

الگوی ترجیح کدونی در ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو زیر گونه گاو (*Bos taurus* و *Bos indicus*)

Codon usage pattern of genes differentially expressed between two bovine subspecies (*Bos indicus* vs. *Bos taurus*)

بتول اصغری اسفدن^۱، غلامرضا داشاب^۱، محمدحسین بناءبازی^{۲*}

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- استادیار، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Asghari B¹, Dashab GR¹, Banabazi MH^{*2}

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of IRAN (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.banabazi@areeo.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

الگوی ترجیح کدونی (CUB)، به عنوان الگوی استفاده غیر تصادفی از کدون‌های مشابه که اسید آمینه‌های مختلف را در ژنوم رمزگذاری می‌کنند، تعریف می‌شود که عوامل مختلفی از جمله جهش و انتخاب در شکل‌گیری آن‌ها مؤثر هستند و از آنجایی که این الگوها مرتبط با بیان و ترجمه ژن‌ها می‌باشند، می‌توان از آن‌ها در فرآیند انتخاب دام‌ها بهره جست. در این مطالعه به بررسی الگوی ترجیح کدونی ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو جمعیت گاو هلشتاین و کلیستانی و ارتباط آن با بیان ژن پرداخته می‌شود. در این مطالعه، از نتایج آنالیز بیان ژن افتراقی دو داده RNA-Seq به ترتیب مربوط به ادغام ۴۰ و ۴۵ نمونه خون کامل از گاوهای ماده هلشتاین (*Bos taurus*) و کلیستانی (*Bos indicus*) استفاده شد. الگوی ترجیح کدونی بر اساس شاخص‌هایی از جمله ENC، GC3S، CAI و GC برای ژن‌های متفاوت بیان شده بین این دو جمعیت گاو محاسبه شد. آنالیز ترجیح کدونی برای نواحی ORF ژن‌های متفاوت بیان شده بین دو جمعیت هلشتاین و کلیستانی نشان داد که همبستگی بالایی بین مقادیر شاخص GC کل و GC3S وجود دارد. این موضوع حاکی از تأثیر مقدار GC و جهش به عنوان عامل مهم در ایجاد کدون‌های مختلف می‌باشد. همچنین، همبستگی بین شاخص ENC و GC3S نشان داد که جهش مهم‌ترین عامل در شکل‌گیری کدون‌ها بوده است. همبستگی بین شاخص CAI، که عمدتاً برای پیش‌بینی سطوح بیان ژن به کار می‌رود، با شاخص ENC نشان‌دهنده ارتباط بین الگوی ترجیح کدونی و بیان ژن بود. این مطالعه مقایسه‌ای بین نمونه‌هایی از دو زیرگونه گاو، به درک بهتر ساز و کارهای تکاملی شکل‌گیری الگوی ترجیح کدونی و نیز بررسی ارتباط آن با بیان ژن کمک می‌نماید.

واژه‌های کلیدی

الگوی ترجیح کدونی

گاو هلشتاین

گاو کلیستانی

ژن‌های متفاوت بیان شده

RNA-Seq

مقدمه

زمانی که در جمعیت انتخاب صورت می‌گیرد (در گذشته بر مبنای فنوتیپ) به دلیل محدودیت زمانی، فرصت کافی برای ایجاد نوترکیبی فراهم نمی‌شود، لذا پیوستگی بین جایگاه یا جایگاه‌های اطراف حفظ می‌شود. بنابراین، تنوع در داخل جمعیت کاهش و در بین جمعیت‌ها افزایش یافته و عدم تعادل لینکاژی (LD) را افزایش می‌دهد (Marais and Piganeau 2002). از این رو زمانی که انتخاب مثبت در جهت افزایش فراوانی آلل‌های مطلوب پیش می‌رود جایگاه‌های نزدیک به این جایگاه نیز حتی اگر اثرشان هم خنثی باشد به علت پیوسته بودن با آلل مطلوب فراوانی‌شان زیاد می‌شوند. این پدیده در ژنتیک جمعیت به نوعی مرتبط با اصطلاحات پاک‌سازی انتخابی ژنوم^۱ و ردپای انتخاب^۲ است. بنابراین، هر اتفاقی در جمعیت رخ دهد قطعاً ردپایی از آن در سطح ژنوم باقی خواهد ماند که ردپای انتخاب نیز در جمعیت بر جای گذاشتن تغییراتی (ایجاد الگوهای ترجیح کدونی مرتبط بایان جایگاه‌های متأثر از انتخاب) در سطح ژنوم است که این تغییرات جمعیت‌ها را از یکدیگر متمایز می‌کند (Marais and Piganeau 2002).

یکی از حوزه‌های ضروری در پژوهش‌های گونه‌های اهلی شناسایی ژن‌هایی است که صفات تولیدی مهم را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Pasandideh et al. 2015). کدون‌ها مرکز تمام فعالیت‌های بیولوژیکی یا به عنوان واحدهای کدکننده خاص و هم‌چنین برای شناسایی اجزای mRNAs ضروری هستند. معمولاً آمینواسیدها با چندین کدون مترادف رمزگذاری می‌شوند که دامنه آن‌ها بین ۲ تا ۶ کدون است، البته تنها استثناء مربوط به اسیدهای آمینه میتوئین و تربیتوفان است که فقط یک کد رمز یا کدون شناسایی دارند (Novoa et al. 2012).

اگرچه جهش‌های بی‌معنی در توالی پروتئین‌ها خاموش هستند، اما کدون‌های مترادف به طور وسیعی در داخل و بین ژنوم حیوانات دیده می‌شوند (Plotkin and Kudla 2011). لذا مطالعه الگوی کاربرد کدون‌ها برای درک بهتر بیولوژی مولکولی و تکامل، ترجمه mRNA، طراحی ترانس ژن‌ها، کشف ژن‌های جدید و

دیگر کاربردهای بیولوژیکی در طی دهه‌های اخیر مورد ارزیابی قرار گرفته است (Duret and Mouchiroud 1999; Shabalina et al. 2013). پایه بیولوژی کدون‌ها بر اساس مطالعات طول کامل توالی ترجمه (ORF) است که در گونه‌های مختلف مگس سرکه و گونه‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است (Duret and Mouchiroud 1999).

از طرف دیگر، کدون‌های مترادف (همه‌ی کدون‌های خاص یک اسید آمینه) در ژنوم یک موجود با فراوانی متفاوتی استفاده می‌شوند به وقوع این رخداد در ژنوم، ترجیح یا تمایل کدونی^۳ (CUB) گفته می‌شود. این پدیده در بین گونه‌های مختلف به طور گسترده‌ای متفاوت است و انتظار می‌رود که به طور قابل ملاحظه‌ای تکامل ژنوم مولکولی را تحت تأثیر قرار دهد (Hershberg and Petrov 2008; Sharp et al. 2010; Plotkin and Kudla 2011).

