



## تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹

صفحه‌های ۱۹۸-۱۸۷

### بررسی الگوی ترجیح کدونی و ارتباط آن با ژن‌هایی با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد

بتول اصغری اسفدن<sup>۱</sup>، غلامرضا داشاب<sup>۲\*</sup>، محمدحسین بنابازی<sup>۳</sup>، محمد رکوعی<sup>۲</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳. استادیار، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۱۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۱۰/۲۷

#### چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی الگوی ترجیح کدونی و ارتباط آن‌ها با بیان ژن‌های با بیان متفاوت در بین نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد بود. در این مطالعه، از نتایج تجزیه بیان ژن افتراقی با استفاده از فن‌آوری RNA-Seq مربوط به نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد (دو تیمار و هر تیمار دو تکرار بیولوژیک) استفاده شد. به همین منظور پس از تعیین نواحی ORF برای این ژن‌ها، از نرم‌افزار CodonW جهت برآورد شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی از جمله CAI، ENC، GC و GC3s استفاده شد. تجزیه ترجیح کدونی برای نواحی ORF ژن‌های با بیان متفاوت، وجود همبستگی بالا و معنی‌داری (۰/۷۴) بین مقادیر شاخص GC و GC3s نشان داد. هم‌چنین همبستگی بالا و معنی‌داری بین مقادیر ENC با GC کل و GC3s همبستگی بالایی مشاهده شد که نشان‌دهنده نقش جهش در شکل‌گیری کدون‌ها می‌باشد. براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، عواملی از جمله مقدار GC، جهش و سطح بیان ژن نقش مهمی در شکل‌گیری کدون‌ها در ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش داشتند. این مطالعه اولین مقایسه بین گاوهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد می‌باشد که به درک بهتر سازوکارهای تکاملی شکل‌گیری الگوی ترجیح کدونی و نیز بررسی ارتباط آن با بیان ژن کمک می‌کند.

**کلیدواژه‌ها:** گاو آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد، ژن‌های متفاوت بیان‌شده، ترجیح کدونی، گاو خالص سیستانی، RNA-Seq.

### Evaluation of Codon usage pattern and its relation with differentially expressed genes between two populations of purebred and crossbred Sistani and Montbeliarde cows

Batoul Asghari Esfeden<sup>1</sup>, Gholam Reza Dashab<sup>2\*</sup>, Mohammad Hossein Banabazi<sup>3</sup>, Mohammad Rokouei<sup>2</sup>

1. Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of IRAN (ASIR), Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Accepted: January 17, 2020

Received: December 8, 2019

#### Abstract

The aim of the present study was to investigate the codon usage pattern and their relationship with gene expression for genes with different expression between pure and crossbred Sistani and Montbeliarde breed. In this study, the results of differential gene expression analysis using RNA-Seq technology between pure and crossbred Sistani and Montbeliarde breed (two pure and two its crossbred) were used. For this purpose, after determining the ORF regions for these genes, CodonW software was used to estimate codon usage pattern indices including CAI, ENC, GC and GC3s. Results showed that there was a significant correlation between total GC and GC3s (0.74). There was also a significant correlation between ENC and GC and GC3s (0.65, 0.77), indicating the role of mutation in codon formation. Based on the results of this study, the factors such as nucleotide composition (GC content), mutation, and gene expression level played important roles in codon formation in the genes studied in this study. This study is the first comparison between pure and crossbred Sistani and Monti-billiard samples, which helps to better understand the evolutionary mechanisms of codon usage pattern formation and its association with gene expression.

**Keywords:** Codon usage pattern, Crossbreed of Sistani and Montbeliarde Cow, Differential expression gene (DEG), RNA-Seq, Sistani cow.

## مقدمه

بیولوژیکی یا به‌عنوان واحدهای کدکننده خاص و همچنین برای شناسایی اجزا mRNAs ضروری هستند. کدهای ژنتیکی از ۶۱ کدون برای رمزگذاری ۲۰ اسیدآمین و سه کدون برای خاتمه‌دادن فرآیند ترجمه در سنتز پروتئین استفاده می‌کنند. معمولاً اسیدهای آمینه با چندین کدون مترادف رمزگذاری می‌شوند که دامنه آن‌ها بین دو تا شش کدون است، البته تنها استثنا مربوط به اسیدهای آمینه متیونین و تریپتوفان است که فقط یک کد رمز یا کدون شناسایی دارند [۱۲]. از طرف دیگر، کدون‌های مترادف (همه کدون‌های خاص یک اسیدآمین) در ژنوم یک موجود با فراوانی متفاوتی استفاده می‌شوند به وقوع این رخداد در ژنوم، ترجیح یا تمایل کدون CUB (Codon usage bias) گفته می‌شود [۱۴].

الگوی ترجیح کدونی تا حد زیادی مسئول تنظیم بیان ژن است که می‌تواند در طول رونویسی یا در سطح ترجمه رخ دهد و این فرضیه در طی دهه اخیر عنوان شده است، اما اخیراً این فرضیه با موفقیت، در شناسایی ژن‌های با بیان بالا در باکتری‌ها و ژنوم‌های یوکاریوتیک مورد استفاده قرار گرفته است [۱۵].

