

# شناسایی، آنالیز توالی مربوط به ژن پروتئین ریپوزومی SA گاومیش رودخانه‌ای ایران و مقایسه آن با چند گونه دیگر

برهان شکراللهی<sup>۱</sup>، سیروس امیری نیا<sup>۲</sup>، نوید دین پرست جدید<sup>۳\*</sup>، نور امیرمظفری<sup>۴</sup>، محمدعلی کمالی<sup>۲</sup>

## چکیده

مقایسه دقیق ژنوم پستانداران نیاز به لوکوس‌هایی دارد که در طول کروموزوم‌ها بصورت محفوظ موجود باشند. یکی از ژن‌هایی که مشخص شده دارای توالی محفوظی است، ژن پروتئین ریپوزومی SA می‌باشد. هدف از این تحقیق شناسایی توالی ژن پروتئین ریپوزومی SA در گاومیش ایران با استفاده از کلون کردن قطعات مربوط به نشانگر RAPD می‌باشد. در ابتدا تعداد ۸۰ نمونه خون از جمعیت‌های مختلف گاومیش ایران اخذ گردید. پس از استخراج DNA، تکثیر پرایمرهای RAPD تحت شرایط بهینه انجام و قطعاتی که در نمونه‌های مختلف تکرار پذیر بودند، انتخاب گردید. پس از خالص‌سازی قطعات، عملیات کلونینگ شامل اتصال قطعات به داخل حامل pDrive و انتقال به داخل باکتری DH5 $\alpha$  انجام شد و پس از تعیین توالی، توالی‌ها ویرایش و توسط نرم افزار NCBI-BLASTN آنالیز شد. نتایج نشان داد که یکی از قطعات مربوط به پرایمر (5'GGGACGTCTC3') RP1 شباهت زیادی با توالی نوکلئوتیدی پروتئین ریپوزومی SA در گونه‌های مختلف دارد. توالی قطعه مورد نظر در گاومیش با گاو، خوک، اسب، سگ، انسان، شمپانزه، بابون و میمون Rhesus در نرم افزار ClustalW هم‌تراز و سپس درخت فیلوژنیک آن رسم گردید. نتایج نشان داد که شباهت توالی بدست آمده با قطعه مشابه در گاو، خوک، اسب، شمپانزه، بابون، سگ، انسان و میمون Rhesus بترتیب به میزان ۹۳٪، ۶۱٪، ۶۰٪، ۶۲٪، ۶۲٪، ۶۲٪، ۶۲٪ و ۶۰٪ می‌باشد. توالی این ژن در بانک جهانی ژن با شماره دسترسی GQ452383 ثبت گردید. نتایج این مطالعه همچنین امکان گسترش نقشه ژنومی گاومیش را فراهم کرد.

**واژگان کلیدی:** گاومیش رودخانه‌ای ایران، پروتئین ریپوزومی SA، درخت فیلوژنیک، نشانگر

RAPD

## مقدمه

توسعه سریع نقشه‌های ژنی انسان و موش باعث شده که توجه محققان به گونه‌های دیگر پستانداران از قبیل گونه‌های دامی جلب شود (۱۵). بدین ترتیب افزایش اطلاعات مربوط به نقشه‌های ژنی بعنوان ابزاری

۱ - دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه آزاد اسلامی واحد

علوم و تحقیقات تهران

۲- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

۳- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

۴- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران

\*-نویسنده مسئول ndinparastdjadid@yahoo.com

سلول برای جذب پروتئین پرئون سلولی ایفای نقش می‌کند، پرئون‌ها از عوامل عفونت‌زای سلولی هستند (۲۴). مطالعات نشان داده که این گیرنده در براش بوردر اپیتلیوم روده کوچک (Brush border of small intestinal epithelium) در ۴۰٪ از بیمارانی که به بیماری جاکوب کروزفلد (Creutzfeldt Jakob disease) مبتلا هستند، وجود دارد (۱۰). تحقیقات سلولی نشان داده‌اند که در سلول‌های عصبی و غیر عصبی این پروتئین نقش مهمی را در چرخه عمر سلولی پروتئین پرئونی ایفا می‌کند. همچنین مشخص شده که این پروتئین در سطح سلول در پستانداران، بعنوان پیش‌نیاز برای اتصال پروتئین پرئونی به سطح سلول عمل می‌کند (۹). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پروتئین ریوزومی SA در تکثیر پروتئین پرئونی ضروری بوده و اتصال پروتئین پرئونی به سطح سلول توسط آنتی‌بادی‌های پروتئین ریوزومی SA ممانعت می‌شود (۱۴). در مطالعه دیگری وارد شدن پروتئین پرئونی به داخل سلول در گاو تشریح شده و مشخص شده که بکار بردن آنتاگونیست پروتئین ریوزومی SA، ورود پروتئین پرئونی را به داخل سلول کاهش می‌دهد (۲۰).

ژن پروتئین ریوزومی SA از ژنوم موش، انسان، گوسفند (۱۷)، خوک، گاو و مرغ جداسازی شده است (۱۱). گزارشات حاکی از این است که پروتئین ریوزومی SA بالغ که وزن مولکولی آن ۶۷ کیلو دالتون است از بهم پیوستگی دو پیش ساز (۱۲) یا یک پیش ساز با یک پروتئین ناشناخته به وجود آمده است (۳).

