

آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن ریبونوکلئاز پانکراتیک (*RNase A*) در گوسفندان نژاد بلوچی و وحشی اوریال

Nucleotide sequence analysis of pancreatic ribonuclease (*RNase A*) gene in Baluchi and Urial wild sheep

محمد رضا نصیری^{۱*}، علی جوادمنش^۲، فرشته اشرفی^۳، علی فروهرمه‌ر^۴، محمد دوستی^۵، حمید آریان‌نژاد^۵

۱- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- گروه تحقیقاتی پروتئین‌های نو ترکیب، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۵- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

Nassiri M^{1,2}, Javadmanesh A^{2,3}, Ashrafi F⁴, Forouharmehr A⁵, Doosti M⁴,
Ariannejad H⁴

1- Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi
University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Recombinant proteins research group, The Research Institute of Biotechnology,
Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4- Graduated PhD student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

5- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Lorestan University, Khorramabad. Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nassiry@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیکی ژن ریبونوکلئاز پانکراسی در دو گونه متفاوت، گوسفند نژاد بلوچی و گوسفند وحشی اوریال انجام گرفت. نمونه خون گوسفند نژاد بلوچی از مرکز اصلاح نژاد عباس‌آباد مشهد و نمونه خون گوسفند وحشی اوریال از اداره محیط زیست استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. قطعه ژنی طولانی ۴۳۴۷ جفت‌بازی ژن ریبونوکلئاز پانکراسی با استفاده از ۷ جفت پرایمر که به صورت هم پوشان طراحی شده بودند، تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج مقایسه توالی ژن ریبونوکلئاز پانکراتیک ۴۳۴۷ جفت‌بازی به دست آمده از هر دو گونه گوسفند نژاد بلوچی و گوسفند وحشی اوریال، ۱۰ تفاوت نوکلئوتیدی را با میزان تشابه ۹۹/۷۸ درصد نشان داد. همچنین نتایج مقایسه توالی ژن ریبونوکلئاز پانکراسی مرجع گوسفند (نژاد رامبویه با شماره دسترسی XM_004010384) با گوسفند وحشی اوریال ۱۸ تفاوت نوکلئوتیدی با میزان تشابه ۹۹/۶۱ درصد و با گوسفند نژاد بلوچی ۱۰ تفاوت نوکلئوتیدی با میزان تشابه ۹۹/۷۸ درصد را نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر تأیید می‌کند، اگرچه توالی کدکننده آنزیم ریبونوکلئاز پانکراسی دو گونه بلوچی و اوریال و توالی ژن مرجع در پایگاه داده NCBI کاملاً با یکدیگر مشابه هستند، اما توالی‌های نوکلئوتیدی بالادستی و پایین دستی این ژن دارای ۱۰ تفاوت نوکلئوتیدی با یکدیگر و دارای ۱۸ تفاوت نوکلئوتیدی با توالی ژن مرجع می‌باشند. نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی و درخت فیلوژنتیک توالی‌های مربوط به گوسفند نژاد بلوچی و گوسفند وحشی اوریال بدست آمده در این مطالعه با سایر توالی‌های ثبت شده از ژن ریبونوکلئاز پانکراسی در پایگاه داده NCBI تأیید می‌کند که هر دو گونه گوسفند نژاد بلوچی و گوسفند وحشی اوریال با توالی ثبت شده برای ژنوم مرجع گوسفند و همراه توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراس ثبت شده برای گونه بز در یک کلاسه قرار گرفته‌اند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم ریبونوکلئاز پانکراسی *RNaseA*

توالی‌یابی

درخت فیلوژنتیک

گوسفند اوریال

گوسفند بلوچی

مقدمه

آنزیم‌های ریونوکلئاز (*RNase*) دارای نقش‌های بیولوژیکی متنوعی در سلول مانند دفاع میزبان^۱، فعالیت ضد توموری و مرگ فیزیولوژیکی می‌باشند، علاوه بر این کاربردهای بالقوه‌ای در آزمایشگاه‌های بیولوژیکی در فرایندهایی از قبیل استخراج DNA، آنالیزهای توالی و ساختاری RNA، از بین بردن RNA از پروتئین‌های تک سلولی، آماده‌سازی DNA پلاسمید خالص برای واکنش‌های DNA و ژن درمانی دارند (Beintema 1990). تشخیص‌کنندگان که هضم مواد غذایی آن‌ها در سکوم اتفاق می‌افتد روزانه حجم بالای ریونوکلئاز پانکراتیک (*RNase A*) از پانکراس ترشح می‌کنند (Barnard 1969; Beintema et al. 1969; Beintema 1990) و با توجه به فعالیت بیشتر ریونوکلئازی *RNase A* نسبت به سایر *RNase*ها، امروزه نگاه ویژه‌ای به استفاده از *RNase A* برای اهداف انسانی شده است. به‌طوری‌که استفاده از این آنزیم به‌عنوان توکسین‌های بیولوژیک در طراحی نسل جدید داروهای ضد سرطان در حال بررسی است. معمولاً این آنزیم‌ها به‌صورت متصل با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شوند، به این صورت که *RNase A* کونژوگ شده به‌کمک آنتی‌بادی وارد سیتوپلاسم سلول هدف شده و ترنسکریپتوم درون سلول را به‌طور کامل می‌شکند (Forouharmehr et al. 2020). مشکل اساسی *RNase*های حیوانی داشتن اثرات جانبی از قبیل ایمنوژنسیته برای سلول‌های انسانی است، از این رو داشتن اطلاعات ساختاری نوکلئوتیدی از این ژن از منابع حیوانی حائز اهمیت است. در حقیقت با داشتن این اطلاعات، می‌توان مهندسی این آنزیم‌ها را در جهت کاهش تحریک ایمنی، در بدن انسان انجام داد. به‌طورکلی *RNase A* گوسفندی مانند سایر تشخیص‌کنندگان به شکل گسترده‌ای توسط پانکراس ترشح می‌شود، علاوه بر این *RNAase A* گوسفندی در ارگان‌ها و مایعات بدن مانند شیر، ادرار، سرم، مایع منی^۲، کلیه‌ها، و زیکول سیمنال^۳، غدد پستانی و غدد بزاقی نیز تولید می‌شود (Beintema et al. 1988).