تعدادی از فرضیه‌ها در مورد عوامل مؤثر بر الگوی ترجیح کدونی غالب هستند و تلاش شده است تا توزیع کدون‌ها در ژن‌های کدکننده پروتئین و همچنین تغییر در الگوی ترجیح کدونی در بین کدون‌های مختلف مترادف در هر ارگانسیم توضیح داده شود [۲ و ۱۶].

گاو نژاد سیستانی تنها نژاد گوشتی شناخته‌شده در ایران است و از خصوصیات این نژاد، مقاومت بالا به بیماری‌ها، آسان‌زایی، عدم وابستگی به کمیت و کیفیت غذا، قابلیت تطابق‌پذیری به محیط زیست جدید، قدرت شنا و تعلیف در آب‌های دریاچه هامون و مهم‌تر از همه، مقاومت به گرما و تغییرات جوی می‌باشد (شکل ۱). بخش عمده پرورش‌دهندگان و روستاییان منطقه تمایلی به پرورش نژاد خالص این دام به‌علت عدم وجود تغذیه رایگان ندارند و گرایش به آمیخته‌گری با اسپرم گاو مونت‌بیلیارد در جهت تولید شیر در منطقه وجود داشته است [۱۳]. گاو نژاد مونت‌بیلیارد از نژادهای فرانسوی است که بیش‌تر جهت تولید شیر و فرآورده‌های لبنی پرورش داده می‌شود. هر چند این نژاد یک نژاد شیری است، اما برای پروراندی و تولید گوشت نیز بسیار سودآور است. به همین دلیل گاو نژاد مونت‌بیلیارد را نژادی شیری-گوشتی می‌دانند (شکل ۱). در ایران تاکنون مطالعات اندکی درباره تغییرات ناشی از آمیخته‌گری در گاو سیستانی و آمیخته‌های آن صورت گرفته است. آمیخته‌گری یک روش متداول برای بهره‌مندی از تفاوت‌های ژنتیکی بین نژادهای مختلف و افزایش قابلیت‌های موجود است.

یکی از حوزه‌های ضروری در پژوهش‌های گونه‌های اهلی شناسایی ژن‌هایی است که صفات تولیدی مهم را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۱۳]. کدون‌ها مرکز تمام فعالیت‌های



شکل ۱. تصویر سمت چپ گاو نژاد مونت‌بیلیارد، تصویر میانی گاو نژاد سیستانی و تصویر سمت راست آمیخته سیستانی با نژاد

مونت‌بیلیارد

## تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹

ترجیح کدونی در بسیاری از گونه‌ها از جمله ویروس‌ها، پروکاریوت‌ها و هم‌چنین در تعدادی از گونه‌های یوکاریوتی مورد بررسی قرار گرفته است [۱۱، ۱۳ و ۱۸]. مطالعات اندکی از بررسی الگوی ترجیح کدونی در حیوانات تاکنون گزارش شده است [۷].

امروزه از فن‌آوری RNA-Seq در جهت بررسی پروفایل بیان ژن و تعیین ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو گونه استفاده می‌شود. با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی می‌توان روی داده‌های مولکولی تحلیل‌های دقیق، سریع و گسترده‌ای را انجام داد. بررسی بیوانفورماتیکی امکان قدم‌زدن در سطح پروتئین، RNA و DNA را ایجاد کرده تا از طریق آن برنامه‌ریزان اصلاح دام بتوانند تصمیم‌های راحت‌تری درباره نقشه‌های اصلاحی داشته باشند. مقایسات بین گونه‌ای نیز این امکان را فراهم کرده تا با توجه به صفت مورد نظر در بین گونه‌ها، توالی که هدف اصلاح‌گران را بهتر تأمین می‌کند شناخته شود و در مرحله بعد با مهندسی ژنتیک، جایگزین توالی ژن مربوط در دام‌های هدف گردد. این رویه به‌خصوص در ژن‌هایی که در ارتباط با صفات رشد، صفات تولیدی و صفات مربوط به مقاومت به بیماری‌ها هستند اهمیت واقعی خود را نشان می‌دهد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی دقیق‌تر ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد و هم‌چنین فرضیه ارتباط میزان بیان ژن و الگوی ترجیح کدونی و عوامل مؤثر در شکل‌گیری کدون‌ها و در واقع تنظیم بیان ژن می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

در این پژوهش از داده‌های RNA-Seq مربوط به گاو نژاد خالص سیستانی و آمیخته آن با مونت بیلارد استفاده شد. در ابتدا از سیاهرگ دمی گاوهای نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد (دو تیمار و برای هر تیمار

