینواسیدی جایگاه H-2D با توالی‌های مرجع در شکل (۷) گزارش شده است. با در نظر گرفتن اینکه توالی ساختار زنجیره‌های آلفا-۱ و آلفا-۲ مشخص‌کننده آلل‌های H-2D می‌باشند، در این مطالعه توالی‌های اسید آمینه‌ای این مولکول در سه بخش آلفا-۱ (توالی ارائه شده در بخش بالایی شکل ۷)، آلفا-۲ (توالی ارائه شده در بخش میانی شکل ۷) و آلفا-۳ (توالی ارائه شده در بخش پایینی شکل ۷) به صورت مجزا بررسی شد. با در نظر گرفتن توالی آلفا-۱ و آلفا-۲، تنها ۲ موش از موش‌های مورد ارزیابی (G52 و L27) جهش‌های ژنی منجر به تفاوت آمینو اسیدی در ساختار شیار H-2D نسبت به توالی‌های داشت.

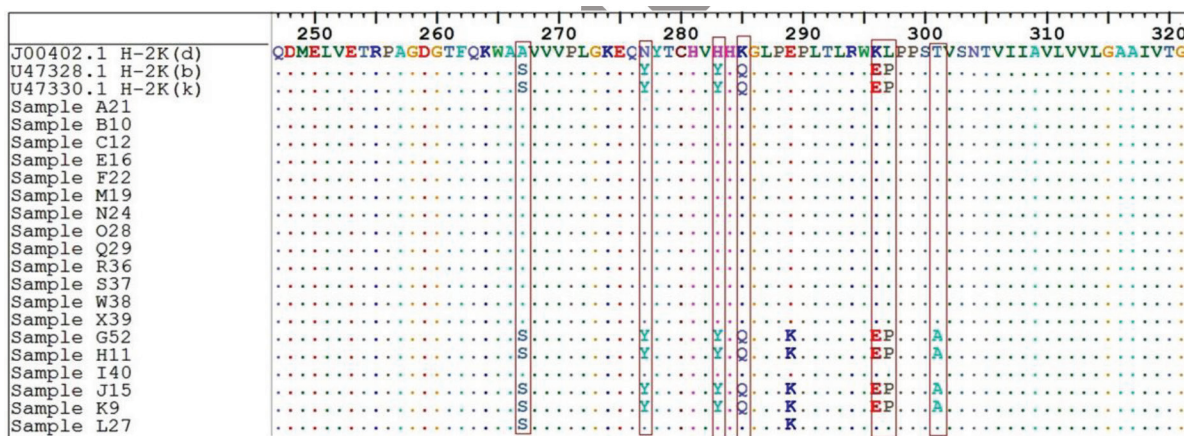
نتایج حاصل از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی پیرایش شده H-2K موش‌های BALB/c مورد مطالعه در شکل (۸) گزارش شده است. بر اساس نتایج، از ۳۰ مورد موش نمونه‌برداری شده، توالی ۲۵ موش به‌طور کامل با توالی H-2K^d موش‌های BALB/c همخوانی داشت. توالی‌های آمینواسیدی H-2K موش‌های BALB/c مورد مطالعه در شکل (۹) نشان داده شده است. آنگونه که مشخص است، تنها توالی ۵



شکل ۷- مقایسه توالی‌های آمینواسیدی پیرایش شده H-2D موش‌های BALB/c با توالی‌های مرجع



شکل ۸- مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی پیرایش شده H-2K موس‌های BALB/c مورد مطالعه با توالی‌های مرجع



شکل ۹- مقایسه توالی آمینواسیدی جایگاه H-2K حاصل از ترجمه توالی‌های موس‌های BALB/c نسبت به توالی‌های مرجع

