

شناسایی و تعیین توالی ۷ ژن RNA ناقل میتوکندریایی در مرغ بومی خراسان

- **سید نادر آلبوشوکه:** گروه علوم دامی، پردیس بین‌الملل، دانشگاه فردوسی، مشهد، صندوق پستی: ۹۱۷۳۵-۳۳۱
- **مجتبی طهمورث‌پور*:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، صندوق پستی: ۹۱۷۳۵-۳۳۱
- **محمدرضا نصیری:** گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی، مشهد، صندوق پستی: ۹۱۷۳۵-۳۳۱

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۳

چکیده

هدف این پژوهش بررسی و تعیین توالی نوکلئوتیدی ۷ ژن tRNA در ژنوم میتوکندری مرغ بومی خراسان و شناسایی جهش‌های احتمالی در آن بود. بدین منظور پس از نمونه‌گیری و استخراج DNA از خون، این بخش از ژنوم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و در پلاسمید pTG19-T در سویه DH5 α باکتری *اشیریشیا کولای* همسانه‌سازی گردید. در نهایت پلاسمید نوترکیب از یک کلونی نوترکیب استخراج و پس از خالص‌سازی توالی‌یابی شد. نتایج هم‌ردیفی نوکلئوتیدی این توالی شباهت ۱۰۰ درصد با توالی مشابه در ژنوم نوکلئوتیدی مرغ مرجع (مرغ اهلی با شماره دسترسی 52392.1x) را نشان داد. به‌علاوه در این مطالعه مشخص گردید که مرغ بومی خراسان در توالی‌های نوکلئوتیدی این ۷ ژن با سایر نژادهای گونه مرغ اهلی شباهت ۹۹ درصد دارد. درمقایسه توالی قطعه تولید شده با توالی مشابه در مرغ مرجع، هیچ‌گونه جهش نوکلئوتیدی مشاهده نشد. ترتیب ژن‌های tRNA موجود در این قطعه توالی‌یابی شده، درست مشابه ترتیب این ژن‌ها در توالی ژنومی میتوکندری مرغ مرجع و به‌صورت tRNAAsn، tRNAAla، tRNATrp، tRNATyr، tRNACys، tRNAAsp، tRNASer، COX1 و ژن COX2 بود.

کلمات کلیدی: همسانه‌سازی، توالی‌یابی، tRNA، مرغ بومی خراسان



مقدمه

DNA میتوکندریایی طیور یک ملکول حلقوی با حدود ۱۶۶۷۵ جفت نوکلئوتید و دارای یک ناحیه کنترل غیرکد شونده (D-Loop) و ناحیه کد شونده که دارای ۳۷ ژن شامل ۱۳ پروتئین و ۲۲ tRNA و ۲ rRNA و فاقد هیستون و اینترون می‌باشد (Sadr و Nassiri, ۲۰۱۴؛ Chinnery و Schon, ۲۰۰۲؛ Wolstenholme, ۱۹۹۲؛ Desjardins و Morais, ۱۹۹۱؛ Desjardins و Morais, ۱۹۹۰). به دلیل برخی خصوصیات منحصر به فرد ژنوم میتوکندریایی و از جمله بسته‌بندی فشرده ژنومی (Compact gene packing)، وجود نوعی سازماندهی در محافظت شدگی ژن‌ها در بین رده و راسته‌های جانوری، عدم وجود نوترکیبی و توارث انحصاری مادری از آن به‌عنوان یک ابزار مناسب در مطالعات مولکولی تکاملی استفاده می‌نمایند. همچنین از توالی DNA میتوکندریایی اغلب جهت رسم درخت فیلوژنتیکی مولکولی در بین حیوانات بسیار خویشاوند استفاده می‌شود (Nishida و Kumazawa, ۱۹۹۳).