توالی ژنی *RNase A* گوسفندی بر روی کروموزوم ۵ قرار گرفته است. توالی آمینواسیدی *RNase A* گوسفندی با ۱۲۴ آمینواسید، در مقایسه با *RNase A* گاوی از لحاظ ۴ آمینواسید: سرین به جای ترئونین در موقعیت ۳، سرین به جای الانین در موقعیت ۱۹، گلوتامین به جای لیزین در موقعیت ۳۷، گلوتامین به جای آسپارژین در موقعیت ۱۰۳ متفاوت می‌باشد (Beintema et al. 1988). این ژن در انسان و موش بر روی کروموزوم ۱۴ و در گاو بر روی کروموزوم ۱۰ قرار گرفته است. در واقع کروموزوم ۵ گوسفندی معادل کروموزوم ۱۰ گاوی است و دارای جایگاه محافظت شده مشترک می‌باشند (Saitou et al. 1987). تاکنون برای *RNase A* نوع گوسفندی فقط یک توالی در پایگاه داده‌ها با شماره دسترسی XM_004010384 گزارش شده است، که این توالی نیز غیر آزمایشگاهی بوده و توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی پیش‌بینی شده است. لذا لازم است توسط کارهای آزمایشگاهی، توالی این ژن، به‌خصوص ناحیه کدکننده آن توالی‌یابی و به‌صورت آزمایشگاهی تایید شود. گوسفند بلوچی به‌عنوان یک نژاد اهلی در نیمه شرقی ایران و در جنوب افغانستان و شمال پاکستان زیستگاه دارد و جزء نژادهای پرجمعیت گوسفند ایران محسوب می‌شود. همچنین گوسفند وحشی اورپال در مراتع و کوهستان‌های کشورهای ایران، افغانستان، پاکستان، کشمیر، شمال غربی هند و بخش‌های غربی آسیای میانه زندگی می‌کنند و جزء یکی از ۵ نژاد گوسفند وحشی در ایران می‌باشد (Zamani et al. 2018). از این نظر که تاکنون هیچ مطالعه‌ای به‌منظور بررسی پتانسیل ژنتیکی آنزیم *RNase A* و تعیین توالی ژن *RNase A* در گونه‌های گوسفند اهلی و وحشی انجام نشده است. لذا این مطالعه برای اولین بار ساختار نوکلئوتیدی ژن *RNase A* را در گوسفند اهلی نژاد بلوچی و وحشی اورپال معرفی می‌کند.

مواد و روش‌ها

به تعداد ۵ نمونه خون از هر دو گونه گوسفند بلوچی و اورپال به‌میزان ۲۰ میکرولیتر در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون به‌ترتیب از مرکز اصلاح نژاد عباس‌آباد مشهد و اداره محیط زیست استان خراسان رضوی جمع‌آوری شدند. سپس استخراج

¹ Host defense² Seminal plasma³ Seminal vesicles

Personal (بایومتر، آلمان) تنظیم شدند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با ژل رد الکتروفورز شدند.

میزان ۵۰ میکرولیتر از محصولات PCR به همراه میزان ۵۰ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به منظور توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند. این نمونه‌ها با استفاده از دستگاه (ABI 3130) به روش اتوماتیک سانگر توالی‌یابی شدند. داده‌های حاصل از توالی‌یابی پس از دریافت به منظور تصحیح خطاهای توالی‌یابی با استفاده از برنامه Chromas Lite 2.01 (McCARTHY, 2005) مورد بازبینی و ویرایش قرار گرفتند (Afsharian et al. 2018). جهت تعیین بالاترین همولوژی ژن *RNase A* از رویه بلاست نوکلئوتیدی تحت پایگاه NCBI (Sayers et al. 2011) استفاده شد. توالی‌های مورد توافق^۴ به دست آمده بر اساس معیار اکثریت، با استفاده از نرم‌افزار SEQMAN (Swindell and Plasterer, 1997) تعیین و در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شدند.

^۴ Consensus

DNA با استفاده از کیت استخراج DNA از خون دیاتوم (روسیه) مطابق با روش پیشنهادی کیت صورت گرفت.

