

تجزیه فیلوژنی و تکاملی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در شترهای منطقه سیستان و بلوچستان

مجتبی پیری^۱ - غلامرضا داشاب^{۲*} - بتول اصغری^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

مطالعه بر روی حیوانات بومی می‌تواند به حفظ ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، پیاده نمودن برنامه‌های اصلاح نژادی و به‌دست آوردن اطلاعات در مورد ساختار ژنتیکی آن‌ها کمک کند. هدف از مطالعه حاضر بررسی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن لپتین در شتر بومی استان سیستان و بلوچستان و مطالعات فیلوژنتیکی و مولکولی آن با سایر گونه‌های پستانداران بود. در این مطالعه نمونه‌های خون از ۵۰ نفر شتر از سیاهرگ گردنی از دو گله واقع در زابل و منطقه دلگان بلوچستان گرفته شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل و تکثیر ناحیه اینترون دوم و اگزون سوم با طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت بازی جایگاه ژن لپتین با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی صورت گرفت و محصول تکثیر شده با آنزیم برشی *AsuHpi* به دو قطعه ۱۴۰۰ و ۶۰۰ جفت بازی شکسته شده و در نهایت قطعات مذکور از روی ژل استخراج و تعیین توالی شدند. پس از برهم گذاری توالی قطعات مذکور یک قطعه ۱۹۴۰ جفت بازی با کمترین خطا جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی به‌دست آمد. همچنین، توالی نوکلئوتیدی ژن لپتین در سایر گونه‌های پستانداران با استفاده از ابزار BLAST در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم حاصل شد. نتایج هم‌ترازی توالی‌های دو جمعیت مورد استفاده در منطقه زابل و بلوچستان تشابه ۹۹ درصد را نشان داد، اما تفرق متمایز از سایر گونه‌های پستانداران داشت. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی نوکلئوتیدی ژن لپتین بیانگر نسبت جایگزینی dn/ds برابر ۰/۷۶ در بین گونه‌های مختلف بود که نشان دهنده انتخاب خالص در طی تکامل این ژن است. نتایج درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی نوکلئوتیدی نشان‌دهنده مسیرهای تکاملی مختلف ژن لپتین در گونه‌های مختلف، شامل هفت دسته از گونه‌ها شتر، (گاو، بوفالو و گاو میش)، (گوسفند و بز)، خوک، خفاش، گربه و پستانداران دریایی بود که شتر، گاو و پستانداران دریایی بیشترین قرابت را داشتند. با توجه به تنوع بسیار بالا در قطعه مورد مطالعه توالی جایگاه ژن لپتین و شاخص تکامل محاسبه شده به نظر می‌رسد اهلی شدن دام‌ها و انتخاب در صفات تولیدی شیر منجر به تغییراتی در توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین و تغییر نقش بیولوژیکی آن شده است.

واژه‌های کلیدی: انتخاب طبیعی، روند تکاملی، شتر بومی، فیلوژنی، لپتین

مقدمه

بزرگی به نام ژن ob رمزگذاری می‌گردد (۲۲). لپتین در ابتدا به‌عنوان فاکتور چاقی توصیف شده است (۸). وقتی که ذخایر چربی افزایش می‌یابد، لپتین روی سیستم نوروپپتیدی هیپوتالاموس تأثیر گذاشته و سبب کاهش اشتها و سپس افزایش مصرف انرژی می‌شود (۴). همچنین، یک فاکتور کلیدی مهم برای شروع رسیدن به بلوغ نیز است (۵). فعالیت‌های لپتین به هر دو صورت کوتاه و بلندمدت اتفاق می‌افتد. در کوتاه‌مدت لپتین پلازما به‌عنوان یک سیگنال سیری عمل می‌کند، اما در بلندمدت میانگین غلظت لپتین پلازما جهت تأمین انرژی مغز ضروری است (۱، ۵ و ۷).

فیلوژنی مولکولی از اطلاعات توالی‌های مولکولی برای احیا کردن روابط تکاملی بین گونه‌های مختلف و برآورد زمان واگرایی ارگانسیم‌ها استفاده می‌شود (۱۹ و ۲۱). روابط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و موجودات

لپتین برای اولین بار در بافت چربی موش‌های چاق کشف شد (۲۲). در پستانداران، این پپتید عمدتاً در بافت چربی تولید می‌شود. بررسی‌های اخیر با استفاده از روش RT-PCR نشان داده‌اند که نسخه‌های رونویسی لپتین (mRNA) در جفت (۹، ۱۴ و ۱۷)، معده (۳ و ۱۹) و مغز (۱۰، ۱۶) جوندگان و انسان نیز وجود دارند. لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتون (با ۱۶۷ اسید آمینه) می‌باشد و توسط ژن

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی، دانشگاه زابل

۲- استادیار علوم دامی، دانشگاه زابل

۳- دانشجوی دکتری علوم دامی، دانشگاه زابل

(Email: dashab@uoz.ac.ir)

* نویسنده مسئول:

می‌شوند. با اجرای مراحل فوق در تحقیق حاضر می‌توان به شناخت کافی از ساختار ژنی لپتین دست یافته و از آنها در مطالعات تکمیلی جهت دستیابی به آلل‌های ویژه برای بهبود صفات تولیدی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها، استخراج DNA و تعیین کیفیت: در

مطالعه حاضر، تعداد ۵۰ نفر شتر از دو گله زابل (۲۵ نفر) و منطقه دلگان بلوچستان (۲۵ نفر) مورد مطالعه قرار گرفت. انتخاب دام‌ها به‌طور تصادفی و با ترکیب جنسی نر و ماده بودند. استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن انجام گرفت. به منظور اطمینان از صحت انجام استخراج DNA، میزان ۵ میکرولیتر از نمونه‌های حاوی DNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

تعیین توالی محصولات تکثیر شده: در مطالعه حاضر ناحیه

اینترون دوم و آگزون سوم با طول تقریبی ۲۰۰۰ جفت بازی جایگاه ژن لپتین، با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر شد. پرایمرهای رفت و برگشت با نرم‌افزار Primer premier (۱۸) بر اساس توالی‌های ثبت شده جایگاه ژن لپتین برای گاو در بانک ژنی NCBI طراحی شد و توسط شرکت سیناژن سنتز گردید.