بنابراین می‌توان گفت که پروتئین ریوزومی SA در بسیاری از اعمال سلولی دخالت داشته و شناسایی این ژن در موجودات مختلف می‌تواند باعث ترغیب محققان در بررسی سازوکارها و اثرات بیشتر این ژن در موجودات مختلف شود. در اصلاح دام نیز با شناسایی ژن‌های مختلف خصوصاً ژن‌های محفوظ (Conserved genes) بین گونه‌های نزدیک می‌توان

جهت کمک به برنامه‌های اصلاح نژادی می‌تواند به پیشرفت ژنتیکی دام‌های اقتصادی کمک کند (۱۶). مقایسه دقیق ژن‌های پستانداران نیاز به جایگاه‌های ژنی دارد که در طول کروموزوم‌ها در گونه‌های مورد نظر محفوظ (Conserved regions) باشند.

در ایران جمعیت گاو‌میش‌ها در حدود چهارصد هزار رأس می‌باشد، این حیوان قادر است در شرایط محیطی کم‌بضاعت زندگی کرده و از علوفه خشبی که برای سایر دام‌ها قابل استفاده نیست، استفاده کند (۲). گاو‌میش نقش مهمی را در اقتصاد خانوارهای روستایی در استان‌های محل پرورش ایفا می‌کند، همچنین شیر و گوشت این حیوان به جهت ترکیبات آن از شیر و گوشت گاو سالم‌تر می‌باشد (۲). انجام تحقیقات جهت پیشرفت ژنتیکی گاو‌میش خصوصاً در صفاتی مثل مقاومت به بیماری، عملکرد تولید مثلی، کیفیت و کمیت شیر و گوشت، ضروری به نظر می‌رسد (۲).

پروتئین ریوزومی SA (Ribosomal Protein)

SA یک زیربخش ساختاری کوچک از ریوزوم موجودات یوکاریوتی می‌باشد، این پروتئین با نام گیرنده شماره ۱ لامینین (Laminin receptor 1) نیز معروف است. پروتئین ریوزومی SA بعنوان یک عنصر چندکاره در سیستم ترجمه دخالت دارد. گیرنده شماره یک لامینین برهم کنش بین لامینین و سلول‌ها را میانجی‌گری می‌کند و بعنوان جزء اصلی غشای پایه شناخته شده است (۱۳).

این گیرنده گلیکوپروتئینی در ماتریکس خارج سلولی (Extra cellular matrix) قرار دارد و در اتصال سلولی، تمایز و رشد سلولی نقش مهمی را ایفا می‌کند (۹). در واکنش‌های مربوط به بهبود زخم گیرنده شماره ۱ لامینین دیده می‌شود (۱۹). مطالعات مربوط به این گلیکوپروتئین در انسان نشان می‌دهد که در انواع مختلف سلول‌ها مخصوصاً سلول‌های سرطانی دیده می‌شود (۸، ۲۳ و ۲۶). آزمایشات هیبرید مخمرها نشان داده که پروتئین ریوزومی SA بعنوان گیرنده سطحی

اتصال به مدت ۵۰ ثانیه (وابسته به  $T_m$  مربوط به پرایمر) و دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه قرار گرفته و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی حرارت داده شد.

**جدول شماره ۱- پرایمرهای RAPD مورد استفاده، توالی نوکلئوتیدی و دمای اتصال آنها**

نام پرایمر	توالی پرایمر (5' to 3')	دمای اتصال
پرایمر ۱	GGGACGTCTC	۳۷/۵
پرایمر ۲	TTAGCGCCCC	۳۷/۵
پرایمر ۳	ATGCCCTGT	۳۶
پرایمر ۴	AAAGCTGCGG	۴۱
پرایمر ۵	ACCGCCGAAG	۳۷

#### کلون کردن محصولات PCR

محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل (ساخت شرکت فرمنتاز (Fermantas)) با توجه به پروتکل شرکت استخراج گردید. کیفیت DNA استخراج شده با الکتروفورز ژل آگارز مشخص و سپس عملیات کلونینگ بصورت زیر آغاز شد:

در ابتدا قطعات DNA حاصل به پلاسمید (pDrive) (ساخت شرکت کیاژن آمریکا (Qiagen)) با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت متصل گردید. سپس پلاسمیدهای نوترکیب به داخل باکتری کامپنانت شده Escherichia coli DH5 $\alpha$  با استفاده از شوک حرارتی به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و سپس بر روی محیط کشت LB-Agar که به آن به مقدار لازم آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-Gal جهت تمایز کلونیهای سفید و آبی (بترتیب دارای قطعه و بدون قطعه) اضافه شده بود، کشت داده شد. سپس جهت تأیید کلونینگ، کلونی PCR با استفاده از پرایمرهای حامل M13 تحت این شرایط انجام شد:

با در نظر گرفتن آنها به عنوان نشانگرهای ژنتیکی، استفاده از آنها در تهیه نقشه‌های ژنتیکی و تشخیص ژن‌های بزرگ اثر (Quantitative trait loci)، قدمهای بزرگی در جهت پیشرفت ژنتیکی دامهای اقتصادی برداشت.

هدف از انجام این تحقیق جداسازی و شناسایی الگوهای انگشت نگاری RAPD در گاومیش ایران بود و طی انجام تحقیق قسمتی از توالی مربوط به ژن پروتئین ریپوزومی SA را جداسازی کرده و تولی آن را مورد آنالیز قرار داده شد.

#### مواد و روش کار

##### نمونه‌گیری

نمونه‌های خونی از رگ و داج ۸۰ راس گاومیش رودخانه‌ای مربوط به استان‌های مازندران، گیلان، خوزستان و آذربایجان اخذ گردید و DNA به روش شستشوی نمکی استخراج شد (۱۸). کمیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت.

##### انجام PCR

عمل PCR با استفاده از پرایمرهای RAPD انجام شد. ۵ پرایمر جهت تکثیر DNA در واکنش‌های مجزا مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). تکثیر PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی بافر PCR 1X، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۱/۵ میلی مول از  $MgCl_2$ ، یک واحد از آنزیم تک پلیمرز (Taq polymerase) (ساخت شرکت متابیون (Metabion) آلمان) و ۲۰ تا ۱۰۰ نانوگرم از DNA انجام گرفت. انجام PCR در دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت بایورد (BioRad) آمریکا) با برنامه زیر انجام گرفت.