RNA ناقل (tRNA) اسیدهای ریبونوکلئیک کوچکی با طولی حدود ۷۳ الی ۹۴ نوکلئوتید بوده و در تمامی موجودات زنده وجود دارند و در بیوسنتز پروتئین ریبوزومی شرکت می‌نمایند (Söll و RajBhandary, ۱۹۹۵). بیش از ۴۳۰۰ توالی مربوط به tRNAهای پروکاریوتی، سیتوزول یوکاریوتی، کلروپلاستی و میتوکندریایی در بانک‌های اطلاعاتی به ثبت رسیده است (Sprinzl و همکاران, ۱۹۹۸). از مجموع ۲۲ ژن tRNA میتوکندریایی ۱۸ ژن برای ۱۸ اسیدآمینو و ۲ ژن برای اسیدآمینو لوسین (tRNA^{leu[UUR]} و tRNA^{leu[CUN]}) و ۲ ژن نیز برای اسیدآمینو سرین (tRNA^{ser[AGY]} و tRNA^{ser[UGN]}) اختصاص یافته است. در این نوع نشانه‌گذاری کدهای سه تایی موجود در گروه نشان‌دهنده توالی کدون‌های مکمل با آنتی‌کدون tRNA بوده و R برای پورین و Y برای پیریمیدین و N برای نشان دادن هریک از بازهای چهارگانه استفاده شده است (Florentz, ۲۰۰۲). tRNA دارای ساختمان اولیه، ثانویه و ساختمان ۳ بعدی می‌باشد. پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدها سبب تاخوردگی‌های متعدد و ایجاد شکل فضایی مشخصی در آن شده به‌صورتی که دو انتهای زنجیره در مجاورت هم قرار می‌گیرند. در یکی از دو انتها همیشه توالی خاصی از سه نوکلئوتید انتهایی به‌صورت ACC دیده می‌شود و این محل اتصال کوآلان اسیدآمینو با نوکلئوتید آدنین tRNA می‌باشد. در زنجیره مقابل نیز نوکلئوتید انتهایی اغلب G است. در نقطه‌ای

نسبتاً مقابل با توالی CCA، در بخش دیگری از مولکول tRNA توالی خاصی از سه نوکلئوتید خاص دیگر به‌نام آنتی‌کدون وجود دارد که با توالی ۳ نوکلئوتیدی در RNA پیامبر (کدون) جفت می‌شود. tRNA به‌عنوان یک رابط فیزیکی بین توالی نوکلئوتیدی اسیدنوکلئیک پیامبر (mRNA) با توالی اسیدآمینو پروتئینی عمل می‌کند و این کار را با حمل یک اسیدآمینو که دستور آن به‌وسیله کدون تعیین می‌گردد به ماشین ساخت پروتئین (ریبوزوم) انجام می‌دهد (Maassen و همکاران, ۲۰۰۴).

سرعت جایگزینی نوکلئوتیدها در برخی نواحی میتوکندری مهره‌داران عالی در مقایسه با ژنوم هسته‌ای ۵ تا ۱۰ برابر بیش‌تر می‌باشد و این ناشی از عدم وجود مکانیزم‌های ترمیمی DNA، فقدان هیستون و پروتئین‌های محافظت‌کننده و همچنین اثر تخریبی مجاورت با رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در فرایندهای فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌باشد (Zachary و McGavin, ۲۰۱۲). ژن‌های کدکننده tRNAهای میتوکندریایی بسیار مستعد به جهش‌های نقطه‌ای بوده و این علت اصلی ناکارایی میتوکندریایی همراه با گستره وسیعی از بیماری‌ها می‌باشد (Suzuki و همکاران, ۲۰۱۱). در انسان بیش از ۱۵۰ جهش بیماری‌زا می‌تواند در ژنوم میتوکندریایی رخ دهد که دو سوم این جهش‌ها مربوط به ژن‌های tRNA می‌باشد (Levinger و همکاران, ۲۰۱۱). به‌عنوان مثال بروز جهش در این قسمت از ژن‌های میتوکندری انسان توام با بیماری‌های مهمی نظیر آلزایمر و پارکینسون (Troen, ۲۰۰۳). دیابت (Maassen و همکاران, ۲۰۰۴)، تومورهای غیرتوارثی (Schon و Zanssen, ۲۰۰۵) و میوپاتی‌های قلبی و اسکلتی (Di Donato و Zeviani, ۲۰۰۴) بوده است.

شناسایی و تعیین توالی ژنومی دام‌های بومی کشور و ثبت آن‌ها در بانک جهانی ژن، اولین گام در راه تعیین میزان تنوع ژنتیکی موجود در این گونه جمعیت‌ها می‌باشد. در مرحله بعدی با مقایسه این اطلاعات با داده‌های مشابه در نژادهای پر تولید تجارتي می‌توان نشانگرهای ژنتیکی مناسبی به‌دست آورد تا به‌وسیله آن‌ها برنامه‌های اصلاح نژادی را با پیشرفت و راندمان بالاتری اجرا نمود.