کدون‌های سه‌گانه، واحدهای اساسی در mRNAها هستند، نقش‌هایی را در برنامه‌ریزی برای اسید آمینه خاص ایفا می‌کنند و یا باعث شروع و خاتمه ترجمه پروتئین می‌شوند (Feng et al. 2013) و گزارش شده است که با فرآیندهای طبیعی نظیر جهش، انتخاب و دریفت ژنتیکی مرتبط هستند و به عنوان مدل ترکیبی (جهش - انتخاب - دریفت ژنتیکی) شناخته می‌شوند (Bulmer 1991). کاهش ترجیح کدونی در مناطقی از ژنوم با نوترکیبی محدود مرتبط است (Marais and Piganeau 2002).

حال بر طبق این فرضیه، کاهش تمایل کدونی در منطقه ژنومی با نوترکیبی محدود به دلیل اثر Roberston-Hill و منطبق با تئوری نشانه‌های انتخاب^۴ Signature of selection است (Marais and Piganeau 2002). با توجه به این ارتباط می‌توان بر مبنای الگوی ترجیح کدونی موجود در سراسر ژنوم مناطقی را که در گذشته مورد انتخاب قرار گرفته‌اند بهتر شناسایی کرد، چراکه ژن‌های موجود در این مناطق دارای بیان بیش‌تری هستند. آنچه امروز جمعیت‌های مختلف را بر مبنای یکسری صفات از یکدیگر متمایز می‌کند تفاوت میزان بیان ژن‌های موجود در این مناطق است که تحت تأثیر انتخاب قرار گرفته‌اند (Misawa et al. 2011). تحقیقات گسترده ژنومی از الگوهای کدونی دارای اهمیت ویژه‌ای

³ Codon usage bias⁴ Signature of selection¹ Selective sweep² Footprint of selection

۱۳۸۷ تولید شیر دارای یک‌روند رو به رشد بوده است (Kharrazi et al. 2011). باوجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین‌تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هر نفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می‌باشد، درحالی‌که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال است (Kharrazi et al. 2011). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه‌ریزی شود. لذا مطالعه و بررسی ژن‌هایی که روی تولید و ترکیب شیر نقش مؤثری دارند اهمیتی دوچندان می‌یابد (Kharrazi Koopaei et al. 2012). به‌دلیل این‌که در ایران گاو مهم‌ترین تولیدکننده شیر است، مطالعه الگوی ترجیح کدونی ژن‌های بایان متفاوت و همچنین ارتباط آن بایان ژن اهمیت زیادی دارد. به‌علاوه، در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی برای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد؛ بنابراین، هدف از مطالعه حاضر آنالیز الگوی ترجیح کدونی ژن‌های با بیان متفاوت و همچنین ارتباط آن با بیان ژن در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی با استفاده از داده‌های RNA-Seq می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از داده‌های RNA-Seq مربوط به ادغام ۴۰ نمونه از گاو هلشتاین مربوط به مرکز گاو شیری دانشگاه ویسکانسین آمریکا (*Bos taurus*) و ۴۵ گاو ماده کلیستانی (*Bos indicus*) در مزرعه گوجایتپیر شهر باه‌والپور واقع در ایالت پنجاب پاکستان استفاده شد. این داده‌ها در مطالعه (Huang et al. 2012) به‌دست آمده بودند. در پژوهش (Salimpour 2016) که بر روی این داده‌ها انجام شد، ۴۰ ژن با بیان متفاوت در بین این دو گروه گاو هلشتاین و کلیستانی را گزارش شد که مبنای مطالعه حاضر قرار گرفت. اطلاعات مربوط به این ژن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. اطلاعات مربوط به توالی این ژن‌ها از بانک اطلاعاتی www.ebi.ac.uk اخذ شدند.

در درک ویژگی‌های اساسی از سازمان مولکولی یک ژنوم می‌باشد. امروزه مشخص شده‌است که عوامل دیگری جز جهش و انتخاب در این فرایند تأثیرگذار هستند. با مطالعه ژنومی صورت گرفته عواملی از جمله طول ژنوم، مقدار GC، نسبت نوترکیبی، سطوح بیان ژن (Sueoka and Kawanishi 2000; Zeeberg 2002; Wan et al. 2004; Palidwor et al. 2010)، ساختار پروتئین، طول ایترون، اندازه جمعیت، سن تکاملی ژن، استرس محیطی، پروتئین‌های آب‌گریز همه‌ی این‌ها منجر به استفاده غیر تصادفی از کدون‌های مترادف در فرایند ترجمه می‌شوند که تأثیرگذار بر تکامل مولکولی ژنوم هستند (Sueoka and Kawanishi 2000; Zeeberg 2002; Wan et al. 2004; Palidwor et al. 2010).

با استفاده از اطلاعاتی که در حال حاضر از توالی ژنوم موجودات مختلف موجود است، می‌توان الگوهای ترجیح کدونی را در سراسر ژنوم موجودات مختلف شناسایی نمود و از الگوهایی که مرتبط با بیان و ترجمه ژن هستند در جهت انتخاب بهره جست و یا حتی از آن برای بررسی وقایعی که در اثر عواملی نظیر انتخاب، جهش در گذشته رخ می‌دهد یا به‌عبارتی جایگاه‌هایی که کاندیدای انتخاب قرار گرفته‌اند استفاده کرد. با این تفاوت که علاوه بر استفاده از اطلاعات SNP‌های گسترده شده در کل ژنوم از اطلاعات الگوی ترجیح کدونی موجود در سراسر ژنوم به یک گام فراتر از سطح ترجمه (ترانسکریپتوم و پروتئوم) گام برداشت، بدون اینکه ترانسکریپتوم و یا حتی پروتئوم سلول را بررسی نمود. الگوی ترجیح کدونی در بسیاری از گونه‌ها از جمله ویروس‌ها، پروکاریوت‌ها و همچنین در تعدادی از گونه‌های یوکاریوتی مورد بررسی قرار گرفته است (Stenico et al. 1994; Powell and Moriyama 1997; Ermolaeva 2001; Jenkins and Holmes 2003; Gu et al. 2004; Mitreva et al. 2006; Behura and Severson 2012)، ولی تاکنون تحقیقات اندکی بر روی گونه‌های دامی صورت گرفته که با رشد داده‌های ترانسکریپتومی امکان بررسی الگوی ترجیح کدونی و بررسی ارتباط آن بایان ژن فراهم شده‌است.

