

توالی‌یابی و تجزیه بیوانفورماتیکی قسمتی از راه انداز ژن بتاکازئین در شترهای تک‌کوهان و دوکوهان ایران

Sequencing and Bioinformatics analysis of partial promoter region of Beta Casein gene in Iranian Dromedary and Bactrian camels

الیاس محمدی^۱، مجتبی طهمورث پور^{۱*}، محمدرضا نصیری^۱، محمدهادی سخاوتی^۱، نغمه ساعدی^۲

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، استادیار، ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد،

ایران

۲- دانشجوی دکتری، ژنتیک و اصلاح نژاد دام، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

Mohammadi E¹, Tahmoorespur M^{*1}, Nasiri MR¹, Hadi Sekhavati M¹, Saedi N²

1- PhD Student, Professor, Associated Professor, Assistant professor, candidate of animal genetics, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran

2- PhD Student, candidate of animal genetics, Science and Research Unit, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: tahmoores@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

کازئین مهم‌ترین بخش پروتئین شیر است. ژن‌های کازئین و تنظیم بیان آن‌ها به خاطر اهمیت اقتصادی‌شان موضوع تحقیقات وسیع بوده‌اند. پیدا کردن عناصر تنظیمی مهم و آلل‌های چندشکل خاص در ناحیه راه‌انداز ژن‌های کازئین پایه خوبی برای انتخاب بر اساس مارکر ایجاد می‌کند. هدف از این مطالعه توالی‌یابی، آنالیز بیوانفورماتیکی و بررسی موتیف‌های قسمتی از راه‌انداز ژن بتاکازئین در شترهای تک‌کوهان و دوکوهان ایران و هم‌چنین بررسی تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) در گونه شتر تک‌کوهان و دوکوهان ایران بود. تعداد ۱۰ عدد نمونه خون شتر نر و ماده تک‌کوهان از کشتارگاه مشهد و تعداد پنج عدد نمونه خون شتر نر و ماده دوکوهان از ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل تهیه شد. پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز توسط آغازگرهای اختصاصی انجام شد و نمونه‌ها جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر ارسال شدند. توالی‌های مورد توافق برای شترهای تک‌کوهان و دوکوهان به دست آمد و بررسی موتیف‌ها، تجزیه و تحلیل تبارزایی و هاپلوتایپ‌ها انجام شد. بر اساس مقایسه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI (بخشی از کل توالی)، مشخص شد که ناحیه مورد مطالعه، با وجود هاپلوتایپ‌های متفاوت، جهشی را نشان نمی‌دهد. بررسی‌ها هشت نوع هاپلوتایپ را در شترهای تک‌کوهان و پنج نوع هاپلوتایپ را در شترهای دوکوهان نشان داد.

واژه‌های کلیدی

توالی‌یابی
تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی
شتر تک‌کوهان
شتر دوکوهان
هاپلوتایپ