در یکی از اولین مطالعات تعیین توالی در مرغ اهلی، Heyman و Weill (۱۹۹۰) ترتیب بازهای ۲ ژن tRNA^{Pro} میتوکندریایی را گزارش نمودند. Sadr و Nassiry (۲۰۱۴) با توالی‌یابی و بررسی ژن MT-NAD5 مرغ بومی خراسان، وجود ۵ جهش را در این ناحیه از ژنوم گزارش نمودند. Mohammadabadi و همکاران (۲۰۱۰) با مطالعه بر ۳ جمعیت مرغ بومی



آمینه تیروزین، tRNA^{Ser} (حامل اسیدآمینه سرین) و tRNA^{Asp} (حامل اسیدآمینه اسپارتنیک).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA: نمونه خون مرغ بومی خراسان از بانک خون گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی تهیه و تا زمان استخراج در لوله‌های خلاءدار حاوی ماده ضدانعقاد EDTA در فریزر و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA از خون کامل و با استفاده از کیت Thermo Scientific صورت گرفت. به دلیل اهمیت خلوص DNA مورد بررسی و تعیین کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان جذب نور در طول موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از ژل آگارز نیز به‌عنوان روش ارزیابی مکمل استفاده گردید. پس از انجام الکتروفورز، عدم مشاهده هاله (Smear) و نبود آلودگی‌های پروتئینی در چاهک ژل از مناسب بودن روش استخراج اطمینان حاصل شد.

طراحی آغازگر اختصاصی: طراحی آغازگر برای تکثیر قطعه مورد نظر از ژنوم میتوکندریایی براساس ژنوم کامل میتوکندری مرغ مرجع (مرغ اهلی یا Domestic chicken با شماره دسترسی X ۵۲۳۹۲/۱) انجام شد. به سبب طول ۲۰۴۹ جفت بازی قطعه مورد نظر و با در نظر گرفتن توانایی توالی‌یابی در هر بار خوانش توالی، این قسمت به دو بخش تقسیم گردید و آغازگرها با در نظر گرفتن ناحیه هم پوشان به طول ۵۵ جفت باز با استفاده از نرم‌افزار آنلاین IDT (Integrate DNA Technology) به نشانی اینترنتی <http://www.idtdna.com> طراحی شدند (جدول ۱).

خراسان میزان تنوع ژنتیکی در این جمعیت‌ها را به‌طور متوسط ۵/۲۵ آلل به‌ازا لوکوس گزارش کردند.

Mannen و همکاران (۲۰۰۳) با مطالعه در گاوهای گوشتی نشان دادند که بین خصوصیات لاشه و چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) میتوکندریایی یک همبستگی معنی‌دار وجود دارد. Zhang و همکاران (۲۰۱۰) گزارش نمودند که جایگاه ژنی MT-COX3 همبستگی معنی‌داری با خصوصیات لاشه در مرغابی نژاد بیجینگ دارد. آن‌ها نتیجه گرفتند که از چندشکلی تک نوکلئوتیدی این ژن می‌توان به‌عنوان یک نشانگر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح نژادی مرغابی استفاده نمود. در یک تحقیق دیگر که با بررسی ژنوم میتوکندریایی مرغ لگهورن سفید انجام شده بود وجود یک SNP در ژن زیرواحد ۴ کمپلکس NADH دهیدروژناز گزارش گردید که ظاهراً با مقاومت به بیماری مارک در این مرغ مرتبط می‌باشد (Li و همکاران، ۱۹۹۸). Fernandez و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که تنوع DNA میتوکندریایی رابطه بسیار معنی‌داری با خصوصیات لاشه در گاو و خوک دارد. Bao و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی ۳ نژاد از طیور وجود ۴ عدد SNP را در ژن‌های tRNA میتوکندریایی مرغ تبت گزارش نمودند. آن‌ها چنین جهش‌هایی را مرتبط به سازگاری ژنتیکی این مرغ به شرایط هیپوکسی موجود در منطقه زیستی دانستند.