از طرفی، طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد ۱۸۸۳۰ واحد صنعتی گاوداری با ظرفیت ۲۰۴۸۵۶۳ رأس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال‌های ۱۳۸۳ تا

جدول ۱-کد، نام اختصاری و جایگاه ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو جمعیت هلشتاین و کلیستانی

جایگاه ژنی*	نام اختصاری ژن	کد ژن‌های حاشیه نویسی
11:46410276-46418787	IL1B	ENSBTAG00000001321
13:53261634-53304213	TGM3	ENSBTAG00000001785
10:86883738-86887169	FOS	ENSBTAG00000004322
3:49110155-49121034	F3	ENSBTAG00000007101
1:82549641-82550013	-	ENSBTAG00000007296
7:51438726-51442500	EGR1	ENSBTAG00000010069
8:38683732-38684116	-	ENSBTAG00000011161
7:13851130-13852933	JUNB	ENSBTAG00000012046
5:99647122-99701630	-	ENSBTAG00000014332
X:66722398-66723397	-	ENSBTAG00000016688
11:38338743-38408288	EFEMP1	ENSBTAG00000017448
5:58013469-58014035	-	ENSBTAG00000018506
11:2250454-2252492	DUSP2	ENSBTAG00000020350
16:72811910-72814133	FAM71A	ENSBTAG00000021166
18:65621141-65621509	-	ENSBTAG00000027787
7:42303402-42303827	COX7B	ENSBTAG00000030735
4:101019787-101021837	-	ENSBTAG00000031458
17:63302946-63311098	SDS	ENSBTAG00000031814
3:21433393-21433557	U1	ENSBTAG00000032308
20:11746000-11746270	DYNLL1	ENSBTAG00000034170
20:64476312-64476463	U3	ENSBTAG00000037147
8:84843153-84843546	RPS15A	ENSBTAG00000037600
6:90811061-90813079	CXCL3	ENSBTAG00000037778
2:11700813-11701755	-	ENSBTAG00000038064
8:62722029-62722587	-	ENSBTAG00000038411
21:35135770-35137852	GZMB	ENSBTAG00000039813
27:24815380-24828237	DUSP4	ENSBTAG00000044208
21:66764060-66764393	-	ENSBTAG00000045497
X:144159055-144234222	EIF2S3Y	ENSBTAG00000045544
X:143364825-143375658	DDX3Y	ENSBTAG00000045750
7:21247238-21247649	-	ENSBTAG00000045914
18:46516556-46516985	PNKD	ENSBTAG00000047277
5:32529438-32529956	-	ENSBTAG00000047354

ENSBTAG00000047766	G0S2	16:75539495-75540404
ENSBTAG00000047966	-	16:6155902-6156793
ENSBTAG00000048102	-	X:143736737-143800954
ENSBTAG00000048172	ZRSR2Y	X:142664999-142690152
ENSBTAG00000034824	-	20:2680573-3054892

* در ستون جایگاه ژن، عدد سمت چپ شماره‌ی کروموزوم و اعداد بعد از آن شماره نوکلئوتید شروع و پایان ژن را نشان می‌دهد.

Sharp and Li (1986) محاسبه شده و مقدار آن در محدوده‌ی ۱-۰ است.

CBI (Codon Bias Index): این شاخص بیانگر این است که یک ژن تا چه حد از کدون مطلوب (optimal) استفاده می‌کند. مشابه با شاخص FOP بوده و در محدوده‌ی بین ۱+ تا ۱- قرار دارد که اگر مقدار آن یک باشد یعنی تمایل به استفاده از کدون مطلوب زیاد و اگر مقدار آن صفر باشد نشانگر استفاده تصادفی از کدون‌ها می‌باشد. در برخی موارد ممکن است تعداد کدون‌های مطلوب کمتر از حد مورد انتظار باشد، در این صورت مقدار این شاخص منفی برآورد می‌شود.

محاسبه شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی برای هر ژن با استفاده از نرم‌افزار CODON W (J Peden,) انجام شد. <http://codonw.sourceforge.net> برای بررسی ارتباط و وجود همبستگی بین شاخص‌های مدنظر و هم‌چنین ارتباط بین شاخص الگوی ترجیح کدونی بایان ژن و در نهایت رسم گراف‌ها از نرم‌افزار آماری R 3.4.2 (<http://www.r-project.org>) استفاده شد.

نتایج و بحث

تعداد کل نواحی ORF برای ۴۰ ژن با بیان متفاوت در بین دو جمعیت هلشتاین و کلیستانی در این تحقیق ۱۳۵۵ ناحیه شناسایی شدند. شاخص‌های ترجیح کدونی برای این نواحی محاسبه شد که در جدول ۲ میانگین این شاخص‌ها برای نواحی ORF ژن‌های بایان متفاوت آورده شده‌است.

برای شناسایی عوامل اصلی مؤثر بر شکل‌گیری کدون، همبستگی بین شاخص‌های مهم الگوی ترجیح کدونی مورد محاسبه قرار گرفت که در جدول ۳ نشان داده شده‌است.

به‌منظور بررسی الگوی ترجیح کدونی برای این ژن‌ها در ابتدا نواحی ORF برای هر ژن به‌صورت آنالین در سایت (bioinformatics.org/sms2/orf_find.html) شناسایی شد و هم‌چنین پس از آن ویرایش بر روی این نواحی صورت گرفت بدین‌صورت که نواحی ORF با طول کمتر از ۱۰۰ bp و نواحی دارای کدون پایانی میانی حذف شدند.

ENC (Effective Number of Codon): نسبت کدون‌های مؤثر استفاده شده در بیان ژن محسوب می‌شود که بر اساس فرمول ارائه شده توسط wright (1990) محاسبه شد. دامنه شاخص مذکور بین ۶۱-۲۱ است که در صورت استفاده فقط یک کدون از کدون‌های مترادف برای یک ژن مقدار آن ۲۱ و در صورت استفاده همه‌ی کدون‌های مترادف یک ژن مقدار آن ۶۱ خواهد بود.

GC3S (GC content at third codon base): مقدار کلی GC در موقعیت سوم کدون می‌باشد که اغلب نشان‌دهنده قدرت جهش می‌باشد.

RSCU (Relative Synonymous Codon Usage): شاخصی است که به‌منظور بررسی تنوع کدونی مشترک استفاده شده در بین ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌طور کلی کسری از فراوانی کدون مشاهده شده به فراوانی کدون مورد انتظار است که برحسب فرمول ارائه شده توسط Sharp and Li (1986) محاسبه می‌شود و دامنه تغییرات این شاخص هم در محدوده بین ۱-۰ است که فراوانی بالاتر از یک نشان‌دهنده ترجیح یا تمایل کدونی است.