مواد در ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن DNA حرارت داده شدند سپس به تعداد ۳۵ چرخه تحت دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای دناتوره شدن)، دمای

شد، بطوریکه این قطعات در تمام افراد مورد آزمایش دیده می‌شدند. در بین قطعات کلون شده یکی از قطعات که مربوط به پرایمر شماره یک (5'GGGACGTCTC3') (قطعه P15) بود (شکل ۱)، با قسمتی از ژن پروتئین ریپوزومی SA در موجودات مختلف دارای شباهت بالایی بود. قطعه مورد نظر مورد آنالیز قرار گرفت و پس از بررسی کامل به بانک ژن فرستاده شد. در بانک جهانی ژن پس از بررسی و تأیید با شماره دسترسی GQ452383 به ثبت رسید. دندروگرام یا درخت فیلوژنیک مربوط به ژن پروتئین ریپوزومی SA با استفاده از توالی یافته شده در این تحقیق و توالی‌های مربوط به گونه‌های دیگر رسم گردید (شکل ۲).

نتایج حاصل از هم ترازی نشان داد که این توالی با ژن پروتئین ریپوزومی SA در چندین گونه داری شباهت بالا می‌باشد، بطوریکه با این ژن در گاو، خوک، اسب، شمشیر، بابون، سگ، انسان و میمون Rhesus دارای همولوژی بالایی بترتیب به میزان ۹۳٪، ۶۱٪، ۶۰٪، ۶۲٪، ۶۲٪، ۶۲٪ و ۶۰٪ می‌باشد. همترازی (Alignment) ژن فوق با ژن‌های گونه‌های مذکور در شکل ۲ نشان داده شده است.

شکل ۱: باندهای حاصل از تکثیر نشانگر ۱ (باندهای P14، P15 و P16)، توالی قطعه P15 مربوط به پروتئین ریپوزومی SA بود. SM در این شکل نشان دهنده نشانگر اندازه است.

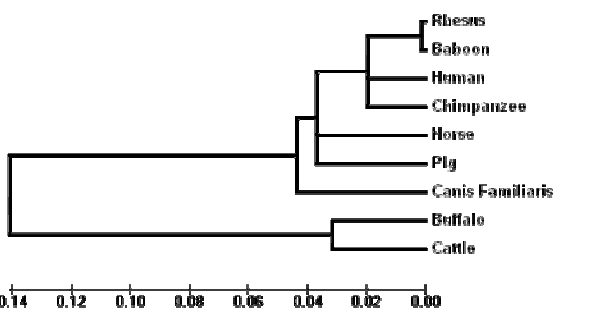
مرحله اول، حرارت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دناتوره شدن DNA، مرحله دوم بتعداد ۳۵ چرخه تحت دماهای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دمای دناتوره شدن)، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و مرحله سوم دمای گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. در مرحله بعد محصولات PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. نتایج کلونی PCR در صورتی کلونینگ را تأیید می‌کرد که اندازه محصول، ۲۶۲ جفت باز بعلاوه اندازه قطعه کلون شده باشد.

### آنالیز توالی

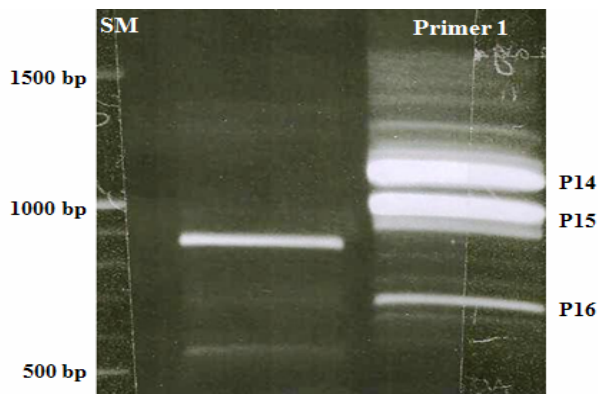
کلونی‌های مثبت (دارنده قطعه) جهت استخراج پلاسمید در محیط LB-Broth کشت داده شدند، پس از گذشت ۱۶ ساعت، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (ساخت شرکت فرمتاز) با توجه به پروتکل شرکت سازنده بعمل آمد و سپس با استفاده از پرایمرهای حامل M13 توسط دستگاه توالی‌یاب، تعیین توالی شد (شرکت تکاپوزیست، تهران). قطعات اضافی از توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (version 7.0.9.0) حذف گردید. قطعه حاصل در سایت NCBI جهت پیدا کردن قطعات مشابه توسط برنامه NCBI-BLASTN آنالیز و قطعات مشابه از بانک ژن گرفته شده و توسط نرم افزار ClustalW هم تراز (Aligned) گردید (۷). لازم به ذکر است که دندروگرام یا درخت فیلوژنی نیز با استفاده از نرم افزار ClustalW کشیده شد.

### نتایج

پس از بهینه کردن PCR برای تکثیر تعداد ۵ نشانگر RAPD، تعداد زیادی باند قوی بدست آمد، قطعات مشخص شده بر روی ژنوم ۱۲ حیوان مربوط به جمعیت‌های مختلف گاومیش رودخانه‌ای ایران تکثیر



شکل شماره ۳- هم‌ترازی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن پروتئین ریپوزومی SA گاومیش رودخانه‌ای ایران (Buffalo) با گونه‌های گاو (Cattle)، خوک (Pig)، اسب (Horse)، شمپانزه (Chimpanzee)، سگ (Canis Familiaris)، انسان (Human) و گونه‌ای از میمون (Rhesus). ستاره‌ها نشان‌دهنده نوکلئوتیدهای مشابه در تمام گونه‌هاست و خط فاصله به منزله حذف نوکلئوتیدها در جایگاه خاص می‌باشد.



