

## تجزیه فیلوژنی و تکاملی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین

بتول اصغری ، غلامرضا داشاب \*

گروه علوم دامی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعه حاضر به منظور آگاهی از روند تکاملی و مولکولی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین در پستانداران، آنالیز فیلوژنی و روند انتخاب طبیعی انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه‌های مورد مطالعه از بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) به دست آمده و هم‌تراز شدند. درصد جانشینی و جایگزینی نوکلئوتیدها با روش حداکثر درست‌نمایی و هم‌چنین ترسیم درخت فیلوژنتیک به روش Neighbor- Joining به دست آمدند.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد جانشینی انتقالی بیش‌تر از جانشینی تقاطعی است و نسبت  $dN/dS$  برابر  $0.70$  محاسبه شد که نشان دهنده انتخاب خالص در طی تکامل این جایگاه ژنی است. نتایج درخت فیلوژنتیک نشان‌دهنده مسیرهای تکاملی مختلف ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه‌های مختلف شامل پنج دسته از گونه‌های (گاو، بوفالو و گاو میش)، (گوسفند و بز)، اسب و گراز وحشی بود که گاو، بوفالو و گوسفند بیش‌ترین قرابت را داشتند.

**بحث:** جهش و انتخاب در طی سالیان گذشته سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید، واریته‌های جدید و سبب تثبیت عملکرد آن‌ها در طی روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آنها گردیده است.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس این تحقیق، نواحی حفاظت شده بخش اندکی از توالی ژن بتالاکتوگلوبولین را تشکیل می‌دهد که این امر نشان دهنده چندشکلی بالای این ژن و هم‌چنین مستعد بودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** انتخاب طبیعی، بتالاکتوگلوبولین، پستانداران، روند تکاملی، فیلوژنی

### مقدمه

سگ و گربه نیز دارای ۲ و ۳ زیرمجموعه می‌باشد، در حالی که در نشخوارکنندگان فقط به یک شکل دیده می‌شود (۱۳). توالی cDNA و ژنومیک BLG برای اولین بار در گوسفند توسط گایا در سال ۱۹۸۶ (۷)، گاو توسط هریس در سال ۱۹۸۸ (۹) و در بز توسط الکساندر در سال ۱۹۸۹ (۲)، شناسایی شده است. عملکرد قطعی فیزیولوژیکی، این ژن هنوز روشن نشده است، ولی از جمله فعالیت‌های آن می‌توان به موارد زیر اشاره کرد (۲): بتا لاکتوگلوبولین (BLG)، پروتئین لپوکالین است که می‌تواند به بسیاری از مولکول‌های آب‌گریز اتصال یابد و نشان‌دهنده نقش آن در انتقال گروه‌ها است که از جمله این گروه‌ها می‌توان به انتقال رتینول در شیر اشاره نمود (۳)، که به کسب ایمنی غیرفعال از طریق آغوز کمک می‌کند (۱۲). هم‌چنین، در شرایط استرس به‌عنوان عامل کاهنده اثرهای استرس فعال می‌شود (۴).

بتا لاکتوگلوبولین (BLG)، پروتئین عمده آب پنی‌ر شیر نشخوارکنندگان است که دارای وزن مولکولی برابر با ۱۸ کیلو دالتون (Kd) می‌باشد. در حیوانات دیگر از جمله اسب، سگ، خوک و گربه وجود دارد، ولی در انسان، خرگوش و موش وجود ندارد. در خوک و اسب به دو صورت BLGI و BLGII و در

### نویسنده مسئول :

گروه علوم دامی، دانشگاه زابل

پستالکترونیکی: dashab@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۳۰

پروتئین‌های متفاوت رفتار مشابهی نشان می‌دهند، فرض می‌شود - گردد که نرخ تکاملی برای هر پروتئین معین در طول زمان ثابت است. این پیشنهاد اشاره به وجود یک نوع ساعت مولکولی دارد که در ژن‌های مختلف سریع‌تر یا کندتر کار می‌کند، اما در مورد هر ژن معین میان دودمان‌های مختلف فیلوژنتیک، نرخ ثابتی دارد. اگر ساعت مولکولی را برای زمان واگرایی در گونه‌های مختلف بپذیریم نرخ تکاملی یک ژن قابل محاسبه است، پس این اطلاعات به آسانی برای تعیین تاریخ ناشناخته انشعابی میان دو گونه فقط با مقایسه توالی DNA یا اسید آمینه تعیین می‌شود؛ بالعکس، اگر اطلاعات مربوط به زمان انشعاب میان دو گونه شناخته شود، پس نرخ تکاملی نوکلئوتیدی از یک ژن معین قابل دستیابی است (۱).

بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تعیین روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن بتالاکتوگلوبولین و نحوه انتخاب در طول تکامل است. ابتدا درخت فیلوژنتیک برای توالی‌های بتالاکتوگلوبولین که در بانک اطلاعاتی قابل دسترس هستند ترسیم می‌گردد و هم‌چنین با استفاده از این توالی‌ها، میزان، مسیر و محل‌های حساس به تغییرهایی در طول تکامل شناسایی می‌شود. با اجرای مراحل فوق در تحقیق حاضر می‌توان به شناخت کافی از ساختار ژنی بتالاکتوگلوبولین دست یافته و از آن‌ها در مطالعه‌های تکمیلی جهت دستیابی به آلل‌های ویژه برای بهبود صفت‌های تولیدی استفاده کرد.

## مواد و روش‌ها

**شناسایی و ویرایش توالی‌های ژنی بتالاکتوگلوبولین:** به منظور شناسایی توالی‌های ژنی بتا لاکتوگلوبولین، اطلاعات مربوط به توالی‌های نوکلئوتیدی DNA و mRNA ژن بتا-لاکتوگلوبولین برای گاو شناسایی شد. هم‌چنین، با استفاده از ابزار BLAST در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم، توالی ژنی بتالاکتوگلوبولین برای سایر گونه‌های مورد نظر نیز به دست آمد (جدول ۱). جهت مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های ژنتیکی ابتدا توالی ژنی بتالاکتوگلوبولین در گاو با توالی سایر گونه‌ها با استفاده از Clustal W هم‌تراز شدند. سپس تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی مشابه یا غیرمشابه اتفاق افتاده، درصد تفرق ژنی،

فیلوژنی مولکولی از اطلاعات توالی‌های نوکلئوتیدی برای احیا کردن روابط تکاملی بین گونه‌های مختلف و برآورد زمان واگرایی گونه‌ها استفاده می‌گردد. روابط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و موجودات را می‌توان با یک درخت فیلوژنتیک شرح داد که قابل مقایسه با شجره‌نامه‌ای است که ژن‌ها یا موجودات بسیار شبیه را نشان می‌دهد و واژه‌های مختلف این نمودار (یعنی ریشه، ساقه، شاخه، گره و برگ) نیز یادآور درختان هستند. گره‌های خارجی (انتهاپی) یا تاکسون باقی‌مانده که واحدهای تاکسونومی فعال نامیده می‌شوند، یک واژه ژنتیکی است که می‌تواند انواعی از تاکسون‌های قابل مقایسه را نشان دهد. گره‌های داخلی نیز به نام واحدهای تاکسونومیکی فرضی نامیده می‌شوند و تأکیدی بر این است که جد فرضی out'ها (واحدهای تاکسونومی فعال) هستند. گروهی از تاکسون‌ها که متعلق به شاخه‌های یکسانی هستند، منشأ منوفیلیتیک دارند، یک خوشه نامیده می‌شوند. الگوی شاخه‌زایی (یعنی ترتیب گروه‌ها) توپولوژی (Topology) درخت نامیده می‌شود (۱۶).

اشتباه در جایگزینی یک پورین با پورین دیگر و یک پیریمیدین با پیریمیدین دیگر، حالتی است که به آسانی رخ می‌دهد. این جهش‌ها، جهش انتقالی (Transition) نام دارند. جایگزینی پورین با پیریمیدین و عکس آن، جهش تقاطعی (Transversion) نامیده می‌شود. جهش در ژن‌هایی که به نتاج می‌رسند و حضور هم‌زمان آن‌ها با ژن‌های اصلی به چندریختی (Polymorphism) می‌انجامد. تکامل پیامد دگرگونی در فراوانی آلل‌هاست که فراوانی ژن نامیده می‌شود. نظر به این که برخی آلل‌ها در طول زمان از دست می‌روند و فراوانی سایر آلل‌ها تا صددرصد افزایش می‌یابد، این آلل‌ها در جمعیت تثبیت می‌شوند. تکامل بلندمدت یک گونه، از تثبیت موفق آلل‌های خاص حاصل می‌شود که بازتاب پایداری جهش‌ها است. آهنگ پایداری این جهش‌ها در جمعیت، نرخ تکاملی یا نرخ پایداری نامیده می‌شود (۱).

بر اساس نظریه نرخ تکاملی پروتئین‌ها فاصله ژنتیکی دو توالی رمز کننده پروتئین یکسان، اما جدا شده از گونه‌های مختلف با زمان انشعاب دو گونه به‌طور خطی نسبت دارد. به‌علت این‌که

<sup>1</sup>Operating Taxonomic Unite

توالی ژن بتالاکتوگلوبولین گاو با شماره دستیابی بانک ژنی (X۱۴۷۱۲،۱)، از NCBI ORF Finder استفاده شد.

