ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحه ۲۶۵ - ۲۵۷

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*[۲،۱]، علی جوادمنش[۳،۲]، فرشته اشرفی[٤]، علی فروهرمهر[٥]، محمد دوستی[٤]، حمید آریان‌نژاد[٤]

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

۲- گروه تحقیقاتی پروتئین های نوترکیب، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد

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

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

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

Nassiri M[*1,2], Javadmanesh A[2,3], Ashrafi F[4], Forouharmehr A[5], Doosti M[4], Ariannejad H[4]

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: nassiryr@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰٦/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰٦/۰۲)

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 ٤۳٤۷ جفت‌بازی ژن ریبونوکلئاز پانکراسی با استفاده از ۷ جفت پرایمر که به‌صورت هم پوشان طراحی شده بودند، تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج مقایسه توالی ژن ریبونوکلئاز پانکراتیک ٤۳٤۷ جفت‌بازی به‌دست 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 رامبوییه با شماره دسترسی XM_004010384) با گوسفند وحشی اوریال ۱۸ تفاوت نوکلئوتیدی با میزان تشابه ۹۹/٦۱ درصد و با گوسفند نژاد بلوچی ۱۰ تفاوت نوکلئوتیدی با میزان تشابه ۹۹/۷۸ درصد را نشان دادند. نتایج مطالعه حاضر تائید می‌کند، اگرچه توالی کدکننده آنزیم ریبونوکلئاز پانکراسی دو گونه بلوچی و اوریال و توالی ژن مرجع در پایگاه داده NCBI کاملا 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 توالی های ثبت شده از ژن ریبونوکلئاز پانکراسی در پایگاه داده NCBI تائید 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 کلاد قرار گرفته‌اند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم ریبونوکلئاز پانکراسی *RNaseA*
توالی‌یابی
درخت فیلوژنتیک
گوسفند اوریال
گوسفند بلوچی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

مقدمه

آنزیم‌های ریبونوکلئاز (*RNase*) دارای نقش‌های بیولوژیکی متنوعی در سلول مانند دفاع میزبان[1]، 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 واکسیناسیون DNA و ژن درمانی دارند (Beintema 1990). نشخوارکنندگان که هضم مواد غذایی آن‌ها در سکوم اتفاق می‌افتد روزانه حجم بالای ریبونوکلئاز پانکراتیک (*RNase A*) از پانکراس ترشح می‌کنند (Barnard 1969; Beintema et al. 1969; Beintema 1990) و با توجه به فعالیت بیشتر ریبونوکلئازی *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. معمولا این آنزیم‌ها به‌صورت متصل با آنتی‌بادی‌های مونوکولونال استفاده می‌شوند، به این صورت که *RNase A* کونژوگه 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 ایمونوژنسیتی 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 نشخوارکنندگان به شکل گسترده‌ای توسط پانکراس ترشح می‌شود، علاوه بر این *RNAese A* گوسفندی در ارگان‌ها و مایعات بدن مانند شیر، ادرار، سرم، مایع منی[2]، کلیه ها، وزیکول سیمنال[3]، غدد پستانی و غدد بزاقی نیز تولید می شود (Beintema et al. 1988).

توالی ژنی *RNase A* گوسفندی بر روی کروموزوم ۵ قرارگرفته است. توالی آمینواسیدی *RNAse A* گوسفندی با ۱۲٤ آمینواسید، در مقایسه با *RNase A* گاوی از لحاظ ٤ آمینواسید: سرین به جای ترئونین در موقعیت ۳، سرین به‌جای الانین در موقعیت ۱۹، گلوتامین به‌جای لیزین در موقعیت ۳۷، گلوتامین به‌جای آسپارژین در موقعیت ۱۰۳ متفاوت می‌باشد (Beintema et al. 1988).این ژن در انسان و موش بر روی کروموزوم ١٤ 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 اوریال 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 پتاسیل 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 اوریال معرفی می‌کند.