Forward primer 5-TCGTCACCAGGATCAACGAC-3
Reverse primer 5-AGGAAGCCAACAGGTGGAGA-3

با توجه به بلند بودن قطعه و عدم امکان خوانش صحیح نوکلئوتیدها در قطعات بزرگتر از ۱۰۰۰ جفت باز، محصول تکثیر در معرض هضم آنزیمی با *Asuhipi* قرار گرفت و محصولات هضم آنزیمی از روی ژل آگارز تخلیص شدند. سپس جهت تعیین توالی به شرکت بایونیر کره (Bioner Co.) ارسال گردید.

شناسایی و ویرایش توالی‌های ژنی لپتین: توالی نوکلئوتیدی

ژن لپتین با استفاده از ابزار BLAST در بانک‌های اطلاعاتی ژنوم، برای سایر گونه‌های مورد نظر نیز به‌دست آمد (جدول ۱). جهت مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های ژنتیکی ابتدا توالی ژنی لپتین در شتر بومی استان سیستان و بلوچستان با توالی سایر گونه‌ها با استفاده از روش Clustal W هم‌تراز شدند. سپس تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی مشابه یا غیرمشابه اتفاق افتاده با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (۲۰) و روش حداکثر درستنمایی برای به‌دست آوردن میزان جانمایی به جایگزینی نوکلئوتیدها در بازهای پورینی و پیریمیدینی استفاده شد. تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، درصد تفرق ژنی و همچنین تنوع آنها با استفاده از نرم‌افزار Dnaspv5 (۱۳) محاسبه گردید.

را می‌توان با یک درخت فیلوژنتیک شرح داد که قابل مقایسه با شجره‌نامه‌ای است که ژن‌ها یا موجودات بسیار شبیه را نشان می‌دهد. به همان اندازه که توالی DNA بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند، الگوهای تغییرات نوکلئوتیدی مورد استفاده برای ایجاد درختان فیلوژنتیک پیچیده‌تر می‌شود که به خاطر تعداد عوامل دخیل در جایگزینی‌هاست. تکامل، پیامد دگرگونی در فراوانی آلل‌هاست نظر به این که برخی آلل‌ها در طول زمان از دست می‌روند و فراوانی سایر آلل‌ها تا صددرصد افزایش می‌یابد، باعث می‌شود تا 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 (۱۷).

به خوبی مشخص شده است که نیروهای متعدد تکاملی بر توالی‌های DNA عمل می‌کند و باعث می‌شود توالی یک ژن در ظرف مدتی نه چندان طولانی دگرگون شود. بنابراین، هر دو توالی که از یک جد مشترک مستقلاً تکامل می‌یابند، سرانجام از یکدیگر دور می‌شوند. اندازه‌ی این واگرایی، فاصله ژنتیکی نامیده می‌شود (۱۷). بر اساس نظریه‌ای که برای نرخ تکاملی پروتئین‌ها ارائه شده است، به نظر می‌رسد که فاصله ژنتیکی دو توالی رمزکننده پروتئین یکسان، اما جدا شده از گونه‌های مختلف، با زمان انشعاب دو گونه به‌طور خطی نسبت داشته باشد. به علت این که ممکن است پروتئین‌های متفاوت رفتار مشابهی نشان دهند، فرض می‌شود که نرخ تکاملی برای هر پروتئین معین در طول زمان ثابت باشد. این پیشنهاد اشاره به وجود یک نوع ساعت مولکولی دارد. فرضیه ساعت مولکولی پیشنهاد می‌کند که نرخ جایگزینی برای هر پروتئین ثابت است. همچنین، اختلافات در توالی یک ژن برای دو ارگانیزم باید فاصله تکاملی آنها را منعکس کند (۱۷).

حیوانات بومی به‌عنوان سرمایه ملی و ذخایر استراتژیک هر کشور محسوب می‌شوند که حفظ و تکثیر آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این موجودات بعد از هزاران نسل انتخاب طبیعی و مصنوعی و نیز گذر از موانع بسیار و یا غلبه بر تمامی شرایط نامساعد محیطی هم‌چنان به حیات خود ادامه داده و به تکثیر و ازدیاد نسل پرداخته‌اند و هم‌چنین به بسیاری از محدودیت‌های محیطی سازگاری پیدا کرده‌اند (۱۵). از طرف دیگر منابع حیوانی برای تأمین خوراک و پایداری اقتصادی-اجتماعی و محیطی کشور ضروری هستند. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر تعیین توالی ژن لپتین در شتر بومی استان سیستان و بلوچستان و همچنین تعیین روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن لپتین و نحوه انتخاب در طول تکامل است. ابتدا درخت فیلوژنتیک برای توالی‌های لپتین که در بانک اطلاعاتی قابل دسترس هستند ترسیم می‌گردد. همچنین، با استفاده از این توالی‌ها، میزان، مسیر و محل‌های حساس به تغییرات در طول تکامل شناسایی

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

Table 1- Species, Scientific name, length and accession number of Leptin gene used in the analysis of phylogenetic and evolutionary