### نتایج و بحث

اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه‌های اهلی و سایر موجودات مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است. تعداد کل جهش‌هایی که در طی تکامل این ژنها رخ داده است برابر ۴۹۳ جهش شناسایی شد که توزیع آن‌ها در طول ژنوم متفاوت بودند. تعداد جایگاه‌های چندشکل نیز ۲۸۴ جایگاه بود که روند انتخاب مثبت در این ژن‌ها را توجیه می‌کند.

درخت فیلوژنتیک روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی این ژن‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۱). مقادیر Bootstrapping بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی نوکلئوتیدی مورد نظر از درجه اعتماد بالایی برخوردار است.

نوکلئوتیدهای ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه‌های مورد بررسی بر پایه مسیر تکاملی به پنج دسته تقسیم شدند. دسته اول مربوط به گونه‌های گاو، گاو میش و بوفالو دسته دوم مربوط به گونه‌های گوسفند و بز، دسته سوم، چهارم و پنجم به ترتیب مربوط به گونه‌های اسب، گربه و گراز وحشی (که به‌عنوان خوک وحشی نیز شناخته می‌شود)، بودند. طبق نتایج به دست آمده، گاو، بوفالو و گوسفند قرابت بیشتری داشتند. همچنین، شباهت بالای درون گروه‌های گربه، اسب و دسته چهارم (گراز وحشی) دیده می‌شود.

ارتباط تکاملی موجودات را می‌توان بر اساس تشابه و همسانی توالی مولکولی آن‌ها درک نمود. اولین فرضیه در فیلوژنتیک بر این اساس است که توالی‌های مولکولی مورد استفاده در ساختار فیلوژنتیکی همولوگ هستند، یعنی یک جد مشترک دارند و در طی زمان از هم فاصله گرفته‌اند. واگرایی فیلوژنتیکی با دو شاخه شدن نشان داده می‌شود. بدین معنی که شاخه والدین به دو شاخه دختر، انشعاب می‌یابد. فرضیه دوم در فیلوژنتیک این است که هر ناحیه‌ای در توالی به صورت مستقل تکامل می‌یابد و تفاوت توالی‌ها، اطلاعات کافی و مفیدی را در جهت ساخت

تبدیل ژنی (Conversion) و همچنین تنوع آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Dnaspv5 (۹) محاسبه گردید.

### فیلوژنی و تعیین مسیر تکاملی: ترسیم درخت فیلوژنتیک

توالی ژن بتالاکتوگلوبولین برای گونه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (۱۵) انجام گرفت. پس از ویرایش توالی‌ها و حذف نواحی غیر ناهمگون، درخت فیلوژنی با استفاده از روش اتصال-همسایگی (NJ) ترسیم گردید. در این روش از ماتریس (Q) استفاده می‌شود که مشتمل بر کل شاخه‌ها بوده و کم‌ترین مقدار که بیان کننده شباهت بالای دو شاخه باشد را انتخاب کرده و در یک انشعاب از درخت فیلوژنی به کار می‌برد. مقادیر Bootstrapping به وسیله ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند. ترسیم درخت فیلوژنی به وسیله روش NJ با استفاده از رابطه ۱ انجام شد.

$$(1) Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k)$$

در رابطه بالا؛  $d(i, j)$ : فاصله بین شاخه  $i$  و  $j$ ؛  $k$ : شاخه  $k$  ام درخت،  $r$ : تعداد کل شاخه‌ها و  $Q(i, j)$ : مقدار عددی شاخه‌های  $i$  و  $j$  است.

بررسی تغییرهای نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند ( $d_N$ ) نسبت به تغییرهای نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند ( $d_S$ )، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد (۱۱). بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت ( $d_N/d_S$ ) روند انتخاب طبیعی برای ژن بتالاکتوگلوبولین با نرم‌افزار HIV\_SNAP v2.1.1 (۷) محاسبه گردید. مقادیر  $d_S$  و  $d_N$  به ترتیب با استفاده از روابط ۲ و ۳ قابل محاسبه هستند.

$$(2) d_N = -3/4 \ln(1 - 4/3 P_N)$$

$$(3) d_S = -3/4 (1 - 4/3 P_S)$$

در روابط بالا،  $P_N$  نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه و  $P_S$  نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند. معنی دار بودن مقدار عددی  $d_N/d_S$  با آزمون فیشر در سطح احتمال ۵ درصد بررسی گردید. همچنین، در تحقیق حاضر برای شناسایی نواحی Open Reading Frame (ORF)،

انتخاب مثبت، اگر کم تر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن ها نشان می- دهد (۸). مقدار عددی این نسبت ( $d_N/d_S$ ) که برابر ۰/۷۰ است (جدول ۲) روند انتخاب خالص در طی تکامل برای ژن بتالاکتوگلوبولین را نشان می دهد.