شاخص سازگاری کدون برای پیش‌بینی بیان ژن، ارزیابی میزان سازگاری ژن‌های ویروسی در دیگر میزبان‌ها و مقایسه ترجیح کدونی در ژن‌های مختلف و در گونه‌های متفاوت استفاده می‌شود [۶]. گزارش شده است که الگوی ترجیح کدونی با فرآیندهای طبیعی نظیر جهش، انتخاب و پس‌روی ژنتیکی مرتبط هستند و به‌عنوان مدل ترکیبی (جهش، انتخاب و پس‌روی ژنتیکی) شناخته می‌شوند [۳]. مطالعات ژنومی صورت‌گرفته نشان می‌دهد که عواملی نظیر نسبت نوترکیبی، مقدار GC، عواملی از جمله طول ژنوم، مقدار سطوح بیان ژن، ساختار RNA، ساختار پروتئین، طول اینترون، اندازه جمعیت، استرس محیطی، پروتئین‌های آب‌گریز همه این‌ها منجر به استفاده غیرتصادفی از کدون‌های مترادف در فرآیند ترجمه می‌شوند که تأثیرگذار بر تکامل مولکولی ژنوم هستند. آنچه امروز جمعیت‌های مختلف را بر مبنای یکسری صفات از یکدیگر متمایز می‌کند تفاوت میزان بیان ژن‌های موجود در این مناطق است که تحت تأثیر انتخاب قرار گرفته‌اند [۱۰].

اگرچه جهش‌های بی‌معنی در توالی پروتئین‌ها خاموش هستند، اما کدون‌های مترادف به‌طور وسیعی در داخل و بین ژنوم حیوانات دیده می‌شوند [۱۴]. لذا مطالعه الگوی کاربرد کدون‌ها برای درک بهتر بیولوژی مولکولی و تکامل، ترجمه mRNA، طراحی ترانس‌ژن‌ها، کشف ژن‌های جدید و دیگر کاربردهای بیولوژیکی در طی دهه‌های اخیر مورد ارزیابی قرار گرفته است [۹]. با استفاده از اطلاعات توالی ژنوم موجودات مختلف، می‌توان الگوی ترجیح کدونی را در سراسر ژنوم شناسایی نموده و از الگوهایی که مرتبط با بیان و ترجمه ژن هستند در جهت انتخاب بهره‌جست و یا حتی از آن برای بررسی وقایعی که در اثر عواملی نظیر انتخاب، جهش در گذشته رخ می‌دهد یا به‌عبارتی جایگاه‌هایی که کاندیدای انتخاب قرار گرفته‌اند، استفاده کرد. الگوی

تلفیق ترانسکریپت‌ها و آنالیز بیان افتراقی) در محیط گرافیکی (GNU) سیستم عامل لینوکس انجام شد. پس از آنالیز داده‌های RNA-Seq مربوط به چهار نمونه گاوهای نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد، ۴۵ ژن شناسایی شدند که تفاوت معنی‌داری در بیان در بین دو جمعیت مورد مطالعه داشتند که مبنای مطالعه حاضر قرار گرفت (جدول ۱). اطلاعات مربوط به توالی این ژن‌ها از بانک اطلاعاتی [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) اخذ شدند.

دو تکرار بیولوژیکی) خون‌گیری شد. RNA با استفاده از کیت RNAEsay شرکت کایژن (کیژن، والنسیا، کالیفرنیا، آمریکا)، طبق دستورالعمل پروتکل‌های سازنده استخراج شد. جهت ساخت کتابخانه cDNA و تعیین توالی، نمونه‌ها به شرکت BGI چین (شنژن، چین) انتقال داده شدند. پس از اخذ داده‌ها، تمامی مراحل آماده‌سازی و تجزیه و تحلیل آن‌ها اعم از (کنترل کیفیت داده‌ها، ویرایش داده‌ها، مکان‌یابی خوانش‌ها بر روی ژنوم مرجع،

جدول ۱. ژن‌های با بیان متفاوت در بین جمعیت گاوهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد

q-value	p-value	جایگاه ژنی ۱	نام ژن
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۱۴۷۰۴۰۹۶۸-۱:۱۴۶۹۸۹۲۴۳	COL18A1
۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۰۱	۳۰۶۸۴۲۴۵-۱۳:۳۰۶۰۴۴۸۸	MINDY3
۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۰۱	۵۷۸۷۹۰۴۲-۱۳:۵۷۸۷۴۰۷۶	TUBB1
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۷۴۹۴۷۷۶۰-۱۳:۷۴۹۴۳۶۲۰	ENSBTAG00000017328
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۱۷۲۸۸۱۷-۱۶:۱۷۱۶۸۰۲	SOX13
۰/۰۰۴	۰/۰۰۰۰۱	۳۰۳۵۹۱۴۷-۱۶:۳۰۳۰۴۵۳۹	STUM
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۱۳۳۱۸۲۹۲-۱۶:۱۳۳۱۴۱۹۱	RGS1
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۱۴۸۳۱۱۵۷-۱۹:۱۴۸۳۴۶۶۹	CCL5
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۴۰۶۶۳۷۶۷-۱۹:۴۰۶۵۵۲۲۱	PPP1R1B
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۲۶۲۸۵۵۸۳-۱۹:۲۶۲۵۴۱۷۹	WSCD1
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۶۱۵۸۵۸۳۸-۲:۶۱۵۸۲۱۲۴	CXCR4
۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۰۵	۶۷۲۸۳۰۸۹-۲۱:۶۷۲۷۴۷۹۹	DLK1
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۷۱۵۳۱۴۴۱-۲۱:۷۱۵۳۰۰۱۲	ENSBTAG00000048268
۰/۰۲۶	۰/۰۰۰۰۱	۲۱۴۹۸۵۳۹-۲۲:۲۱۴۹۲۸۹۵	BHLHE40
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۷۳۱۸۸۴۰-۲۳:۷۲۹۰۴۵۴	COL11A2
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۲۷۴۰۶۳۶۰-۲۳:۲۷۴۰۳۱۲۷	MPIG6B
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۲۱۴۷۷۳-۲۵:۲۱۴۰۰۵	GLNC1
۰/۰۲۶	۰/۰۰۰۰۱	۳۹۵۲۶۲۳۸-۲۵:۳۹۵۱۵۶۸۷	SLC29A4
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۳۴۶۹۹۴۸۰-۲۷:۳۴۹۸۶۵۷۶	IDO1
۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۰۱	۱۷۵۱۲۵۹۴-۲۹:۱۷۴۹۶۵۷۱	ENSBTAG00000040202
۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۰۱	۹۲۳۰۹۰۳۶-۳۰:۹۲۲۶۰۷۶۲	ACOT11
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۱۰۴۷۲۷۳۰۱-۵:۱۰۴۶۰۳۴۳۱	VWF
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۹۰۶۷۴۱۷۳-۶:۹۰۶۷۳۲۰۴	PF4
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۱۱۰۶۱۳۰۱-۸:۱۱۰۴۳۹۴۰	CLU
۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۰۱	۷۷۱۰۷۰۹-۸:۷۶۵۸۸۷۶۸۷۶	BLK
۰/۰۳۶	۰/۰۰۰۰۱	۱۹۸۲۰۹۵۲-۱۹۷۷۷۷۹۸X:	FHL1
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۵۳۷۰۵۷۷۸-۵۳۷۰۳۶۹۳X:	MUMIL1
۰/۰۲۳	۰/۰۰۰۰۵	۹۷۹۳۵۷۷۵-۹۷۹۰۸۶۱۵ X:	ALAS2