مواد و روش‌ها

به تعداد ۵ نمونه خون از هر دو گونه گوسفند بلوچی و اوریال 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 defense
[2] Seminal plasma
[3] Seminal vesicles

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

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

به‌منظور تکثیر ٤٣٤٧ جفت‌باز ژن *RNase A* گوسفندی بر اساس توالی ژنوم مرجع گوسفند (نژاد رامبوییه) موجود در پایگاه بانک جهانی ژن NCBI، با استفاده از نرم افزار Primer Premier 5 هفت جفت آغازگر اختصاصی به‌صورت هم پوشان با مشخصات مندرج در (جدول ١) طراحی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مستر میکس آمپلیکون (دانمارک) در حجم نهایی٢٠ میکرولیتر شامل ٥٠ نانوگرم DNA و ٥ 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 به‌صورت؛ واسرشت‌سازی در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد برای ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای (٦٠ درجه برای ٣٠ ثانیه برای جفت آغازگرهای ٥ و ٧) و (٦٥ درجه برای ١٥ ثانیه برای جفت آغازگرهای ١، ٢، ٣ ، ٤ و ٦)، تکثیر در دمای ٧٢ درجه برای ٤٠ ثانیه، یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد برای ١٠ دقیقه و یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ٧٢ درجه برای ١٠ دقیقه) در دستگاه ترموسایکلر T-Personal (بایومترا، آلمان) تنظیم شدند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ١ درصد رنگ‌آمیزی شده با ژل رد الکتروفورز شدند.

میزان٥٠ میکرولیتر از محصولات PCR به‌همراه میزان ٥٠ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ١٠ پیکومول به‌منظور 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 به‌منظور 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[4] به‌دست آمده بر اساس معیار اکثریت، با استفاده از نرم‌افزار SEQMAN (Swindell and Plasterer, 1997) تعیین و در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شدند.

[4] Consensus

جدول ١- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

جفت پرایمر	توالی آغازگرهای رفت و برگشت	موقعیت مکانی جفت پرایمرها	اندازه محصول (bp)
١	For: 5′- GCCACAAGGGAAGCCCAAGA-3′	١٤٢-١٢٣	٩٧٤
	Rev: 5′-TCCAGACCACAGTTGACAGAGC-3′	١٠٩٦-١٠٧٥	
٢	For: 5′-CCCAGGTAAGCAGCCCAAGAA-3′	٨٠٣-٧٨٣	٨٠٧
	Rev: 5′-ACCAGGACCAACAGTGACAACA-3′	١٥٨٩-١٥٦٨	
٣	For: 5′-CTCTGTAGGGAGTGGGAGTCAA-3′	١٣٤٦-١٣٢٥	٨٩٨
	Rev: 5′-GGAGCAAGTGTGGGTTGGATAG-3′	٢٢٢٢-٢٢٠١	
٤	For: 5′-CCCTGTGTTTCCTTGCCCTG-3′	٢٠٩٢-٢٠٧٣	٨٧٥
	Rev: 5′-CCGTGGAGCCTTTGGTAGAGA-3′	٢٩٤٧-٢٩٢٧	
٥	For: 5′-TGGAAAGGACCTCAGGGATCAC-3′	٢٨١٠-٢٧٨٩	٨٩٦
	Rev: 5′-TCTCAGCTCTAGGAGGAGGGAA-3′	٣٦٨٤-٣٦٦٣	
٦	For: 5′-GCCAACCAGTTTGAGCAGTTCT-3′	٣٤١٧-٣٣٩٦	٦٦٣
	Rev: 5′-GCAGCAGAAGCCTGGAGTCT-3′	٤٠٥٨-٤٠٣٩	
٧	For: 5′-AGGACACCGAAAGGGAAGAGAT-3′	٣٩٣٢-٣٩١١	٨١١
	Rev: 5′-GGAAGACTATTGGCTGCTGGAA-3′	٤٧٢١-٤٧٠٠	