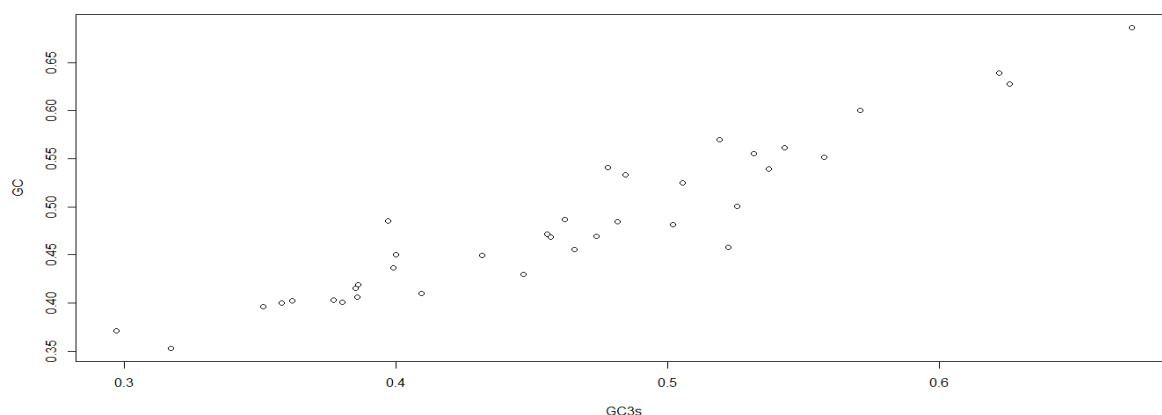
CAI (Codon Adaptation Index): نسبت کدون‌های مترادف استفاده شده به کدون‌های مترادف با فراوانی بالا (ترجیح داده‌شده) برای یک ژن است که بر اساس فرمول ارائه شده توسط

جدول ۲- میانگین شاخص‌های ترجیح کدونی برای نواحی ORF ژن‌های مورد مطالعه در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

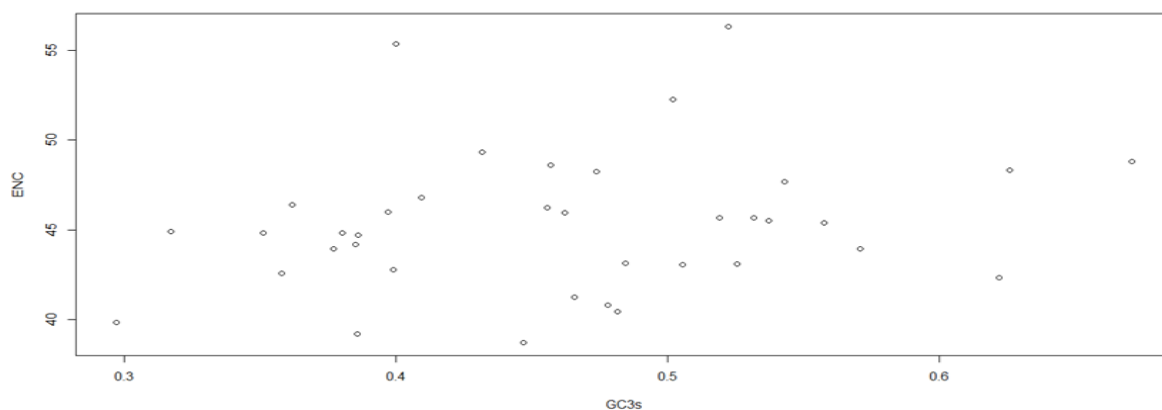
ژن های با بیان متفاوت					
ENC	GC _{3S}	FOP	CBI	CAI	
۳۸/۷۳	۰/۴۴	۰/۳۷	-۰/۰۵۴	۰/۱۹	COX7B
۴۲/۷۸	۰/۳۹	۰/۴	-۰/۰۲	۰/۱۸	CXCL3
۴۴/۸۴	۰/۳۵	۰/۳۵	-۰/۰۹۶	۰/۱۸	DDX3Y
۴۲/۳۳	۰/۶۲	۰/۴۴	۰/۰۶۶	۰/۱۸	DUSP2
۴۷/۶۷	۰/۵۴	۰/۴۰	-۰/۰۰۱	۰/۱۷	DUSP4
۵۶/۳۳	۰/۵۲	۰/۴۴	۰/۰۶	۰/۲۴	DUYNLL1
۴۳/۹۳	۰/۳۷	۰/۳۷	-۰/۰۶۷	۰/۱۸	EFEMP1
۴۵/۳۸	۰/۵۵	۰/۳۸	-۰/۰۳۶	۰/۱۶	EGR1
۴۴/۷۰	۰/۳۸	۰/۳۵	-۰/۰۶۸	۰/۱۸	EIF2SY
۵۵/۳۷	۰/۴	۰/۴۵	-۰/۰۲	۰/۲۶	ENSBTAG00000007296
۴۱/۲۵	۰/۴۶	۰/۳۵	-۰/۰۰۶	۰/۲۲	ENSBTAG00000011161
۴۴/۹۱	۰/۳۱	۰/۳۴	-۰/۰۹۹	۰/۱۸	ENSBTAG00000014332
۴۶/۳۹	۰/۳۶	۰/۳۴	-۰/۱۰	۰/۱۹	ENSBTAG00000016688
۴۹/۳۲	۰/۴۳	۰/۴۷	۰/۱	۰/۲۰	ENSBTAG00000018506
۴۰/۸۲	۰/۴۷	۰/۴۰	-۰/۰۳	۰/۱۹	ENSBTAG00000027787
۳۹/۸۹	۰/۲۹	۰/۳۴	-۰/۱۲	۰/۱۷	ENSBTAG00000031458
۴۳/۱۶	۰/۴۸	۰/۴۳	۰/۰۱۳	۰/۱۹	ENSBTAG00000034824
۵۲/۲۵	۰/۵۰	۰/۳۸	-۰/۰۱۴	۰/۱۷	ENSBTAG00000038064
۴۶/۰۱	۰/۳۹	۰/۳۷	-۰/۰۷۶	۰/۱۹	ENSBTAG00000038411
۴۰/۴۵	۰/۴۸	۰/۳۸	-۰/۰۸	۰/۱۷	ENSBTAG00000045497
۴۲/۵۹	۰/۳۵	۰/۴۰	-۰/۰۲	۰/۲۱	ENSBTAG00000045914
۴۶/۸۱	۰/۴۰	۰/۳۶	-۰/۰۵۲	۰/۱۸	ENSBTAG00000047354
۴۳/۱	۰/۵۲	۰/۳۹	-۰/۰۶	۰/۱۸	ENSBTAG00000047966
۴۴/۲۱	۰/۳۸	۰/۳۸	-۰/۰۵۸	۰/۱۹	ENSBTAG00000048102
۴۸/۶۲	۰/۴۵	۰/۳۸	-۰/۰۳۳	۰/۱۸	F3
۴۵/۶۹	۰/۵۱	۰/۴۲	-۰/۰۰۵	۰/۱۷	FAM71A
۴۵	۰/۵۳	۰/۴۱	۰/۰۰۹	۰/۱۶	FOS
۴۸/۳۳	۰/۶۲	۰/۴۰	۰/۰۱	۰/۱۳	GOS2
۴۵/۵۱	۰/۵۳	۰/۴۲	۰/۰۳	۰/۱۸	GZMB
۴۶/۲۲	۰/۴۵	۰/۴۰	-۰/۰۰۷	۰/۱۹	ILIB
۴۸/۸۱	۰/۶۷	۰/۴۰	۰/۰۰۵۷	۰/۱۴	JUNB
۳۹/۲	۰/۳۸	۰/۳۸	-۰/۰۵	۰/۱۸	PNKD
۴۸/۲۵	۰/۴۷	۰/۴۳	۰/۰۴	۰/۲۰	RPS15A
۴۳/۰۵	۰/۵۰	۰/۴۰	۰/۰۰۲	۰/۱۸	SDS
۴۵/۹	۰/۴۶	۰/۳۸	-۰/۰۳۰	۰/۱۷	TGM3
۴۳/۹۷	۰/۵۷	۰/۴۱	۰/۰۰۲	۰/۱۷	U1
۴۳/۱۶	۰/۴۸	۰/۴۳	۰/۰۱۳	۰/۱۹	U3
۴۴/۸۵	۰/۳۸	۰/۳۹	-۰/۰۳۲	۰/۱۹	ZRSR2Y

