



نشریه آموزشی - پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۳۸، بهار ۱۴۰۰

ص:ص: ۹۱~۹۸

بررسی تنوع ژنتیکی ژن لپتین در گونه های مختلف شتر

کریم نویری*^۱، عبدالله کاویان^۲، عباس بهاری^۳

^۱ استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
^۲ مربی بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
^۳ استادیار پژوهشکده فناوری های نوین زیستی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۰

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۴۲۵۶۰۰۱

Email: k.nobari@areo.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/aasrj.2021.124296

چکیده:

یکی از عناصر کلیدی تنظیم مصرف خوراک لپتین می باشد که با تحریک مرکز گرسنگی در هیپوتالاموس باعث تنظیم اشتها می گردد. علاوه بر آن ثابت شده است که این هورمون بر روی عملکرد تولید شیر برخی از گونه ها مانند گاو و گوسفند تأثیر می گذارد. هدف از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی و تفاوت بین گونه های مختلف شتر است که نتایج آن می تواند ما را در شناخت بهتر این ژن و تأثیر آن بر روی عملکرد شتر کمک نماید. توالی ژن لپتین شتر ترکمن (*Camelus dromedarius*) به کمک توالی یابی کل ژنوم و توالی ژن لپتین شتر عربی (*Camelus dromedarius*)، شتر دوکانه اهلی (*Camelus Bactrianus*) و وحشی (*Camelus Ferus*) از بانک ژن (www.ncbi.nlm.gov) تهیه گردید. در این مطالعه از ژنوم یک نفر شتر ترکمن توالی یابی شده توسط دستگاه Hiseq 2000 شرکت ایلومینا استفاده شد. داده های خام حاصل از توالی یابی با استفاده از روش Denovo مونتاژ شد و در مجموع ۲۳۵۹۷۸ کانژیک^۱ بدست آمد. سپس با استفاده از خوانش منطقه ای، کانژیک مربوط به ژن لپتین استخراج گردید. سپس با تجزیه و تحلیل ژنوم هم ترازی بخش های مختلف توالی درخت فیلوژنی تهیه گردید. در کلیه موارد تجزیه و تحلیل توالی ها با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench 12 انجام گرفت. نتایج نشان داد که طول و توالی ژن لپتین در گونه های مختلف متفاوت می باشد. همچنین علیرغم تفاوت در توالی اگزون های ژن لپتین، توالی اسیدهای آمینه پروتئین گونه های مختلف شتر هیچ تفاوتی نداشتند. نتایج این تحقیق با تحقیقات دیگر در گونه های مختلف مشابهت داشت.

واژه های کلیدی: شتر، لپتین، توالی کل ژنوم، فیلوژنیک

Applied Animal Science Research Journal No 38 pp: 91-98

Genetic diversity analysis of leptin gene in different species of camel

By: K. Nobari¹, A. Kavian², A Bahari³

1. Assistant Prof., Animal Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran.

2. Member of Scientific Board, Animal Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran.

3. Assistant professor, Research Institute of modern biological techniques, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received: December 2020

Accepted: April 2021

As a key element on regulating feed intake, leptin can affect hunger center on hypothalamus to regulation of appetite. Furthermore, it has been shown that leptin gene can have influential on milk production of some species like sheep and cattle. The objective of present study is considering genetic diversity of different species to better understanding of underlying effects of the gene on camel production. Leptin gene sequence of Turkmen camel (*amelus dromedarius*) obtained using whole genome sequence and the sequences of Arabian (*amelus dromedarius*), wild (*Camelus Ferus*) and domestic (*Camelus Bactrianus*) two humped camel were downloaded from gene bank (www.ncbi.nlm.gov). In this study, genome of a Turkmen camel that sequenced by Illumina Hiseq 2000 was used. The gross data of sequence assembled using Denovo method and 235978 contigs were obtained. Then, reads of the contig that containing the leptin gene were extracted from the whole data set. Analysis of the sequence and alignment of different parts of the gene sequence were done for preparing phylogenetic tree. Analysis of the sequences were performed using CLC Genomics Workbench software. The results showed that the length and the sequence of the gene were different in the species. Also, despite the difference on sequence of exons of the leptin gene, sequence of leptin protein was the same in all camels. Results of the research were similar to other researches in different species.