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

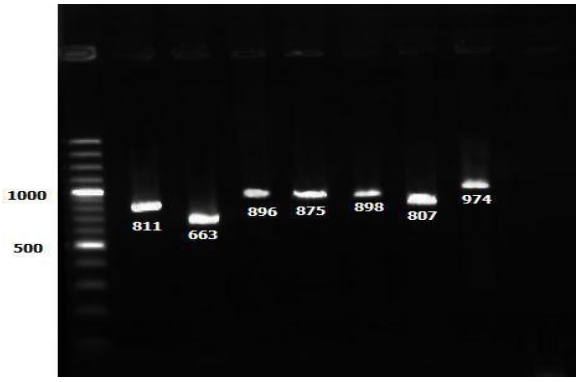
به‌منظور مقایسه داده‌های این مطالعه با دیگر مطالعات و همچنین ترسیم درخت فیلوژنی، از توالی‌های مرجع ثبت شده در بانک داده NCBI استفاده شد. بدین منظور توالی‌های ژن *RNase A* مربوط به ۲۲ گونه از پستانداران دریافت شد. هم‌ردیف سازی در سطح نوکلئوتیدی به کمک الگوریتم Clustal نسخه ۲ (Larkin et al. 2007) صورت گرفت. رسم درخت فیلوژنتیکی به کمک روش‌های مختلف بنا به شرایط، شامل نیبر–جوینینگ (Saitou and Nei, 1987)، ماکسیمم پارسیمونی (Farris 1970; Fitch 1971)، روش حداکثر درست‌نمایی (Felsenstein, 1981) و استنباط بیزی بهبود یافته به‌کمک زنجیره مارکوف مونت کارلو (Yang and Rannala 1997) بود. ابزار مورد نظر در آنالیز نیبر–جوینینگ و پارسیمونی برنامه تجاری PAUP نسخه ٤ (Swoffard and Sullivan 2003) و برای دو آنالیز حداکثر درست‌نمایی و آنالیز بیزی به‌ترتیب RAxML (Stamatakis 2006) و PhyloBayes MPI (Lartillot et al. 2013) بود. به‌منظور ارزیابی و 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 اوریال با ژنوم مرجع ژن *RNase A* گوسفند رامبوییه با شماره دسترسی (XM-004010384) با سرور آنلاین 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 آنلاین MultiAlign صورت گرفت.

به‌منظور بررسی تاثیر جهش‌ها در توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراسی (به‌خصوص در اگزون ۲)، ساختار ثانوی توالی‌های mRNA برای ژن *RNase A* برای هر سه گونه گوسفند رامبوییه (ژنوم مرجع)، گوسفند وحشی اوریال و گوسفند بلوچی به کمک RNA Fold Web Server (http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) ترسیم و داده‌های حداقل انرژی آزاد و انرژی آزاد ترمودینامیک بررسی شدند.

نتایج و بحث

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز یک درصد نشان داد که هر ۷ قطعه مختص به توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی ٤٣٤٧ جفت‌بازی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده به‌صورت همپوشان به‌خوبی تکثیر شده‌اند (شکل ۱).



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

نتایج حاصل از توالی‌های به‌دست 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 اوریال 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 اوریال به کمک نرم‌افزار SEQMAN به‌دست آمد. در واقع مقایسه هم‌ردیفی‌های بین ژن RNase پانکراتیک گوسفند بلوچی و گوسفند وحشی اوریال با ژنوم مرجع ژن RNase گوسفند رامبوییه (XM_004010384) تشابه بالایی را نشان می‌دهد، هرچند که در برخی نقاط، تفاوت نوکلئوتیدی نیزمشاهده می‌شود. مقایسه‌ی هم‌ردیفی وجود اگزون یک و دو و همچنین ناحیه‌ی ترجمه شونده، نشان از توالی محافظت شده‌ی ناحیه‌ی ترجمه شونده[1] CDS بین این سه نژاد برای این ژن می‌باشد. در