هدف از این تحقیق شناسایی و تعیین توالی نوکلئوتیدی ۷ ژن tRNA میتوکندریایی در مرغ بومی خراسان و مقایسه آن با داده‌های بانک‌های اطلاعاتی و نیز شناسایی جهش‌های احتمالی در این ناحیه از ژنوم می‌باشد. این ژن‌ها به‌ترتیب عبارتند از: tRNA^{Tyr} (حامل اسیدآمینه تریپتوفان)، tRNA^{Ala} (حامل اسیدآمینه آلانین)، tRNA^{Asn} (حامل اسیدآمینه اسپارژین)، tRNA^{Cys} (حامل اسیدآمینه سیستئین)، tRNA^{Tyr} (حامل اسید

جدول ۱: توالی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعه ژنومی مورد نظر

نام پرایمر	ناحیه دسترسی	توالی پرایمر	قطعه تکثیر شده
COX1 Part A. F	۶۲۲۸-۷۳۶۷	GCGCTATCAACCACCCTATT	۱۱۶۲
COX1 Part A. R		GGAGGATGAGGATGTAACCTTCG	
COX1 Part B. F	۷۲۹۲-۸۳۵۵	CACCACATTCCTCGACCCA	۱۰۸۲
COX1 Part B. R		GGGATGAGGCGTCTTGAAA	

شرکت Jena Bioscience عبارت بودند از: آنزیم تک پلیمراز ۱ واحد، ۰/۲۵ dNtp میلی‌مولار، MgCl₂ به‌میزان ۱/۵ میلی‌مولار، آغازگر رفت و برگشت هرکدام ۱۰ پیکومول، DNA الگو ۱۰۰ نانوگرم و آب مقطر.

از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعات جفت بازی در برگرفته ناحیه ژنی میتوکندریایی مورد نظر براساس روش استاندارد استفاده شد. غلظت و اجزای واکنش در ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی براساس شرایط مندرج در کیت Taq Polymerase



شرکت MacroGen کره جنوبی ارسال گردید. خواندن توالی از دو انتها و با آغازگرهای عمومی M₁₃-R و M₁₃-F تعبیه شده در ناقل صورت گرفت. نتیجه توالی‌یابی با نرم‌افزار Bio Edit نسخه ۷ ویرایش و با حذف توالی‌های اضافی مربوط به ناقل در دو انتهای هر توالی و ادغام نواحی همپوشان، در نهایت قطعه مورد نظر جدا و مشخص گردید. سپس با استفاده از ابزار BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) و رویه blastn توالی به‌دست آمده با توالی کامل ژنوم میتوکندری مربوط به گونه مرغ اهلی (*Gallus Gallus*) در پایگاه NCBI به نشانی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> مقایسه گردید.

نتایج

استخراج DNA از نمونه خون با موفقیت انجام شد. نتایج طیف‌سنجی نشان داد DNA استخراجی از کیفیت مناسبی برخوردار است. الکتروفورز نمونه بر روی ژل آگارز ۱ درصد وجود یک باند اختصاصی بدون کشیدگی و صاف را نشان داد و این موضوع موید خلوص بالای نمونه استخراجی و عدم وجود شکستگی در DNA و نیز عاری بودن از RNA اضافی در نمونه می‌باشد (شکل ۱). این موضوع نشان می‌داد آغازگرهای اختصاصی به‌خوبی توانسته‌اند محصولات مورد نظر با طول ۱۱۶۵ و ۱۰۸۲ را تولید نموده و نیز توالی مشابهی برای جفت شدن آن‌ها در مکان‌های دیگر ژنوم وجود نداشته است. به‌علاوه وجود توالی‌های آغازگر طراحی شده در دو انتهای توالی‌های به‌دست آمده صحت کار انجام شده را ثابت می‌نمود.

در مقایسه نوکلئوتیدی توالی مربوط به جایگاه ۶۶۴۳-۶۲۸۰ (محدوده قرارگیری ۵ ژن tRNAAsn، tRNAAla، tRNATrp، tRNACys، tRNATyr) با توالی کامل ژنوم میتوکندری گونه مرغ اهلی حدود ۶۶ توالی یافت شد که از بین آن‌ها ۶۱ توالی از جمله توالی‌های ثبت شده با شماره‌های دسترسی X52392/1، DQ648776/1، GU261718/1، HQ857211/1، KF981434/1، AP03323/1 و AB086102/1 دارای ۱۰۰ درصد هم‌پوشانی بودند. همچنین ۵ توالی باقیمانده به شماره‌های دسترسی GU261719/1، GU261710/1، GU261690/1، GU261676/1 و AP03580/1 دارای ۹۹ درصد هم‌پوشانی با توالی مورد نظر بود (شکل ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در سه مرحله و مطابق برنامه دمایی و زمانی به‌شرح ذیل انجام گرفت. مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و سپس مرحله دوم شامل ۳۵ سیکل از مراحل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در ۵۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه. در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز محصول PCR، خالص‌سازی آن از ژن و