۱. در ستون جایگاه ژن، عدد سمت چپ شماره کروموزوم و اعداد بعد از آن شماره نوکلئوتید شروع و پایان ژن را نشان می‌دهد.

GC3s (GC content at third codon base): این شاخص نشان‌دهنده مقدار کلی GC (درصد سیتوزین و گوانین) در موقعیت سوم کدون می‌باشد که اغلب نشان‌دهنده قدرت جهش می‌باشد.

CAI (Codon Adaptation Index): نسبت کدون‌های مترادف استفاده‌شده به کدون‌های با فراوانی بالا و یا ترجیح داده‌شده برای یک ژن است که براساس فرمول ارائه‌شده توسط [۱۶] و مقدار آن در محدوده ۰-۱ است. مقادیر نزدیک به یک نشان‌دهنده انحراف بیش‌تر به سمت ژن‌های با بیان بالا است. از این‌رو ژن‌های دارای عدد بزرگ‌تر میزان بیان بیش‌تری دارند.

Fop (Frequency of optimal codon): این شاخص عبارت است از نسبت بین فراوانی کدون‌های بهینه و تعداد کل کدون‌های مترادف. این شاخص از صفر (زمانی که ژن کدون بهینه ندارد) تا ۱ (زمانی که یک ژن ترکیبی از کدون‌های بهینه دارد) تغییر می‌کند.

CBI (Codon Bias Index): این شاخص بیانگر این است که یک ژن تا چه حد از کدون مطلوب (Optimal) استفاده می‌کند. در محدوده بین +۱ تا -۱ قرار دارد که اگر مقدار آن یک باشد یعنی تمایل به استفاده از کدون مطلوب زیاد و اگر مقدار آن صفر باشد نشان‌دهنده استفاده تصادفی از کدون‌ها می‌باشد. در برخی موارد ممکن است تعداد کدون‌های مطلوب کم‌تر از حد موردانتظار باشد، در این صورت مقدار این شاخص منفی برآورد می‌شود. برای بررسی ارتباط و وجود همبستگی بین شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی و بیان ژن و همچنین رسم گراف‌ها از نرم‌افزار آماری R (نسخه ۳/۶/۱) استفاده شد.

### نتایج و بحث

شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی برای نواحی ORF ژن‌های با بیان متفاوت در بین گاوهای نژاد خالص و

به‌منظور بررسی الگوی ترجیح کدونی برای ژن‌های با بیان متفاوت مورد مطالعه، در ابتدا نواحی ORF برای هر ژن به‌صورت آنلاین در سایت [www.bioinformatics.org](http://www.bioinformatics.org) شناسایی شدند و بعد از آن ویرایش بر روی این نواحی صورت گرفت، به این صورت که نواحی با طول کم‌تر از ۱۰۰ جفت باز و نواحی دارای کدون پایانی میانی حذف شدند. پس از آن شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی با استفاده از نرم‌افزار CodonW (نسخه ۱/۳) برای هر ژن محاسبه گردید که در زیر به این شاخص‌ها پرداخته شده است.