شکل شماره ۲- درخت فیلوژنتیکی بدست آمده با استفاده از روش UPGMA براساس آنالیز توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن پروتئین ریپوزومی SA گاومیش (Buffalo) رودخانه‌ای ایران، گاو (Cattle)، خوک (Pig)، اسب (Horse)، شمپانزه (Chimpanzee)، سگ (Canis Familiaris)، انسان (Human)، بابون (Baboon)، میمون (Rhesus)

Buffalo	CTTAGAAAAAACAAATAAACCTCCGGAAGCTATTCCTGAGAAACAAAACACGTGGCTGA	60
Cattle	-----GGCTGA	6
Pig	-----	
Horse	-----	
Chimpanzee	-----	
Baboon	-----	
Canis	-----	
Human	-----	
Rhesus	-----	
Buffalo	CTGTGGAAGCAGCAGGGCCCTTAACAAGAAAGGAGGGGGGTAGGAAGAACAATGGAATATG	120
Cattle	CTGTGGAAGCAGCAGGGCCCTTGACAAGAAGGGAGGGGG-TAGGAAGAACAATGGAATATA	65
Pig	-----	
Horse	-----	
Chimpanzee	-----	
Baboon	-----	
Canis	-----	
Human	-----	
Rhesus	-----	
Buffalo	AAGTATTTTATATTTTCTAGGTTCTTGAACCTTGTACATGTATTGTAAGTTTATCAGAAAT	180
Cattle	AATTATTTTATATTTTCTAGGTTCTTGAACCTTGTACATGTATCACAAGTTTCTCAGAAAT	125
Pig	-----	
Horse	-----	
Chimpanzee	-----	
Baboon	-----	
Canis	-----	
Human	-----	
Rhesus	-----	
Buffalo	GCCAAGACATTACAACAAAATTTTAAACCTCTAAAGAATAGAACTCACAGCGTTATTTCT	240
Cattle	GCCAAGACATTACAACAAAATTTTAAACCTCTAAAGAATAAACTCACAGTGTATTTCT	185
Pig	-----	
Horse	-----	
Chimpanzee	-----	
Baboon	-----	
Canis	-----	
Human	-----TATTTTGTTTTGATAATAGCCATCCTA	27
Rhesus	-----	