مقدار GC برای ژن‌های مورد مطالعه در محدوده ۰/۳۵-۰/۶۸ و مقدار GC₃₅ نیز در محدوده ۰/۲۹-۰/۶۸ محاسبه شد (جدول ۲). بررسی ارتباط بین مقادیر کلی GC و این مقدار در موقعیت سوم راهی برای بررسی نقش جهش در شکل‌گیری کدون‌های ژن‌های مورد مطالعه است (شکل ۱). بدین‌صورت که اگر همبستگی بین این دو مقدار از لحاظ آماری معنی‌دار شود جهش عامل اصلی شکل‌گیری کدون‌ها بوده و در صورت عدم همبستگی

معنی‌دار بین این دو شاخص، انتخاب عامل اصلی در شکل‌گیری کدون‌ها می‌باشد (Sueoka and Kawanishi 2000). همان‌گونه که در جدول ۳ آورده شده‌است، همبستگی بین این دو شاخص از نظر آماری معنی‌دار بوده و مقدار آن ۰/۹۴ با خطای استاندارد ۰/۰۰۱ برآورد شد و نشان‌دهنده این است که جهش عامل مهمی در شکل‌گیری کدون‌ها در این تحقیق بوده است.



شکل ۱- رابطه‌ی بین شاخص‌های GC3S و GC در ژنهای با بیان متفاوت در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

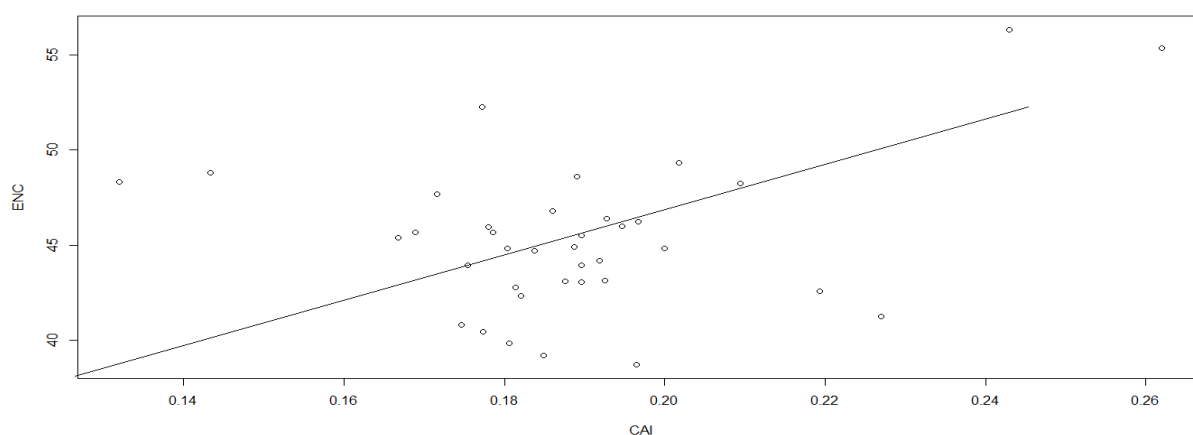


شکل ۲- رابطه‌ی بین شاخص‌های ENC و GC3S در ژنهای با بیان متفاوت در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

متنوع و به عبارتی کدون‌های مترادف متنوع استفاده شده، در بین ژنهای مورد مطالعه در این تحقیق بود. شکل ۲ ارتباط بین ENC و GC3S در بین ژنهای با بیان متفاوت در دو توده جمعیتی را نمایش می‌دهد. از این ارتباط برای بررسی این‌که کدون مطلوب مورد استفاده تحت تأثیر عامل جهش و یا انتخاب شکل گرفته است، استفاده می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۲ نمایان می‌شود، در نقاط نزدیک به منحنی، جهش به عنوان عامل اصلی در شکل‌گیری کدون‌های مطلوب بوده و در نقاط دورتر از منحنی، انتخاب نیز عاملی در شکل‌گیری این کدون می‌باشد. در این تحقیق همبستگی بین این دو شاخص ۰/۲۱ به دست آمد که خود نشان‌دهنده این است که جهش عامل مؤثر شکل‌گیری کدون‌های مطلوب می‌باشد.

در پژوهشی Wu et al. (2015) الگوی ترجیح کدونی را برای گونه‌های گیاهی به دست آوردند و گزارش کردند که جهش عامل اصلی در شکل‌گیری کدون‌های مورد مطالعه بوده و همبستگی معنی‌دار ۰/۵۹ را بین دو شاخص GC3S و GC کل به دست آوردند. در پژوهشی دیگر Yang et al. (2014) نیز همبستگی معنی‌دار ۰/۲۱ را برای این دو شاخص بر روی گونه *Taenia saginata* که به عنوان انگل روده‌ای در انسان شناخته می‌شود را گزارش کردند.