Key words: Camel, Leptin, Whole genome sequence, Phylogenetic

مقدمه

آدرنال، گره‌های لنفاوی، بافت چربی، سلول‌های بافت روده، قلب، کلیه، کبد و ششها گزارش شده است (Hoggard et al., 1997). توالی ژن لپتین در انسان بر روی کروموزوم ۷ می‌باشد (Fatima et al., 2011) و دارای سه آگزون و دو اینترون است که دو آگزون آن ترجمه می‌گردد. در پستانداران، لپتین به کمک گیرنده‌های کوتاه‌مدت و بلندمدت خود باعث تحریک هیپوتالاموس (Barb et al., 2001) و در نهایت مصرف خوراک و متابولیسم انرژی می‌گردد. لپتین در پستانداران نقش اساسی را در کنترل رشد بدن، اشتها، فعالیت ایمنی، فعالیت غدد لنفاوی، فعالیت کلیه‌ها و تولیدمثل دارد (Wallace et al., 2014). با تمام تفصیلات فوق، لپتین می‌تواند به عنوان عامل تعیین کننده

لپتین هورمون پروتئینی با وزن ۱۶ کیلو دالتون است که برای اولین بار در موش شناسایی شد. این هورمون نقش تعیین کننده در تنظیم اشتها، متابولیسم انرژی، ترکیب بدن، فعالیت ایمنی و تولید مثل پستانداران دارد (Trombley et al., 2012). لپتین از بافت چربی برای پاسخ به تغییرات سطح چربی بدن و یا وضعیت انرژی، ترشح می‌گردد. بنابراین با ترشح لپتین بازخورد منفی برای اشتها در مراکز اشتها بلندمدت و کوتاه‌مدت اشتها در هیپوتالاموس را فعال می‌نماید که در نهایت منجر به تنظیم مصرف خوراک و انرژی توسط جاندار می‌گردد (Trombley et al., 2012). بنابراین اعتقاد بر این است که این هورمون با بالانس میزان مصرف خوراک و متابولیسم انرژی در تنظیم وزن بدن نقش اساسی دارد (Friedman et al., 1998). بیان ژن لپتین در غدد هیپوفیز،

نتایج و بحث

نتایج استخراج DNA و توالی یابی

غلظت DNA اندازه گیری شده با دستگاه Qubit Fluorometer مقدار ۳۰۴ نانوگرم بر میکرولیتر را نشان داد که نشان از استخراج DNA با کیفیت بود. نمونه ارسالی به شرکت ایلومینا نتایج خام حاوی تعداد خوانش های شفاف ۵۸۹/۳۲۶/۱۵۸ متشکل از بیش از ۸۸ میلیارد باز واضح را نشان داد که طول هر یک از خوانش ها ۱۵۰ جفت باز بود. بعد از پیرایش نتایج خام توالی یابی (خوانش ها)، خوانش ها با استفاده از نرم افزار CLC، مونتاژ شده و کانینگ های مختلف بدست آمد. کانینگ حاوی ژن لپتین از میان کانینگ های بدست آمده استخراج شد و با استفاده از نرم افزار CLC مورد بررسی in-silico قرار گرفت.

بررسی هم ترازی ژن و اگزون های آن

هم ترازی توالی ژن در گونه های مختلف شتر به دلیل گسست های موجود در توالی و همچنین تفاوت در نقطه شروع و پایان، تعداد نوکلئوتیدهای گونه های مختلف شتر تک کوهانه و دو کوهانه مورد بررسی متفاوت بودند. هم ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای هر یک از گونه ها در شکل ۱ آورده شده است.