به منظور تکثیر ۴۳۴۷ جفت‌باز ژن *RNase A* گوسفندی بر اساس توالی ژنوم مرجع گوسفند (نژاد رامبویی) موجود در پایگاه بانک جهانی ژن NCBI، با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 هفت جفت آغازگر اختصاصی به صورت هم پوشان با مشخصات مندرج در (جدول ۱) طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از مستر میکس آمپلیکون (دانمارک) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA و ۵ پیکو مول از مخلوط آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر هر قطعه هم پوشان انجام شد. برنامه حرارتی برای هر جفت پرایمر به صورت مجزا و اختصاصی به صورت؛ واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای (۶۰ درجه برای ۳۰ ثانیه برای جفت آغازگرهای ۵ و ۷) و (۶۵ درجه برای ۱۵ ثانیه برای جفت آغازگرهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۶)، تکثیر در دمای ۷۲ درجه برای ۴۰ ثانیه، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه) در دستگاه ترموسایکلر T-

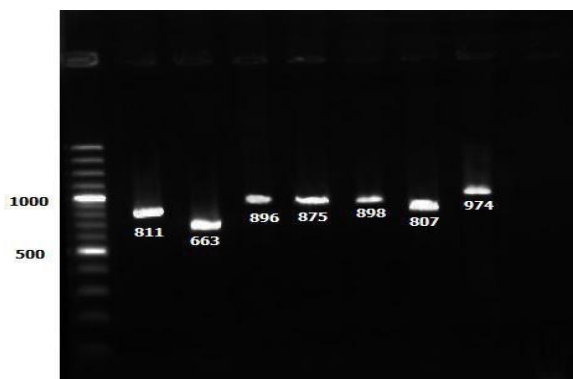
جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

اندازه محصول (bp)	موقعیت مکانی جفت پرایمرها	توالی آغازگرهای رفت و برگشت	جفت پرایمر
۹۷۴	۱۴۲-۱۲۳	For: 5'-GCCACAAGGGAAGCCCAAGA-3'	۱
	۱۰۹۶-۱۰۷۵	Rev: 5'-TCCAGACCACAGTTGACAGAGC-3'	
۸۰۷	۸۰۳-۷۸۳	For: 5'-CCCAGGTAAGCAGCCCAAGAA-3'	۲
	۱۵۸۹-۱۵۶۸	Rev: 5'-ACCAGGACCAACAGTGACAACA-3'	
۸۹۸	۱۳۴۶-۱۳۲۵	For: 5'-CTCTGTAGGGAGTGGGAGTCAA-3'	۳
	۲۲۲۲-۲۲۰۱	Rev: 5'-GGAGCAAGTGTGGGTTGGATAG-3'	
۸۷۵	۲۰۹۲-۲۰۷۳	For: 5'-CCCTGTGTTTCCTTGCCCTG-3'	۴
	۲۹۴۷-۲۹۲۷	Rev: 5'-CCGTGGAGCCTTTGGTAGAGA-3'	
۸۹۶	۲۸۱۰-۲۷۸۹	For: 5'-TGGAAGGACCTCAGGGATCAC-3'	۵
	۳۶۸۴-۳۶۶۳	Rev: 5'-TCTCAGCTCTAGGAGGAGGGAA-3'	
۶۶۳	۳۴۱۷-۳۳۹۶	For: 5'-GCCAACCAGTTTGAGCAGTTCT-3'	۶
	۴۰۵۸-۴۰۳۹	Rev: 5'-GCAGCAGAAGCCTGGAGTCT-3'	
۸۱۱	۳۹۳۲-۳۹۱۱	For: 5'-AGGACACCGAAAGGGAAGAGAT-3'	۷
	۴۷۲۱-۴۷۰۰	Rev: 5'-GGAAGACTATTGGCTGCTGGAA-3'	

bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) ترسیم و داده‌های حداقل انرژی آزاد و انرژی آزاد ترمودینامیک بررسی شدند.

نتایج و بحث

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که هر ۷ قطعه مختص به توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی ۴۳۴۷ جفت‌بازی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به صورت همپوشان به خوبی تکثیر شده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، از سمت راست (قطعات ۱ تا ۷).

نتایج حاصل از توالی‌های به دست آمده مرتبط با قطعات تکثیر شده از لحاظ کیفیت توالی‌یابی برای هر باز مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که تمامی خوانش‌ها برای تمامی نمونه‌ها از هر دو نژاد گوسفند بلوچی و اوریل با کیفیت بسیار بالایی صورت گرفته است. پس از زیرهم چینی و اسمبل کردن خوانش‌های مربوط به هر قطعه، توالی مورد توافق برای گوسفند بلوچی و اوریل به کمک نرم‌افزار SEQMAN به دست آمد. در واقع مقایسه هم‌ردیفی‌های بین ژن RNase پانکراتیک گوسفند بلوچی و گوسفند وحشی اوریل با ژنوم مرجع ژن RNase گوسفند رامبویی (XM_004010384) تشابه بالایی را نشان می‌دهد، هرچند که در برخی نقاط، تفاوت نوکلئوتیدی نیز مشاهده می‌شود. مقایسه‌ی هم‌ردیفی وجود اگزون یک و دو و همچنین ناحیه‌ی ترجمه شونده، نشان از توالی محافظت شده‌ی ناحیه‌ی ترجمه شونده^۱ CDS بین این سه نژاد برای این ژن می‌باشد. در

به منظور مقایسه داده‌های این مطالعه با دیگر مطالعات و همچنین ترسیم درخت فیلوژنی، از توالی‌های مرجع ثبت شده در بانک داده NCBI استفاده شد. بدین منظور توالی‌های ژن RNase A مربوط به ۲۲ گونه از پستانداران دریافت شد. هم‌ردیف سازی در سطح نوکلئوتیدی به کمک الگوریتم Clustal نسخه ۲ (Larkin et al. 2007) صورت گرفت. رسم درخت فیلوژنتیکی به کمک روش‌های مختلف بنا به شرایط، شامل نیر-جوینینگ (Saitou and Nei, 1987)، ماکسیمم پارسیمونی (Farris 1970; Fitch, 1971)، روش حداکثر درست‌نمایی (Felsenstein, 1981) و استنباط بیزی بهبود یافته به کمک زنجیره مارکوف مونت کارلو (Yang and Rannala 1997) بود. ابزار مورد نظر در آنالیز نیر-جوینینگ و پارسیمونی برنامه تجاری PAUP نسخه ۴ (Swofford and Sullivan 2003) و برای دو آنالیز حداکثر درست‌نمایی و آنالیز بیزی به ترتیب RAxML (Stamatakis 2006) و PhyloBayes MPI (Lartillot et al. 2013) بود. به منظور ارزیابی دست‌یابی به پارامترهای بهینه، روش بوت استرپ (Stamatakis et al. 2008) ۱۰۰ گانه مکرر انجام شد. همچنین از شاخص‌های امتیاز حداکثر درست‌نمایی مقیاس شده و شاخص پایداری مقیاس شده (RC) (Farris 1989) نیز استفاده شد. فاصله ژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی و همچنین توالی کدکننده پروتئینی مربوطه به RNase انجام پذیرفت.