جدول ۲. پارامترهای تعیین روند انتخاب طبیعی در جایگاه ژن

بتالاکتوگلوبولین

پارامتر*	مقدار عددی	انحراف استاندارد
$d_N$	۰/۸۸	۰/۰۱۷
$d_S$	۱/۲۵	۰/۰۲۵
$d_N/d_S$	۰/۷۰	۰/۰۱

\* تغییرهای نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده اند ( $d_N$ )، تغییرهای نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته اند ( $d_S$ )، مقدار عددی ( $d_N/d_S$ ) نشان دهنده روند انتخاب طبیعی.

نتایج حاصل از درصد جابه جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن بتالاکتوگلوبولین در جدول ۳ آورده شده است. مقادیر بالای جانیشینی مربوط به بازهای پیریمیدینی است، به طوری که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۲۳/۲۵ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین برابر ۱۳/۶۲ درصد محاسبه گردید. این مقادیر برای بازهای پورینی کم تر و به ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین برابر ۱۷/۳۲ و ۱۱/۰۷ درصد بودند.

مقادیر جایگزینی حاصل در این بررسی با مقادیر ذکر شده توسط سایر محققین که بیشترین میزان جانیشینی را جانیشینی بازهای پیریمیدینی گزارش کرده اند، مطابقت دارد. علت این تغییرها را می توان به متیله شده سیتوزین نسبت داد. هم- چنین، میزان جایگزینی بازهای پیریمیدینی به پورینی و پورینی به پیریمیدینی نیز ۱/۵۵ درصد بود.

نتایج حاصل از آنالیز نواحی حفاظت شده در قطعه هم تراز شده از ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه ها و نژادهای مختلف آن ها نشان داد، که بخش کوچکی از توالی ژن بتالاکتوگلوبولین در طی روند تکامل حفظ شده است که این امر نشان دهنده چندشکلی بالای این ژن و هم چنین مستعد بودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش می باشد، که سبب به وجود آمدن

درخت های فیلوژنتیکی بدون ابهام فراهم می کنند. روش اتصال مجاور (NJ) ترسیم درخت فیلوژنی، درخت را با یافتن پی در پی جفت های نزدیک به هم رسم می کند، که جفت outها با یک گروهی داخلی به هم وصل می شوند. این روش تلاش نمی کند تا شبیه ترین outها را خوشه بندی کند، اما به جای آن، طول همه شاخه های داخلی و سپس طول کل درخت را حداقل می نماید. در ابتدا، اولین شاخه داخلی وارد می شود و طول درخت حاصل محاسبه می شود. الگوریتم پی در پی هر جفت ممکن از outها را متصل نموده و سرانجام جفت outهایی که منجر به کوتاه ترین درخت گردد را به هم وصل می کند. هنگامی که دو توالی واگرا باشد، به احتمال در یک موقعیت معین دو یا چند جهش متوالی رخ داده است (۱). در این خصوص همان طور که در شکل (۱) مشخص شده است، توالی مربوط به یکی از گونه های گاو اهلی از سایر گونه های این گروه جدا شده است که به احتمال وجود جهش در این توالی، علت واگرایی آن از دیگر توالی گونه های مربوط به این گروه است. فاصله ژنتیکی حاصل از این رویدادهای چندگانه در دو توالی نسبت به آنچه از درصد تفاوت دو توالی به دست می آید، بیش تر است. هر چه توالی ها واگراتر باشد، اثر رویدادهای چندگانه بزرگ تر است.

سویار و همکاران نیز نتایجی مشابه با تحقیق حاضر گزارش نمودند. به طوری که طی گزارش آن ها بیشترین قرابت ژنی مربوط به گاو، گوسفند و بوفالو بوده است و هم چنین شباهت بالای درون گروه های اسب، گربه و سگ گزارش کرده اند (۱۰). پیوتت و همکاران نیز با بررسی فیلوژنتیک پروتئین های مربوط به گروه لیپوکالین از جمله بتالاکتوگلوبولین، نتایجی مشابه با نتایج تحقیق حاضر گزارش می نمایند، به طوری که آن ها نیز بیشترین قرابت ژنی را در گاو، گوسفند و بز و هم چنین شباهت بالایی در بین اسب، سگ و گربه را گزارش کردند (۱۴).