به جای گوانین) و همچنین در موقعیت ۹۰۱ (گوانین بجای باز آدنین) وجود داشت. سایر بخش‌های توالی به‌طور کامل با آلل k منطبق بود، به‌طوری که می‌توان این موش‌ها را دارای آلل H-2K^k معرفی نمود. بررسی توالی‌های آمینواسیدی H-2K موش‌های BALB/c مورد مطالعه (شکل ۹) نشان داد که تنها توالی ۵ موش با توالی مرجع H-2K^d تطابق کامل نداشت. در نمونه موش شماره L27، دو تغییر آمینو اسیدی در موقعیت اسیدهای آمینه ۲۶۷ (سریں به جای آلانین) و ۲۸۹ (لایزن به جای گلوتامین) نسبت به توالی مرجع مشاهده شد. در مورد توالی موش‌های G59، H11، G15 و K9 دو تغییر نسبت به توالی رفرنس H-2K^k در موقعیت‌های ۲۸۹ (لایزن به جای گلوتامین) و ۳۰۱ (آلانین به جای تراونین) مشاهده شد.

فرضیه‌ی ثابت ژنتیکی یکی از پیش‌فرض‌های تفسیر نتایج بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی معتبر می‌باشد؛ با این وجود، همواره جهش‌های ژنی تصادفی اتفاق می‌افتد، و آمیزش‌های ثبت نشده (یعنی خطا) بین سویه‌ها نیز بروز می‌کند (۱۳، ۱۶). در گزارشی، بیلی (۴) نشان داد که حتی با بیش از ۲۰ نسل آمیزش خواهر-برادری، هنوز ممکن است حدود ۲۷۳ لوکوس به ثبت نرسیده وجود داشته باشد. این محاسبه با این فرض انجام شده است که ۱۰۵۰۰ لوکوس آلونیک کدکنده‌ی پروتئین در جمعیت پایه وجود دارد. جهش‌هایی که در زیرسویه‌های یک نژاد به ثبت می‌رسند، ممکن است منجر به ایجاد خصوصیات جدید و ایجاد زیرسویه‌های مختلف گردند (۲، ۳).

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که در کلنی موش‌های BALB/c، حدود ۸۳ درصد خلوص ژنتیکی و حدود ۱۷٪ آلودگی در جایگاه‌های مورد مطالعه وجود داشت. این یافته‌ها با گزارش سایر مراکز در خصوص بروز آلودگی‌های ژنتیکی همخوانی داشت (۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۶). آلودگی‌های ژنتیکی اغلب حاصل از آمیزش‌های کنترل نشده و ناخواسته، هتروزیگوسیتی باقیمانده و یا جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی

H11، در موقعیت نوکلئوتید ۸۴۰، باز گوانین به تیمین جهش‌یافته بود. همچنین، موش ۱۴۰، در نوکلئوتید شماره ۷۵۳ باز آدنین به سیتوزین جهش یافته بود. نوکلئوتید شماره ۷۵۳ موش J15، از سیتوزین به تیمین جهش یافته بود. همچنین، بررسی توالی موش K9 نشان داد که در موقعیت نوکلئوتید شماره ۷۵۳ بجای باز آدنین، سیتوزین قرار داشت. بیشترین تغییرات در موش L27 مشاهده شد به‌طوری که توالی این نمونه با توالی استاندارد بیش از ده مورد تفاوت داشت. سایر توالی‌های مورد مطالعه با توالی مرجع همخوانی کامل داشت.