هم‌ردیفی توالی‌های خوانش شده برای ژن RNase A گوسفند بلوچی و وحشی اوریل با ژنوم مرجع ژن RNase A گوسفند رامبویی با شماره دسترسی (XM-004010384) با سرور آنالین MultiAlign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) انجام گرفت (Corpet 1988). همچنین شناسایی جایگاه اگزون، اینترون و ناحیه‌ی ترجمه شونده، جایگاه‌های وجود جهش (جابه‌جایی نوکلئوتیدی) و حذف نوکلئوتید نیز با استفاده از سرور آنالین MultiAlign صورت گرفت.

به منظور بررسی تاثیر جهش‌ها در توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراسی (به خصوص در اگزون ۲)، ساختار ثانوی توالی‌های mRNA برای ژن RNase A برای هر سه گونه گوسفند رامبویی (ژنوم مرجع)، گوسفند وحشی اوریل و گوسفند بلوچی به کمک RNA Fold Web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi->

¹ from coding sequence

۱۸ تفاوت نوکلئوتیدی را با میزان مشابهت ۹۹/۶۱ درصد را نشان داد.

جدول ۲- موقعیت مکانی تفاوت‌های نوکلئوتیدی

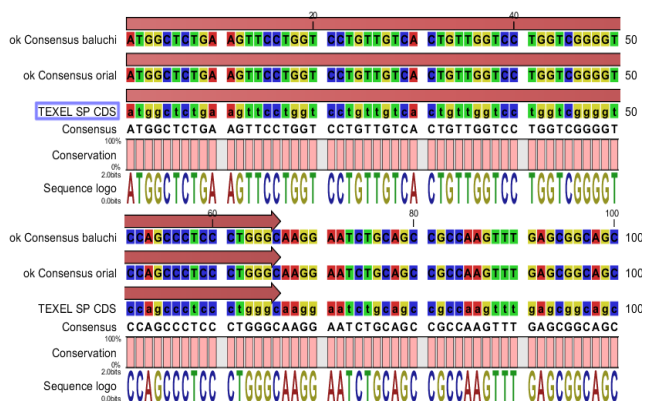
رامبویییه Rambouillet	اوریل Oriol	بلوچی Baluchi	موقعیت جفت‌باز (bp)
T	C	C	411
-	G	G	718
A	G	G	943
-	-	GGCCC	1780-1785
T	C	T	1767
C	T	C	1988
T	A	T	2428
-	A	-	2639
T	A	T	2848
A	G	A	2858
A	C	A	2899
G	A	G	3205
G	G	A	2968
G	T	T	4212

Exon1 (1-528bp)			
Balochi	AGCCAAGATG	CTCCTCCAC	CCTTCTTGGG
Oriol	AGCCAAGATG	CTCCTCCAC	CCTTCTTGGG
Texel	AGCCAAGATG	CTCCTCCAC	CCTTCTTGGG
Intron (529-1261bp)			
Balochi	AGCCTCCAGG	TTGGGGGAG	GCTTGACTCT
Oriol	AGCCTCCAGG	TTGGGGGAG	GCTTGACTCT
Texel	AGCCTCCAGG	TTGGGGGAG	GCTTGACTCT
Substitution1			
Balochi	AGTGGTTTAT	TCAAAGGAT	CCCTAATGA
Oriol	AGTGGTTTAT	TCAAAGGAT	CCCTAATGA
Texel	AGTGGTTTAT	TCAAAGGAT	CCCTAATGA
Substitution2			
Balochi	GCAAGATGCA	CCGCTTTACC	ACAAAGGCAC
Oriol	GCAAGATGCA	CCGCTTTACC	ACAAAGGCAC
Texel	GCAAGATGCA	CCGCTTTACC	ACAAAGGCAC
Substitution3			
Balochi	CCCACACTTG	CTCCCCTGGC	CTGCGTCTTG
Oriol	CCCACACTTG	CTCCCCTGGC	CTGCGTCTTG
Texel	CCCACACTTG	CTCCCCTGGC	CTGCGTCTTG
Substitution4			
Balochi	CCTCAGGAGC	AGAGGAAGAC	TATGAAATTT
Oriol	CCTCAGGAGC	AGAGGAAGAC	TATGAAATTT
Texel	CCTCAGGAGC	AGAGGAAGAC	TATGAAATTT
Substitution5			
Balochi	CTCTAATTAG	AAGTGCCCTG	CTAGAATGTG
Oriol	CTCTAATTAG	AAGTGCCCTG	CTAGAATGTG
Texel	CTCTAATTAG	AAGTGCCCTG	CTAGAATGTG
Substitution6			
Balochi	CTGCTAGTTA	CTGTCAGATT	GAGATCAAAAC
Oriol	CTGCTAGTTA	CTGTCAGATT	GAGATCAAAAC
Texel	CTGCTAGTTA	CTGTCAGATT	GAGATCAAAAC
Substitution7			
Balochi	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Oriol	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Texel	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Substitution8			
Balochi	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Oriol	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Texel	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Substitution9			
Balochi	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Oriol	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Texel	TGCTGTTGTC	CTTTCTGCTA	CTGGAGTCTC
Substitution10			
Balochi	ATGTTGTTT	AGGTAAGATG	AATGCTTAAC
Oriol	ATGTTGTTT	AGGTAAGATG	AATGCTTAAC
Texel	ATGTTGTTT	AGGTAAGATG	AATGCTTAAC
Substitution11			
Balochi	CCGAGGTCTC	CTGCATTAGA	GCGAGACGCT
Oriol	CCGAGGTCTC	CTGCATTAGA	GCGAGACGCT
Texel	CCGAGGTCTC	CTGCATTAGA	GCGAGACGCT