وی پروتئین از بتالاکتوگلوبولین، ایمونوگلوبولین، گلیکوماکروپپتیدها، سرم آلبومین و پروتئین‌های کوچکتر مثل لاکتوپراکسیدازها، لیزوزیم و لاکتوفرین تشکیل شده است (Farrel et al. 2008; Haddadin et al. 2004). شیر شتر تمامی مواد مغذی ضروری موجود در شیر گاو را دارا می‌باشد. کازئین ۸۰ درصد پروتئین شیر گاو را تشکیل می‌دهد در حالی که کازئین شیر شتر ۵۲ تا ۸۷ درصد پروتئین آن را تشکیل می‌دهد. قسمت‌های اصلی کازئین گاوی شامل آلفا_۱، آلفا_۲، بتا و کاپا کازئین هستند (Kaminski et al. 2007; Salmen et al. 2012). این قسمت‌ها به ترتیب نام برده شده با نسبت ۴:۱:۴:۱ می‌باشند و تعداد اسیدهای آمینه‌ی آن‌ها به ترتیب ۱۹۹، ۲۰۷، ۲۰۹ و ۱۶۹ عدد است و در مقایسه با شیر گاو، در شیر شتر شامل ۲۰۷، ۱۷۸، ۲۱۷ و ۱۶۲ اسید آمینه است. شیر شتر تک‌کوهان و گاو، آمینواسیدهای مشابهی دارند با این حال اسیدهای آمینه گلايسين و سيستئين در پروتئین کازئین شیر شتر دوکوهان کمتر از شیر گاو است (Salmen et al. 2012). به دلیل جایگاه کازئین به عنوان مهم‌ترین بخش پروتئین شیر این قسمت انتخاب شد و هدف از انجام این تحقیق اول توالی یابی قسمتی از راه‌انداز ژن بتاکازئین در گونه‌های شتر تک‌کوهان و دوکوهان ایران، دوم بررسی فیلوژنتیکی، سوم بررسی موتیف‌های ناحیه غیر رمزدهنده و در نهایت شناسایی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) موجود در قسمتی از نواحی غیر رمزدهنده (راه انداز) ژن بتاکازئین که اطلاعات حاصل از آن کاربرد فراوانی در مطالعات همبستگی چندشکلی‌های ژنی با صفات مورد بررسی دارند.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ عدد نمونه خون شتر تک‌کوهان از کشتارگاه مشهد واقع در جاده فریمان روستای تپه‌سلام و تعداد پنج عدد نمونه خون شتر دوکوهان از ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل واقع در روستای جهادآباد تهیه شد. خون از رگ وداجی و به مقدار شش میلی‌لیتر گرفته شد. برای جلوگیری از انعقاد خون، از لوله‌های حاوی EDTA ده درصد استفاده شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در

تعداد شترهای تک‌کوهان (*Camelus dromedaries*) و دوکوهان (*Camelus bactrianus*) در سراسر جهان، تا سال ۱۹۹۸ تقریباً به حدود ۱۸ میلیون نفر رسیده است و پس از آن، انتظار می‌رود این تعداد با توجه به افزایش جمعیت و بیابان‌زایی افزایش داشته باشد (Kappeler et al. 1998). شتر مهم‌ترین دامی است که می‌تواند در مراتع فقیر توان زیست و تولید داشته باشد و با توجه به عادات چرای خود باعث حفظ و احیای این مراتع شود. شتر علاوه بر شرایط سخت صحرایی قادر است که در شرایط تغذیه دستی با دام‌های پر تولید هم وزن خود (مانند گاو) رقابت کرده و افزایش وزن روزانه بالایی داشته باشد. شیر شتر یکی از نزدیک‌ترین شیرها به شیر انسان می‌باشد که بیانگر ارزش بالای آن است. این شیر فاقد بتالاکتوگلوبولین (پروتئین عمده آب پنیر) می‌باشد که این پروتئین در شیر انسان هم وجود ندارد. این پروتئین عمده‌ترین پروتئین آلرژی‌زای فاز محلول گزارش شده است. در شیر شتر آنتی‌بادی‌هایی موجود می‌باشد که در درمان سرطان، ایدز، آلزایمر و هیپاتیت B نقش بسزایی دارند. مطالعه دگرگونی ژنتیکی پروتئین شیر گاوی ۵۰ سال پیش توسط شناسایی گونه‌های اصلی بتا لاکتوگلوبولین آغاز شد و در سال‌های اخیر با بهبود روش‌های تجربی و مشارکت در زمینه‌های زیست‌شناسی ملکولی، ژنتیک و بیوشیمی به شدت افزایش یافته است. شیر به طور کلی از آب، پروتئین، چربی، کربوهیدرات، لاکتوز و مواد معدنی تشکیل شده است. پروتئین شیر به دو گروه اصلی تقسیم می‌شود که شامل کازئین‌ها (حدود ۸۰ درصد از پروتئین شیر را تشکیل می‌دهند) و وی پروتئین‌ها می‌باشند (Singh et al. 2007; Konuspaveva 2009). کازئین مهم‌ترین بخش پروتئین شیر است و تاکنون بر روی ژن‌های کدکننده آن تحقیقات وسیعی صورت گرفته است. پیدا کردن عناصر تنظیمی مهم و آلل‌های چندشکل خاص در ناحیه راه‌انداز ژن‌های کازئین پایه خوبی برای انتخاب بر اساس مارکر ایجاد می‌کند. کازئین پروتئین تغذیه‌ای شیر است که در پستانداران اهمیت زیادی دارد (Gatsey et al. 1996; Mishara et al. 2009). کازئین یک فسفو پروتئین می‌باشد که در صنایع غذایی و هم‌چنین در پزشکی کاربرد دارد. حدود ۸۰ درصد پروتئین شیر را کازئین تشکیل می‌دهد (Farrel et al. 2004; Shamsia 2009).