رشد، ضریب تبدیل غذایی و سلامت حیوان باشد. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی in-silico ژن لپتین گونه های مختلف شتر در جهت شناخت بیشتر آن طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش ها

تهیه توالی های گونه های مختلف شتر

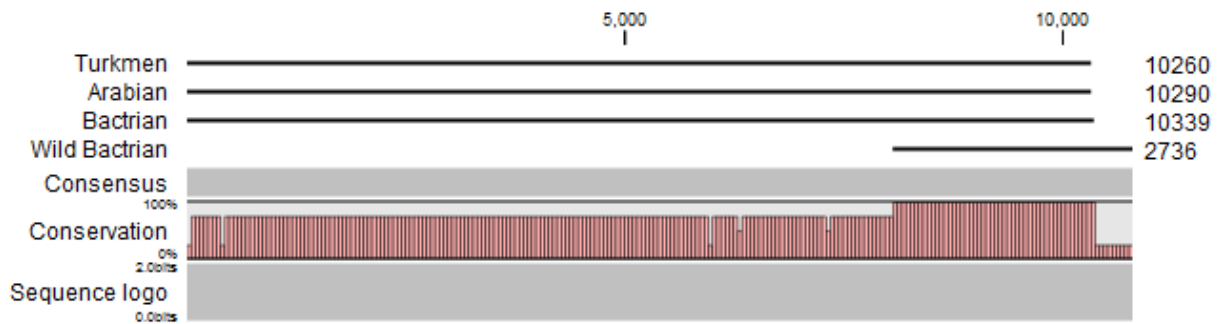
برای تهیه توالی کامل ژنوم شتر ترکمن که یک نمونه خون در تیوب حاوی EDTA تهیه و به روش بهینه استخراج نمکی DNA استخراج گردید. تعیین میزان غلظت DNA با استفاده از دستگاه Qubit Fluorometer صورت گرفت. بعد از تایید غلظت مناسب DNA، نمونه استخراج شده به شرکت ارسال گردید تا با دستگاه Illumina HiSeq 2000 توالی یابی گردد. توالی های دیگر گونه های شتر شامل شتر تک کوهانه عربی، شتر دو کوهانه اهلی و شتر تک کوهانه وحشی نیز از بانک بانک داده NCBI بخش Gene استخراج و تهیه گردید (www.ncbi.nlm.gov).

تجزیه و تحلیل توالی های ژن لپتین

در این مطالعه از روش اتصال نزدیک^۱ (NJ) یکی از روش های مبتنی بر فاصله است که از پرکاربردترین روش های رسم درخت های فیلوژنتیکی استفاده گردید. بطوری که از روش فاصله ای اتصال نزدیک (NJ) جهت ترسیم درخت فیلوژنتیکی و از مدل Kimura جهت تصحیح فاصله تکاملی استفاده گردید. در تعیین فاصله تکاملی مدل Kimura سرعت جهش های انتقال و تبدیل در تصحیح فاصله تکاملی متفاوت در نظر گرفته می شود. همانند مطالعات دیگر، در این مطالعه نیز جهت ترسیم صحیح ترین درخت از نمونه گیری مجدد به روش بوت استراپ (۱۰۰۰ مرتبه) استفاده گردید.