شکل ۲- تغییرات نوکلئوتیدی میان ژن ریونوکلئاز توالی‌یابی شده نژاد اوریل و بلوچی با ژن ریونوکلئاز مرجع نژاد رامبویییه.

ناحیه ژنی اگزون یک گوسفند بلوچی با اوریل تنها یک تفاوت تک نوکلئوتیدی در موقعیت بازی ۴۱۱ نشان داده شد، و همچنین تفاوت‌های نوکلئوتیدی متعددی در ناحیه اینترون و اگزون ۲ بعد از هم‌ردیفی مشاهده شدند. به‌طور کلی این تفاوت‌ها می‌توانند در تنظیم بیان ژن در شرایط خاص نقش داشته باشند. در پایگاه داده NCBI توالی ژنی ریونوکلئاز با شماره دسترسی (XM_004010384) نوکلئوتید ۱ تا ۵۲۸ اگزون اول و نوکلئوتید ۱۲۶۲ تا ۴۳۴۷ جفت‌بازی ناحیه اگزون دوم گزارش شده است. به‌دنبال هم‌ردیفی توالی ژنی ریونوکلئاز پانکراس گوسفند بلوچی و اوریل در مطالعه حاضر با توالی ژنی مرجع نژاد رامبویییه توسط سرور آنالیز MultiAlign تفاوت‌هایی به‌صورت حذف، اضافه و جابه‌جایی‌های تک نوکلئوتیدی دیده شدند. در موقعیت نوکلئوتیدی ۴۱۱ ناحیه اگزون یک (جابه‌جایی نوکلئوتید تیمین به سیتوزین در نژاد اوریل و بلوچی)، موقعیت نوکلئوتیدی ۷۱۸ و ۹۴۳ در ناحیه اینترون به‌ترتیب (حذف نوکلئوتید گوانین در نژاد رامبویییه و جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین به ادنین در نژاد اوریل و بلوچی)، در اگزون ۲ حذف توالی GGCCC در ناحیه ۱۷۸۰ تا ۱۷۸۵ در نژاد اهلی بلوچی و نژاد وحشی اوریل در مقایسه با توالی ژن مرجع نژاد رامبویییه، در موقعیت‌های ۱۷۶۷، ۱۹۸۸، ۲۴۲۸، ۲۶۳۹، ۲۸۴۸، ۲۸۵۵، ۲۸۹۹ و ۳۲۰۵ به‌ترتیب (جابه‌جایی نوکلئوتید تیمین به سیتوزین، سیتوزین به تیمین، تیمین به ادنین در نژاد اوریل، حذف نوکلئوتید ادنین در نژاد رامبویییه و بلوچی، جابه‌جایی نوکلئوتید ادنین به سیتوزین، ادنین به گوانین، سیتوزین به ادنین، گوانین به ادنین در نژاد اوریل)، موقعیت نوکلئوتیدی ۲۹۶۸ (جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین به ادنین در نژاد بلوچی)، موقعیت نوکلئوتیدی ۴۲۱۲ (جابه‌جایی گوانین به تیمین در نژاد اوریل و بلوچی) مشاهده شدند. تمام تغییرات ذکر شده در (جدول ۲) و به‌صورت شماتیک در (شکل ۲) مشخص شده‌اند. مقایسه سه توالی ۴۳۴۷ جفت‌بازی به‌دست آمده برای گوسفند بلوچی و اوریل و ژنوم مرجع رامبویییه با شماره دسترسی (XM_004010384) ۱۰ تفاوت نوکلئوتیدی را با میزان مشابهت ۹۹/۷۸ درصد نشان داد. هم‌چنین مقایسه توالی گوسفند نژاد رامبویییه با شماره دسترسی (XM_004010384) با گوسفند اوریل

رامبویه، بلوچی و وحشی اوریل موقعیت نوکلئوتیدیهای ۱۲۸۷ تا ۱۳۵۲ جایگاه سیگنال پپتید و همچنین نوکلئوتید ۱۳۵۲ تا ۱۷۲۷ در ناحیه اگزون یک این ژن توالی ترجمه شده به پروتئین CDS می باشد (شکل ۵). رونوشت برداری توالی DNA به mRNA و برش توالی های بالادست و پایین دست نشان داد که توالی های مورد همراه با سیگنال پپتید شامل ۴۴۱ نوکلئوتید هستند. جایگاه سیگنال پپتید همان طور که در شکل ۳ دیده می شود از نوکلئوتید ۱ تا ۶۶ در هر سه توالی یکسان بوده و نشان گذاری شده است.