[1] from coding sequence

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

ناحیه ژنی اگزون یک گوسفند بلوچی با اوریال تنها یک تفاوت تک نوکلئوتیدی در موقعیت بازی ٤١١ نشان داده شد، و همچنین تفاوت‌های نوکلئوتیدی متعددی در ناحیه اینترون و اگزون ٢ 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 ریبونوکلئاز با شماره دسترسی (XM_004010384) نوکلئوتید ١ تا ٥٢٨ اگزون اول و نوکلئوتید ١٢٦٢ تا ٤٣٤٧ جفت‌بازی ناحیه اگزون دوم گزارش شده است. به‌دنبال هم‌ردیفی توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند بلوچی و اوریال در مطالعه حاضر با توالی ژنی مرجع نژاد رامبوییه توسط سرور آنلاین MultiAlign تفاوت‌هایی به‌صورت حذف، اضافه و جابه جایی‌های تک نوکلئوتیدی دیده شدند. در موقعیت نوکلئوتیدی ٤١١ ناحیه اگزون یک (جابه‌جایی نوکلئوتید تیمین به سیتوزین در نژاد اوریال و بلوچی)، موقعیت نوکلئوتیدی ٧١٨ و ٩٤٣ در ناحیه اینترون به‌ترتیب (حذف نوکلئوتید گوانین در نژاد رامبوییه و جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین به ادنین در نژاد اوریال و بلوچی)، در اگزون ٢ حذف توالی GGCCC در ناحیه ١٧٨٠ تا ١٧٨٥ در نژاد اهلی بلوچی و نژاد وحشی اوریال در مقایسه با توالی ژن مرجع نژاد رامبوییه، در موقعیت‌های ١٧٦٧، ١٩٨٨، ٢٤٢٨، ٢٦٣٩، ٢٨٤٨، ٢٨٥٥، ٢٨٩٩ و ٣٢٠٥ به‌ترتیب (جابه‌جایی نوکلئوتید تیمین به سیتوزین، سیتوزین به تیمین، تیمین به ادنین در نژاد اوریال، حذف نوکلئوتید ادنین در نژاد رامبوییه و بلوچی، جابه‌جایی نوکلئوتید ادنین به سیتوزین، ادنین به گوانین، سیتوزین به ادنین، گوانین به ادنین در نژاد اوریال)، موقعیت نوکلئوتیدی ٢٩٦٨ (جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین به ادنین در نژاد بلوچی)، موقعیت نوکلئوتیدی ٤٢١٢ (جابه‌جایی گوانین به تیمین در نژاد اوریال و بلوچی) مشاهده شدند. تمام تغییرات ذکر شده در (جدول ٢) و به‌صورت شماتیک در (شکل ٢) مشخص شده‌اند. مقایسه سه توالی ٤٣٤٧ جفت‌بازی به‌دست آمده برای گوسفند بلوچی و اوریال و ژنوم مرجع رامبوییه با شماره دسترسی (XM_004010384) ١٠ تفاوت نوکلئوتیدی را با میزان مشابهت ٩٩/٧٨ درصد نشان داد. هم‌چنین مقایسه توالی گوسفند نژاد رامبوییه با شماره دسترسی (XM_004010384) با گوسفند اوریال ١٨ تفاوت نوکلئوتیدی را با میزان مشابهت ٩٩/٦١ درصد را نشان داد.

جدول ٢- موقعیت مکانی تفاوت‌های نوکلئوتیدی

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



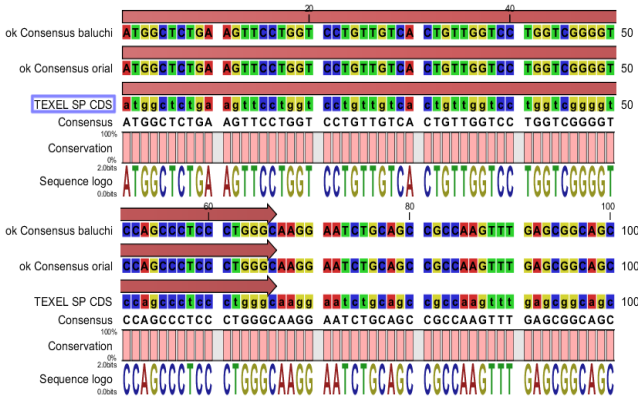
شکل ٢- تغییرات نوکلئوتیدی میان ژن ریبونوکلئاز توالی‌یابی شده نژاد اوریال و بلوچی با ژن ریبونوکلئاز مرجع نژاد رامبوییه.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

با وجود تشابهت بالای ژن کدکننده آنزیم *RNase A* در این سه گونه بیشتر تفاوت‌های گزارش شده مربوط به اگزون ۲ این ژن می‌باشد.

همچنین بیشتر تفاوت‌های ذکر شده در توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراسی نژاد اوریال دیده شده است که این نشانی از تکامل گوسفند وحشی اوریال به اهلی بوده است. مهم‌تر از همه یک حذف ۵ نوکلئوتیدی که در هر دو نژاد بلوچی و اوریال نسبت به نژاد رامبوییه دیده شده است. در واقع این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت‌های نژادی و ژنتیکی بین نژادهای اهلی و وحشی می‌باشد که در طی سالیان درازی تثبیت شده‌اند. ناحیه ترجمه شونده به پروتئین (CDS) به شکل کاملا محافظت شده در توالی‌های گوسفندهای بلوچی، وحشی اوریال و رامبوییه قرار گرفته‌اند ولی تفاوت‌های نوکلئوتیدی مشاهده شده درناحیه اگزون ۲ ژن *RNase A* با توالی ژن مرجع رامبوییه می‌تواند در تنظیم بیان ژن نقش و نحوه عملکرد پروتئین ترجمه شده نقش و تاثیر به‌سزایی داشته باشند.