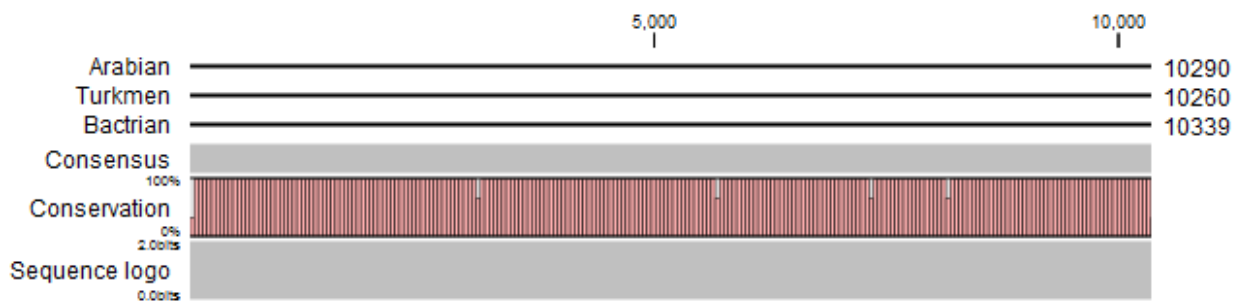
همچنین با توجه به حاشیه نگاری (Annotation) توالی ژن میوستاتین گونه های شتر نواحی مختلف ژن استخراج گردید. سپس هم ترازی، تفاوت ها و درصد تشابه مشخص شد و سپس درخت فیلوژنتیکی آن ترسیم گردید. تجزیه و تحلیل توالی های بدست آمده با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench 12 انجام گرفت.

¹ Neighbor joining



شکل ۱. تعداد نوکلئوتیدهای ژن لپتین گونه‌های مختلف شتر

شکل ۲ نیز هم‌ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای گونه‌های شتر تک‌کوهانه و دوکوهانه اهلی را نشان می‌دهد.



شکل ۲. هم‌ترازی و تعداد نوکلئوتیدهای ژن لپتین در گونه‌های اهلی شتر

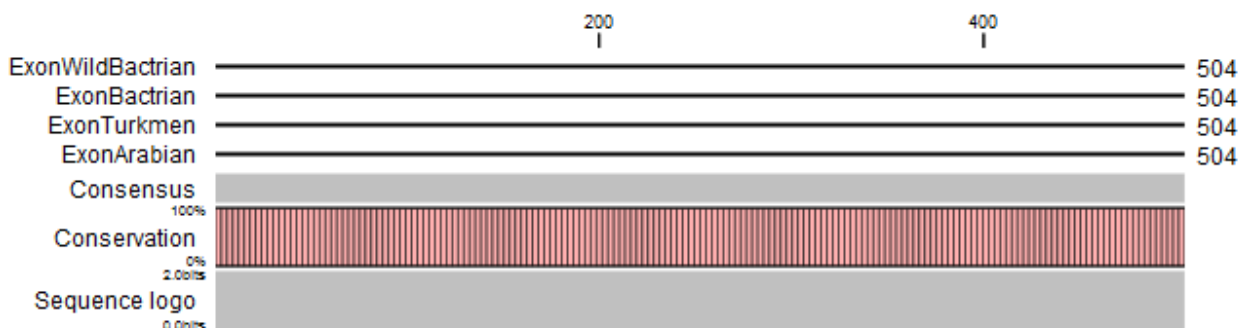
درصد تشابه و تعداد تفاوت توالی نوکلئوتیدهای ژن لپتین در گونه‌های مختلف شتر بررسی گردید. نتایج در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی جداگانه سه گونه شتر نیز نتایج مشابهی را ارائه می‌نمایند که جدول آن آورده نشده است.

	1	2	3	4
Turkmen	1	99.65	98.57	21.02
Arabian	2	36	98.82	20.97
Bactrian	3	148	122	21.22
Wild Bactrian	4	8477	8506	8492

جدول ۱. درصد تشابه و تعداد تفاوت توالی نوکلئوتیدهای ژن لپتین در گونه‌های مختلف شتر

جهت بررسی میزان هم‌ترازی در سطح اگزون، اگزون‌های هر یک از گونه‌ها استخراج گردید و مورد تجزیه هم‌ترازی قرار گرفت. نتایج حاصل از هم‌ترازی اگزون‌های همه گونه‌های شتر در شکل ۳ ارائه شده است.

بررسی توالی ژن نشان می‌دهد که درصد تشابه بین شترهای تک‌کوهانه بیشتر می‌باشد. تفاوت زیاد بین شتر دوکوهانه وحشی به دلیل طول پایین توالی ژن در آن نوع شتر می‌باشد.