مقدار ENC همان‌گونه که در جدول ۲ آورده شده است شاخصی برای بررسی نسبت کدون مؤثر استفاده شده است که مقدار آن در دامنه ۶۴-۲۱ متغیر است. در این تحقیق، مقدار این شاخص در دامنه ۳۳/۵۶-۷۳/۳۸ محاسبه شد که نشان‌دهنده کدون‌های مؤثر



شکل ۳- رابطه‌ی بین ENC و CAI در ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

جدول ۳- همبستگی بین شاخص‌های مهم الگوی ترجیح کدونی در ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

ENC	CAI	GC3S	GC	پارامتر
-	-	-	۰/۹۴ ^{**} (۰/۰۰۱)	GC3S
-	-	-۰/۴۱ ^{**} (۰/۰۰۹)	-۰/۴۹ ^{**} (۰/۰۰۲)	CAI
-	۰/۲۸ (۰/۰۰۸)	۰/۲۱ (۰/۰۰۲)	۰/۱۲ (۰/۰۰۱)	ENC

^{**} معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ درصد

جدول ۴- مقدار RSCU کدون‌های مترادف شناسایی شده در نواحی ORF ژن TGM3 با بیان متفاوت در بین دو نژاد هلشتاین و کلیستانی

Amino acids	Codon	Rscu	Amino acids	Codon	Rscu	Amino acids	Codon	Rscu
Phe	UUU	۲	Pro	CCU	۱/۷۱	Asn	AAU	۱/۳۳
	UUC	.		CCC	۱/۷۱		AAC	۰/۶۷
Leu	UUA	۱/۲۰		CCA	.	Tyr	UAU	۲
	UUG	.		CCG	۰/۵۷		UAC	.
	CUC	.	His	CAU	.	Asp	GAU	.
	CUA	۲/۴۰		CAC	۲		GAC	.
	CUG	.	Glu	GAA	۱	Arg	CGU	.
Ile	AUU	۳		GAG	۱		CGC	۱/۵۰
	AUC	.	Thr	ACU	۱/۳۳		CGA	۱/۵۰
	AUA	.		ACC	۰/۶۷		CGG	۱/۵۰
Val	GUU	.		ACA	۱/۳۳	Arg	AGA	.
	GUC	.		ACG	۰/۶۷		AGG	۱/۵۰
	GUA	.		CAA	.	Gly	GGU	.
	GUG	.		CAG	.		GGC	۱/۳۳
Ser	UCU	۱/۳۳	Cys	UGU	.		GCA	۰/۶۷
	UCC	۲		UGC	.		GGG	۲
	UCA	۱/۳۳	Ala	GCU	۰/۸۰			
	UCG	.		GCC	۰/۸۰			
Ser	AGU	۰/۶۷		GCA	۱/۶۰			
	AGC	۰/۶		GCG	۰/۸۰			

در پژوهش Wu et al. (2015) مقدار همبستگی بین این دو شاخص ۰/۳۴ گزارش شد. هم‌چنین در پژوهشی دیگر (2014) Yang et al. نیز همبستگی معنی‌داری برای این دو شاخص در گونه‌ی مورد مطالعه گزارش کردند.

شاخص CAI معمولاً برای پیش‌بینی سطح بیان ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. مقدار آن در این تحقیق در دامنه ۰/۱۳-۰/۲۶ به‌دست آمد (جدول ۲). برای بررسی همبستگی بین نسبت کدون مؤثر استفاده شده و سطح بیان ژن از ضریب همبستگی شاخص CAI و ENC استفاده می‌شود که در این تحقیق همبستگی بین این دو شاخص همبستگی مثبت و ۰/۲۸ داشت. هم‌چنین، ارتباط بین شاخص CAI و ENC نیز در شکل ۳ آورده شده‌است. این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌هایی که بیان متفاوتی دارند از کدون‌های مؤثر بیشتری استفاده کردند و فرآیند ترجمه تحت تأثیر کدون‌های مورد استفاده قرار دارد. (Yang et al. 2014) نیز ارتباط بین سطح بیان ژن و الگوی ترجیح کدونی را مورد بررسی قرار دادند و از CAI به‌عنوان شاخصی برای سطح بیان ژن استفاده کردند و همبستگی بین این شاخص را با ENC مورد بررسی و گزارش کردند که همبستگی بین این دو شاخص معنی‌دار بوده و کدون‌های مؤثر مورد استفاده بایان ژن در ارتباط هستند. در پژوهش دیگری (Hajjari et al. 2016) ارتباط سطوح بیان ژن در بافت‌های مختلف انسان را با الگوی ترجیح کدونی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که همبستگی بین شاخص کدونی CAI با سطوح بیان ژن در بافت‌های مختلف انسان وجود دارد. در این تحقیق همبستگی بین CAI، GC3S و GC کل به‌ترتیب ۰/۴۱- و ۰/۴۹- محاسبه شد.

مقدار RSCU کدون‌های یکی از جایگاه‌های ژنی بایان متفاوت در دو نژاد هلشتاین و کلیستانی در جدول ۴ ذکر شده‌است. کدون‌های با فراوانی بیش از یک نشان‌دهنده ترجیح داده شدن آن کدون نسبت به کدون مترادف برای ژن مورد مطالعه می‌باشد. در بین کدون‌های این ژن، کدون‌های AUU، CUA، UUA، UUU، AAC، CAC، GCA، ACA، ACU، UCA، UCC، CGC، UAU، AAU، GGC، GGG نسبت به کدون‌های مترادف ترجیح داده شده‌اند. به‌طور کلی، الگوی ترجیح کدونی یک پدیده تکاملی مهم و پیچیده است که در انواع ارگانیسم‌ها اعم از پروکاریوت‌ها،

یوکاریوت‌ها تا تک‌سلولی‌ها و چند سلولی‌ها وجود دارد. فرضیه‌هایی برای نحوه‌ی شکل‌گیری الگوی ترجیح کدونی وجود داشته که می‌توان به تئوری انتخاب و مدل تعادل جهش و انتخاب به‌عنوان شاخص اشاره کرد. در مدل جهش انتخاب، الگوی ترجیح کدونی به‌وسیله تعادل بین فشار جهش، دریافت ژنتیکی و انتخاب ضعیف شکل می‌گیرد. بدین‌صورت که اگر یک ژن تحت انتخاب شدید قرار بگیرد ممکن است که تمایل بیشتری به استفاده از کدون‌های مترادف داشته باشد. از طرفی دیگر بر طبق تئوری انتخاب خنثی، جهش عامل شکل‌گیری کدون‌ها در زمان برنامه‌نویسی می‌باشد. با این‌حال در سال‌های اخیر، با تکمیل پروژه‌های ژنوم بسیاری از ارگانیسم‌ها این دو فرضیه دیگر برای توضیح الگوی ترجیح یا تمایل کدونی کافی نیستند. گزارش شده‌است که فاکتورهای دیگری در شکل‌گیری CUB تأثیرگذار می‌باشند ازجمله: طول ژن، مقدار GC، میزان نوترکیبی، سطح بیان ژن، ساختار RNA، ساختار پروتئین، طول اینترون، اندازه جمعیت، سن تکامل ژن و استرس‌های محیطی. در این مطالعه عوامل دخیل در شکل‌گیری استفاده کدونی یا همان الگوی ترجیح کدونی ژنوم گاو هلشتاین و کلیستانی شامل سطوح بیان ژن، مقدار GC و جهش هست.