اتصال به پلاسمید: محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. به‌منظور خالص‌سازی محصول واکنش، باند مورد نظر به‌وسیله اسکالپل استریل از ژن جدا و با استفاده از کیت Gene All ساخت کشور کره استخراج و خالص گردید. به‌منظور تهیه پلاسمید نوترکیب و اتصال قطعه بازیابی شده به ناقل pTZ57R/T، طبق شرایط مندرج در کیت Thermo scientific و نیز رعایت نسبت ۱ به ۳ بین ناقل و قطعه بازیابی شده با هم مخلوط شدند. آنزیم T₄DNA Ligase موجود در واکنش سبب برقراری پیوند فسفودی استری بین قطعه بازیابی شده و ناقل شد.

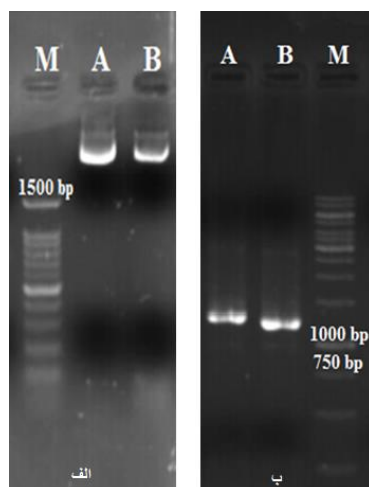
تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد، انتقال پلاسمید

نوترکیب به باکتری و غربالگری کلونی‌های نوترکیب: از کشت شبانه باکتری اشیریشیاکولای سویه DH5 α به‌منظور تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد استفاده شد. از روش شوک حرارتی جهت انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری‌ها استفاده شد. در مرحله بعد کشت باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین به‌مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. برای شناسایی کلونی‌های حاوی پلاسمید دارای قطعات ژنوم مورد نظر، از روش PCR کلونی‌های مقاوم استفاده شد.

استخراج پلاسمید، PCR پلاسمیدهای استخراج شده

و تعیین توالی قطعات تکثیر شده: پس از کشت شبانه مایع حاوی آمپی‌سیلین با استفاده از کیت Gene All استخراج پلاسمید از کلونی انجام شد (Sambrook و همکاران، ۲۰۰۳). پس از استخراج و به‌منظور تأیید وجود قطعه مورد نظر در پلاسمید، غلظت پلاسمیدهای استخراجی با دستگاه نانودراپ به نسبت ۱:۲۰ رقیق شده و به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز قرار گرفتند. غلظت مواد مورد استفاده، شرایط دمایی واکنش و الکتروفورز محصول واکنش مطابق روش قبل بود. پلاسمید استخراج شده به‌منظور تعیین توالی با آغازگرهای رفت و برگشت M₁₃ به





شکل ۲: الف - الکتروفورز پلاسمید استخراج شده هر دو قطعه A و B - LADDER 100BP-
 ب - الکتروفورز محصول PCR، A قطعه ۱۱۶۵ و B قطعه ۱۰۸۲ جفت بازی- LADDER 1KB

(M) سایز مارکر -

AY۲۳۵۵۷۱/۱، AP۰۰۳۳۱۹/۱، GU۲۶۱۷۱۳/۱، HQ۸۵۷۲۱۲/۱،
 X۵۲۳۹۲/۱ و GU۲۶۱۷۱۹/۱، KF۹۸۱۴۳۴/۱ دارای ۱۰۰ درصد
 هم پوشانی و ۸ توالی نیز ۹۹ درصد هم پوشانی با توالی مورد نظر
 داشتند (شکل ۳).