Buffalo	ACAAACTGAATGAAAGTCAAGTTTGTGGTTTATCAGAAAGATTATCTGGCTTCTCTAAAATA	300
Cattle	ACAAACTGAATGAAAGTCAAGTTTGTGGTTTATCA-----GATTATCTGGCTTCTCTAACATA	241
Pig	-----	
Horse	-----	
Chimpanzee	-----AAAAAAAAAAAAAAAA	15
Baboon	-----	
Canis	-----	
Human	ACAAGTATAATGTGATATAGCTCTATACTTTTAAATTGCAATTTCCTGATGATTAGAAGT	87
Rhesus	-----A	1
Buffalo	TCTTCTTAGGCTTTTCCCACGCTACCCAGACAGTGGTCCATACAGCACTG-TCTGGATTTC	359
Cattle	TCTTCTCAGGCTTTTCCCACGCTACTCAGACAGTGGTCCATACGGCACTG-TCTGGATTTC	300
Pig	----ACGCGGGGCTTTCCGCGCTGCCAGACCGGGTCCATACGGCGTTGTTCTTGATTTC	56
Horse	-----CCTTTCCGCGCTGCCCGGCGAGGGTCCATTACGGCGTTGTTCTGGGTTC	49
Chimpanzee	AAAAAATCTTCCCTTTCCGCTGCTACCTACAGAGGGGTCCATATGGCGTTGTTCTTGATTTC	75
Baboon	-----	
Canis	-----TGCCTTTCTGCGCTACCCAGGGAAGGGTCCATACGGCGTTGTTTTGCGTTC	51
Human	GTCGAGTACTGCCTTTCCGCGCTACCTACAGAAGGGTCCATACAGTGTGTTCTTGATTTC	147
Rhesus	TTTTTTTTTTTTTCTTTCCGCGCTACCTACAGAGGGGTCCATACGGCGTTGTTCTTGATTTC	61
Buffalo	TTGTCATAACGT-AAAGTGAATCTTTTACACTATCCTCGGTCCCTTGATGTCCAGCAAATG	417
Cattle	TTGTCATAAAGT-GAAGTGAATCTTTTACACTATCCTGGGTCCCTTGCTGTCCGGCAAATG	358
Pig	CCGTCGTAACCT-AAAGGGAGACTTTTACAATGTCCGGAGCCCTCGATGTCTTGCAAATG	114
Horse	CCGTCGTAACCTAAAAGGGAAGCTTTTACAATGTCCGGAGCCCTTGACGTCTTGCAAATG	108
Chimpanzee	CCGTCGTTAACTTAAAGGGAAACTTTTACAATGTCCGGAGCCCTTGATGTCTTGCAAATG	134
Baboon	-----ATGTCCGGAGCCCTTGATGTCTTGCAAATG	29
Canis	CCATCGTAACCT-AAAGGGAAACTTTTACAATCTCCGGAGCCCTTGATGTCTTGCAAATG	109
Human	CTATCGTAACCT-AAAGGGAAACTATCACAATGTCTGGAGCCCTTGATGTCTTGCAAATG	205
Rhesus	CCGTCGTAACCT-AAAGGGAAACTTTTACAATGTCCGGAGCCCTTGATGTCTTGCAAATG	119
	* * * * *	
Buffalo	---GAGGACGATGTCATCACGTTTCCTTGAGCAGGGGCCACTTAGGCAGCACCGACCTC	474
Cattle	---AAGGACGACGTCATCACGTTTCCTTGAGTAGGGGCCACTTAGGTAGCACCGACCTT	415
Pig	AAAGAGGAGGATGTCCTCAAGTTCCTTGAGCAGGAACCCACTTGGTGGACCAACCTT	174
Horse	AAGGAGGAGGATGTCCTCAAATTCCTTGAGCAGGAACCCACTTAGGTGGACCAACCTT	168
Chimpanzee	AAGGAGGAGGATGTCCTTAAAGTTTCCTTGAGCAGGAACCCACTTAGGTAGCACCAATCTT	194
Baboon	AAGGAGGAGGATGTCCTTAAAGTTTCCTTGAGCAGGAACCCACTTAGGTGGACCAACCTT	89
Canis	AAGGAGGAGGATGTCCTCAAATTCCTTGAGCAGGAACCCACTTAGGTGGACCAACCTT	169
Human	AAGGAGGATGATGTCCTTACGTTTCCTTGAGCAGGAACCCACTTAGGTGGACCAACCTT	265
Rhesus	AAGGAGGAGGATGTCCTTAAAGTTTCCTTGAGCAGGAACCCACTTAGATGGACCAACCTT	179
	***** *	
Buffalo	TACTTCCCAACGGAGCAGTACATCTACAGAAGGAAAAGTGTGATGGCGTCTACACTAGGAAT	534
Cattle	TACTTCCCAAGGAGCGGTACATCTACAGAAGGAAAAGTGTGATGGCGTCTACACTAGGAAT	475
Pig	GACTTCCAAATGGAACAGTACATCTACAAAAGGAAAAGTGTGATGGCATCTACATCATAAAT	234
Horse	GACTTCCAGATGGAACAGTACATCTACAAAAGGAAAAGTGTGATGGCATCTACATCATAAAT	228
Chimpanzee	GACTTCCAGATGGAACAGTACATGTATAAAAAGGAAAAGTGTGATGGCATCTACATCATAAAT	254
Baboon	GACTTCCAGATGGAGCAGTACATCTATAAAAAGGAAAAGTGTGATGGCATCTACATCATAAAT	149
Canis	GACTTCCAAATGGAACAGTACATCTACAAAAGGAAAAGTGTGATGGTATCTACACCATAAAT	229
Human	GACTTCCAGATGGAACAGTACATCTATAAAAAGGAAAAGTGTGATGGCATCTACATCATAAAT	325
Rhesus	GACTTCCAGATGGAGCAGTACATCTATAAAAAGGAAAAGTGTGATGGCATCTACATCATAAAT	239
	***** *	
Buffalo	CCGAAGAGAACCTGGGAGAAGCTTCTGTAGGCAGCTCATGCCATCGTTGCCACTGAAAAC	594
Cattle	CCGAAGAGAACCTGGGAGAAGCTTCTGTAGGCAGCTCATGCCATCGTTGCCACTGAAAAC	535
Pig	CTGAAGAGAACCTGGGAGAACTTCTGTTGGCGGCTCGTGCCATCGTTGCCATTGAAAAC	294
Horse	TTGAAGAGAACCTGGGAGAAGCTGCTGCTGGCAGCTCGTGCCATTGTTGCCATTGAAAAC	288
Chimpanzee	CTGAAGGGGACCTGGGAGAAGCTTCTGCTGGCAGCTCGTGCTATTGTTGCCACTGAAAAC	314
Baboon	CTGAAGAGGACCTGGGAGAAGCTTCTGCTGGCGGCTCGTGCCATTGTTGCCATTGAAAAC	209
Canis	CTGAAGAGAACCTGGGAGAAGCTTCTGTTGGCAGCTCGTGCCATTGTTGCCATTGAAAAC	289
Human	CTGAAGAGGACCTGGGAGAAGCTTCCGCTGGCAGCTCATGCCATTGTTGCCATTGAAAAC	385
Rhesus	CTGAAGAGGACCTGGGAGAAGCTTCTGCTGGCGGCTCGTGCCATTGTTGCCATTGAAAAC	299
	***** *	