از آنزیم Taq polymerase با غلظت ۱/۵ واحد، ۱ میکرولیتر از آغازگر با غلظت ۱ پیکومول در میکرولیتر و ۱۶/۳ میکرولیتر آب دیونیزه بود. محصولات واکنش های زنجیره ای پلیمراز بر روی ژل آگارز یک درصد تفکیک شدند و سپس نمونه ها به منظور تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer; South Korea) ارسال شدند.

به منظور رسم ماتریس فواصل ژنتیکی، در مرحله اول توالی مورد توافق قسمتی از راه انداز ژن بتاکازین با توالی های موجود در پایگاه NCBI تحت فرایند BLAST مورد مقایسه قرار گرفتند. طی این فرایند تعداد ۱۶۰ توالی از ۹ جنس و گونه مختلف که با نواحی مورد مطالعه هم پوشانی داشتند، از این پایگاه دریافت و تحت رویه Clustal برنامه MEGA v5 (Tamura et al. 2013) با توالی های به دست آمده در این مطالعه هم ردیف سازی (Alignment) شدند (جدول ۲). ماتریس فواصل ژنتیکی به وسیله نرم افزار CLC Main Workbench 5.5 محاسبه شد و درخت فیلوژنتیکی این فواصل به وسیله نرم افزار MEGA v5 رسم شد (شکل های ۲ و ۳). تمامی توالی ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI جمع آوری شدند.

جهت شناسایی هاپلوتایپ ها از رویه Alignment نرم افزار CLC Workbench (<https://www.qiagenbioinformatics.com/>) 5.5 استفاده شد. بدین منظور ابتدا توالی ها ویرایش شدند و سپس برای هر یک از نمونه ها قسمتی از توالی کامل ژن بتاکازین بدست آمد. در مرحله بعد با هم ردیف کردن توالی ها جهش ها مشخص شد. همانطور که در توالی های هم ردیف شده در شکل های ۴ و ۵ مشاهده می شود پس از هم ردیف کردن نمونه ها قسمت های مشترک بین همه نمونه ها با علامت " - " مشخص شدند و قسمت های متفاوت با فلش در آن جایگاه مشخص تعیین شدند.

آزمایشگاه بیوتکنولوژی حیوانی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری شد.

به منظور استخراج DNA از کیت Bioneer (آمریکا--Cat. No. k-3032) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییر استفاده شد. جهت بررسی کیفیت DNA نمونه ها روی ژل آگارز یک درصد مشاهده شدند. در نهایت برای تعیین دقیق غلظت DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop® ND-1000, USA) استفاده شد. مقدار ۱/۸ تا ۲ برای نسبت A260/A280 نشانگر کیفیت خوب DNA است.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

در این بررسی از یک جفت آغازگر جهت تکثیر بخشی از راه انداز ژن بتاکازین (از باز ۱۳۸- تا باز ۱۱۴۸-) شتر تک کوهان و دو کوهان استفاده شد که مشخصات آن را در جدول ۱ مشاهده می شود. جفت آغازگر با استفاده از توالی ثبت شده شتر تک کوهان در پایگاه اطلاعاتی NCBI و با استفاده از نرم افزار Primer premier 5 طراحی شد (GenBank: AJ575419.1). در مجموع قطعاتی به طول ۹۶۰ و ۹۱۰ جفت باز به ترتیب برای شترهای تک کوهان و دو کوهان توسط این جفت آغازگر تکثیر شد.

انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra آلمان (T-personal) در ۳۵ سیکل و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

واسرشت ابتدایی و بسط نهایی در زمان ۶۰۰ ثانیه، یک سیکل و در دمای ۹۴ و ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شدند. واسرشت، اتصال و بسط در طی ۳۵ سیکل به ترتیب در دمای ۹۴، ۶۴ و ۷۲ درجه سانتی گراد و زمان ۳۰، ۳۰ و ۵۴ ثانیه انجام شدند. محتوای مواد تشکیل دهنده این واکنش شامل ۱/۵ میکرولیتر از نمونه DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر از بافر با غلظت ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۱/۶ میلی مولار، ۰/۲ میکرولیتر

جدول ۱- مشخصات و توالی آغازگر استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمراز

نام	توالی	طول قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)	منبع
Scence	5' CAAGATACTGAATATGGTTCCCTGT 3'	۹۱۰ (دوکوهان)	۶۴ °C	طراحی شد (به وسیله primer)
Anti-scence	3' GTTCTATGACTTATACCAAGGGACA 5'	۹۶۰ (تک کوهان)	۶۴ °C	(premier5)

زنجیره‌ای پلیمرز و B نشان‌دهنده کنترل مثبت با آغازگرهای اختصاصی برای راه انداز ژن آلفا لاکتالبومین در شیر شتر با طول ۱۰۱۲ می‌باشد.

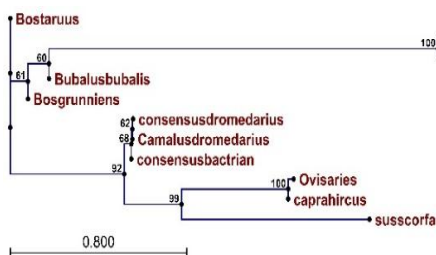
جدول ۲- توالی‌های دریافت شده از NCBI جهت آنالیز فیلوژنتیک

جنس و گونه	تعداد توالی دریافت شده
<i>Sus scrofa</i>	۵۱
<i>Ovis aries</i>	۶۰
<i>Capra hircus</i>	۳۲
<i>Bos Taurus</i>	۳
<i>Bubalus bubalis</i>	۲
<i>Equus caballus</i>	۵
<i>Equus asinus</i>	۲
<i>Bos grunniens</i>	۳
<i>Camelus dromedaries</i>	۲

