

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

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^۶

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

۲- گروه تحقیقاتی پروتئین‌های نوترکیب، 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 اوریا انجام گرفت. نمونه خون گوسفند نژاد بلوچی از مرکز اصلاح نژاد عباس‌آباد مشهد و نمونه خون گوسفند وحشی اوریا 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 اوریا، 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 اوریا 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 اوریا 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 اوریا 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 اوریا 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 اوریا

گوسفند بلوچی

مقدمه

آنزیم‌های ریبونوکلئاز (*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). 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. به طوری که استفاده از این آنزیم به عنوان توکسین‌های بیولوژیک در طراحی نسل جدید داروهای ضد سرطان در حال بررسی است. معمولاً این آنزیم‌ها به صورت متصل با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال استفاده می‌شوند، به این صورت که *RNase A* کونژوگه شده به کمک آنتی‌بادی وارد سیتوپلاسم سلول هدف شده و ترنسکریپتوم درون سلول را به طور کامل می‌شکند (Forouharmehr et al. 2020). مشکل اساسی *RNase*های حیوانی داشتن اثرات جانبی از قبیل ایمنونوزیستی 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. به طور کلی *RNase A* گوسفندی مانند سایر نشخوارکنندگان 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، وزیکول 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، به خصوص ناحیه کدکننده آن توالی‌یابی و به صورت آزمایشگاهی تایید شود. گوسفند بلوچی به عنوان 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 به منظور 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 به میزان ۲۰ میکرولیتر در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون به ترتیب 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.

⁴ 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، 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-

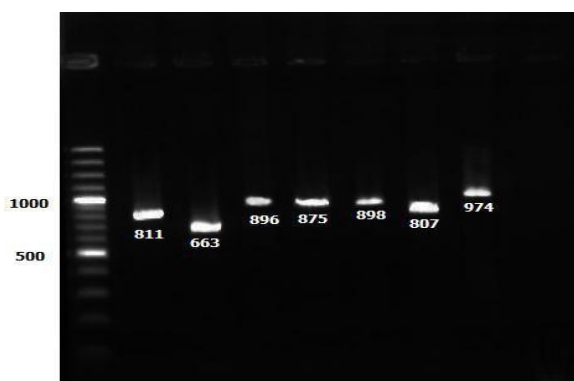
جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

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

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 اورپال 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 اورپال به کمک نرم‌افزار SEQMAN به دست آمد. در واقع مقایسه هم‌ردیفی‌های بین ژن RNase پانکراتیک گوسفند بلوچی و گوسفند وحشی اورپال 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 آگزون 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 نیبر-جوینینگ (Saitou and Nei, 1987)، ماکسیم 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 نیبر-جوینینگ و پارسیمونی برنامه تجاری PAUP نسخه ۴ (Swoffard 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 اورپال 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 آگزون، 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 آگزون ۲)، ساختار ثانوی توالی‌های mRNA برای ژن *RNase A* برای هر سه گونه گوسفند رامبویی (ژنوم مرجع)، گوسفند وحشی اورپال 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

موقعیت جفت‌باز (bp)	بلوچی	اوریل	رامبوییه Rambouillet
	Baluchi	Oriol	
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

ناحیه ژنی آگزون 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 آگزون 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 ریبونوکلئاز با شماره دسترسی (XM_004010384) نوکلئوتید ۱ تا ۵۲۸ آگزون اول و نوکلئوتید ۱۲۶۲ تا ۴۳۴۷ جفت‌بازی ناحیه آگزون دوم گزارش شده است. به‌دنبال هم‌ردیفی توالی ژنی ریبونوکلئاز پانکراس گوسفند بلوچی و اوریل در مطالعه حاضر با توالی ژنی مرجع نژاد رامبوییه توسط سرور آنالین MultiAlign تفاوت‌هایی به‌صورت حذف، اضافه و جابه‌جایی‌های تک نوکلئوتیدی دیده شدند. در موقعیت نوکلئوتیدی ۴۱۱ ناحیه آگزون 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 رامبوییه و جابه‌جایی نوکلئوتید گوانین به ادنین در نژاد اوریل و بلوچی)، در آگزون ۲ حذف توالی GGCCC در ناحیه ۱۷۸۰ تا ۱۷۸۵ در نژاد اهلی بلوچی و نژاد وحشی اوریل در مقایسه با توالی ژن مرجع نژاد رامبوییه، 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 رامبوییه 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 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 رامبوییه با شماره دسترسی (XM_004010384) ۱۰ تفاوت نوکلئوتیدی را با میزان مشابهت ۹۹/۷۸ درصد نشان داد. هم‌چنین مقایسه توالی گوسفند نژاد رامبوییه با شماره دسترسی (XM_004010384) با گوسفند اوریل