توالی‌های قطعه ژنی تکثیر شده ژن ریبونوکلئاز به‌ترتیب با شماره دسترسی MG932658 برای نژاد اوریال و MG932659 برای نژاد بلوچی در پایگاه داده NCBI ثبت شده‌اند. میزان حداقل انرژی آزاد ساختار ثانویه بهینه mRNA ژن*RNase A* در نژاد رامبوییه به‌میزان ۱۲۲٤/۲۰- کیلوکالری/مول، گوسفند بلوچی به‌میزان ۱۲۲۳/۲۰- کیلوکالری/ مول و گوسفند اوریال ۱۲۱٦۰/۸۰- کیلوکالری/مول به‌دست آمد. در نتیجه، عامل انرژی آزاد ساختار ثانویه mRNA ژن *RNase A* نژاد بلوچی و رامبوییه به یکدیگر نزدیک‌تر هستند که حاکی از شباهت بالای این دو نژاد برای این پارامتر ساختاری mRNA می باشد، در حالی‌که سطح انرژی آزاد در نژاد وحشی اوریال تفاوت بیشتری نسبت به نژادهای اهلی مطالعه شده دارد. بنابراین با بررسی ظاهری ساختار ثانویه‌ی mRNA ژن *RNase A* در نژادهای اهلی مورد مطالعه و نژاد وحشی، شباهت بالایی را بین نژادهای اهلی و تفاوت با نژاد وحشی را می‌توان مشاهده کرد. تفاوت در موقعیت‌های نوکلئوتیدی ۱۸۲۰ تا ۲۰۷۰ ساختار ثانویه mRNA ژن *RNase A* تفاوت موجود در میان نژاد اهلی با وحشی اوریال را ثابت می‌کند. به‌دنبال هر سه توالی ژن *RNase A* هم‌ردیف شده نژادهای رامبوییه، بلوچی و وحشی اوریال موقعیت نوکلئوتیدهای ۱۲۸۷ تا ۱۳۵۲ جایگاه سیگنال پپتید و همچنین نوکلئوتید ۱۳۵۲ تا ۱۷۲۷ در ناحیه اگزون یک این ژن توالی ترجمه شده به پروتئین CDS می‌باشد (شکل ۵). رونوشت‌برداری توالی DNA به mRNA و برش توالی‌های بالادست و پایین دست نشان داد که توالی‌های مورد همراه با سیگنال پپتید شامل ٤٤۱ نوکلئوتید هستند. جایگاه سیگنال پپتید همان‌طورکه در شکل ۳ دیده می‌شود از نوکلئوتید ۱ تا ٦٦ در هر سه توالی یکسان بوده و نشان گذاری شده است.



شکل۳- قسمتی از توالی ژن *RNase A* هم‌ردیف شده و ناحیه سیگنال پپتاید (پیکان قرمز) از نوکلئوتید ۱ تا ٦٦.

جدول فواصل ژنتیکی با استفاده از توالی‌های به‌دست آمده برای گوسفند اوریال و بلوچی و همچنین با سایر توالی‌های نشخوارکنندگان از قبیل بز، گاو، شتر و غیره موجود در پایگاه داده NCBI مورد محاسبه قرار گرفت (شکل ٤). از آنجا که اعداد حاصل از فواصل ژنتیکی بین گونه‌های مختلف به‌صورت دو به دو است، در نتیجه این اعداد نمایانگر میزان جانشینی نوکلئوتیدها بین توالی‌های گونه‌های مورد بررسی می‌باشند و فاصله ژنتیکی بین دو گونه با همبستگی فیلوژنتیکی بین گونه‌ها مرتبط خواهد بود، در نتیجه این شاخص هم می‌تواند برای تعیین دوری و نزدیکی ژنتیکی گونه‌های 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 توالی‌های بالا دستی و پایین دستی ژن دارای تفاوت‌های زیادی با یکدیگر هستند. در این میان گونه بز دارای فاصله ژنتیکی ۰/۰۱ با گونه گوسفندی و ۰/۰٦ سانتی‌مورگان با به *RNase A* گاوی است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