یکی از اهداف این تحقیق تعیین توالی مورد توافق برای شترهای تک‌کوهان و دوکوهان بود. به‌منظور تعیین توالی قسمتی از راه‌انداز ژن بتاکازئین برای هرکدام از نمونه‌ها از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 استفاده شد. پس از زیر هم‌چینی توالی مورد توافق برای ژن بتاکازئین برای گونه شتر تک‌کوهان و دوکوهان ایران به‌دست آمد که به‌ترتیب ۹۶۰ و ۹۱۰ جفت‌باز طول داشت و در پایگاه اطلاعاتی NCBI به‌ترتیب با شماره دسترسی KR611005-KR611009 و KR610995-KR611004 برای اولین بار (برای شترهای تک‌کوهان و دوکوهان ایران) ثبت شد. فواصل ژنتیکی بین توالی گونه‌های مورد مطالعه محاسبه و نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده‌است.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<i>Camelusdromedarius</i>	1		0	0	296	277	277	276	294	232	255	256
<i>consensusdromedarius</i>	2	1	0	0	296	277	277	276	294	232	255	256
<i>consensusbactrianus</i>	3	1	2	0	296	277	277	276	294	232	255	256
<i>caprahiricus</i>	4	421	421	420		337	337	336	2	234	491	492
<i>Bostaurus</i>	5	407	408	406	409		0	1	336	326	264	265
<i>Bosgrunniens</i>	6	406	407	405	399	0		1	335	325	264	265
<i>Bubalusbubalis</i>	7	406	407	405	393	1	3		336	326	265	266
<i>Ovisaries</i>	8	451	451	450	2	416	415	414		232	489	490
<i>susscorfa</i>	9	453	453	452	496	525	524	524	509		412	416
<i>Equuscaballus</i>	10	486	487	485	600	485	484	482	694	620		1
<i>Equusasinus</i>	11	486	487	485	601	486	485	483	695	633	6	

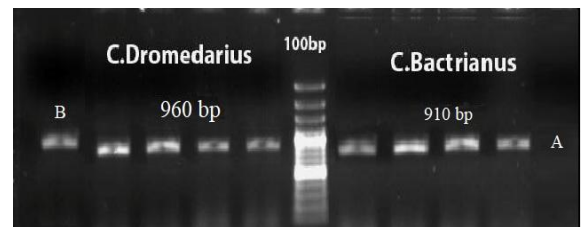
شکل ۲ - ماتریس فواصل ژنتیکی



در ابتدا صحت خوانش‌های توالی‌های کروماتوگرام (با فرمت ab1) به‌وسیله نرم‌افزار Chromas Lite 2.1 (Chromas Lite) (2.1.1 by Australia Technelysium Pty Ltd) مورد بررسی قرار گرفت. توالی‌یابی ابتدا و انتهای هر کدام از فایل‌های ورودی مقداری خطا داشت اما سایر قسمت‌های توالی با کیفیت مناسب خوانش شده بودند. در مرحله بعد توالی رفت و برگشت هر کدام از نمونه‌ها (پس از هم سو کردن توالی رفت و برگشت) به کمک CLC Workbench 5.5 زیر هم‌چینی شدند و توالی توافقی برای هرکدام از نمونه‌ها تهیه شد. توالی توافقی برای نمونه‌های هرکدام از شترهای تک‌کوهان و دوکوهان نیز به همین روش تهیه شد.

نتایج و بحث

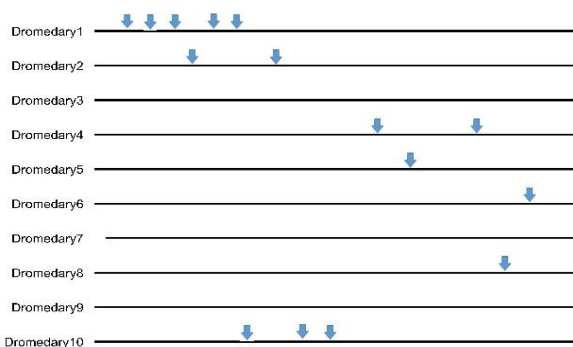
به‌منظور بررسی عملکرد آغازگرهای اختصاصی برای بخشی از راه‌انداز ژن بتاکازئین، الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل یک درصد انجام شد. مطابق شکل ۱، آغازگرها به‌خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ناحیه راه‌انداز ژن بتاکازئین را تکثیر نموده‌اند. به‌عنوان کنترل منفی، مواد تشکیل دهنده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به‌جز DNA (Master mix) استفاده شد که در بخش A در شکل ۱ مشخص شده‌است. در این قسمت هیچ باندهای مشاهده نشد که نشان از عدم آلودگی این مواد به DNA ناخواسته می‌باشد. برای کنترل مثبت از آغازگرهای اختصاصی برای بخشی از راه‌انداز ژن آلفا لاکتالبومین استفاده شد (Saedi et al. 2017). این قسمت با کد دسترسی KP217170 به طول ۱۰۱۲ جفت‌باز در قسمت B شکل ۱ نشان داده شده‌است.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR برای ناحیه راه‌انداز ژن بتاکازئین شترهای تک‌کوهان و دوکوهان به‌ترتیب با طول ۹۶۰ و ۹۱۰ جفت‌باز بر روی ژل آگارز یک درصد. A نشان‌دهنده کنترل منفی با Master mix واکنش