Exon1 (1-528bp) Substitution1 420 440

Balochi GACCAAGATG CT CCTGCCAC CCTTCTGGGA AGCCAAGGCC CCTTTCACGTG
 Oriol GACCAAGATG CT CCTGCCAC CCTTCTGGGA AGCCAAGGCC CCTTTCACGTG
 Texel GACCAAGATG **T**CTCCTGCCAC CCTTCTGGGA AGCCAAGGCC CCTTTCACGTG

Intron (529-1261bp) Deletion 720 740

Balochi AGCCTCCAGG TTGGGGGGAG GCTTGAAGCT CTGTAGGAA TATAATGGTG
 Oriol AGCCTCCAGG TTGGGGGGAG GCTTGAAGCT CTGTAGGAA TATAATGGTG
 Texel AGCCTCCAGG **AG** TTGGGGGGAG GCTTGAAGCT CTGTAGGAA TATAATGGTG

Substitution 2 940

Balochi AGTGGTTTAT TCAAAGGAT CCCCTAATGA GCTGCATGAG TGCTGGGTAC
 Oriol AGTGGTTTAT TCAAAGGAT CCCCTAATGA GCTGCATGAG TGCTGGGTAC
 Texel AGTGGTTTAT TCAAAGGAT CCCCTAATGA GCTGCATGAG **A** TGCTGGGTAC

Substitution 3 1,760 Deletion 1,780 1,800

Balochi GCAAGATGCA CCGCTTTAGC ACAAAAGGCAC - - - - CTGCC TCTCCCCCCC
 Oriol GCAAGATGCA CCGCTTTAGC ACAAAAGGCAC - - - - CTGCC TCTCCCCCCC
 Texel GCAAGATGCA CCGCTTTAGC ACAAAAGGCAC **GGCC**CTGCC TCTCCCCCCC

Substitution 4 1,960 1,980 2,000

Balochi CCCACACTTG CTCCCCTGGC CTGCGTCTTG CCCCTGACGG TTGGGGGGGT
 Oriol CCCACACTTG CTCCCCTGGC CTGCGTCTTG CCCCTGACGG TTGGGGGGGT
 Texel CCCACACTTG CTCCCCTGGC CTGCGTCTTG CCCCTGACGG TTGGGGGGGT

Substitution 5 2,420 2,440

Balochi CCTCAGGAGC AGAGGAAGAC TATGAAATTT TGACCTAAGA TTTCATTTTT
 Oriol CCTCAGGAGC AGAGGAAGAC TATGAAATTT TGACCTAAGA TTTCATTTTT
 Texel CCTCAGGAGC AGAGGAAGAC TATGAAATTT TGACCTAAGA TTTCATTTTT

Deletion 2,640

Balochi CTCTAATTAG AAGTGCCCTG CTAGAATGTG TACAAAAA-T GCCTAAACAG
 Oriol CTCTAATTAG AAGTGCCCTG CTAGAATGTG TACAAAAA-T GCCTAAACAG
 Texel CTCTAATTAG AAGTGCCCTG CTAGAATGTG TACAAAAA-T GCCTAAACAG

Substitution 6 2,820 2,840

Balochi CTGCTAGTTA CTGTCAGATT GAGATCAAAAC CCTGGGTGTC CTGGCTTCC
 Oriol CTGCTAGTTA CTGTCAGATT GAGATCAAAAC CCTGGGTGTC CTGGCTTCC
 Texel CTGCTAGTTA CTGTCAGATT GAGATCAAAAC CCTGGGTGTC CTGGCTTCC

Substitution 7 2,860 2,880 2,900

Balochi TGTCAATTGCC CTTTCTGTCTA CTGGAGTCTC CTCAAGGTGA AATCCCCAG
 Oriol TGTCAATTGCC CTTTCTGTCTA CTGGAGTCTC CTCAAGGTGA AATCCCCAG
 Texel TGTCAATTGCC CTTTCTGTCTA CTGGAGTCTC CTCAAGGTGA AATCCCCAG

Substitution 9 2,960 2,980 3,000

Balochi TGTGGGGGGC TCTCACAAAGT TCCAGTGCA CTTGGCTGCG AGCCTGCTCC
 Oriol TGTGGGGGGC TCTCACAAAGT TCCAGTGCA CTTGGCTGCG AGCCTGCTCC
 Texel TGTGGGGGGC TCTCACAAAGT TCCAGTGCA CTTGGCTGCG AGCCTGCTCC