Buffalo	CCAGCTGCTATCCCTGCTGCGTCCCTCCAGGAACCCCTGGCCAACGAGCTGAGCTGCAGTTT	654
Cattle	CCAGCTGCTGTCCCTGCTGCGTCCCTCCAGGAACCCCTCGCCAGCGAGCTGAGCTGCAGTTT	595
Pig	CCAGCCGATGTCAGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGCGAGCTGTGCTGAAGTTT	354
Horse	CCAGCTGACGTCAGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGCGAGCTGTGCTGAAGTTT	348
Chimpanzee	CCTGCTGATGTCAGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGACGGCTGTGCTGAAGTTT	374
Baboon	CCTGCTGATGTCAGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGAGGGCCGTGCTGAAGTTT	269
Canis	CCAGCTGATGTCGGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGCGAGCTGTGCTGAAATTT	349
Human	CCTGTAGATGTCAGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGAGGGCCATGCTGAAGTTT	445
Rhesus	CCTGCTGATGTCAGTGTTCATATCCCTCCAGGAATACTGGCCAGAGGGCCGTGCTGAAGTTT	359
	** * * ** ** *	
Buffalo	GCTGCCGC-----CGCTCCTCTGGTTCGGCCGCTTTGCTCCTGGAGCCTCCACTAA	704
Cattle	GCTGCCAC-----CGCTCCTCTGGTTCAGCCGCTTCGCTCCTGGAGCCTCCACTAA	645
Pig	GCTGCTGCCACTGGAGC-CACTCCTATTGCTGGCCGCTTCACTCCTGGAACCTTCACTAA	413
Horse	GCTGCTGCCACTGGAGC-CACTCCTATTGCTGGCCGCTTCACTCCTGGAACCTTCACTAA	407
Chimpanzee	GCTGCTGCCACTGGAGC-CACTCCAATTGCTGGCCACTTCACTCCTGGAACCTTCACTAA	433
Baboon	GCTGCTGCCACTGGAGC-CACTCCAATTGCTGGCCGCTTCACTCCTGGAACCTTCACTAA	328
Canis	GCTGCTGCTACTGGAGC-CACTCCTATTGCTGGCCGCTTCACTCCTGGAGCCTTCACTAA	408
Human	GCTGCTGCCACTGGAGCAAACCTCCAATTGCTGGCCACTTCACTCCTGGAAGCTTCACTAA	505
Rhesus	GCTGCTGCCACTGAAGC-CACTCCAATTGCTGGCCGCTTCACTCCTGGAACCTTCACTAA	418
	***** * **** *	
Buffalo	CCAGACCCAGGAAG-CTTCCAGGAGCCAAGACTCCTGGTGGTTA-TGGGCCCA-GGGCTG	761
Cattle	CCAGACCCAGGCA--TTCAGGAGCCAAGACTCCTGGTGGTTA-CGAGGCCA-GGGCTG	700
Pig	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCGGGAGCCAAGACTTCTGGTGGTTACTGATCCCA-GGGCTG	472
Horse	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCGGGAGCCAGACTTCTGGTGGTTAACTGATCCCA-GGGCTG	466
Chimpanzee	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCGGGAGCCATGGCTTCTTATGGTTACTGACCCCAAGGGCTG	493
Baboon	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCGGGAGCCACGGCTTCTTGTGGTTACTGACCCCA-GGGCTG	387
Canis	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCAGAGCCAAGGCTTCCGGTGGTTACTGATCCCA-GGGCTG	467
Human	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCAGGAGCCATGGCTTCTTGTGGTTACTGACCCCA-GGGCTG	564
Rhesus	CCAGATCCAGGCAGCCTTCCGGGAGCCACGGCTTCTTGTGGTTACTGACCCCA-GGGCTG	477
	***** ***** * **** *	
Buffalo	ACCGCCAGCCTCTCCCAGAGACAT-GTATGTGAACCT-CTTACCATTAGTCTGTGTGACA	819
Cattle	ACCGCTGGCCTCTCCCAGAGGCAT-GTATGTGAACCT-CTTACCATTAGTCTGTGTGACA	758
Pig	ACCACCAGCCTCTCACAGAGGCCTCTTATGTTAACCTGCCTACCATTGCTCTGTGTAACA	532
Horse	ACCACCAGCCTCTCACAGAGGCCTCTTATGTTAACCTGCCTACCATTGCTCTGTGTAACA	526
Chimpanzee	ACCATCAGCCTCTCACAGAGGCATCTTATGTTAACCTACCTACCATTGCTCTGTGTAACA	553
Baboon	ACCACCAGCCTCTCACAGAGGCATCTTATGTTAACCTACCTACCATTGCTCTGTGTAACA	447
Canis	ACCACCAGCCTCTCACAGAGGCATCTTACCTTAACCTGCCTACCATTGCTCTGTGTAACA	527
Human	ACCGCCAGCCTCTCACAGAGGCATCTTATGTTAACCTACCTACCATTGCTCTGTGTAACA	624
Rhesus	ACCACCAGCCTCTCACAGAGGCATCTTATGTTAACCTACCTACCATTGCTCTGTGTAACA	537
	*** ***** ***** * * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Buffalo	CGGACTCTCCTCTGCACCTTGGAGA-----CGTCCC-----	851
Cattle	CGGACTCTCCTCTGCACCTTGGAGA-----CGACCCATTCCCGAACCAGGGAGCTCAGT	812
Pig	CAGACTCACCTCTGCGTTATGTGGACATTGCCATCCCGTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	592
Horse	CGGACTCTCCTCTGCGTTATGTGGACATTGCCATCCCGTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	586
Chimpanzee	CAGATTCTCCTCTGTGCTATGTGGACATTGCCATCCCGTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	613
Baboon	CAGATTCTCCTCTGCGTTATGTGGACATTGCCATCCCGTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	507
Canis	CAGACTCTCCTCTGCGTACGTGGACATTGCCATCCCTTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	587
Human	CAGATTCTCCTCTGCGTTATGTGGACATTGCCATCCCGTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	684
Rhesus	CAGATTCTCCTCTGCGTTATGTGGACATTGCCATCCCGTGCAACAACAAGGGAGCTCACT	597
	* *	

تعداد جایگاه‌های شناسایی شده در بز و اسب بترتیب ۷۳۱ و ۲۹۸۸ جایگاه می‌باشد (۱). اما مطالعات کمی در مورد نقشه ژنومی گاومیش رودخانه‌ای وجود دارد و تعداد خیلی کمی از ژنهای این گونه گزارش شده است. در این مطالعه قسمت زیادی از توالی مربوط به ژن

## بحث

ژنوم حیوانات اهلی در مقایسه با انسان و موش تقریباً ناشناخته است، در بین دام‌ها، گاو تنها گونه‌ای است که مطالعات زیادی بر روی آن انجام گرفته است. در این حیوان ۴۳۵۷ جایگاه ژنی شناسایی شده است.