RSCU (Relative Synonymous Codon Usage):

شاخصی است که به‌منظور بررسی تنوع کدونی مشترک استفاده شده در بین ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این شاخص برای تخمین میزان انحراف کدون‌های برتر در ژن‌های با بیان بالا و همچنین تعیین کدون‌های برتر در مجموعه‌ای از ژن در یک گونه استفاده می‌شود؛ که برحسب رابطه ۱ محاسبه می‌شود [۱۶]. دامنه تغییرات این شاخص در محدوده بین ۰-۱ می‌باشد و در صورتی که فراوانی آن بالاتر از یک باشد، نشان‌دهنده ترجیح یا تمایل کدونی است.

$$\text{RSCU} = \frac{X_i}{1/n \sum_{i=1}^n X_i} \quad \text{رابطه (۱)}$$

که در این رابطه،  $n$ ، تعداد کدون‌های مترادف ( $1 \leq n \leq 6$ ) برای اسید آمینه مورد نظر و  $X_i$ ، تعداد دفعات وقوع کدون است.

ENC (Effective Number of Codon): تعداد

کدون‌های مؤثر استفاده‌شده در بیان ژن محسوب می‌شود که براساس فرمول ارائه‌شده توسط [۲۰] محاسبه می‌شود. دامنه شاخص مذکور بین ۶۱-۲۱ قرار دارد که در صورت استفاده فقط از یک کدون از کدون‌های مترادف برای یک ژن مقدار آن ۲۱ و در واقع نشان‌دهنده بیش‌ترین ترجیح کدونی در صورت استفاده از همه کدون‌های مترادف یک ژن به‌طور یکسان، مقدار آن ۶۱ خواهد بود.

به عبارتی کدون‌های مترادف متنوع استفاده شده در بین ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش است. در این مطالعه بیش‌ترین انحراف کدونی مربوط به ژن ENSBTAG00000040202 و کم‌ترین انحراف کدونی و در واقع استفاده یکسان از کدون‌های مترادف برای هر اسید آمینه مربوط به ژن ENSBTAG00000017328 بودند (جدول ۲).

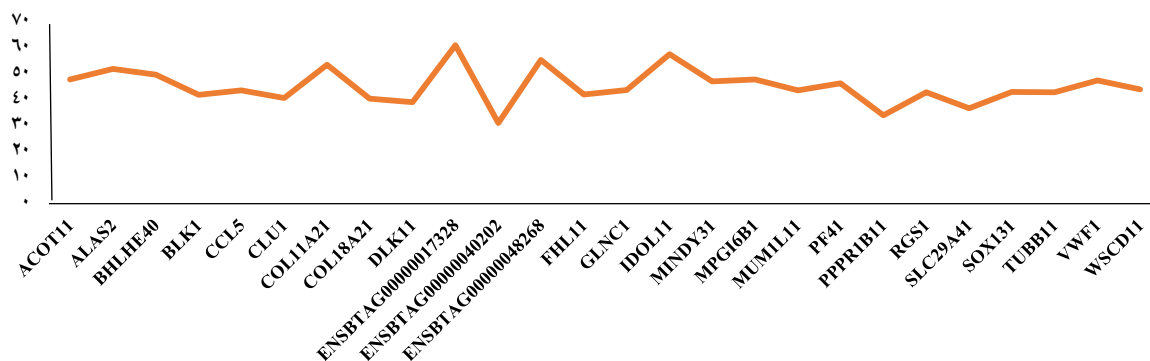
آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد در (جدول ۲) آورده شده است. ENC شاخصی است که برای تخمین میزان انحراف کدونی در یک ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۹ و ۲۰]. در این پژوهش، مقدار این شاخص در محدوده ۶۱-۳۱ قرار داشت (شکل ۲)، که نشان‌دهنده کدون‌های مؤثر متنوع و

جدول ۲. میانگین شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی برای ژن‌های با بیان متفاوت در بین گاوهای نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلیارد

شاخص‌های الگوی ترجیح کدونی					ژن‌های با بیان متفاوت
ENC	GC <sub>3S</sub>	FOP	CBI	CAI	
۴۷/۷۴	۰/۴۷	۰/۳۹	-۰/۰۳	۰/۱۷	ACOTH1
۵۱/۸۸	۰/۵۸	۰/۴۵	۰/۰۵	۰/۲۵	ALAS2
۴۹/۶۵	۰/۶۰	۰/۳۳	-۰/۱۱	۰/۱۲	BHLHE40
۴۱/۸۹	۰/۶۶	۰/۴۷	۰/۰۸	۰/۲۳	BLK
۴۳/۶۲	۰/۷۸	۰/۴۹	۰/۱۲	۰/۲۹	CCL5
۴۰/۶۴	۰/۵۶	۰/۴۹	۰/۱۳	۰/۲۵	CLU
۵۳/۵۱	۰/۵۸	۰/۳۹	-۰/۰۲	۰/۱۴	COL11A2
۴۰/۳۴	۰/۷۳	۰/۴۴	۰/۰۶	۰/۱۴	COL18A2
۳۸/۹۸	۰/۶۲	۰/۴۲	-۰/۰۰۲	۰/۱۹	DLK1
۶۱	۰/۶۱	۰/۴۰	۰/۰۷	۰/۱۶	ENSBTAG00000017328
۳۱	۰/۴۸	۰/۴۲	۰/۰۵	۰/۱۸	ENSBTAG00000040202
۵۵/۳۱	۰/۵۹	۰/۴۵	۰/۰۸	۰/۱۹	ENSBTAG00000048268
۴۱/۰۹	۰/۵۷	۰/۴۴	۰/۰۶	۰/۲۳	FHL1
۴۳/۷۳	۰/۶۶	۰/۵۷	۰/۲۶	۰/۳۷	GLNC1
۵۷/۵۰	۰/۵۳	۰/۴۳	۰/۰۰۷	۰/۲۰	IDOL1
۴۷/۰۵	۰/۳۸	۰/۳۸	-۰/۲۴	۰/۱۶	MINDY3
۴۷/۷۴	۰/۶۵	۰/۴۷	۰/۱۴	۰/۱۹	MPGI6B
۴۳/۶۰	۰/۴۲	۰/۳۷	-۰/۰۷	۰/۱۹	MUM1L1
۴۶/۲۹	۰/۴۴	۰/۴۱	۰/۰۶	۰/۱۹	PF4
۳۳/۹۲	۰/۸۱	۰/۳۳	-۰/۱۲	۰/۱۰	PPPR1B1
۴۲/۸۲	۰/۳۵	۰/۳۱	-۰/۱۴	۰/۱۲	RGS1
۳۶/۶۷	۰/۷۰	۰/۵۵	۰/۲۳	۰/۲۴	SLC29A4
۴۲/۹۶	۰/۶۲	۰/۴۵	۰/۱۰	۰/۲۱	SOX13
۴۲/۹۱	۰/۶۲	۰/۴۵	۰/۰۶	۰/۲۴	TUBB1
۴۷/۴۴	۰/۵۷	۰/۴۲	۰/۱۸	۰/۱۷	VWF
۴۳/۹۰	۰/۵۵	۰/۴۰	-۰/۰۰۲	۰/۱۶	WSCD1