شکل ۳- قسمتی از توالی ژن *RNase A* هم ردیف شده و ناحیه سیگنال پپتید (پیکان قرمز) از نوکلئوتید ۱ تا ۶۶.

جدول فواصل ژنتیکی با استفاده از توالی های به دست آمده برای گوسفند اوریل و بلوچی و همچنین با سایر توالی های نشخوارکنندگان از قبیل بز، گاو، شتر و غیره موجود در پایگاه داده NCBI مورد محاسبه قرار گرفت (شکل ۴). از آنجا که اعداد حاصل از فواصل ژنتیکی بین گونه های مختلف به صورت دو به دو است، در نتیجه این اعداد نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی های گونه های مورد بررسی می باشند و فاصله ژنتیکی بین دو گونه با همبستگی فیلوژنتیکی بین گونه ها مرتبط خواهد بود، در نتیجه این شاخص هم می تواند برای تعیین دوری و نزدیکی ژنتیکی گونه های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. اگرچه توالی کدکننده ژن *RNase A* نشخوارکنندگان دارای شباهت بالایی با یکدیگر هستند، اما نتایج این مطالعه نشان داد که توالی های بالا دستی و پایین دستی ژن دارای تفاوت های زیادی با یکدیگر هستند. در این میان گونه بز دارای فاصله ژنتیکی ۰/۰۱ با گونه گوسفندی و ۰/۰۶ سانتی مورگان با به *RNase A* گاوی است.

با وجود تشابهت بالای ژن کدکننده آنزیم *RNase A* در این سه گونه بیشتر تفاوت های گزارش شده مربوط به اگزون ۲ این ژن می باشد.

همچنین بیشتر تفاوت های ذکر شده در توالی ژنی ریونوکلئاز پانکراسی نژاد اوریل دیده شده است که این نشانی از تکامل گوسفند وحشی اوریل به اهلی بوده است. مهم تر از همه یک حذف ۵ نوکلئوتیدی که در هر دو نژاد بلوچی و اوریل نسبت به نژاد رامبویه دیده شده است. در واقع این تفاوت ها ناشی از تفاوت های نژادی و ژنتیکی بین نژادهای اهلی و وحشی می باشد که در طی سالیان درازی تثبیت شده اند. ناحیه ترجمه شونده به پروتئین (CDS) به شکل کاملاً محافظت شده در توالی های گوسفند های بلوچی، وحشی اوریل و رامبویه قرار گرفته اند ولی تفاوت های نوکلئوتیدی مشاهده شده در ناحیه اگزون ۲ ژن *RNase A* با توالی ژن مرجع رامبویه می تواند در تنظیم بیان ژن نقش و نحوه عملکرد پروتئین ترجمه شده نقش و تاثیر به سزایی داشته باشند.

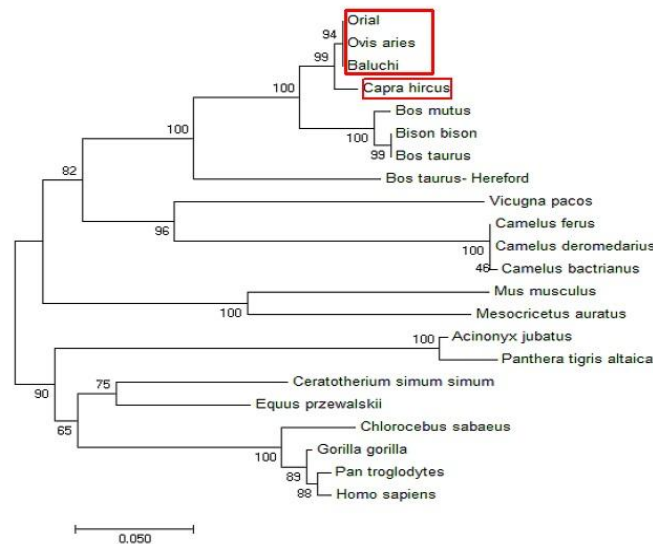
توالی های قطعه ژنی تکثیر شده ژن ریونوکلئاز به ترتیب با شماره دسترسی MG932658 برای نژاد اوریل و MG932659 برای نژاد بلوچی در پایگاه داده NCBI ثبت شده اند. میزان حداقل انرژی آزاد ساختار ثانویه بهینه mRNA ژن *RNase A* در نژاد رامبویه به میزان ۱۲۲۴/۲۰- کیلوکالری/مول، گوسفند بلوچی به میزان ۱۲۲۳/۲۰- کیلوکالری/مول و گوسفند اوریل ۱۲۱۶۰/۸۰- کیلوکالری/مول به دست آمد. در نتیجه، عامل انرژی آزاد ساختار ثانویه mRNA ژن *RNase A* نژاد بلوچی و رامبویه به یکدیگر نزدیک تر هستند که حاکی از شباهت بالای این دو نژاد برای این پارامتر ساختاری mRNA می باشد، در حالی که سطح انرژی آزاد در نژاد وحشی اوریل تفاوت بیشتری نسبت به نژادهای اهلی مطالعه شده دارد. بنابراین با بررسی ظاهری ساختار ثانویه mRNA ژن *RNase A* در نژادهای اهلی مورد مطالعه و نژاد وحشی، شباهت بالایی را بین نژادهای اهلی و تفاوت با نژاد وحشی را می توان مشاهده کرد. تفاوت در موقعیت های نوکلئوتیدی ۱۸۲۰ تا ۲۰۷۰ ساختار ثانویه mRNA ژن *RNase A* تفاوت موجود در میان نژاد اهلی با وحشی اوریل را ثابت می کند. به دنبال هر سه توالی ژن *RNase A* هم ردیف شده نژادهای