گونه‌های مورد بررسی Species (Scientific name)	شماره دستیابی بانک ژن Accession number	اندازه ژن (جفت باز) Length gene (bp)
Baluchi-camel (شتر)	-	1940
Lama glama (شتر لاما)	KC295539.1	2683
Delphinapterus leucas (دلفین)	AF296671.1	1802
Delphinapterus leucas (دلفین)	JN833619.1	2020
Myotis pilosus (خفاش)	GU230846.1	2046
Bubalus bubalis (یوفالو)	NM 001290901.1	504
Bos Taurus (گاو اهلی)	AJ512638.1	581
Zalophus californianus (شیر دریایی)	AM157372.2	592
Halichoerus grypus (خوک آبی)	AJ618982.1	759
Phoca vitulina (خوک آبی)	AJ618981.1	757
Bos Taurus (گاو اهلی)	AM266811.1	467
Bos Taurus (گاو اهلی)	AM266809.1	467
Bos Taurus (گاو اهلی)	AM266810.1	467
Bos Taurus (گاو اهلی)	AB003143.1	441
Macaca mulatta (میمون)	NM 001042755.1	773
Xenopus laevis (قورباغه)	NM 001095714.1	1065
Columba livia (کبوتر)	HG797022.1	608
Bos Taurus (گاو اهلی)	XM 010804453.2	3003
Bos Taurus (گاو اهلی)	NM 173928.2	2930
Ovis aries (گوسفند)	XM 004008038.3	3004
Ovis aries musimon (گوسفند)	XM 012131507.2	3006
Capra hircus (بز)	XM 018046968.1	3004
Ovis aries (گوسفند)	XM 012177090.2	3001
Ovis aries musimon (گوسفند)	XM 012131508.2	3003
Ovis aries (گوسفند)	U84247.1	441
Capra hircus (بز)	EF583947.1	441
Capra hircus breed Huanghuai (بز)	EU158187.1	444
Ovis aries (گوسفند)	FR688115.1	425
Sus scrofa (خوک)	U63540.1	541
Sus scrofa obese (خوک)	GQ268935.1	522
Sus scrofa breed Tibetan pig (خوک)	GQ240885.1	504
Sus scrofa Banna minipigs inbred (خوک)	HM194604.1	504
Sus scrofa lean (خوک)	GQ268936.1	513
Equus Ceballos (اسب)	NM 001163980.1	2935
Felis catus (گربه)	XM 006929352.2	500
Felis catus (گربه)	NM 001009850.1	2935
Felis catus (گربه)	XM 006929352.2	500
Felis catus (گربه)	XM 006929350.2	500

روند انتخاب در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد (۱۹). مقادیر d_S و d_N به ترتیب با استفاده از روابط ۲ و ۳ قابل محاسبه هستند.

$$d_N = -3/4 \ln(1 - 4/3P_N) \quad \text{رابطه (۲)}$$

$$d_S = -3/4 \ln(1 - 4/3P_S) \quad \text{رابطه (۳)}$$

در این روابط P_N نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی نامشابه و P_S نیز نسبت جایگاه‌های دارای جایگزینی مشابه می‌باشند. بنابراین، با استفاده از مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) روند انتخاب برای ژن لپتین محاسبه گردید. معنی‌دار بودن مقدار عددی d_N/d_S با آزمون فیشر در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار آنلاین HIV_SNAP v2.1.1 (۱۱) محاسبه شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از نمونه‌های خون شتر مورد مطالعه (زابل و منطقه دلگان بلوچستان) و تکثیر ناحیه مورد مطالعه با موفقیت انجام شد و نتایج الکتروفورز محصولات استخراج، تکثیر ژن و هضم آنزیمی بر روی ژل آگارز نشان از کیفیت مطلوب آنها دارد (شکل ۱).

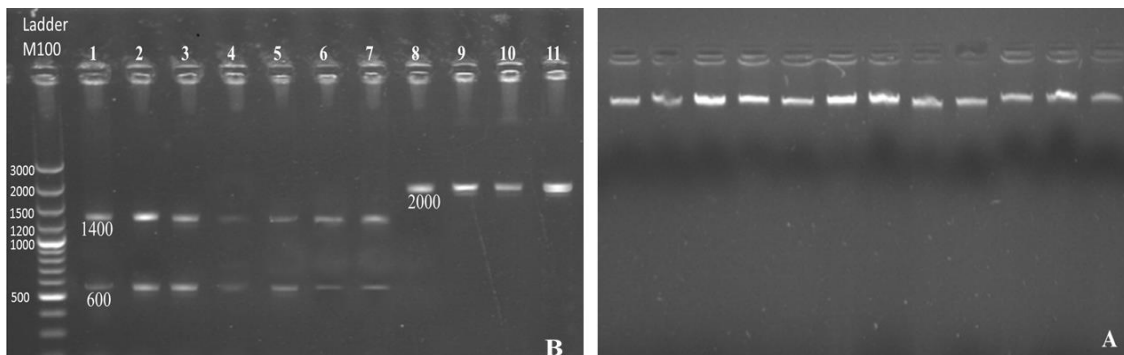
فیلوژنی و تعیین مسیر تکاملی: به منظور ترسیم درخت

فیلوژنتیک، از توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن لپتین برای گونه‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 (۲۰) استفاده شد. 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 بیان‌کننده شباهت بالای دو شاخه باشد را انتخاب نموده و در یک انشعاب از درخت فیلوژنی به کار می‌برد. مقادیر Bootstrapping به وسیله ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند. ترسیم درخت فیلوژنی بوسیله روش NJ با استفاده از رابطه ۱ انجام شد.