شکل ۳. هم ترازوی اگزون های ژن لپتین در گونه های مختلف شتر

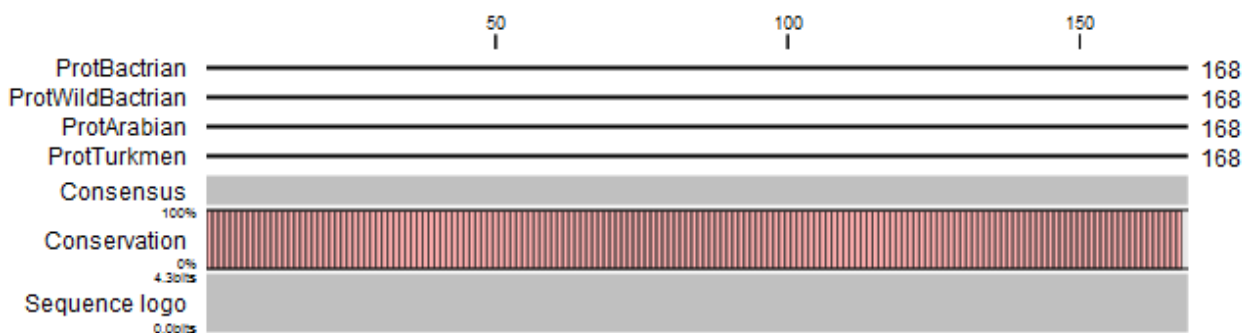
دو کوهانه اهلی و بقیه گونه های شتر وجود دارد که در جدول ۲ آورده شده است.

همانطور که در شکل نشان داده شده است طول توالی اگزون در تمامی گونه ها ۵۰۴ نوکلئوتید می باشد. در بررسی درصد تشابه و تعداد تفاوت ها مشخص گردید که یک تفاوت نوکلئوتید بین شتر

	1	2	3	4
ExonWildBactrian	1	99.80	100.00	100.00
ExonBactrian	1	1	99.80	99.80
ExonTurkmen	0	1	100.00	
ExonArabian	0	1	0	

جدول ۲. درصد تشابه (بالای قطر) و تعداد تفاوت بین توالی اگزون در گونه های مختلف شتر

اگزون ها به پروتئین ترجمه شد و هم ترازوی پروتئین لپتین مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۴ نشان دهنده هم ترازوی پروتئین لپتین در گونه های مختلف شتر می باشد.



شکل ۴. هم ترازوی پروتئین لپتین گونه های مختلف شتر

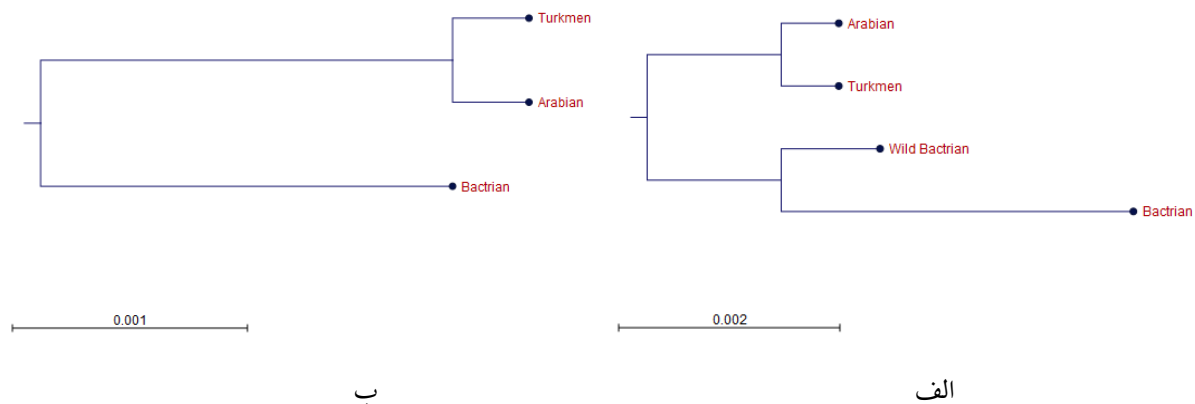
درصد شباهت و میزان تفاوت های توالی پروتئین لپتین در گونه های مختلف نشان دهنده تشابه کامل تمام گونه ها از لحاظ توالی اسید آمینه پروتئین لپتین می باشد که در جدول ۳ نشان داده شده است.