آن باشد. در مطالعه (Debeljak et al. (2005، ۲۰۰۵ تراکم عناصر تنظیمی در ۷۵۰ باز اولیه راه‌انداز تمامی گونه‌ها زیاد گزارش نشد و بر خلاف آن این تراکم بین ناحیه‌ی ۷۵۰- تا ۱۰۰۰- و ۱۵۰۰- تا ۲۰۵۰- زیاد به دست آمد. از آنجایی که توالی به دست آمده از این تحقیق تنها تا باز ۱۱۴۸- توالی‌یابی شده بود، باز هم ۵۷ درصد از موتیف‌های پیدا شده یعنی ۱۱ موتیف از ۱۹ موتیف در این ناحیه قرار داشت. پس نتایج این مطالعه این قسمت از نتایج (Debeljak et al. (2005 را تایید کرد.

اما نتیجه‌ی دیگر (Debeljak et al. (2005 این بود که در بین ناحیه ۷۵۰- تا ۱۳۰۰- تمامی گونه‌ها حداقل دو موتیف STAT5 مشاهده می‌شود که در این مورد ما به چنین نتیجه‌ای نرسیدیم و این موتیف مشاهده نشد که شاید دلیل آن عدم توالی‌یابی تا باز ۱۳۰۰- بود. از دیگر نتایج این افراد که توسط این تحقیق تایید شد می‌توان به حضور موتیف AP-1 و OCT-1 اشاره کرد که سهم هر کدام یک موتیف بود که البته OCT-1 قبلاً در موش و گوسفند مشاهده شده بود. (Rosen et al. (1999 گزارش کردند که C/EBP یک خانواده موتیف شدیداً حفاظت شده است که در دایمریزاسیون و اتصال DNA بسیار اهمیت دارند. به گفته روزن و همکاران این فاکتورها در راه‌انداز ژن بتاکازئین موش شامل چهار موتیف بین نواحی ۸۲- تا ۲۴۰- بود که در شتر این موتیف شامل دو تکرار و در نواحی ۸۷۴- و ۴۶۷- مشاهده شد.



شکل ۴- نمای کامل زیر هم‌چینی ۱۰ نمونه توالی‌یابی شده شتر تک‌کوهان جهت یافتن تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی

شکل ۳- درخت فیلوژنی توالی راه‌انداز ژن بتاکازئین شترهای تک‌کوهان و دوکوهان ایران و گونه‌های دیگر گرفته شده از بانک ژن NCBI.

با توجه به شکل ۲، شترهای دوکوهان ایران کم‌ترین فاصله ژنتیکی را با توالی ثبت شده از شترهای تک‌کوهان در پایگاه اطلاعاتی NCBI و پس از آن بیش‌ترین شباهت را با گونه شتر تک‌کوهان ایران بررسی شده در این مطالعه (Camelus dromedaris) و سپس بیش‌ترین شباهت یا کم‌ترین فاصله ژنتیکی را با گونه گاو کوهان‌دار (Bos grunniens) داشتند. در این بین کم‌ترین شباهت توالی به دست آمده برای شترهای دوکوهان ایران با الاغ (Equus Asinus) به دست آمد. البته در این بین بیش‌ترین فاصله ژنتیکی نسبت به هم متعلق به دو گونه بز (Capra hircus) و الاغ (Equus Asinus) بود.