در مقایسه قطعه مورد نظر در جایگاه ۸۱۸۴-۸۳۲۹
 (محدوده فرارگیری دو ژن tRNA^{Asp} و tRNA^{Ser}) با توالی گونه
 مرغ اهلی حدود ۷۰ توالی یافت شده که از بین آن‌ها ۶۲ توالی
 و از جمله توالی‌های ثبت شده با شماره دسترسی KF۹۵۴۷۲۷/۱

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	KM096864.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	KJ778617.1
Gallus gallus breed Taoyuan mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	KF981434.1
Gallus gallus breed Huang Lang chicken mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	KF954727.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	KF939304.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	KF826490.1
Gallus gallus isolate yin46 mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	HQ857212.1
Gallus gallus isolate yin125 mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	HQ857211.1
Gallus gallus isolate yin109 mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	HQ857210.1
Gallus gallus isolate yin100 mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	HQ857209.1
Gallus gallus isolate YP20123 breed Chigulu mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	GU261717.1
Gallus gallus spadiceus isolate YP19903 breed Red jungle fowl mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	GU261716.1
Gallus gallus isolate YP20112 breed Chigulu mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	GU261715.1
Gallus gallus isolate J37 breed Jiangbian mitochondrion, complete genome	771	771	100%	0.0	100%	GU261714.1

شکل ۲: نتیجه هم ترازوی توالی قطعه با توالی دیگر نژادهای مرغ در جایگاه ۶۶۴۳ - ۶۲۸۰

شماره جایگاه نوکلئوتیدی ژن‌های tRNA و نوکلئوتیدهای
 بینابینی ژن‌های tRNA در ژنوم مرغ مرجع و ژنوم مرغ بومی
 خراسان در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

طراحی درخت فیلوژنی توالی‌های حاصل با توالی مرجع و
 سایر توالی‌های موجود در بانک پایگاه ژن نیز گزارش‌های ارائه
 شده و شباهت بالای ژن‌های tRNA در مرغ بومی خراسان را با
 توالی‌های ثبت شده در بانک ژن تأیید نمود. ترتیب و



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	KM096864.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	KJ778617.1
Gallus gallus breed Taoyuan mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	KF981434.1
Gallus gallus breed Huang Lang chicken mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	KF954727.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	KF939304.1
Gallus gallus mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	KF826490.1
Gallus gallus isolate yin46 mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	HQ857212.1
Gallus gallus isolate yin125 mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	HQ857211.1
Gallus gallus isolate yin109 mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	HQ857210.1
Gallus gallus isolate yin100 mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	HQ857209.1
Gallus gallus isolate YP20092 breed Chigulu mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	GU261719.1
Gallus gallus isolate YP20123 breed Chigulu mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	GU261717.1
Gallus gallus isolate YP20112 breed Chigulu mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	GU261715.1
Gallus gallus isolate J37 breed Jiangbian mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	GU261714.1
Gallus oallus isolate J41 breed Jianbian mitochondrion, complete genome	270	270	100%	1e-71	100%	GU261713.1

شکل ۳: نتیجه هم‌ترازی توالی قطعه با توالی دیگر نژادهای مرغ در جایگاه ۸۳۲۹ - ۸۱۸۴

جدول ۲: ترتیب و شماره جایگاه نوکلئوتیدی ژن‌های tRNA و نوکلئوتیدهای بینابینی

اسید آمینه حمل شونده	tRNA	جایگاه نوکلئوتیدی	نوکلئوتیدهای بینابینی با ژن بعدی tRNA	
			مرغ بومی خراسان	مرغ مرجع
تریپتوفان	Trp	۶۳۵۵ - ۶۲۸۰	CCCAAC	
آلانین	Ala	۶۴۳۰ - ۶۳۶۲	TAC	
آسپارژین	Asn	۶۵۰۶ - ۶۴۳۴	AC	
سیستئین	Cys	۶۵۷۳ - ۶۵۰۸	-	
تیروزین	Tyr	۶۶۴۳ - ۶۵۷۳	*	
سرین	Ser	۸۲۵۸ - ۸۱۸۴	AT	
اسید آسپارتیک	Asp	۸۳۲۹ - ۸۲۶۱	**	

COX I ژن: **، COX II ژن: ***

نوکلئوتید همپوشانی داشته و این نوکلئوتید هم به‌عنوان باز خاتمه دهنده ژن tRNA^{Tyr} و هم باز ۵' مربوط به ژن tRNA^{Cys} عمل می‌نماید (Pääbo و Yokobori، ۱۹۹۷). نتایج این مطالعه نیز وجود چنین هم‌پوشانی را ما بین این دو ژن میتوکندریایی نشان داد (جدول ۲).

در تحقیقی که با استفاده از مرغ لگهورن سفید و پلیموت راک سفید به‌عنوان نژادهای غالب انجام شده بود ۹۹/۹۶ درصد شباهت توالی در ژنوم میتوکندری این دو نژاد گزارش شد (Nishibori و همکاران، ۲۰۰۳). چنین نتیجه‌ای در توافق و نزدیک به نتیجه این مطالعه می‌باشد.