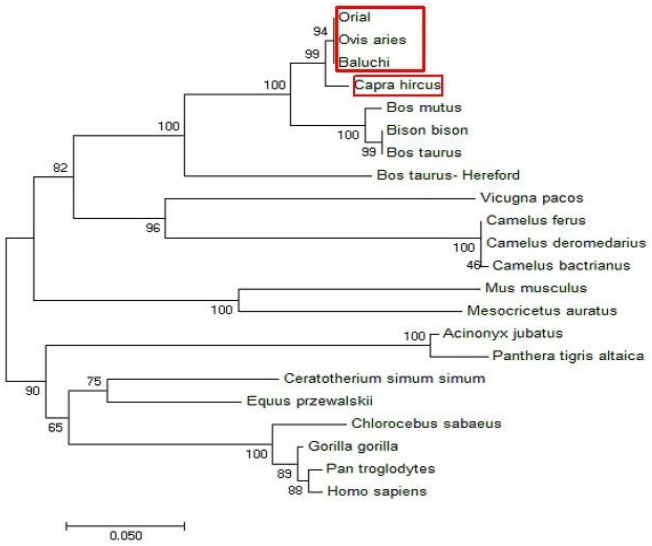
همچنین *RNase A* گونه گاوی داری فاصله ژنتیکی ۰/۰۶ سانتی‌مورگان با گونه گوسفندی و ۰/۳ سانتی‌مورگانی با نمونه *RNase A* انسانی است.

به‌منظور تائید نتایج حاصل از ماتریس فواصل ژنتیکی (شکل ٤)، درخت فیلوژنتیک توالی‌های مربوط به گوسفند بلوچی و اوریال 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 اوریال با توالی ثبت شده برای نژاد رامبوییه همراه توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراس ثبت شده برای گونه بز در یک کلاد قرار گرفته‌اند و این به‌دلیل نزدیکی تشابه ژنتیکی گوسفندان و بز از طریق مشابهت اجدادی بین این نژادها می‌باشد. همچنین نتایج نقشه فیلوژنتیکی ژن *RNase A* برای نژاد گاو نشان داد که اگرچه تفاوت‌های نوکلئوتیدی در این توالی‌ها موجود است، اما با توجه به شباهت بالا در نواحی بالا دستی و پایین دستی همه زیرگونه‌های مختلف گاو در یک کلاد قرار گرفته‌اند. همچنین در سایر نژادها (گاوی وحشی*Bos mutus* با گاوهای اهلی)، خانواده شترها، موش‌ها، گربه سانان، اسب با کرگدن و انسان با توالی ژنی ریبونوکلئاز مرتبط با گوریل و میمون‌ها با درصد تشابه بالایی در یک کلاد قرار گرفته‌اند. مطالعه انجام شده (Premzl 2014) بر مبنای درصد تشابه و روابط فیلوژنی خانواده آنزیم‌های ریبونوکلئاز در تطابق با مطالعه حاضر تائید کردند که آنزیم ریبونوکلئاز *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 می باشد (Premzl 2014).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. Homosapiens 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. Musmusculus 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. Camelusferus 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. Bisonbison 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. Consensusofonsl	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. Bosmutus Bos mutus isolate yak-QH1 unp...	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. Ovisaries Ovis aries breed Texel chro...	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. Caprahircus 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. Gorillagorilla Gorilla gorilla gorill...	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. BostaurusHereford 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. Camelusbactrianus 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. Bostaurus 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. Ceratotheriumsimumsimum Ceratotherium...	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. Pantheratigrisaltaica 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. Camelusdromedarius 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. Chlorocebussabaeus 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. Acinonyxjubatus 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. Vicugnapacos 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. Pantroglodytes 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. Consensusofbaluchi	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. Mesocricetusauratus Mesocricetus aura...	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 ٤- 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی مقایسه توالی ژن *RNase A* برای نژاد بلوچی و اوریال 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 کاملا 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، احتمالا 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, Zwiers 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]

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, cáp 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.3.1.6]