CAI: Codon Adaptation Index, ENC: Effective Number of Codon, GC<sub>3S</sub>:GC content at third codon base, Fop: Frequency of optimal codon, CBI: Codon Bias Index

بررسی الگوی ترجیح کدونی و ارتباط آن با ژن‌هایی با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلارد



شکل ۲. میزان شاخص ENC برای ژن‌های با بیان متفاوت در بین گاوهای نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلارد

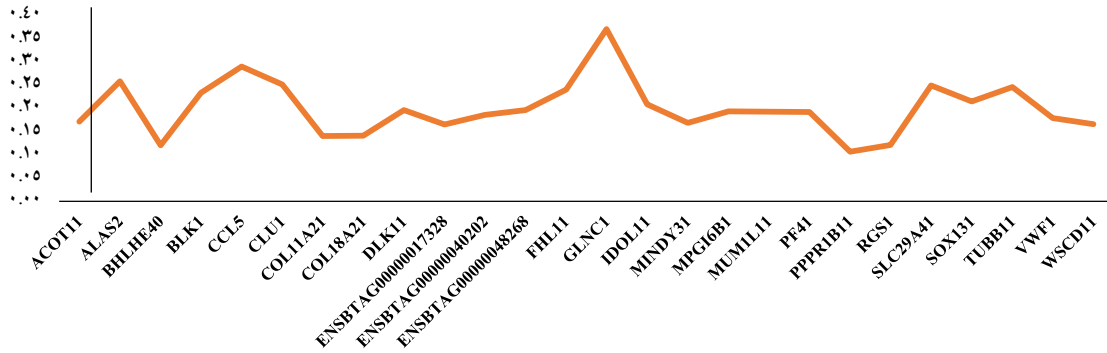
کردند که مقدار شاخص سازگاری کدون (CAI) در گونه گاو بالاترین و در گوسفند کم‌ترین مقدار برای ژن کالپستاتین می‌باشد. این بدین معنی است که یک چهارم از محصول فنوتیپی پروتئین کالپستاتین در گونه گاو حاصل بیان کدون‌های بهینه می‌باشد. هم‌چنین در پژوهشی [۱]، توانستند با بهینه‌سازی ژن زیر واحد بتاکراتوکسین شاخص سازگاری کدون که برای ژن طبیعی ۶۱ درصد بوده است را در ژن بهینه‌شده به مقدار ۹۲ درصد برسانند.

همبستگی بین شاخص CAI و ENC نشان‌دهنده این است که سطوح بیان ژن عاملی تأثیرگذار در شکل‌گیری کدون‌ها هستند (جدول ۳). ارتباط بین CAI و ENC در شکل (۴) آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌هایی که بیان متفاوتی دارند از کدون‌های مؤثر بیشتری استفاده کردند و فرایند ترجمه تحت تأثیر کدون‌های مورد استفاده قرار داشت. در این پژوهش ژن PPP1R1B بالاترین مقدار بیان ژن را در بین دو جمعیت گاوهای نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت‌بیلارد را داشت. مقدار CAI برای این ژن همان‌گونه که در جدول (۲) آورده شده است ۰/۱۰ به‌دست آمد. همبستگی بین شاخص‌های CAI و ENC برای این ژن در این پژوهش ۰/۹۶ محاسبه شد و این مقدار نشان‌دهنده این است که فرایند ترجمه تحت