الگوی کدون‌های مترادف (CUB) به‌عنوان کاربرد غیر تصادفی از کدون‌هایی که یک اسیدآمین را در ژنوم رمزگذاری می‌کنند تعریف می‌شود. این پدیده در تمام ارگانیسم‌ها مشابه هم است و عواملی که در این تغییر شکل درگیر هستند هنوز به‌طور کامل شناسایی نشده‌است. مکانیسم CUB پیچیده و نامشخص است و به‌نظر می‌رسد فاکتورهای بیولوژیکی متعددی در انتخاب کدون بهینه مرتبط باشند که بعضی از این عوامل شامل محتوای GC هم در سطح ژن و هم در سطح کل ژنوم، طول ژنوم، ساختار ژنتیکی ارگانیسم، سطح بیان ژن و راندمان ترجمه کدون‌ها به پروتئین، و فور tRNA، انتخاب، جهش و رانش تصادفی از مهم‌ترین این فاکتورها می‌باشند (Xie et al. 1998; Sharp et al. 1993).

مطالعات وسیعی در ارتباط با کدون‌های مترادف (CUB) در بسیاری از گونه‌های ویروس، پروکاریوت‌ها و هم‌چنین تعدادی از یوکاریوت‌ها به‌عنوان مدل حیوانی انجام گرفته است، اما در مهره‌داران تعداد معدودی از مطالعات در دسترس است (Mitreva

مقدار بالای این شاخص گواه میزان جهش مؤثر بالا در شکل‌گیری کدون‌های استفاده شده در بین ژن‌های مورد مطالعه بود. CAI نیز به‌طور گسترده‌ای برای بررسی بیان ژن توسط بسیاری از محققین مورد استفاده قرار گرفته است و یک شاخص قابل قبولی برای بررسی بیان ژن می‌باشد. همان‌گونه که ذکر شد همبستگی با شاخص ENC دارد که نشان‌دهنده این است که سطوح بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق عاملی تأثیرگذار در شکل‌گیری کدون‌ها هستند.

نتیجه‌گیری کلی

شواهد مطالعه حاضر نشان داد که الگوی ترجیح کدون‌ی در نتیجه تعادل بین عواملی از جمله جهش، انتخاب طبیعی، محتوای GC و سطح بیان ژن به‌وجود می‌آید، که این اطلاعات در جهت بررسی روند تکاملی و تغییرات در ژنوم و پیش‌بینی سطوح بیان ژن در گونه‌ها مفید هستند. شاخص CAI برای پیش‌بینی سطوح بیان و بازده رونویسی از ژن‌های ناشناخته و یا متفاوت بیان شده به‌کار می‌رود. از طرف دیگر کدون‌ها دارای پیامدهای عمیق در بازسازی فیلوژنتیک مبتنی بر کدون هستند که می‌تواند برای جلوگیری از برآوردهای بیش از حد تفرق در گونه‌های دور و برآوردهای کمتر از حد تفرق برای گونه‌های نزدیک به‌هم مؤثر باشند.

سپاسگزاری

مولفین بر خود لازم می‌دانند بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از پروفیسور حسن خطیب و تیم تحقیقاتی ایشان از دانشگاه ویسکانسین آمریکا بخاطر تولید داده‌های RNA-Seq و نیز از سرکار خانم مهندس مینا سلیم‌پور، دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران به‌خاطر در اختیار قرار دادن نتایج آنالیز بیان ژن افتراقی، ابراز دارند.

منابع

Ahn I, Jeong B-J, Bae S-E, Jung J, Son HS (2006) Genomic analysis of influenza some viruses, including avian flu (H5N1) strains. *European Journal of Epidemiology* 21:511-519.

et al. 2006, Behura and Severson 2012). کاربرد کدون‌های مترادف به‌طور مستقیم در تعیین ویژگی مولکولی گونه‌ها و هم‌چنین به‌عنوان یک نشانگر در تکامل مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mitreva et al. 2006).

گزارش شده‌است فاکتورهای متعددی شاخص کدون مترادف (CUB) را تغییر می‌دهند از جمله انتخاب طبیعی و شدت جهش که فاکتورهای اصلی در تنوع شاخص CUB در میان ژن‌ها در ارگانیسم‌های مختلف هستند. تجزیه و تحلیل شاخص CUB کاربردهای متعددی از جمله بیان متمایز ژن‌ها، طراحی پرایمرهای آغازین سنتز کننده کدون‌ها، پیش‌بینی سطح بیان ژن‌ها و هم‌چنین پیش‌بینی عملکرد و نقش ژن‌ها دارند (Ahn et al. 2006; Zheng et al. 2007; Naya et al. 2001).

مطالعات ژنتیک جمعیت نشان می‌دهد که سایت‌های مترادف با انتخاب ضعیف همراه هستند. شاخص کدون‌های مترادف با تعادل بین انتخاب، جهش و رانش ژنتیکی حفظ می‌شود. این نشان می‌دهد که عامل‌های اصلی انتخاب روی الگوی کدون‌ها با دقت و راندمان بالایی به پروتئین ترجمه می‌شوند (Hersberg and Petrov 2008). شدت الگوی کدون‌ها در بین ارگانیسم‌ها متفاوت است. در بعضی از ارگانیسم‌ها شاخص کدون مترادف قوی درحالی‌که در بعضی دیگر ضعیف هستند (Shields and Sharp 1987; Shields et al. 1988). هم‌چنین شاخص کدون مترادف در میان ژن‌ها در هر ژنوم نیز متفاوت است. بعضی از ژن‌ها از شاخص کدون بالا استفاده می‌کنند، اما بعضی دیگر شاخص کدون مترادف متفاوت با فراوانی مشابه دارند (Gouy and Gautier 1982; Ikemura 1985).

ترکیبات نوکلئوتیدی می‌تواند یکی از مهم‌ترین عوامل در شکل‌گیری کدون‌های استفاده شده در بین ژن‌ها باشد. همان‌گونه که ذکر شد مقدار GC در بین این ژن‌ها بالا بوده و همبستگی معنی‌داری با کدون‌های استفاده شده دارد که نشان‌دهنده نقش این عامل در شکل‌گیری کدون‌های استفاده شده‌است و از طرفی دیگر

Behura SK and Severson DW (2012) Comparative analysis of codon usage bias and codon context patterns between dipteran and hymenopteran sequenced genomes. *PLoS ONE* 7:e43111.