ترتیب ژن‌های tRNA موجود در این قطعه توالی‌یابی

بحث

در ژنوم میتوکندری اغلب مهره‌داران به‌استثنا طیور یک ناحیه به نام مبدا همانندسازی (A replication origin) بین ژن‌های tRNA^{Cys} و tRNA^{Asn} وجود دارد که یک توالی بسیار محافظت شده می‌باشد و دارای کم‌ترین میزان تغییرات نوکلئوتیدی است. نتایج این مطالعه نشان داد در توالی ما بین این دو ژن فقط ۲ نوکلئوتید تکی A و C وجود دارد (جدول ۲) و همانند سایر طیور این فاصله فاقد ناحیه مبدا همانندسازی می‌باشد.

در ژنوم میتوکندریایی طیور ژن tRNA^{Tyr} با ژن پایین دست tRNA^{Cys} که در یک رشته قرار گرفته‌اند به اندازه یک



3. Desjardins, P. and Morais, R., 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 212, No. 4, pp: 599-634.
4. Desjardins, P. and Morais, R., 1991. Nucleotide sequence and evolution of coding and noncoding regions of a quail mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 32, No. 2, pp: 153-161.
5. Fernández, A.; Alves, E.; De Pedro, E.; López-García, M.; Ovilo, C.; Rodríguez, M. and Silió, L., 2008. Mitochondrial genome polymorphisms associated with longissimus muscle composition in Iberian pigs. *Journal of animal science*. Vol. 86, No. 6, pp: 1283-1290.
6. Florentz, C., 2002. Molecular investigations on tRNAs involved in human mitochondrial disorders. *Bioscience reports*. Vol. 22, pp: 81-98.
7. Kumazawa, Y. and Nishida, M., 1993. Sequence evolution of mitochondrial tRNA genes and deep-branch animal phylogenetics. *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 37, No. 4, pp: 380-398.
8. Levinger, L.; Mörl, M. and Florentz, C., 2004. Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic acids research*. Vol. 32, No. 18, pp: 5430-5441.
9. Li, S.; Aggrey, S.E.; Zadworny, D.; Fairfull, W. and Kuhnlein, U., 1998. Evidence for a genetic variation in the mitochondrial genome affecting traits in White Leghorn chickens. *Journal of Heredity*. Vol. 89, No. 3, pp: 222-226.
10. Maassen, J.A.; MtHart, L.; Van Essen, E.; Heine, R.J.; Nijpels, G.; Tafrechi, R.S.J.; Raap, A.K.; Janssen, G.M. and Lemkes, H.H., 2004. Mitochondrial diabetes. *Molecular mechanisms and clinical presentation*. *Diabetes*. Vol. 53, No. suppl. 1, pp: S103-S109.
11. Mannen, H.; Morimoto, M.; Oyama, K.; Mukai, F. and Tsuji, S., 2003. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. *Journal of animal science*. Vol. 81, No. 1, pp: 68-73.
12. Mohammadabadi, M.R.; Nikbakhti, M.; Mirzaee, H.R.; Shandi, M.A.; Saghii, D.A.; Romanov, M.N. and Moiseyeva, I.G., 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. *Genetika*. Vol. 46, No. 4, pp: 57-62.
13. Nishibori, M.; Hanazono, M.; Yamamoto, Y.; Tsudzuki, M. and Yasue, H., 2003. Complete nucleotide sequence of mitochondrial DNA in White Leghorn and White Plymouth Rock chickens. *Animal Science Journal*. Vol. 74, No. 5, pp: 437-439.
14. Sadr, A.S. and Nassiri, M.R., 2014. Characterization and sequencing of MT ND5 gene in native Khorasan poultry. *Online Journal of Veterinary Research*. Vol. 18, No. 6, pp: 489-494.
15. Sambrook, J.G.; Campbell, R.D. and Elgar, G., 2003. Characterisation of a gene cluster in *Fugu rubripes* containing the complement component C4 gene. *Gene*. Vol. 312, pp: 73-83.
16. Söll, D. and RajBhandary, U.L., 1995. tRNA: structure, biosynthesis and function. *Zondervan*. ASM Press, 1th Edition. 572 p.
17. Sprinzl, M.; Horn, C.; Brown, M.; Ioudovitch, A. and Steinberg, S., 1998. Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic acids research*. Vol. 26, No. 1, pp: 148-153.