$$Q(i, j) = (r - 2)d(i, j) - \sum d(i, k) - \sum d(j, k) \quad \text{رابطه (۱)}$$

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

بررسی تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص



شکل ۱- A: کیفیت DNA استخراج شده از خون کامل شتر با استفاده از کیت سیناژن در شتر استان سیستان و بلوچستان؛ **B:** الکتروفورز محصولات PCR (شماره‌های ۸ تا ۱۱) و محصولات هضم آنزیمی (شماره‌های ۱ تا ۷) جایگاه ژنی لپتین بر روی ژل آگارز ۲ درصد و راهک M100، اندازه نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی DNA (Gene Ruler ladder, Fermentas)

Figure 1- A: Quality DNA extracted from whole blood using Cinna gene kit in camel of Sistan and Baluchistan Province; **B:** The electrophoresis of 2% agarose gel of PCR product (from 8 to 11) and products of endonuclease digestion enzyme (from 1 to 7) of Leptin gene and M100 Ladder, Marker size of 100bp (Gene Ruler 100 bp) DNA ladder, Fermentas.

ژن لپتین در شتر بلوچی با سایر توالی‌های به دست آمده از بانک اطلاعات ژنوم (NCBI) با ابزار Alignment نرم‌افزار MEGA6 و روش Clustal W همتراز شدند.

کانتینگ توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین (۱۹۴۰ جفت بازی) در شتر بلوچی استان سیستان و بلوچستان مطابق با شکل ۲ است. اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در پستانداران و سایر گونه‌های اهلی در جدول ۱ آورده شده است. توالی‌های جایگاه

```

AGTACTCTCC ACCTGTTGCG CTTCTCTAG GCGAGCCGGG TCTCTGAGGT CGGCTGAGGC
CGTGCAACCA TACAAGGTGC TGTCAGTGGA ATCGATGCC TCCCACGTGT CCACGTATCC
TACAACCTGCC TCTGCTCTCC CCTCCCCACA GCCCCACTC CTTTCTCCCT CTTCTGCCCT
GACTGGAATC CTAGTGCCAA GGACCAGAAG GAGACGTAAA GGTCTGTGT TCCCTGGGGA
AGTGACCAGA CCCCCAGGA GCATCTCCAC TGGGTCTTCA TCCCATCTCT AAAACGTGCT
AATCATGGG CATTCTCGT GGTGGAGCT GAACCTGAC CCCATGAAGC TTTCATGAC
CACTAGGTCT GCCTGTCAGG CCGCATAGAA AAAAATCTGT CTTCTTTTAC ATACAGCCCT
CTATGTACTT GCAAACAGCT GTCAATGTCC CCTGAGTCTT TTCTGTGGGG ACCACTTCCC
AGATGAGGTC TGTACTTAGA ATTAGGAAGA CTAAGTGTGA ATCCTCACCC TTCTGTTCTC
TGTCTGTAAG ATCTTTTTTT TTCCAACAAT GAAAGTTTTT TTTTAAACT TTGTTTTGGG
GGGGGAGGCA AGGGAGGTAA TTAGGTTTAT TTATTTTTAA AGGAGGTAAT AGGGATTCTA
AATCCCACAG AGCCTCATT ATGGCAAAGC ATTGCGCTCA AGGCTCTTTG AGCTATAACC
TCCACACTCT GCCCGAATA TCCTAAACCA GTTAAAGTTC CTTAATTTCT TTAATTTCTG
GTTTCTCCC TCTAGGTAAG GGGACATACC TAATAGTCTC TACCAAGTCC GTAATGAGAA
TCAATCAAGA TAAAGCATGG GGACCCATCG CCCCCATAA TACACCCTG CGAGAACCAG
ACAAGAGTG CGAGACTACT TCAAAGGTTT CAGATGTGAC TTAGATATC CCCAGCCTA
AAGTTTACTT ATTGACCTGC GATTGAGCAA TCGGGAGAGC TTCATCTCCT GGGCCACTGG
GCATTCTCGA ACGTGGGCCG GTTTGTTGCG ATTGCTCGGG GAGAAGTTCG GTGGCTGGAA
GCTGGGACAG TTCAGAATCA GATGGAGTCT TGGGCATTTC ATAGAGAAAA ATCTGTATGT
CTCCTTACTT TCAAAATAGT CATTGACAA GCTGCACATG ATGGATCCAG AGTGTGCCAA
CCTGTGTTGT GCAGGGAGTG CTGTGGGCTG GGGGCAGGGG GAGAGTCTCT CTTGTTGACC
GAGTTATTAG AGCAGAGGAG TGAGGTGGGG CATCGCTGGG GGTATGGTCT TGATCTTTAA
GGGGGTGGGA TTTCATGGAG AACCTGACTG GAGGAAGGAG TCTGCTCAGG GAGGAAGGGA
ATGAGAATCA CTGGGAATGG GGACCTTATG GAGGACCTCA ATGGCTGGGA AGAGGCTCAA
CTTAGTAAGA AGTAGGGATT CATGGCTGGT TCTATAGCAG AGGCATCTGG AGAAGGGAAC
AACTGCAAAA GGAGGGTCTA AAGTGGTGGG CAGGGTGGTT TGGGAAGGGG AGGAAGACAG
AAGTCCAGGA GACAAACCCG CAGGTTGGC AGCCACTGG GCACAAGAAG TAAGGGCTTA
GGCAGGATGA TGTGGAAGGG AGAAAGGAGG TACCAAAGGA ACAAACCTCC ATGCTTGTGG
GAAAGGCCAG GGTTCGAGA GCTGACATCT CCCCCTGTA GCAGTTGCTC TCCCCTCCT
CCTGCACAGC AGTTGGTTTC TTCCAAGCAG AGGGTCACTG GTTTGACTTC ATCCATGGGC
TCCACCCTT TTGACTTFA TGCAAGATGG ACCAGACCAG GTTGATCTAC GCATCAGACA
CCACCAGTTT TCGTACCAG GATCAACGAC AGTCCTATAC GGACTAGATC CCACAGAGCC
TCATC