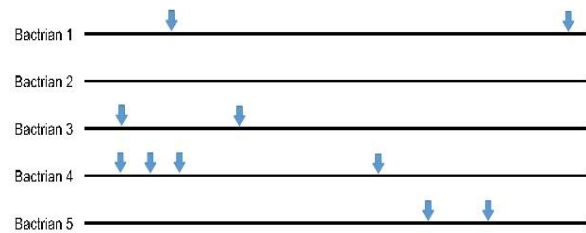
بر اساس فواصل ژنتیکی به دست آمده در شکل ۳ حیوانات به سه شاخه تقسیم می‌شوند. در شاخه‌ی شماره سه، دو زیر شاخه مشاهده می‌شود که در آن گونه‌های شتر در نزدیک‌ترین فاصله نسبت به هم قرار دارند. بر اساس نتایج به دست آمده از درخت فیلوژنی نیز، بالاترین درصد تطابق با شترهای ایرانی پس از شتر تک‌کوهان ثبت شده در NCBI (Camelus dromedaries) متعلق به گاو کوهان‌دار (Bos grunniens) است و کم‌ترین تطابق با شتر در بین گونه‌های بررسی شده متعلق به الاغ (Equus Asinus) و اسب (Equus ferus caballus) می‌باشد.

هشت نوع هاپلوتایپ متفاوت در شتر تک‌کوهان (شکل ۴) و پنج هاپلوتایپ در شتر دوکوهان (شکل ۵) شناسایی شد. ولی در توالی توافقی نهایی پس از زیرهم‌چینی توالی توافقی شترهای ایران با توالی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI جهشی گزارش نشد. در توالی توافقی شترهای تک‌کوهان و دوکوهان توسط پایگاه اطلاعاتی سافت بری^۱ در مجموع ۳۲ موتیف مشاهده شد که ۲۹ عدد غیر تکراری و از این بین تنها ۱۹ عدد شناخته شده بودند که در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

یکی از اهداف این مطالعه جست‌وجوی تفاوت‌های تک‌نوکلئوتیدی بود که جهشی در توالی‌ها یافت نشد. علت این امر می‌تواند حفاظت شدید ناحیه راه‌انداز به دلیل وظیفه تنظیمی

¹ -www.softberry.com

شکل ۵- نمای کامل عمل زیرهم چینی پنج نمونه توالی یابی شده شتر دوکوهان جهت یافتن تفاوت های تک نوکلئوتیدی



جدول ۳- موتیف های شناسایی شده در قسمتی از راه انداز ژن بتاکازین شیر شتر تک کوهان و دوکوهان ایران

مکان در ژن	توالی موتیف	نام موتیف
-۵۳۸	TGACTTCT	AP-1
-۴۳۰	TGACAAGATAA	Evi-1
-۵۹۳	TACTCCCT	TFII-I
-۳۸۸	CACCTG	MyoD
-۶۲۲	CTTTCTCTTT	ISGF2
-۸۶۵	ACTTCCAT	Oct-1
-۸۷۴ و -۴۶۷	GAGGAGGG	C/EBP
-۶۸۷	GGTGGGG	CAC-binding
-۹۸۹	TTCATAAA	TFIID
-۵۴۳	AACTAAATC	kni/krnl/egon
-۹۸۷	ATCAATCA	PBX proteins
-۵۱۹	ATAATTAAT	Brn-3
-۸۲۲ و -۸۱۵	TCAGCTGA	ESF-1
-۳۷۵	TGGCCGTTG	c-Myb
-۸۲۵	TTCATGGAA	Stat92E
-۹۵۰	CTTTGTA AAA	Fkh
-۸۷۳	CCATCTGC	Bhlh
-۸۵۲	CTTCCTCC	Spi-1/PU.1
-۸۶۶	GCAGATGG	Ngn3
-۱۰۲۲	ATGCAAAT	OCT- FACTOR (IGNFA)

در برابر جهش در مقایسه با راه انداز ژن آلفا لاکتالبومین در شیر شتر باشد.