شده، درست مشابه ترتیب این ژن‌ها در توالی ژنومی میتوکندری مرغ مرجع و دیگر نژادهای گونه مرغ اهلی و به صورت tRNA^{Tyr}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Ala}, tRNA^{Tyr} ژن COX1، tRNA^{Ser} و tRNA^{Asp} و ژن COX2 بود. در مقایسه توالی قطعات تولید شده با توالی مشابه آن در مرغ مرجع، هیچ‌گونه جهش نوکلئوتیدی مشاهده نشد و حتی نوکلئوتیدهای بینابین ژن‌های tRNAهای این ناحیه از ژنوم مرغ بومی خراسان نیز عیناً مشابه مرغ مرجع بود (جدول ۲).

بنابراین و با توجه به شباهت ۱۰۰ درصدی این دو توالی می‌توان نتیجه گرفت ژن‌های این ناحیه از ژنوم مرغ بومی خراسان و مرغ مرجع از نظر کارکرد مشابه یکدیگر می‌باشند. با توجه به مطالب فوق به نظر می‌رسد در حیوانات پرورشی و از جمله طیور، عملیات اصلاح نژادی که در طی سالیان متمادی اعمال شده و فرایندهای طبیعی و یا مصنوعی نظیر به‌گزینی حیوانات برتر و حذف حیوانات ناکار، موجب شده است فراوانی ژن‌هایی که اثر سوء بر شایستگی (Fitness) و عملکرد تولیدی حیوان داشته‌اند کاهش یابد و به‌همین دلیل و برخلاف جوامع انسانی در حیوانات پرورشی امروزی چنین جهش‌هایی را به‌ندرت بتوان مشاهده نمود. در حالی‌که جهش‌هایی که منجر به افزایش شایستگی و عملکرد تولیدی شوند در جمعیت‌ها حفظ شده و ماندگار می‌گردند. در نتیجه چنین فرایندهایی است که نژادهای بومی توانسته‌اند در طول زمان بر تمامی شرایط نامساعد محیطی غلبه یافته و با مقاومت نسبی در مقابل بیماری‌های موجود در منطقه به حیات خویش ادامه داده و سازگاری یابند.

تشکر و قدردانی

از دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی و پردیس بین‌الملل دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Bao, H.; Zhao, C.; Li, J. and Wu, C., 2008. Sequencing and alignment of mitochondrial genomes of Tibetan chicken and two lowland chicken breeds. *Science in China Series C: Life Sciences*. Vol 51, No 1, pp: 47-51.
2. Chinnery, P.F. and Schon, E.A., 2003. Mitochondria. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. Vol. 74, No. 9, pp: 1188-1199.



18. Suzuki, T.; Nagao, A. and Suzuki, T., 2011. Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet.* Vol. 45, pp: 299-329.
19. Troen, B.R., 2003. The biology of aging. *Mount Sinai Journal of Medicine.* Vol. 70, No. 1, pp: 3-22.
20. Weill, D. and Heyman T., 1990. Nucleotide sequence of two proline tRNA (AGG and CGG) genes from chicken. *Nucleic Acids Res.* Vol. 18, No. 20, pp: 6134.
21. Wolstenholme, D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int Rev Cytol.* Vol. 141, pp: 173-216.
22. Yokobori, S.I. and Pääbo, S., 1997. Polyadenylation creates the discriminator nucleotide of chicken mitochondrial tRNA^{Tyr}. *Journal of Molecular Biology.* Vol. 265, No. 2, pp: 95-99.
23. Zachary, J.F. and McGavin, M.D., 2012. *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* Elsevier Health Sciences. 5th Edition. 1344 p.
24. Zanssen, S. and Schon, E.A., 2005. Mitochondrial DNA mutations in cancer. *PLoS medicine.* Vol. 2, No. 11, p: 1082.
25. Zeviani, M. and Di Donato, S., 2004. Mitochondrial disorders. *Brain.* Vol. 127, No. 10, pp: 2153-2172.
26. Zhang, C.; Wang, Y.; Xie, M.; Chen, M.; Wang, X. and Hou, S., 2010. Mitochondrial Coding Gene Polymorphisms Associated with Carcass Traits in Beijing Duck. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* Vol. 9, No. 19, pp: 2522-2525.