```

شکل ۲- کانتینگ توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در شتر بلوچی استان سیستان و بلوچستان

Figure 2- The contig of nucleotide sequences of Leptin gene in Baluchi camel in Sistan and Baluchistan province

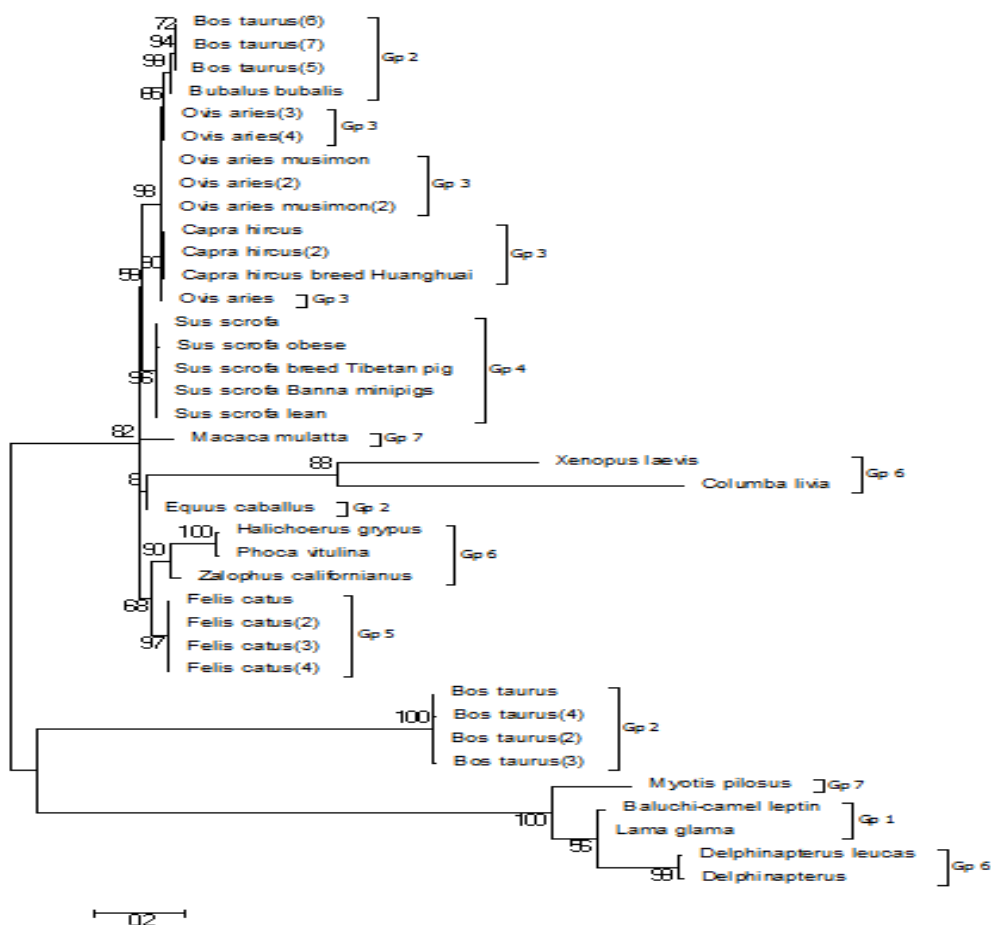
مناطق خشک و گرمسیری پرورش می‌یابند و تغییرات تکاملی به نحوی سوق پیدا کرده است تا بتوانند با محیط سازگار و نقش بیولوژیک خود که تنظیم هموستازی انرژی است را داشته باشند. همچنین، تشابه زیادی در جایگاه ژن لپتین در بین گونه‌های گاو و بوفالو مشاهده گردید. در گروه ششم که متعلق به پستانداران دریایی است، تقسیم‌بندی زیر شاخه‌ای صورت گرفته است، به طوری که قرابت ژنی بین گونه‌های دلفین و همچنین بین گونه‌های خوک آبی، بالا بودند. قرابت ژنی درون گروهی برای سایر گروه‌ها نیز بالا هستند. محققین قرابت ژنی بالای درون گونه‌های گاو و بوفالو و همچنین گوسفند و بز گزارش کرده‌اند (۲). همچنین، نتایج این تحقیق مشابه با نتایج بررسی فیلوژنی بر روی پستانداران بود (۶). هرچند نتایج آنالیز فیلوژنی زمان دقیق انشعاب گونه‌ها را نمایش نداد، اما واضح است که زمان شروع تمایز و تغییرات تکاملی در گونه‌های پستانداران کوچک مانند گوسفند و بز، پستانداران بزرگ مانند گاو و بوفالو و نهایتاً گونه‌های شتر مربوط به دوره‌های زمانی خیلی دور است. بدین نحو شکل ۳ سه خوشه‌بندی اصلی پیکره ژن لپتین را در گونه‌های

درخت فیلوژنتیک روابط تکاملی توالی‌های نوکلئوتیدی ژن لپتین را در موجودات مختلف نشان می‌دهد (شکل ۳). مقادیر Bootstrapping بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی ترسیم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی مورد استفاده از درجه اعتماد بالایی برخوردار است. همان‌گونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، توالی نوکلئوتیدی این ژن در گونه‌های مورد بررسی بر اساس روابط تکاملی به هفت گروه یا شاخه تقسیم شده‌اند. دسته اول مربوط به توالی ژن لپتین در شتر، دسته دوم و سوم به ترتیب مربوط به (گاو، بوفالو) و (بز، گوسفند) هستند. همچنین، در دسته چهارم و پنجم نیز خوک و گربه قرار گرفته‌اند و نهایتاً دسته ششم و هفتم به ترتیب متعلق به گونه‌های پستانداران دریایی (خوک آبی، خوک آبی خاکستری و شیردریایی) و خفاش هستند.