نتایج حاصل از همردیف‌سازی توالی‌های آمینواسیدی جایگاه H-2D با توالی‌های مرجع (شکل ۷) نشان داد که با در نظر گرفتن توالی آلفا-۱ و آلفا-۲، تنها ۲ موش از موش‌های مورد ارزیابی (G52 و L27) جهش‌های ژنی منجر به تفاوت آمینو اسیدی در ساختار شیار H-2D نسبت به توالی‌های داشت. در موش G52، در موقعیت اسید آمینه شماره ۹۰ زنجیره سنگین H-2D بجای آرژنین، ایزولوسین قرار داشت. در موقعیت‌های ۹۰ و ۱۰۷ توالی موش L27 اسیدآمینه‌های آرژنین به ترتیب با ایزولوسین و گلايسین جایگزین شده بود. همچنین، در موقعیت ۱۱۶، بجای سریں، تراهونین قرار داشت، در موقعیت ۱۲۳ بجای آلانین، تریپتوفان قرار داشت، در موقعیت ۱۲۸ بجای اسید آمینه گلوتامین، گلايسین قرار داشت، و در موقعیت ۱۳۸ اسید آمینه تریپتوفان با گلوتامین جایگزین شده بود (شکل ۷). در کل با در نظر گرفتن این نتایج، ۹۳٪ از موش‌های مورد آزمایش در جایگاه H-2D آلل d داشتند. نتایج حاصل از همردیف‌سازی توالی‌های نوکلئوتیدی پیرایش شده H-2K موش‌های BALB/c مورد مطالعه (شکل ۸) نشان داد که در موش L2۷ و موقعیت باز ۷۷۹، گوانین با باز تیمین و در موقعیت نوکلئوتید ۸۶۵ گوانین با تیمین جایگزین شده بود. در سایر بخش‌های توالی مورد مطالعه، مشابهت کامل با توالی H-2K^d وجود داشت. در مورد توالی موش‌های G59، H11، G15 و K9 جهش‌هایی در موقعیت ۸۶۵ (آدنین

جدول ۲- خلاصه نتایج پایش ژنتیکی جایگاه‌های ایمونوژنیک H-2K و H-2D در موش‌های BALB/c.

موارد	H-2K	H-2D	هاپلوتا‌پ
تعداد نمونه	۳۰	۳۰	-
ژنوتیپ مرجع BALB/c	d	d	d
تعداد نمونه‌های خالص	۲۵	۲۵	۲۵
درصد خلوص اولیه	۸۳/۵	۸۳/۵	۸۳/۵
درصد ناخالصی اولیه	۱۶/۵	۱۶/۵	۱۶/۵
تعداد حیوان با آلل مرجع BALB/c جهش یافته	۱	۳	--
درصد کلی موش‌های با ژنوتیپ مرجع خالص و جهش‌یافته	۸۶/۵	۹۰	۸۶/۵
تعداد موش‌های با آلل غیر از BALB/c (نوع آلل)	4 (H-2K ^k)	2 (H-2D ^k)	H- 2 ^k

- 4- Bailey, D. W. 1982. How pure are inbred strains of mice? *Immunology Today* 3: 210-214.
- 5- Benavides, F., T. Rüllicke, J.-B. Prins, J. Bussell, F. Scavizzi, P. Cinelli, Y. Herault and D. Wedekind. 2019. Genetic quality assurance and genetic monitoring of laboratory mice and rats: FELASA Working Group Report. *Laboratory Animals*: 0023677219867719.
- 6- Cao, T. M., B. Lo, E. A. Ranheim, F. C. Grumet and J. A. Shizuru. 2003. Variable hematopoietic graft rejection and graft-versus-host disease in MHC-matched strains of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 11571-11576.
- 7- Danchin, E., V. Vitiello, A. Vienne, O. Richard, P. Gouret, M. F. McDermott and P. Pontarotti. 2004. The major histocompatibility complex origin. *Immunological Reviews* 198: 216-232.
- 8- Fahey, J. R., H. Katoh, R. Malcolm and A. V. Perez. 2013. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research. *Mammalian Genome* 24: 89-94.
- 9- Fox, J. G., S. Barthold, M. Davisson, C. E. Newcomer, F. W. Quimby and A. Smith. 2006. The Mouse in biomedical research diseases. *Academic Press*, 852.
- 10- Fox, J. L. 1983. Scientist sues over genetically impure mice. *Science (New York, NY)* 221: 625-628.
- 11- Kahan, B., R. Auerbach, B. J. Alter and F. H. Bach. 1982. Histocompatibility and isoenzyme differences in commercially supplied "BALB/c" mice. *Science* 217: 379-381.
- 12- Klebs, S. H., M. W. Hoffmann, P. B. Musholt, B. Bayer and T. J. Musholt. 2003. Detection of H-2 alleles by PCR-RFLP—an alternative to flow cytometry in the screening of transgenic mice. *Journal of Immunological Methods* 276: 197-205.
- 13- Petkov, P. M., M. A. Cassell, E. E. Sargent, C. J. Donnelly, P. Robinson, V. Crew, S. Asquith, R. V. Haar and M. V. Wiles. 2004. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics* 83: 902-911.
- 14- Strobel, M. C., L. G. Reinholdt, R. D. Malcolm and K. Pritchett-Corning. 2015. Genetic monitoring of laboratory mice and rats. *Laboratory Animal Medicine*. Elsevier, 1403-1416.
- 15- Sundberg, J., D. Boggess, L. Shultz and W. Beamer. 1994. The flaky skin (fsn) mutation, chromosome. *CRC Press, Boca Raton, FL*. p. 253-268.
- 16- Zurita, E., M. Chagoyen, M. Cantero, R. Alonso, A. González-Neira, A. López-Jiménez, J. A. López-Moreno, C. P. Landel, J. Benítez and F. Pazos. 2011. Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Research* 20: 481-489.