گاو و گاومیش بترتیب در موقعیت‌های ۲۹۱ و ۳۵۰، ۳۵۸ و ۴۱۸، ۶۰۳ و ۶۶۱، ۶۸۶ و ۷۴۷ و در نهایت ۷۲۴ و ۷۸۵ به تعداد یک نوکلئوتید نسبت به گونه‌های خوک، اسب، شمپانزه، بابون، سگ، انسان و میمون Rhesus در طول تکامل حذف گردیده است. همچنین در ژن گاومیش در موقعیت ۷۱۸ و ۸۴۳ بترتیب به تعداد یک و دو نوکلئوتید و در گاو در موقعیت‌های هم‌تراز نواحی اخیر، به تعداد ۳ و ۶ نوکلئوتید نسبت به گونه‌های مذکور حذف گردیده است. با بررسی میزان شباهت این ژن در گاو و گاومیش رودخانه‌ای (۹۳٪) می‌توان گفت که توالی این ژن در این حیوانات بطور محفوظ باقی مانده است، نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی (۲۱ و ۲۲) و ژن‌های دیگر (۵ و ۶) مطابقت دارد. توالی این ژن در گونه‌های مختلف در تمامی نقاطی که هم‌تراز شده‌اند، دارای شباهت می‌باشند. همانطور که اشاره شد محصول ژن پروتئین ریپوزومی SA (گیرنده شماره ۱ لامینین) با کاهش میزان پروتئین‌های پرپونی در ارتباط است. برای این ژن ممکن است در افراد مختلف یک گونه چندشکلی وجود داشته باشد، در تحقیقی با شناسایی ژن پروتئین ریپوزومی SA در گوسفند اظهار شد که این ژن در افراد مختلف در گوسفند دارای چند شکلی می‌باشد. بطوریکه در گوسفندان مبتلا به بیماری اسکریپی (Scrpie) بیان این ژن به میزان خیلی کمتری است بدین ترتیب افرادی که مقاوم به بیماری اسکریپی بودند میزان بیان این ژن بیشتر بود (۱۷). همچنین عنوان شد که واریانت‌های مختلفی از این ژن در افراد مختلف وجود دارد و ممکن است بافت‌های مختلف به میزان متفاوتی از این ژن را بیان کنند. در این تحقیق توالی پروتئینی این ژن مورد بررسی قرار نگرفت، همانطور که از نتایج هم‌ترازی مشاهده می‌شود توالی یافته شده دارای تفاوت با توالی‌های مربوط به گونه‌های دیگر است، وجود تفاوت ممکن است دلیل متفاوت بودن توالی این ژن در گاومیش بوده باشد که در پی آن

پروتئین ریپوزومی SA در گاومیش رودخانه‌ای ایران جداسازی و شناسایی شد. آنالیز توالی این ژن و مقایسه آن با گونه‌های مورد نظر نشان می‌دهد که علی‌رغم جدایی گونه‌ها در طول تکامل، ساختار این ژن بطور زیادی محفوظ باقی مانده است.

آنالیز فیلوژنتیک توالی نوکلئوتیدی مربوط به گونه‌های مختلف نشان می‌دهد که گاو و گاومیش در یک شاخه قرار گرفته‌اند، Das و همکاران (۲۰۰۸) طی بررسی مقایسه و بررسی ژن اینترلوکین-۱۸ در چند گونه (انسان، سگ، اسب، گاو، گاومیش و گوسفند) به این نتیجه رسیدند که گاو و گاومیش نزدیکترین گونه به هم بوده و دو حیوان در درخت فیلوژنتیک، در یک خوشه قرار دارند، بنابراین نتایج مطالعه فوق با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. بررسی دندروگرام حاکی از این است که گونه‌های مختلف میمون با انسان در یک خوشه قرار دارند البته انسان با شمپانزه دارای بیشترین شباهت می‌باشد. Wang و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی روابط تکاملی ژن‌های بیان شده در مغز انسان و دیگر گونه‌های مرتبط مشاهده کردند که شمپانزه و انسان دارای کمترین فاصله ژنتیکی می‌باشند که این مطلب با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. نکته جالب توجه این است که تمام گونه‌های تک معده‌ای اعم از انسان، گونه‌های مختلف میمون، خوک، اسب و سگ در یک خوشه قرار گرفته‌اند.

مقایسه توالی ژن پروتئین ریپوزومی SA مربوط به گاومیش با توالی گاو نشان می‌دهد که در طول توالی نوکلئوتیدی گاومیش تعداد ۳۲ تک نوکلئوتید در موقعیت‌های مختلف تغییر پیدا کرده است که این امر احتمالاً به علت تغییرات در طول تمایز گونه‌ای و جهش در طول تکامل بوده است. نکته جالب توجه اینکه گاو ۶۰ کروموزوم درحالی‌که گاومیش رودخانه‌ای ۵۰ کروموزوم دارد که شکل شناسی آنها نیز با هم تفاوت دارد. مقایسه توالی‌های گاو و گاومیش با گونه‌های دیگر نشان می‌دهد که در توالی‌های ژن مربوط به