	1	2	3	4
ProtBactrian	1	100.00	100.00	100.00
ProtWildBactrian	2	0	100.00	100.00
ProtArabian	3	0	0	100.00
ProtTurkmen	4	0	0	0

جدول ۳. درصد شباهت (بالای قطر) و تعداد تفاوت اسیدهای آمینه پروتئین لپتین در گونه‌های مختلف شتر

ترسیم درخت فیلوژنی

درخت فیلوژنتیکی برای داده‌های خام چهار گونه شتر و سه گونه شتر ذکر شده به صورت شکل ۵ بودند.



شکل ۵. درخت فیلوژنی برای چهار گونه شتر (الف) و سه گونه شتر (ب)

پایین دست این ژن که می‌تواند به عنوان مناطق تاثیرگذار بر روی ژن باشند مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم میدانند تا از همکاری و حمایت‌های مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان در خصوص انجام این مطالعه تشکر قدردانی نمایند.

منابع

- Barb C.R., Hausman G.J., Houseknecht K.L. (2001): Biology of leptin in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. **21**(4): 297-317.
- Fatima W., Shahid A., Imran M., Manzoor J., Hasnain S., Rana S., Mahmood S. (2011): Leptin deficiency and leptin gene mutations in obese children from Pakistan. *International Journal of Pediatric Obesity*. **6**: 419-427.
- Friedman., Jeffrey M., Halaas J.L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. **395**: 6704, 763-770.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در مناطقی از توالی ژن لپتین گونه‌های مختلف تفاوت وجود دارد که تاثیری بر روی توالی پروتئین ندارد که با مطالعه طهمورث پور و شجاعی (۲۰۱۳) مطابقت داشت. آنها نشان دادند که بین قطعات تکثیر شده توالی لپتین در آن مطالعه در گونه‌های شتر تک کوهانه و دو کوهانه تفاوتی وجود نداشت. آنها شباهت زیادی را بین توالی‌های تکثیر خود در گاو و گونه‌های دیگر یافتند. این تحقیق نشان داد که در توالی آگزون شتر دو کوهانه اهلی و وحشی یک نوکلئوتید تفاوت وجود دارد اما توالی پروتئین نشان داد که این تفاوت منجر به تفاوت در توالی اسید آمینه نمی‌گردد. همچنین تفاوت یک نوکلئوتید موجود در بین شتر دو کوهانه اهلی و شترهای تک کوهانه نیز باعث تغییر در توالی اسیدهای آمینه پروتئین لپتین نگردیده است.

این تحقیق حفاظت‌شدگی کامل توالی اسیدهای آمینه پروتئین لپتین را نشان می‌دهد. پیشنهاد می‌گردد که نواحی بالادست و

Tahmoorespur M., M. Shojaei M. (2013) Partial sequence and investigation of leptin and calpain, candidate genes for meat quality in camel. *Journal of Camel Practical and Research*. **20**(2):1-6.

Trombley S., Maugars G., Kling P., Bjornsson B.T.H., Schmitz. (2012) Effects of long-term restricted feeding on plasma leptin, hepatic leptin expression and leptin receptor expression in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology*. **175**: 92-99

Hoggard N.I., Hunter L., Duncan J.S., Williams L.M., Trayhurn P., Mercer J.G. (1997): Leptin and Leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of National Academic Science, USA*, **94**: 11073-11078.

Wallace J.M., Milne J.S., Aitken R.P., Adam C.L. (2014): Influence of birth weight and gender on lipid status and adipose tissue gene expression in lambs. *Journal of Molecular Endocrinology*, **53**: 131-144.