موجود است، اما با توجه به شباهت بالا در نواحی بالا دستی و پایین دستی همه زیرگونه‌های مختلف گاو در یک کلاذ قرار گرفته‌اند. همچنین در سایر نژادها (گاو وحشی *Bos mutus* با گاوهای اهلی)، خانواده شترها، موش‌ها، گربه سانان، اسب با کرگدن و انسان با توالی ژنی ریونوکلئاز مرتبط با گوریل و میمون‌ها با درصد تشابه بالایی در یک کلاذ قرار گرفته‌اند. مطالعه انجام شده (Premzl 2014) بر مبنای درصد تشابه و روابط فیلوژنی خانواده آنزیم‌های ریونوکلئاز در تطابق با مطالعه حاضر تأیید کردند که آنزیم ریونوکلئاز *RNase A* در انسان با *pan troglodytes* و میمون‌ها، خانواده اجدادی گاوها و موش‌ها با هم مشابه هستند که ناشی از درصد تشابه بالای اجدادی ژنتیکی بین آن‌ها می‌باشد (Premzl 2014).

همچنین *RNase A* گونه گاوی دارای فاصله ژنتیکی ۰/۰۶ سانتی‌مورگان با گونه گوسفندی و ۰/۳ سانتی‌مورگانی با نمونه *RNase A* انسانی است. به‌منظور تأیید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی (شکل ۴)، درخت فیلوژنتیک توالی‌های مربوط به گوسفند بلوچی و اورپال با سایر توالی‌های موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ ترسیم شد (شکل ۵). همان‌طور که در شکل (۵) مشخص شده، هر دو گونه گوسفند نژاد بلوچی و اورپال با توالی ثبت شده برای نژاد رامبویه همراه توالی ژنی ریونوکلئاز پانکراس ثبت شده برای گونه بز در یک کلاذ قرار گرفته‌اند و این به‌دلیل نزدیکی ژنتیکی گوسفندان و بز از طریق شباهت اجدادی بین این نژادها می‌باشد. همچنین نتایج نقشه فیلوژنتیکی ژن *RNase A* برای نژاد گاو نشان داد که اگرچه تفاوت‌های نوکلئوتیدی در این توالی‌ها

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. Homo sapiens Homo sapiens chromosome 1...		0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.01	0.07	0.08	0.08	0.05	0.08	0.08	0.01	0.08	0.09	0.01	0.08	0.07
2. Mus musculus Mus musculus strain C57BL...	0.29		0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.06	0.07	0.08	0.08	0.08	0.10	0.08	0.07	0.09	0.09	0.07	0.08	0.04
3. Camelus ferus Camelus ferus isolate Na...	0.33	0.33		0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.00	0.08	0.08	0.10	0.00	0.08	0.10	0.06	0.08	0.07	0.09
4. Bison bison Bison bison isolate...	0.30	0.30	0.30		0.02	0.00	0.02	0.02	0.07	0.00	0.07	0.04	0.07	0.09	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	0.02	0.08
5. Consensus of all...	0.30	0.31	0.30	0.06		0.02	0.00	0.01	0.07	0.02	0.07	0.03	0.06	0.09	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07	0.00	0.08
6. Bos mutus Bos mutus isolate yak QH1 un...	0.30	0.30	0.30	0.01	0.06		0.02	0.02	0.07	0.00	0.08	0.04	0.07	0.09	0.07	0.08	0.09	0.07	0.08	0.02	0.08
7. Ovis aries Ovis aries breed Texel cho...	0.31	0.32	0.30	0.06	0.00	0.06		0.01	0.07	0.02	0.08	0.04	0.07	0.09	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07	0.00	0.08
8. Capra hircus Capra hircus breed San Cl...	0.33	0.31	0.32	0.06	0.01	0.06	0.02		0.08	0.02	0.08	0.04	0.07	0.09	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.01	0.08
9. Goral goral Goral goral gonil...	0.02	0.27	0.32	0.30	0.29	0.29	0.29	0.31		0.07	0.08	0.07	0.05	0.08	0.08	0.01	0.08	0.09	0.00	0.07	0.07
10. Bos taurus Hereford Bos taurus breed He...	0.30	0.30	0.30	0.00	0.06	0.01	0.06	0.06	0.30		0.07	0.04	0.07	0.09	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	0.02	0.08
11. Camelus bactrianus Camelus bactrianus...	0.33	0.34	0.00	0.30	0.30	0.31	0.31	0.32	0.32	0.30		0.08	0.08	0.11	0.00	0.08	0.10	0.06	0.08	0.08	0.09
12. Bos taurus Bos taurus breed Hereford c...	0.31	0.32	0.30	0.16	0.15	0.15	0.15	0.15	0.29	0.16	0.31		0.07	0.11	0.08	0.08	0.10	0.08	0.08	0.04	0.08
13. Cervos elaphus Cervos elaphus...	0.22	0.30	0.31	0.28	0.27	0.28	0.27	0.28	0.21	0.28	0.32	0.27		0.06	0.08	0.05	0.06	0.07	0.05	0.07	0.07
14. Panthera tigris Panthera tigris...	0.32	0.39	0.40	0.36	0.35	0.37	0.35	0.37	0.33	0.36	0.41	0.41	0.27		0.10	0.09	0.01	0.11	0.08	0.09	0.10
15. Camelus dromedarius Camelus dromedariu...	0.33	0.33	0.00	0.30	0.30	0.30	0.30	0.32	0.32	0.30	0.00	0.30	0.31	0.40		0.08	0.10	0.06	0.08	0.07	0.09
16. Chlorocebus sabaeus Chlorocebus sabaeu...	0.05	0.29	0.31	0.31	0.30	0.31	0.30	0.33	0.05	0.31	0.32	0.30	0.22	0.34	0.31		0.08	0.09	0.01	0.08	0.07
17. Acinonyx jubatus Acinonyx jubatus isol...	0.32	0.37	0.39	0.33	0.32	0.35	0.33	0.34	0.31	0.33	0.39	0.38	0.26	0.03	0.39	0.33		0.10	0.08	0.08	0.10
18. Vicugna pacos Vicugna pacos isolate Ca...	0.37	0.36	0.24	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.35	0.29	0.24	0.31	0.29	0.43	0.24	0.35	0.41		0.09	0.07	0.10
19. Pan troglodytes Pan troglodytes isolat...	0.01	0.29	0.33	0.31	0.30	0.30	0.30	0.32	0.01	0.31	0.33	0.30	0.21	0.32	0.33	0.05	0.32	0.37		0.07	0.07
20. Consensus of all...	0.31	0.32	0.30	0.06	0.00	0.06	0.00	0.02	0.29	0.06	0.31	0.15	0.27	0.35	0.30	0.30	0.33	0.29	0.30		0.08
21. Mesocricetus auratus Mesocricetus aur...	0.31	0.19	0.37	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.30	0.31	0.37	0.31	0.30	0.40	0.37	0.31	0.40	0.40	0.31	0.31	