## منابع

- 1- Anonymous., (2009): <http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/mapping/bovmap>
- 2- Borghese, A, Mazzi, M., (2005): Buffalo population and strategies in the world. In: Buffalo production and research, Food and agriculture Organization of the United Nations. pp 1-39. Rome: FAO
- 3- Castronovo, V., Claysmith, A. P., Barker, K. T., Cioce, V., Krutzsch, H. C., Sobel, M. E., (1991): Biosynthesis of the 67 kDa high affinity laminin receptor. Biochemistry Biophysics Research Communication. 177: 177-183
- 4- Das, D. K., Saini, M., Swarup, Gupta, D., P. K., (2008): Comparison of nucleotide and amino acids sequence of Nilgai (*Boselaphus tragocamelus*) interleukin-18 (IL-18) with other ruminants. Indian Journal of Biotechnology. 7:195-199
- 5- De Hondt, H. A., El Nahas, S. M., (2001): Genetics and Genomic mapping of the water buffalo, *Bubalus bubalis* L. Egyptian Journal of Veterinary Science. 35: 1-26
- 6- De Hondt, H. A., Gallagher, D., Oraby, H., Othman, O. E., Bosma, A. A., Womack, J. E., El Nahas, S. M., (1997): Gene mapping in the river buffalo (*Bubalus bubalis* L.): Five syntenic groups. Journal of Animal Breeding and Genetics. 114: 79-85
- 7- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., Bairoch, A., (2003): ExPasy: the proteomics server for in-dept protein knowledge and analysis. Nucleic Acids Research. 31:3784-3788
- 8- Gatphayak, K., Knorr, C., Beck, J., Brenig, B., (2004): Molecular characterization of porcine hyaluronidase genes 1, 2, and 3 clustered on SSC13q21. Cytogenet. Genome Research. 106: 98-106
- 9- Gauczynski, S., et al., (2001): The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. EMBO Journal. 20, 5863-5875
- 10- Ghosh, S., (2002): Intestinal entry of prions. Z. Gastroenterol. 40: 37-39

واریانتهای اختصاصی جدیدی در گاومیش ممکن است وجود داشته باشد، بهمین دلیل باید مطالعه گسترده‌تری در مورد شناسایی این ژن صورت گیرد تا بتوان به سازوکارهای این ژن در گاومیش و وجود ارتباط این ژن با بیماری‌هایی مثل جنون گاوی و اسکاریزی در این حیوان پی برد.

خاطر نشان می‌شود که ژن پروتئین ریوزومی SA یکی از ژن‌هایی است که محصول آن در داخل سلول اعمال مختلفی را بعهده دارد و با توجه به اینکه در بین گونه‌های مختلف توالی آن به میزان بالایی در طول تکامل محفوظ مانده است بنابراین می‌توان از آن بعنوان ژن نشانگر در بررسی مناطق محفوظ کروموزومی در بین گونه‌های مذکور استفاده کرد. همچنین می‌توان به بررسی سازوکار این ژن در ارتباط با همبستگی آن با بیماری‌های اختصاصی گاومیش اقدام ورزید و چون تابحال در گاومیش در این زمینه مطالعه‌ای صورت نگرفته است باید تحقیقات بیشتری در ارتباط با شناسایی عملکرد و سازوکار این ژن در گاومیش صورت گیرد. در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی پروتئین ریوزومی SA گاومیش برای اولین بار در دنیا شناخته شد و در بانک جهانی ژن به ثبت رسید از طرفی با بررسی قطعه‌ای از این ژن، امکان بسط نقشه فیزیکی ژنوم گاومیش فراهم گردید.

- 11- Knorr, C., Beuermann, C., Beck, J., Brenig, B., (2007): Characterization of the porcine multicopy ribosomal protein SA/37-kD a laminin receptor gene family. *Gene*. 395:135 – 143
- 12- Landowski, T. H., Uthayakumar, S., Starkey, J. R., (1995): Control pathways of the 67 kDa laminin binding protein: surface expression and activity of a new ligand binding domain. *Clinical Experimental Metastasis*. 13: 357– 372
- 13- Lesot, H., Kuhl, U., Mark, K. V., (1983): Isolation of a laminin-binding protein from muscle cell membranes. *Embo Journal*. 2: 861–865
- 14- Leucht, C., et al., (2003): The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP (Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep*. 4: 290 –295
- 15- Lyons, L. A., Laughlin, T. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E., O'Brien, S. J., (1997): Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature Genetics*, 15: 47-56
- 16- Mahfouz, E. R., (2007): Sequence and Comparative Analysis of Myeloperoxidase (MPO) in River Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1: 533-541
- 17- Marcos-Carcavilla, A., Calvo, J. H., Gonzalez, C., Serrano, C., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Bertaud, M., Hayes, H., Beattie, A. E., Lyahyai, J., Martin-Burriel, I., Maria-Torres, J., Serrano, M., (2008): Structural and functional analysis of the ovine laminin receptor gene (RPSA): Possible involvement of the LRP/LR protein in scrapie response. *Mammalian Genome*. 19: 92-105
- 18- Miller, S. A., Dykes, D. D., Polesky, H. F., (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16:1215
- 19- Miragliotta, V., Lussier, J. G., Theoret, C. L. (2008): Laminin receptor 1 is differentially expressed in thoracic and limb wounds in the horse, ESVD and ACVD. 20: 27–34
- 20- Morel, E., et al., (2005): Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *American Journal of Pathology*. 167:1033–1042
- 21- Othman, E. O., Abdel Samad, M. F., El Nahas, S. M., (2003). Synteny assignment of nine molecular markers to river buffalo chromosomes. *Buffalo Journal*., 3: 299-310
- 22- Othman, E. O., Bibars, M.A., (2004): Mapping of twelve bovine microsatellites on river buffalo chromosomes and homology with cattle chromosomes. *Buffalo Journal*, 2: 139-152
- 23- Rao, C. N., et al., (1989): Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis associated murine laminin receptor. *Biochemistry* 28: 7476–7486
- 24- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I., Weiss, S., (1997): The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *National Medicine*. 3: 1383–1388
- 25- Wang, H.Y., Chien, H.C., Osada, N., Hashimoto, K., Sugano, S., Gojobori, T., Chou, C. K., Tsai, S. F., Wu, C. I., Shen, C. K. J. (2007): Rate of Evolution in Brain-Expressed Genes in Humans and Other Primates *PLoS Biology* 5:335-342
- 26- Yow, H. K., et al., (1988): Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein. *Proceeding of National Academic Science, USA*. 85: 6394– 6398