نتایج حاصل از تغییرهای نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده اند ( $d_N$ ) نسبت به تغییرهای نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته اند ( $d_S$ )، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن ها است (۱۱). اگر این نسبت بیش تر از یک باشد

Dnaspv5، ده ناحیه در بین توالی‌ها شناسایی شد که در آن‌ها تبدیل ژنی رخ داده است (جدول ۴).

همانگونه که قبلاً ذکر شده است، برای شناسایی نواحی (ORF) Open Reading Frame، توالی ژن بتالاکتوگلوبولین گاو با شماره دستیابی بانک ژنی X14712.1، از NCBI ORF Finder استفاده شد، کد آغازین ATG و کد پایانی آن نیز TGA بود که در (شکل ۳) نشان داده شده است.

### نتیجه گیری

به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ژن بتالاکتوگلوبولین از پراکندگی کروموزومی و وظایف بیولوژیکی مختلفی برخوردار است. بر اساس این تحقیق، نواحی حفاظت شده بخش اندکی از توالی ژن بتالاکتوگلوبولین را تشکیل می‌دهد که این امر نشان‌دهنده چندشکلی بالای این ژن و هم‌چنین مستعد بودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد. تعداد کل جهش‌هایی که در طی تکامل این جایگاه ژنی رخ داده است برابر ۴۹۳ و همچنین تعداد جایگاه‌های چندشکل نیز ۲۸۴ محاسبه شد که روند انتخاب مثبت در این ژن‌ها را توجیه می‌کند و این امر نقش عمده‌ای در شناخت وظیفه بیولوژیکی این ژن خواهد داشت که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و هم‌چنین عملکردهای جدید می‌شود. هم‌چنین، نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان جانیشینی بازها مربوط به بازهای پیریمیدینی بود که در تمامی قسمت‌های ژن پراکنده‌اند. هم‌چنین، درصد تفرق بین گونه‌ها در این بررسی برابر با ۱/۳۶ محاسبه شد.

پروتئین‌های جدید و هم‌چنین عملکردهای جدید آن شده است.

تفرق ژنتیکی مجموع کل ویژگی‌های ژنتیکی یک گونه است و به‌عنوان راه‌حلی در جهت سازگاری با تغییرهای محیطی شناخته شده است. به‌عبارت دیگر بیان‌گر تعدادی از افراد یک جمعیت است که دارای آلل‌هایی هستند که منطبق با شرایط محیطی می‌باشند و این افراد بیش‌ترین احتمال برای زنده‌مانی و شرکت در ایجاد نسل بعدی را دارند. برآوردها نشان داد که درصد تفرق بین گونه‌ها بر اساس روش آماری حداکثر درست-نمایی (ML) و نسبت جایگزینی کل، برابر با ۱/۳۶ بوده است. هم‌چنین، درصد تنوع نوکلئوتیدی ۰/۳۸ درصد به‌دست آمد.

تبدیل ژنی (conversion)، فرآیندی است که طی آن یک توالی DNA جایگزین توالی همولوگ آن می‌شود. این فرآیند می‌تواند به صورت آللی، به این معنی که یک آلل جایگزین یک آلل دیگر از همان ژن شود و یا به این صورت که یک توالی پارالوگ DNA تبدیل به دیگری شود، نیز تعریف می‌شود. تبدیل ژنی آللی در طی میوز رخ می‌دهد، که در طی آن نوترکیبی بین مکان‌های هتروزیگوتی منجر به عدم تطابق در جفت شدن بازها می‌شود. این عدم تطابق شناسایی شده و توسط فرآیندهای سلولی اصلاح می‌شود که منجر به تبدیل آللی به آلل دیگر می‌شود. تبدیل ژنی یک فرآیند اساسی ژنتیکی در جدایی گونه‌هاست، که به‌عنوان شبکه اتصال دهنده بین توالی‌های DNA در بین افراد یک گونه عمل می‌کند که این شبکه منجر به یکسان سازی، انسجام و یک‌پارچگی توالی DNA در بین گونه‌ها می‌شود (۱).

در این تحقیق، براساس آنالیز صورت گرفته جهت شناسایی نواحی که در آن‌ها تبدیل صورت گرفته با استفاده از نرم‌افزار