تجزیه روابط تکاملی ژن لپتین نشان داد که بیشترین قرابت در جایگاه ژن لپتین شتر بلوچی با شتر لاما است که با احتمالاً دارای اجداد مشترکی بوده‌اند و یا مربوط به شرایط نگهداری آنها است که در

جهت سازگاری با شرایط مختلف یا هموستازی می‌گردد. تفرق ژنتیکی مجموع کل ویژگی‌های ژنتیکی یک گونه است و به‌عنوان راه‌حلی در جهت سازگاری با تغییرات محیطی شناخته شده است. به عبارت 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 درستی (ML) و نسبت جایگزینی کل، برابر با ۱/۵۸ محاسبه شد و درصد تنوع نوکلئوتیدی ۹۰ درصد بود.

پستانداران نمایش می‌دهد. تعداد کل جهش‌هایی که در طی تکامل جایگاه ژن لپتین رخ داده است برابر ۵۹۱ جهش شناسایی شد که توزیع آنها در طول ژنوم متفاوت بودند. تعداد جایگاه‌های چندشکل ۳۰۹ جایگاه در بین گونه‌های مختلف بودند. نتایج حاصل از آنالیز نواحی حفاظت شده نشان داد، که بخش کوچکی از توالی ژن لپتین در طی روند تکامل حفظ شده است که این امر نشان‌دهنده چندشکلی بالای این ژن و مستعد بودن آن به تغییرات نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید آن



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک توالی‌های نوکلئوتیدی ژن لپتین در گونه‌های مورد بررسی (۰/۲ نرخ جایگزینی نوکلئوتیدها در هر جایگاه)
Figure 3- Phylogenetic tree for nucleotide sequences of Leptin gene in the studied species (0.2 nucleotide rate substitutions per site)

انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل ژن‌ها نشان می‌دهد (۱۲). مقدار عددی این نسبت (d_N/d_S) در مطالعه حاضر بر ژن لپتین برابر ۰/۷۶ محاسبه شد (جدول ۲). روند انتخاب خالص در طی تکامل برای ژن لپتین در شتر و سایر گونه‌ها را نشان می‌دهد.

یکی دیگر از شاخص‌های روند تکاملی گونه‌ها، نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند (d_S) است که به‌عنوان یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها استفاده می‌گردد (۱۹)، اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد

جدول ۲- پارامترهای تعیین روند انتخاب طبیعی در جایگاه ژن لپتین در گونه شتر با سایر گونه‌ها

Table 2- Parameters of determining of natural selection process in the leptin gene in camel and other species

پارامتر* (Parameter)	مقدار عددی (Value)	انحراف استاندارد (Standard error)
d_N	0.65	0.077
d_S	0.94	0.089
d_N/d_S	0.69	0.083

*تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N)، تغییرات نوکلئوتیدی که تأثیری در اسید آمینه حاصله نداشته‌اند (d_S)، مقدار عددی (d_N/d_S) نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی. Nucleotide changes that alter amino acids (d_N), nucleotide changes that have not had an effect on the amino acid (d_S), the numerical value (d_N/d_S) represents the natural selection process.

جدول ۳- درصد جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن لپتین در گونه‌های مورد بررسی بر اساس روش حداکثر درست‌نمایی

Table 3- The percentage of substitution nucleotides of Leptin gene in the studied species based on maximum likelihood method

نوکلئوتید ^۱ (Nucleotide)	A	T/U	C	G
A	-	3.55	5.60	18.54
T	4.27	-	17.91	5.58
C	4.27	11.36	-	5.54
G	14.19	3.55	5.60	-

^۱درصد جانشینی بازها از یک ردیف به ستون را نشان می‌دهد. اعداد خارج قطر نشان‌دهنده جانشینی تقاطعی (ایتالیک) و اعداد روی قطر درصد جانشینی انتقالی (بولد) هستند.

Each entry is the probability of substitution (r) from one base (row) to another base (column). Rates of different transversional substitutions are shown in *italics* and those of transitional substitutions are shown in **bold**

به عدم تطابق در جفت شدن بازها می‌گردد. این عدم تطابق شناسایی شده و توسط فرآیندهای سلولی اصلاح شده که در نهایت منجر به تبدیل آلی به آل دیگر خواهد شد. تبدیل ژنی یک فرآیند اساسی ژنتیکی در تفرق و جدایی گونه‌هاست که به‌عنوان شبکه‌ی اتصال‌دهنده بین توالی‌های DNA در بین افراد یک گونه عمل می‌کند که این شبکه منجر به یکسان‌سازی، انسجام و یکپارچگی توالی DNA در بین گونه‌ها می‌شود (۱۷). در این تحقیق، براساس آنالیز صورت گرفته جهت شناسایی نواحی که در آن‌ها تبدیل صورت گرفته، نه ناحیه در بین توالی‌ها شناسایی شدند که در آن‌ها تبدیل ژنی رخ داده است (جدول ۴).