Substitution 10 3,220 3,240

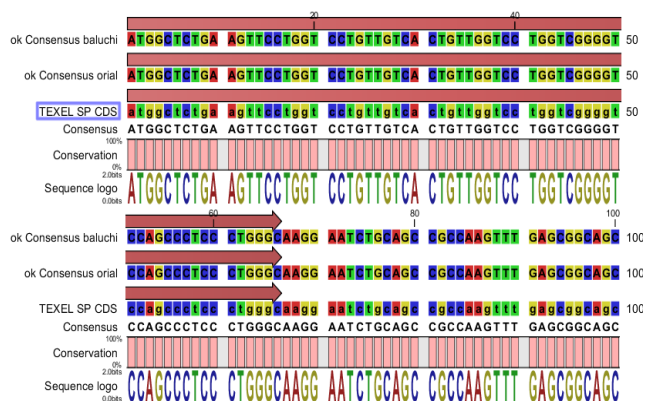
Balochi ATGTGTTTT AGGTAAGATG AATGCTTAAAC CTTGGGGTCT CTGGGGGATA
 Oriol ATGTGTTTT AGGTAAGATG AATGCTTAAAC CTTGGGGTCT CTGGGGGATA
 Texel ATGTGTTTT AGGTAAGATG AATGCTTAAAC CTTGGGGTCT CTGGGGGATA

Substitution 11 4,220 4,240

Balochi CCCAGGTCTC CTGCATTAGA GGCAGACGCT TTAACCTCTG AGAAGGATAG
 Oriol CCCAGGTCTC CTGCATTAGA GGCAGACGCT TTAACCTCTG AGAAGGATAG
 Texel CCCAGGTCTC **CG**GCATTAGA GGCAGACGCT TTAACCTCTG AGAAGGATAG

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

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). رونوشت برداری توالی DNA به mRNA و برش توالی‌های بالادست و پایین دست نشان داد که توالی‌های مورد همراه با سیگنال پپتید شامل ۴۴۱ نوکلئوتید هستند. جایگاه سیگنال پپتید همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود از نوکلئوتید ۱ تا ۶۶ در هر سه توالی یکسان بوده و نشان‌گذاری شده است.



شکل ۳- قسمتی از توالی ژن *RNase A* هم‌ردیف شده و ناحیه سیگنال پپتاید (بیکان قرمز) از نوکلئوتید ۱ تا ۶۶.

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 ۴). 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 ۰/۰۶ سانتی‌مورگان با به *RNase A* گاو است.

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 ریونوکلئاز 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 کاملاً محافظت شده در توالی‌های گوسفندهای بلوچی، وحشی اوریال و رامبوییه قرار گرفته‌اند ولی تفاوت‌های نوکلئوتیدی مشاهده شده در ناحیه 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.

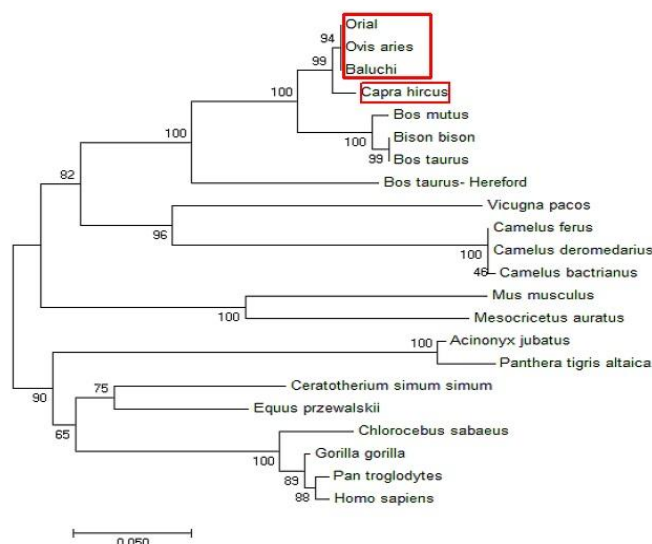
توالی‌های قطعه ژنی تکثیر شده ژن ریونوکلئاز به‌ترتیب با شماره دسترسی MG932658 برای نژاد اوریال و MG932659 برای نژاد بلوچی در پایگاه داده NCBI ثبت شده‌اند. میزان حداقل انرژی آزاد ساختار ثانویه بهینه mRNA ژن *RNase A* در نژاد رامبوییه به‌میزان ۱۲۲۴/۲۰- کیلوکالری/مول، گوسفند بلوچی به‌میزان ۱۲۲۳/۲۰- کیلوکالری/مول و گوسفند اوریال ۱۲۱۶۰/۸۰- 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 می‌باشد، در حالی که سطح انرژی آزاد در نژاد وحشی اوریال 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 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

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 (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 کلاد 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 کلاد قرار گرفته‌اند و این به‌دلیل نزدیکی تشابه 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. 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. 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 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 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/total	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 Bos mutus isolate yak QH1 urp	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 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 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 gazelle	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 Bos taurus breed Hereford	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 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 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. Cervus Cervus mandchuricus	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 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 Camelus dromedarius	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 Chlorocebus sabaeus	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 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 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 isol	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/total	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 Mesocricetus auratus	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 خط 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, Zwierts 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.