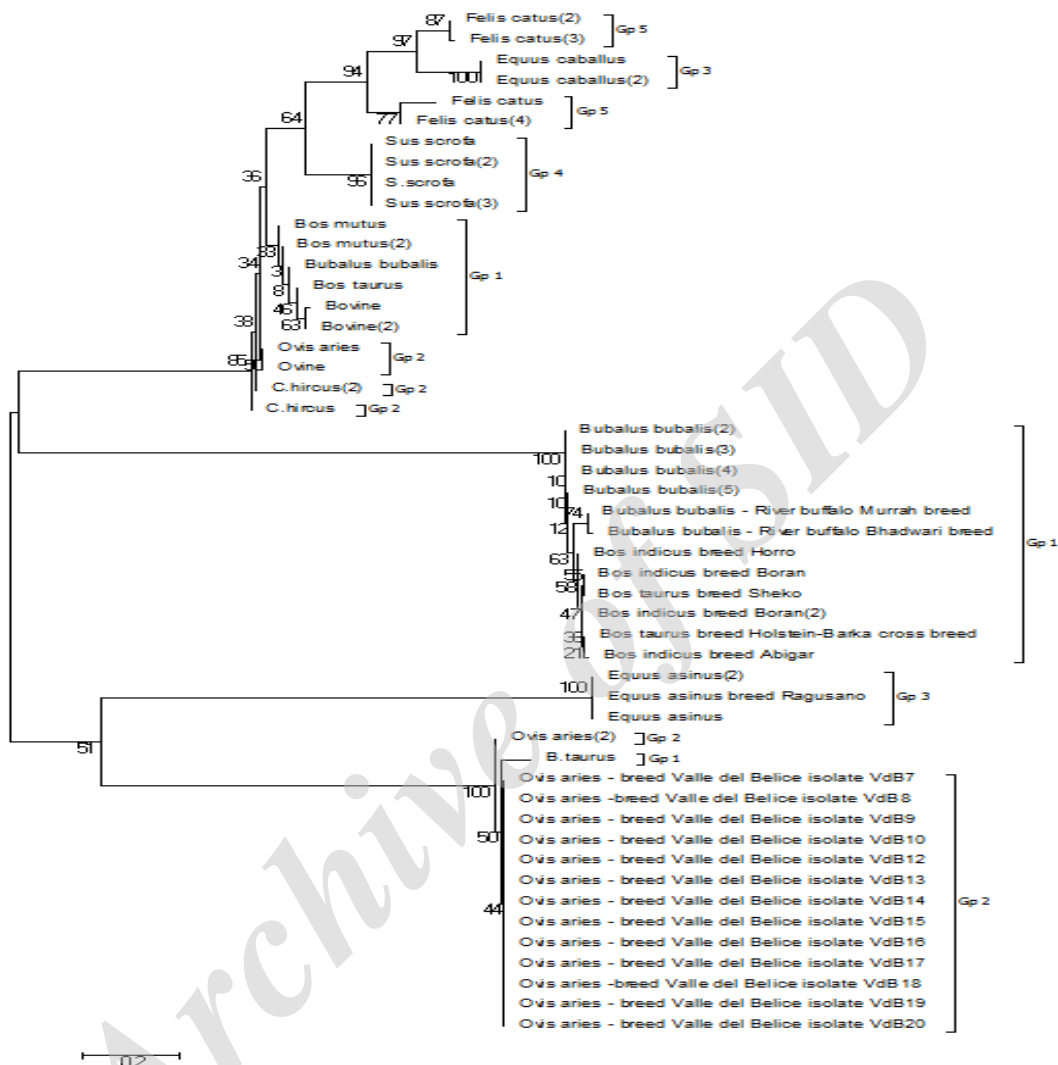
جدول ۱- گونه، اسم علمی، اندازه ژن و شماره دستیابی توالی‌های ژن بتالاکتوگلوبولین استفاده شده در آنالیز فیلوژنی و روند تکاملی

ردیف	گونه مورد بررسی	شماره دستیابی بانک ژن	اندازه ژن (جفت باز)
۱	Bovine (گاو)	X14712.1	۷۹۰
۲	Capra_hircus (بز)	Z19569.1	۷۸۶
۳	Bos_mutus (گاو کوهان‌دار)	XM_014481456.1	۹۳۰
۴	Sus_scrofa (گراز وحشی)	XM_013993953.1	۷۹۵
۵	Bos_mutus (گاو کوهان‌دار)	XM_005888515.2	۹۶۱

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هشتم شماره سی ام - تجزیه فیلوژنی ...