نتیجه‌گیری کلی

درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن لپتین در بین گونه‌های مختلف به دو شاخه اصلی شامل شتر و نشخوارکنندگان بزرگ مانند گاو و شاخه دیگر نشخوارکنندگان کوچک گوسفند و بز و برخی گونه‌های تک معده‌ای تقسیم شدند. البته شاخه اصلی نشخوارکنندگان کوچک به ۵ شاخه کوچکتر تقسیم شدند. توالی ژن لپتین شتر بلوچی بیشترین شباهت را با شتر لاما داشت که احتمالاً به‌واسطه اجداد اولیه یا نتیجه انتخاب طبیعی جهت سازگاری با شرایط محیطی گرم و خشک است که این دو جمعیت نگهداری می‌شوند. بخش حفاظت شده ناحیه مورد مطالعه در جایگاه ژن لپتین در بین

نتایج حاصل از درصد انواع جابه‌جایی‌های انتقالی و تقاطعی در توالی نوکلئوتیدهای ژن لپتین در جدول ۳ آورده شده است. مقادیر بالای جانشینی مربوط به بازهای پورینی است، به طوری که این مقدار برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین برابر ۱۸/۵۴ و ۱۴/۱۹ درصد محاسبه گردید. این مقادیر برای بازهای پیریمیدینی کمتر و به ترتیب برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۱۷/۹۱ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین برابر ۱/۳۶ درصد بودند. همچنین، نسبت جایگزینی بازهای پیریمیدینی به پورینی و پورینی به پیریمیدینی نیز ۱/۵۸ درصد محاسبه شد که نشان‌دهنده بیشتر بودن جهش‌های انتقالی نسبت به جهش‌های تقاطعی است. بر اساس مطالعه انجام شده بر روی توالی ژن لپتین موش نرخ جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدی برای بازهای پیریمیدینی بیشتر از پورینی گزارش شده است (۲). علت اختلاف در این نتایج را می‌توان به توالی‌های متفاوت جایگاه ژن و اختلاف روند تکاملی این ژن در موش و شتر دانست.

تبدیل ژنی^۱ فرآیندی است که طی آن یک توالی DNA جایگزین توالی همولوگ آن می‌شود. این فرآیند می‌تواند به صورت آلی، 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 آلی در طی میوز رخ می‌دهد که در طی آن نوترکیبی بین مکان‌های هتروزایگوسیتی منجر

1- Gene conversion

محیطی متفاوت است. همچنین روند انتخاب طبیعی جایگاه ژن لپتین برابر با ۰/۷۶ محاسبه شد که نشان‌دهنده روند تکاملی مجزا این جایگاه ژنی در گونه‌های مختلف است.

گونه‌های مختلف تنها بخش بسیار کوچکی از کل توالی‌ها را تشکیل داد که نشان‌دهنده چندشکلی بالای این جایگاه و مستعد بودن به انواع تغییرات نوکلئوتیدی و جهش است که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید آن جهت سازگاری با شرایط

جدول ۴- نواحی تبدیل ژنی و احتمال وقوع آنها در جایگاه ژن لپتین گونه‌های مختلف حیوانی

Table 4- Gene conversion regions of the leptin gene in different species

ناحیه تبدیل ژنی (Gene conversion regions)	طول قطعه ناحیه تبدیل (bp) (Length of conversion region)	میانگین (Psi) (Average)
Baluchi-camel (1-241)	147	0.12
(113-271) Baluchi-camel	180	0.13
151-380) (Baluchi-camel	241	0.13
181-342) (Lama_glama	271	0.13
242-373) (Lama_glama	308	0.13
(272-405) Lama_glama	342	0.13
Bos_taurus (309-436)	373	0.12
Equus_caballus (343-467)	405	0.14
(374-495) Macaca_mulatta	436	0.13

منابع

- Ahima, R. S. 2005. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 16: 307-313.
- Ahmadpanah, J. 2014. Phylogenetic Analysis and Molecular Evolution of the Leptin Gene. *Research on Animal Production*, 7: 208-213.
- Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel, and M. J. Lewin. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394:790-793.
- Caro, J. R., M. K. Sinha, J. W. Kolaczynski, P. L. Zhang, and R.V. Considine. 1996. Leptin: The tale of an obese gene. *Diabetes*, 45:455-1462.
- Chehab, F. F. 2000. Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Pharmacology Science*, 21:309-314.
- Doyon, C., G. Drouin, V. L. Trudeau, and T. W. Moon. 2001. Molecular Evolution of Leptin. *General and Comparative Endocrinology*, 124:188-1.
- Dridi, S., N. Raver, E. E. Gussakovsky, M. Derouet, M. Picard, A. Gertler, and M. Taouis. 2000. Biological activities of recombinant chicken leptin C4S analog compared with unmodified leptins. *Journal of Physiology*, 279:116-123.
- Frederich, R. C., A. A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell, and J. S. Flier. 1995. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine Journal*, 1:1311-1314.
- Hoggard, N., L. Hunter, J. S. Duncan, L. M. Williams, P. Trayhurn, and J. G. Mercer. 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 94: 11073-11078.
- Jin, L., B. G. Burguera, M. E. Couce, B. W. Scheithauer, J. Lamsan, N. L. Eberhardt, E. Kulig, and R. V. Lloyd. 1999. Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: Evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 2903-2911.
- Korber, B. 2000. HIV Signature and Sequence Variation Analysis. *Computational Analysis of HIV Molecular Sequences*, Chapter 4, pages 55-72. Allen G. Rodrigo and Gerald H. Learn, eds. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Li, W. H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DNASP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25:1451-1452.
- Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori, and K. Nakao. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine Journal*, 3:1029-1033.
- Nasaj Hossain., M. and M. Shamsbakhsh. 2010. *Method of Phylogenetic Analysis*. Haghshenas Press. 239p (In