سپاسگزاری

آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد که امکان این تحقیق را فراهم کرد. کشتارگاه مشهد (به خاطر امکان فراهم کردن نمونه خون شتر تک کوهان). ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل (به خاطر امکان فراهم کردن نمونه خون شتر دو کوهان).

در مطالعات (Saedi et al. (2017 بر روی ناحیه پروموتوری ژن آلفا لاکتالبومین شیر در شترهای تک کوهان و دوکوهان ایران، چهار جهش در شتر تک کوهان و سه جهش در شتر دوکوهان مشاهده شد اما در این مطالعه با وجود فراوانی بیشتر هاپلوتایپی (هشت هاپلوتایپ برای شتر تک کوهان و پنج هاپلوتایپ برای شتر دو کوهان) نسبت به مطالعه ذکر شده (پنج هاپلوتایپ در شتر تک کوهان و چهار هاپلوتایپ در شتر دو کوهان) جهشی یافت نشد. دلیل این موضوع می تواند حفاظت بیشتر از راه انداز ژن بتاکازین

منابع

Debeljak MA, RUŠ A, Frajman POLONA, Lenasi TINA, Narat MOJCA, Baldi ANTONELLA, Dovic PETER (2005). Functional analysis of the bovine beta-and kappa

casein gene promoters using homologous mammary gland derived cell line. Archives Animal Breeding 48:334-345. Farrell HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Swaisgood HE (2004).

- Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of dairy science* 87:1641-1674.
- Gatesy J, Hayashi C, Cronin MA, Arctander P (1996). Evidence from milk casein genes that cetaceans are close relatives of hippopotamid artiodactyls. *Molecular biology and evolution* 13:954-963.
- Haddadin MSY, Gammoh SI, Robinson RK (2008). Seasonal variation in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research* 75:8-12.
- Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G (2009). The composition of camel milk: a metaAnalysis of the Literature data. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:95-101.
- Kamiński S, Cieślińska A, Kostyra E (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of applied genetics* 48:189-198.
- KAPPELER S, FARAH Z, PUHAN Z (1998). Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research* 65:209-222.
- Mishra BP, Mukesh M, Prakash B, Sodhi M, Kapila R, Kishore A, Bujarbaruah KM (2009). Status of milk protein, b-casein variants among Indian milch animals. *Indian Journal of Animal Sciences* 79:722-5.
- Michael R, Leuze, Tatiana V Karpinets, Mustafa H Syed, Alexander S, Beliaev and Edward C, erbacher (2012). Binding Motifs in Bacterial Gene Promoters Modulate Transcriptional Effects of Global Regulators CRP and ArcA. *Gene Regulation and Systems Biology* 6: 93-107.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Mortensen RM (1999). PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Molecular cell* 4:611-617.
- Salmen SH, Abu-Tarboush HM, Al-Saleh AA, Metwalli, AA (2012). Amino acids content and electrophoretic profile of camel milk casein from different camel breeds in Saudi Arabia. *Saudi journal of biological sciences* 19:177-183.
- Saedi N, Tahmoorespur M, Nassiri M, Sekhavati M, RAEI TM (2017). Sequencing and analysis of partial promoter region of Alpha lactalbumin gene in Iranian dromedary and bactrian camels. (In Farsi).
- Singh S, Kumar P, Bhattacharya TK, Bushan B, Sharma A (2007). Comparative study of the nucleotide sequence of the beta casein gene of buffalo (*bubalus bubalis*) with various livestock species. *Buffalo bulletin ibic, kasetsart university, po box 1084 bangkok 10903, Thailand* 26:1.
- Shamsia SM (2009). Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 1:52-58.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30:2725-2729.
- CLC Genomics Workbench 5.5
(<https://www.qiagenbioinformatics.com/>)