۸۵۴	X63139.1	B.taurus (گاو اهلی)	۶
۷۵۵	X58471.1	C.hircus (بز)	۷
۷۷۸	X54976.1	S.scrofa (گراز وحشی)	۸
۷۹۰	X14712.1	Bovine (گاو)	۹
۷۳۷۹	X12817.1	Ovis aries (گوسفند)	۱۰
۷۸۵	X04520.1	Ovine (گوسفند)	۱۱
۷۲۸	U60978.1	Equus caballus (اسب)	۱۲
۷۹۵	NM 213754.2	Sus scrofa (گراز وحشی)	۱۳
۸۷۹	NM 173929.3	Bos taurus (گاو اهلی)	۱۴
728	NM 001082494.1	Equus caballus (اسب)	۱۵
785	NM 001009366.1	Ovis aries (گوسفند)	۱۶
601	M19088.1	Bovine (گاو)	۱۷
۲۰۱۷	KU934236.2	Equus asinus breed Ragusano (اسب)	۱۸
۴۷۷	HQ877769.1	Bos indicus breed Abigar (گاو کوهان دار)	۱۹
۴۷۵	HQ589927.1	Bos taurus breed Holstein (گاو اهلی)	۲۰
۴۶۳	HQ589926.1	Bos indicus breed Horro (گاو کوهان دار)	۲۱
۴۷۲	HQ589925.1	Bos taurus breed Sheko (گاو اهلی)	۲۲
۴۶۶	HQ589924.1	Bos indicus breed Boran (گاو کوهان دار)	۲۳
۴۶۸	HQ589923.1	Bos indicus breed Boran (گاو کوهان دار)	۲۴
۴۵۵۰	HM012800.1	Equus asinus (اسب)	۲۵
۴۵۵۰	HM012799.1	Equus asinus (اسب)	۲۶
۲۱۴۷	FR821310.1	Ovis aries (گوسفند)	۲۷
۲۱۴۷	FR821309.1	Ovis aries (گوسفند)	۲۸
۲۱۴۷	FR821308.1	Ovis aries (گوسفند)	۲۹
۲۱۴۷	FR821307.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۰
۲۱۴۷	FR821306.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۱
۲۱۴۷	FR821305.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۲
۲۱۴۶	FR821304.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۳
۲۱۴۶	FR821303.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۴
۲۱۴۷	FR821302.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۵
۲۱۴۷	FR821300.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۶
۲۱۴۷	FR821299.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۷
۲۱۴۷	FR821298.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۸
۲۱۴۷	FR821297.1	Ovis aries (گوسفند)	۳۹
۴۰۰	AY775802.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۰
۴۰۰	AY775801.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۱
۴۰۰	AY775800.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۲
۴۰۰	AY775799.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۳
۵۵۱	AY372187.1	Sus scrofa (گراز وحشی)	۴۴
۳۹۸	AJ492506.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۵
۳۹۸	AJ492505.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۶
۷۴۲	AJ005429.1	Bubalus bubalis (بوفالو)	۴۷
۶۲۹	AF073785.1	Felis catus (گربه اهلی)	۴۸

۶۴۳	AF073784.1	Felis catus (گره اهلی)	۴۹
۶۴۳	AF073783.1	Felis catus (گره اهلی)	۵۰
۶۳۴	AF073782.1	Felis catus (گره اهلی)	۵۱



شکل ۱. درخت فیلوژنتیک توالی های نوکلئوتیدی ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه های مورد بررسی (۰/۲ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه)

جدول ۳- درصد جابه جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن بتالاکتوگلوبولین در گونه های مورد بررسی بر اساس روش حداکثر درست نمایی

G	C	T/U	A	نوکلئوتید <sup>۱</sup>
۱۷/۳۲	۵/۲۱	۳/۰۵	-	A
۵/۵۴	۲۳/۲۵	-	۳/۵۳	T
۵/۵۴	-	۱۳/۶۲	۳/۵۳	C
-	۵/۲۱	۳/۰۵	۱۱/۰۷	G

درصد جانشینی بازها از یک ردیف به ستون را نشان می دهد. اعداد خارج قطر نشان دهنده جانشینی تقاطعی (ایتالیک) و اعداد روی قطر درصد جانشینی انتقالی (بولد) هستند.

جدول ۴- نواحی تبدیل ژنی در جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین در بین گونه های مورد مطالعه

سطح معنی داری (Psi)	نقطه مرکزی تبدیل	ناحیه تبدیل ژنی
۰/۲۱	۵۰	۱-۱۰۰ (Bubalus)
۰/۲۰	۷۵	۲۶-۱۲۵ (Equus)
۰/۲۲	۱۰۰	۵۱-۱۵۰ (Equus)
۰/۲۰	۱۲۵	۷۶-۱۷۵ (Equus)
۰/۱۹۸	۱۵۰	۱۰۱-۲۰۰ (Bovine)
۰/۱۹۷	۱۷۵	۱۲۶-۲۲۵ (Bovine)
۰/۲۰	۲۰۰	۱۵۱-۲۵۰ (Bos)
۰/۱۹۵	۲۲۵	۱۷۶-۲۷۵ (Ovis)
۰/۲۲	۲۵۰	۲۰۱-۳۰۰ (Bovine)
۰/۲۳	۲۶۳	۳۰۳-۳۲۶ (Bovine)