است. با توجه به نوع نتایج حاصل از این پژوهش، به نظر می‌رسد که جهش‌های تک نوکلئوتیدی و آمیزش‌های کنترل نشده عامل اصلی آلودگی در جایگاه‌های مورد مطالعه باشد. بر این اساس، ضروری است کلنی موش‌های آزمایشگاهی از نظر سایر ژن‌های معرفی شده از سوی FELASA مورد آزمایش قرار گیرد تا شناسنامه دقیق موش‌های آزمایشگاهی مشخص شود. همچنین، می‌توان با توجه به اینکه درصدی از موش‌های خالص نیز در کلنی وجود دارند، نسبت به اصلاح نژاد کلنی‌های پایش شده اقدام نمود و یا اینکه برای اطمینان از خلوص نژاد موش‌های مورد استفاده، چند جفت موش خالص نژادهای مختلف آزمایشگاهی تهیه و کلنی به مرور زمان با زاده‌های آن‌ها جایگزین شود.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی یافته‌های این پژوهش نشان داد که در کلنی موش‌های BALB/c آلودگی ژنتیکی وجود دارد. اگر چه در آغاز ممکن است درصد این ناخالصی‌ها پایین باشد، اما به مرور ممکن است نسبت موش‌های ناخالص افزایش یابد و منجر به ایجاد خطا در نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی آن‌ها شود. می‌توان با توجه به اینکه درصدی از موش‌های خالص نیز در کلنی وجود دارند، نسبت به اصلاح نژاد کلنی‌های پایش شده اقدام نمود و یا اینکه برای اطمینان از خلوص نژاد موش‌های مورد استفاده، چند جفت موش خالص نژادهای مختلف آزمایشگاهی تهیه و کلنی به مرور زمان با زاده‌های آن‌ها جایگزین شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از اعضای بخش تولید و پرورش حیوانات آزمایشگاهی و بخش تحقیق بیماری‌های زنبور عسل موسسه رازی، گروه علوم دامی دانشگاه تهران، جناب آقای دکتر علی جلیل سرقلعه و به ویژه از جناب آقای دکتر سیدرضا بنی‌هاشمی که هر یک به نحوی در اجرای این تحقیق همکاری داشته‌اند کمال تقدیر و تشکر را دارند. همچنین از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بابت حمایت مالی از پژوهش حاضر در قالب پروژه مصوب با کد ۲۰۱۸-۱۸-۰۲۸-۹۶۰۴۷۱ تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- 1- Amadou, C., A. Kumánovics, E. P. Jones, D. Lambracht-Washington, M. Yoshino and K. F. Lindahl. 1999. The mouse major histocompatibility complex: some assembly required. *Immunological Reviews* 167: 211-221.
- 2- Bailey, D. W. 1959. Rates of subline divergence in highly inbred strains of mice. *Journal of Heredity* 50: 26-30.
- 3- Bailey, D. W. 1978. Sources of subline divergence and their relative importance for sublines of six major inbred strains of mice. 3rd edition. Academic Press, 852.