شکل ۴- ماتریس فواصل ژنتیکی بر مبنای توالی ژن *RNase A* گونه‌های مختلف پستانداران، مثلث پایینی فاصله ژنتیکی و بالایی استاندارد خطا می‌باشد. مربع‌های قرمز نشان‌دهنده گونه‌های شاخص بررسی شده در این مطالعه می‌باشد.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی مقایسه توالی ژن *RNase A* برای نژاد بلوچی و اورپال با سایر گونه‌های حیوانی وحشی و اهلی

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه پتانسیل ژنتیکی آنزیم *RNase A* گونه گوسفند اهلی و وحشی مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه توالی نوکلئوتیدی آنزیم *RNase A* این دو گونه و در مقایسه با توالی مرجع در NCBI کاملاً با یکدیگر شباهت داشت، اما تفاوت‌های نوکلئوتیدی در بالادست و پایین دست ژن پیدا شد که این SNPها با توجه به نزدیک بودن به نواحی تنظیمی، احتمالاً می‌توانند نقشی در تنظیم بیان ژن *RNase A* داشته باشد. شکل سه

بعدی آنزیم ریبونوکلئاز نیز پیش‌بینی و مشخص شد و همچنین جایگاه سیگنال پپتید نیز در توالی نشان‌گذاری شد، از طرفی نتایج این مطالعه نشان داد که *RNase A* گونه بز دارای بیشترین شباهت با گونه گوسفندی است.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، گرنت شماره ۳۰۹۵۹/۲ انجام شد.

منابع

- Afsharian A, Nassiri M, Javadmanesh A, Ebrahimie S (2018) Genetic diversity of Persian crocodile *Crocodylus palustris* using sequencing of D-Loop and Cyt b regions of mitochondria. *Agricultural Biotechnology Journal* 4: 17-38. (In Farsi)
- Barnard E (1969) Ribonucleases. *Annual review of biochemistry* 38: 677-732.
- Beintema J, Scheffer A, van Duk H, Welling G, Zwieters H (1973) Pancreatic ribonuclease distribution and comparisons in mammals. *Nature New Biology* 241: 76.
- Beintema JJ (1990) The primary structure of langur (*Presbytis entellus*) pancreatic ribonuclease: adaptive features in digestive enzymes in mammals. *Molecular biology and evolution* 7: 470-7.
- Beintema JJ, Schüller C, Irie M, Carsana A (1988) Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. *Progress in biophysics and molecular biology* 51: 165-92.

- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic acids research* 16: 10881-90.
- Forouharmehr A, Nassiri M, Ghovvati Roudsari S, Javadmanesh A (2020) Production and introduction of a novel immunotoxin based on engineered *RNase A* for inducing death to Her1-positive cell lines. *Journal of Cellular Physiology* 235:4679-4687.
- Farris JS (1970) Methods for computing Wagner trees. *Systematic Biology* 19:83-92.
- Farris JS (1989) The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417-9.
- Fitch WM (1971) Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* 20: 406-16.
- Felsenstein J (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of molecular evolution* 17: 368-76.

Larkin MA, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics* 23: 2947-8.

Lartillot N, Rodrigue N, Stubbs D, Richer J (2013) PhyloBayes MPI: phylogenetic reconstruction with infinite mixtures of profiles in a parallel environment. *Systematic Biology* 62: 611-5.

Premzl M (2014) Comparative genomic analysis of eutherian ribonuclease A gene. *Molecular genetics and genomics* 289: 161-7.

Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K (2011) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research* 40: D13-D25.

Swindell SR, Plasterer T (1997) Sequence data analysis guidebook: Humana Press New York.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4: 406-25.

Swofford DL, Sullivan J (2003) Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP*. The

Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny, cap 7:160-206.

Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688-90.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic biology* 57:758-71.

Yang Z, Rannala B (1997) Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular biology and evolution* 14: 717-24.

Zamani W, Ghasempouri SM, Rezaei HR, Naderi S, Hesari ARE, Ouhrouch A (2018) Comparing polymorphism of 86 candidate genes putatively involved in domestication of sheep, between wild and domestic Iranian sheep. *Meta Gene* 17: 223-31.