Bulmer M (1991) The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* 129:897-907.

- Duret L and Mouchiroud D (1999) Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4482-4487.
- Ermolaeva MD (2001) Synonymous codon usage in bacteria. *Current Issues in Molecular Biology* 3: 91-97.
- Eyre-Walker A (1996) Synonymous codon bias is related to gene length in *Escherichia coli*: selection for translational accuracy. *Molecular Biology and Evolution* 13:864-872.
- Feng C, Xu C, Wang Y, Liu W, Yin X, Li X, Chen M and Chen K (2013) Codon usage patterns in Chinese bayberry (*Myrica rubra*) based on RNA-Seq data. *BMC Genomics* 14:732.
- Gouy M and Gautier C (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Research* 10:7055-7074.
- Gouy M, Gautier C (1982) Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucleic Acids Research* 10:7055-74.
- Gu W, Zhou T, Ma J, Sun X and Lu Z (2004) Analysis of synonymous codon usage in SARS Coronavirus and other viruses in the Nidovirales. *Virus Research* 101:155-161.
- Hajjari M, Sadeghi I, Salavaty A, Nasiri H and Tahmasebi Birgani M (2016) Tissue specific expression levels of apoptosis involved genes have correlations with codon and amino acid usage. *Genomics Inform* 14:234-240.
- Hershberg R and Petrov DA (2008) Selection on codon bias. *Annual Review of Genetics* 42:287-299.
- Huang W, Nadeem A, Zhang B, Babar M, Soller M and Khatib H (2012) Characterization and comparison of the leukocyte transcriptomes of three cattle breeds. *PLoS One* 7:e30244.
- Ikemura T (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Molecular Biology Evolution* 2:13-34.
- Jenkins GM and Holmes EC (2003) The extent of codon usage bias in human RNA viruses and its evolutionary origin. *Virus Research* 92:1-7.
- Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mahyari S, Tarang AR, Potki P, Esmailizadeh AK (2012) Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. *Animal Science Papers and Reports* 30:231-240.
- Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mehyari S, Esmailizadeh AK, Tarang A, Nikbakhti M (2011) Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. *Iranian Journal of Animal Science Research* 3:185-192.
- Marais G and Piganeau G (2002) Hill-Robertson interference is a minor determinant of variations in codon bias across *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* genomes. *Molecular biology and evolution*. 19:1399-1406.
- Misawa K, Kikuno RF (2011) Relationship between amino acid composition and gene expression in the mouse genome. *BMC Research Notes*. 4:20.
- Mitreva M, Wendl MC, Martin J, Wylie T, Yin Y, Larson A, Parkinson J, Waterston RH and McCarter JP (2006) Codon usage patterns in Nematoda: analysis based on over 25 million codons in thirty-two species. *Genome Biology* 7: R75.
- Naya H, Romero H, Carels N, Zavala A, Musto H (2001) Translational selection shapes codon usage in the GC-rich genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* 501:127-130.
- Novoa EM, Pavon-Eternod M, Pan T, Ribas de Pouplana L (2012) A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage. *Cell* 149:202-213.
- Palidwor GA, Perkins TJ and Xia X (2010) A general model of codon bias due to GC mutational bias. *PLoS ONE* 5:e13431.
- Pasandideh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Tarang A (2015) Association of bovinePPARGC1A and OPN genes with milk production and composition in Holstein cattle. *Czech Journal Animal Science* 60:97-104.
- Plotkin JB and Kudla G (2011) Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics* 12:32-42.
- Powell JR and Moriyama EN (1997) Evolution of codon usage bias in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:7784-7790.
- Salimpour M (2016) Differential gene expression analysis between the Holstein and cholistani (a Pakistani breed) population using RNA sequencing (RNA-seq). University of Tehran, IRAN.
- Shabalina SA, Spiridonov NA, Kashina A (2013) Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity. *Nucleic Acids Research* 41:2073-2094.
- Sharp PM, and Li WH (1986) An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *Journal of Molecular Evolution* 24:28-38.
- Sharp PM, Emery LR and Zeng K (2010) Forces that influence the evolution of codon bias. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:1203-1212.
- Sharp PM, Stenico M, Peden JF, Lloyd AT (1993) Codon usage: mutational bias, translational selection, or both? *Biochemical Society Transactions* 21: 835-841.
- Sharp PM, Tuohy TM and Mosurski KR (1986) Codon usage in yeast: cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acids Research* 14:5125-5143.
- Shields DC, Sharp PM (1987) Synonymous codon usage in *Bacillus subtilis* reflects both translational selection and mutational biases. *Nucleic Acids Research* 15: 8023-40.
- Shields DC, Sharp PM, Higgins DG, Wright F (1988) "Silent" sites in *Drosophila* genes are not neutral: evidence of selection among synonymous codons. *Molecular Biology Evolution* 5:704-16.
- Stenico M, Lloyd AT and Sharp PM (1994) Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: delineation of translational selection and mutational biases. *Nucleic Acids Research* 22:2437-2446.

Sueoka N and Kawanishi Y (2000) DNA G+C content of the third codon position and codon usage biases of human genes. *Gene* 261:53-62.

Wan XF, Xu D, Kleinhofs A and Zhou J (2004) Quantitative relationship between synonymous codon usage bias and GC composition across unicellular genomes. *BMC Evolutionary Biology* 4:19.

Wright F (1990) The "effective number of codons" used in a gene. *Gene* 87:23-29.

Wu Y, Zhao D and Tao J (2015) Analysis of Codon Usage Patterns in Herbaceous Peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) Based on Transcriptome Data. *Gene* 6:1125-1139.

Xie T, Ding D, Tao X, Dafu D (1998) The relationship between synonymous codon usage and protein structure. *FEBS Letters* 434:93-96.

Yang X, Luo X and Cai X (2014) Analysis of codon usage pattern in *Taenia saginata* based on a transcriptome dataset. *Parasites and Vectors* 7:527.

Zeeberg B (2002) Shannon information theoretic computation of synonymous codon usage biases in coding regions of human and mouse genomes. *Genome Research* 12:944-955.

Zheng Y, Zhao WM, Wang H, Zhou YB, Luan Y, Qi M, Cheng YZ, Tang W, Liu J, Yu H, Yu XP, Fan YZ, Yang X (2007) Codon usage bias in *Chlamydia trachomatis* and the effect of codon modification in the MOMP gene on immune responses to vaccination. *Biochemistry Cell Biology* 85:218-226.