**46 Atg aag tgc ctc ctg ctt gcc ctg gcc etc acc tgt ggc gcc cag**  
**M K C L L L A L A L T C G A**  
**91 gcc etc atc gtc acc cag acc atg aag ggc ctg gat atc cag aag**  
**A L I V T Q T M K G L D I Q K**  
**136 gtg gcg ggg act tgg tac tcc ttg gcc atg gcg gcc agc gac atc**  
**V A G T W Y S L A M A A S D I**  
**181 tcc ctg ctg gac gcc cag agt gcc ccc ctg aga gtg tat gtg gag**  
**S L L D A Q S A P L R V Y V E**  
**226 gag ctg aag ccc acc cct gag gcc gac ctg gag atc ctg ctg cag**  
**E L K P T P E G D L E I L L Q**  
**271 aaa tgg gag aat gat gag tgt gct cag aag aag atc att gca gaa**  
**K W E N D E C A Q K K I I A E**  
**316 aaa acc aag atc cct gcg gtg ttc aag atc gat gcc ttg aac gag**  
**K T K I P A V F K I D A L N E**  
**361 aac aaa gtc ctt gtg ctg gac acc gac tac aaa aag tac ctg ctc**  
**N K V L V L D T D Y K K Y L L**  
**406 gtc tgc atg gag aac agt gct gag ccc gag caa agc ctg gtc tgc**  
**V C M E N S A E P E Q S L V C**  
**451 cag tgc ctg gtc agg acc ccg gag gtg gac gac gag gcc ctg gag**  
**Q C L V R T P E V D D E A L**  
**496 aaa ttc gac aaa gcc ctc aag gcc ctg ccc atg cac atc cgg ctg**  
**K F D K A L K A L P M H I R L**  
**541 tcc ttc aac cca acc cag ctg gag gag cag tgc cac atc tag**  
**S F N P T Q L E E Q C H I \***



شکل ۲- شناسایی نواحی ORF جایگاه ژن بتالاکتوگلوبولین



۱. نساج حسینی م.، شمس بخش، م. روش های آنالیز فیلوژنتیکی. چاپ اول، انتشارات حق شناس، ۱۳۸۹، ۲۳۹ ص.
2. Alexander, L.J., Hayes, G., Pearse, M.J., Biattie, C.W., Stewart, A.F., Willis, I.M. and Mackinlay, A.G. Complete sequence of bovine P-lactoglobulin cDNA, *Nucleic. Acids. Res.*, 1989.17, 6739.
3. Ali, S. and Clark, A.J. Characterisation of the gene encoding ovine P-lactoglobulin: similarity to the genes for retinol-binding protein and other secretory proteins. *Mol. Biol.*, 1988. 199, 415426.
4. Alston-Mills, B. and Thompson, M.P. A possible mechanism of action of P-lactoglobulin, *J. Dairy. Sci.* 1993. 76, p. 196.
5. Gaye. P., Hue-Delahaie, D., Mercier, J.C., Soulier, S., Vilotte, J.L. and Furet, J.P. Ovine P-lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland, *Biochimie*, 1986. 68, p. 1097-1107.
6. Hariss, S., Ali, S., Anderson, S., Archibald, A.L. and Clark, A.J. Complete nucleotide sequence of the genomic ovine P-lactoglobulin gene, *Nucleic. Acids. Res.*, 1988. 16, p. 10379-10380.
7. Korber, B. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*, 2000. Chapter 4, pages 55-72. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
8. Li, W.H. *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA. 1997.
9. Librado, P. & Rozas, J. DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 2009. 25, p. 1451-1452.
10. Nei, M. and S. Kumar. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 2000. p. 51-72.
11. Papiz, M.Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E., North, A.C.T., Findlay, J.B.C., Sivaprasadarao, R., Jones, T.A., Newcomer, M.E. and Kraulis, P.J. The structure of p-lactoglobulin and its similarity to retinol-binding protein, *Nature*, 1986. 324, p. 383-385.
12. Pervaiz, S. and Brew, K. Homology of P-lactoglobulin. Serum retinol-binding protein, and protein HC, *Scienc*, 1998. 228, p. 335-337.
13. Pottie, C.P., Marshall, C.J., Hubbard, M.J., Collett, C. and Grigor, M.R. Phylogenetic Analysis of Three Lipocalin-Like Proteins Present in the Milk of *Trichosurus vulpecula* (Phalangeridae, Marsupialia). *J Mol Evol.* 1997. 46: p. 361-369.
14. Sawyer, L. and Kontopidis, G. The core lipocalin, bovine L-lactoglobulin, Elsevier Science B.V. 2000. p. 136-148.
15. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013. 30:p. 2725-2729.
16. Techenmacher, H. and Koch, G. Opioids in the milk, *Endocrine Reg.*, 1991. 25, p. 147-150.