- Persian).
16. Papiz, M. Z., L. Sawyer, E. E. Eliopoulos, A. C. T. North, J. B. C. Findlay, R. Sivaprasadarao, T. A. Jones, M. E. Newcomer, and P. J. Kraulis. 1986. The structure of p-lactoglobulin and its similarity to retinol-binding protein, *Nature*, 324: 383-385.
 17. Senaris, R., T. Garcia-Caballero, X. Casabiell, R. Gallego, R. Castro, R. V. Considine, C. Dieguez, and F. F. Casanueva. 1997. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, 138:4501-4504.
 18. Singh, V. K., A. K. Mangalam, S. Dwivedi, and S. Naik. 1998. Primer Premier: Program for design of degenerate primers from a protein sequence. *BioTechniques*, 24: 318-319.
 19. Sobhani, I., A. Bado, C. Vissuzaine, M. Buyse, S. Kermorgant, J.P. Laigneau, S. Attoub, T. Lehy, D. Henin, M. Mignon, and M. J. Lewin. 2000. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut*, 47:178-183.
 20. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
 21. Tavaría, M., T. Gabriele, I. Kola and R.L. Anderson. 1996. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell stress and chaperones*, 1: 23-28.
 22. Techenmacher, H. and Koch, G. Opioids in the milk, *Endocrine Reg.*, 1991. 25: 147-150.



Nucleotide Sequence Analysis of Phylogenetic and Evolutionary Status of Leptin Gene in Camel

M. Piri¹ - Gh. R. Dashab^{2*} - B. Asghari³

Received: 28-01-2017

Accepted: 16-12-2017

Introduction: Leptin is a pleiotropic protein best known for regulation of appetite and fat storage in mammals. While many leptin orthologs have been identified among vertebrates, an authentic leptin in birds has remained elusive and controversial. Leptin, the ob gene product, is a 167 amino acid polypeptide known to play a major role in regulating the fat stores of the body and is found in all eukaryotes, including mammals and in invertebrates. In mammals, leptin functions as an adiposity signal: circulating leptin fluctuates in proportion to fat mass, and it acts on the hypothalamus to suppress food intake. However, little is known about the molecular evolution of the leptin sequence gene. Therefore, the aim of this study, we conducted an analysis of the evolutionary and phylogenetic of the mammalian's Leptin nucleotide sequences in native camel of Sistan and Baluchistan province and compare with other species in NCBI gene bank.

Materials and methods: In this study, blood samples were collected from 50 camels, randomly from two stock of Sistan and Baluchistan province. DNA is extracted from whole blood with phenol-chloroform method. PCR amplification of 2000 bp from of partial ob gene including intron2 and xon3 of Leptin gene was performed using one pairs of special primers. PCR product was digested with endonuclease *AsuHpi* enzyme and purified on the agarose gel. Then, the sequencing of the digestion products was performed by the Sanger method. Data sequence for other species was achieved and aligned by searching its genome database (NCBI). The nucleotide substitution rate of the sequences (transition and transversion substitution rate) and molecular evolution (including polymorphism site, conservation site and gene conversion) of the Leptin were calculated by maximum likelihood and neighbor-joining (NJ) method respectively and phylogenetic tree was based on nucleotide sequences constructed. Evolutionary and phylogenetic tree analysis was performed by using MEGA6 and Dnasp v5 software's. Finally, a fundamental measure of the relative importance of selection and genetic drift in causing amino-acid substitutions is the d_N/d_S ratio. In this study was calculated with online package HIV_SNAP v2.1.1.

Results and Discussion: Results of alignment of DNA sequencing of two populations of camel in Sistan and Baluchistan showed 99% similarity, but diversity showed distinct from other mammalian species. The results showed that the transitional substitution was more than transversion substitution and ratio these was 1.58. Totally, there were 591 mutations including insert, deletion and polymorphism sites at the DNA level of leptin gene (ob gene) in different species but sequence alignment of the Leptin gene fragment revealed only 309 polymorphic sites and conservation area of ob gene was very small. Evolutionary pressures on proteins are often quantified by the ratio of substitution rates at non-synonymous and synonymous sites. The d_N/d_S ratio was originally developed for application to distantly diverged sequences, the differences among which represent substitutions that have fixed along independent lineages. Nevertheless, the d_N/d_S measure is often applied to sequences sampled from a single population, the differences among which represent segregating polymorphisms. The d_N/d_S ratio of the Leptin sequences in this study (0.76) indicated that negative selection was accrued during evolution. Phylogenetic tree for the leptin gene in different organisms show that seven categories in the mammals such as camel, cows and buffalo, sheep and goat, pork's, bats, cats and marine. Phylogenetic analysis of leptin gene using Neighbor-Joining method showed that Baluchi camel population in this study has the highest similarity with Lama among the Camelidae family.

Conclusion: Phylogenetic analysis of DNA sequence has played an important role in the study on evolution of life. However, recent researches suggest in some cases phylogenetic trees based on the analyses of DNA sequences may be misleading and that based on trees protein-based trees from amino acid sequences may be more reliable. Similarities of between the two populations of Baluchi camel in this study showed that common

1- MSc of Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Assistant Professor of Genetic and Animal Breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

3- Ph.D Student of Animal breeding, Department of Animal Science, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

(* - Corresponding author email: dashab@uoz.ac.ir)

ancestry and genetic similarity. Mutations and natural selection resulted in the development of new varieties, new proteins and also stabilizes their performance during the evolution and advance progress toward their performance has been purified. According to this study, protected areas make up a small part of leptin gene sequence insures that this reflects the polymorphism of this gene as well as being susceptible to variations and mutations, respectively. The results of d_N/d_S suggested that evolution in camel is different of other species.

Keywords: Evolution, Leptin, Native camel, Natural selection, Phylogeny