معمولاً برای پیش‌بینی سطح بیان ژن، از شاخص CAI استفاده می‌شود. در این پژوهش مقدار این شاخص در محدوده ۰/۳۷-۰/۱۰ به‌دست آمد (شکل ۳). بالابودن این شاخص ارتباط بین الگوی ترجیح کدونی و بیان ژن را نشان می‌دهد. در واقع ژن‌های با عدد بزرگ‌تر برای این شاخص میزان بیان بیشتری را خواهند داشت. در مطالعه‌ای [۵]، از شاخص سازگاری کدون (CAI) برای تخمین ترجیح کدونی در هشت ژن پروتئین‌های ریپوزومی باکتری *Xanthomonas axonopodis pv. Citri* استفاده کردند و گزارش نمودند که مقدار عددی CAI تعیین‌کننده سطح بیان ژن است. آن‌ها گزارش کردند که نتایج حاصل از اندازه‌گیری CAI نشان می‌دهد که این ژن‌ها به‌طور دائم در باکتری بیان می‌شوند و ارتباط مثبتی بین درجه اریب کدونی و سطح بیان در ژن‌های ریپوزومی این باکتری بیماری‌زا وجود دارد. هم‌چنین در پژوهشی [۴] نیز ارتباط سطوح بیان ژن در بافت‌های مختلف انسان را با الگوی ترجیح کدونی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که همبستگی بین شاخص الگوی ترجیح کدونی CAI با سطوح بیان ژن در بافت‌های مختلف انسان وجود دارد. در مطالعه‌ای [۷]، نیز انحراف کدونی برای ژن کالپستاتین در پستانداران مختلف (گاو، گوسفند، بز، انسان و کژگاو) را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش

ترجیح کدونی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که همبستگی بین شاخص کدونی CAI با سطوح بیان ژن در بافت‌های مختلف انسان وجود دارد.

تأثیر کدون‌های مورداستفاده قرار دارد و این ژن از کدون‌های مؤثر بیشتری استفاده می‌نماید. در مطالعه‌ای [۴]، ارتباط سطوح بیان ژن در بافت‌های مختلف انسان را با الگوی



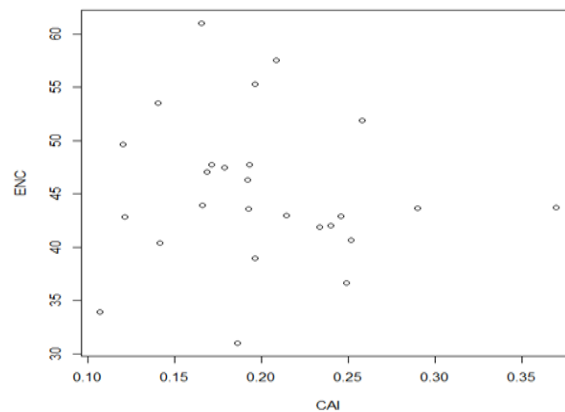
شکل ۳. میزان شاخص CAI برای نواحی ORF ژن‌های با بیان متفاوت در بین گاوهای نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلپارد

جدول ۳. همبستگی بین شاخص‌های مهم الگوی ترجیح کدونی برای ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای خالص و آمیخته سیستانی

ENC	CAI	GC3s	GC	پارامترها
۰/۷۷**	۰/۳۴	-	۰/۷۴**	GC3s
۰/۰۵۹	-	۰/۳۴	۰/۳۶	CAI
-	۰/۰۵	۰/۷۷**	۰/۶۵**	ENC

\*\* معنی‌داری در سطح ۱ درصد.

CAI: Codon Adaptation Index, ENC: Effective Number of Codon, GC3s: GC content at third codon base, GC: GC content.



شکل ۴. رابطه بین شاخص‌های ENC و CAI در بین ژن‌های با بیان متفاوت در بین گاوهای نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلپارد

## تولیدات دامی

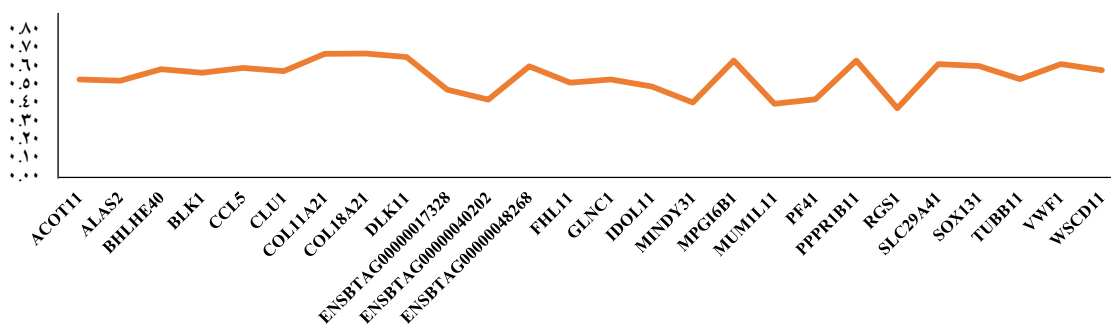
دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹



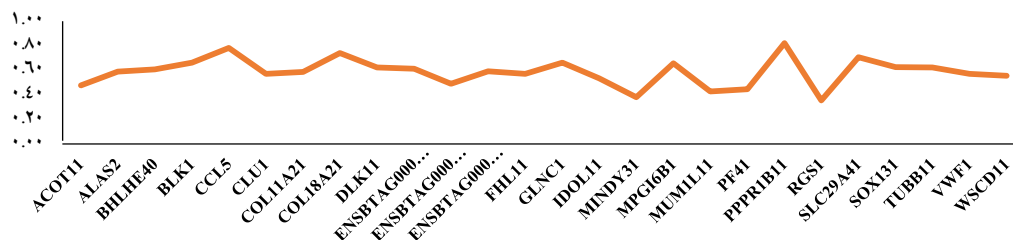
بررسی الگوی ترجیح کدونی و ارتباط آن با ژنهایی با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد

بوده و در صورت عدم همبستگی معنی دار بین این دو شاخص، انتخاب عامل اصلی در شکل گیری کدونها هستند [۱۸]. در این پژوهش همبستگی بین این دو شاخص از نظر آماری معنی دار بوده و مقدار آن ۰/۷۶ با خطای استاندارد ۰/۰۱ برآورد شد (جدول ۳)، که نشان دهنده این است که جهش عامل مهمی در شکل گیری کدونها در این پژوهش بوده است (شکل ۷). در مطالعه‌ای [۲۱]، الگوی ترجیح کدونی را در گونه گیاهی *Herbaceous peony* به دست آوردند و گزارش کردند که جهش عامل اصلی در شکل گیری کدونهای مورد مطالعه بوده و همبستگی معنی دار ۰/۵۹ را بین دو شاخص GC و GC3s گزارش نمودند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، همبستگی معنی دار ۰/۲۱ بین این دو شاخص در گونه *Taenia saginata* که به عنوان انگل روده‌ای در انسان شناخته می شود گزارش شده است [۲۲].

در این پژوهش مقادیر GC و GC<sub>3s</sub> به ترتیب در محدوده ۰/۳۷-۰/۶۷ و ۰/۸۱-۰/۳۵ محاسبه شد (شکل های ۵ و ۶). مقدار بالای این دو شاخص نشان دهنده نقش این شاخصها در شکل گیری کدونهای استفاده شده است. قرار گرفتن نوکلئوتیدهای سیتوزین و گوانین در جایگاه سوم برای آنالیز ترجیح کدونی در موجودات زنده بسیار مهم می باشد. قابل ذکر است که تعداد کل این نوکلئوتیدها در ژن سبب بروز رفتارهای ویژه خواهد شد، چرا که محتوای این دو نوکلئوتید با ترجیح کدونی، طول ژن، مدت زمان همانندسازی و نرخ متیلاسیون همبستگی دارد [۸]. بررسی ارتباط بین مقادیر کلی GC و مقدار GC در موقعیت سوم راهی برای بررسی نقش جهش در شکل گیری کدونهای ژنهای مورد مطالعه است. به این صورت اگر همبستگی بین این دو مقدار از لحاظ آماری معنی دار شود جهش عامل اصلی شکل گیری کدونها



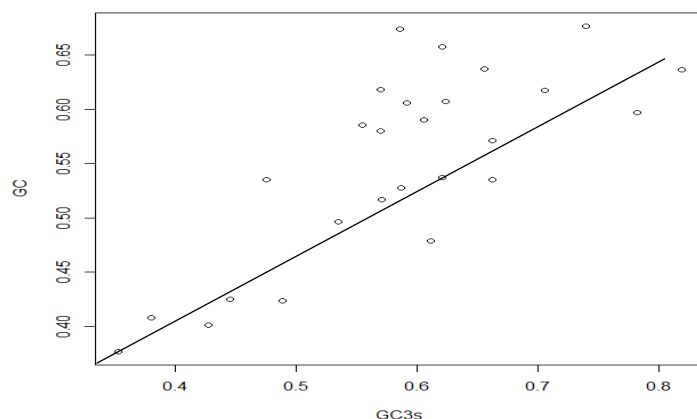
شکل ۵. میزان شاخص GC برای ژنهای با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد



شکل ۶. میزان شاخص GC<sub>3s</sub> برای نواحی ORF ژنهای با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد

## تولیدات دامی

دوره ۲۲ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹



شکل ۷. رابطه بین شاخص‌های GC<sub>3S</sub> و GC در بین ژن‌های با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای نژاد خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد

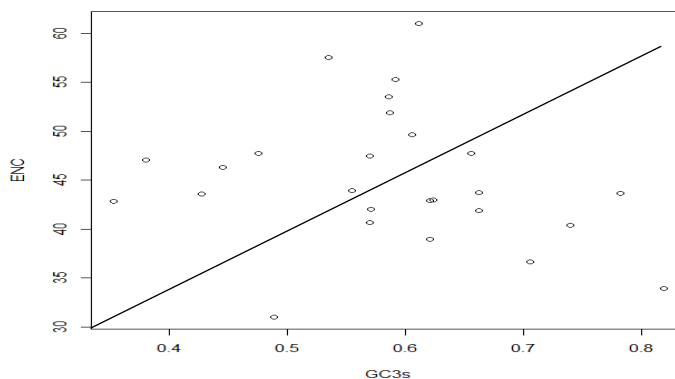
آن کدون در بین کدون‌های مترادف یک اسید آمینه می‌باشد. مقادیر این شاخص برای کدون‌های هر اسید آمینه مربوط به ژن‌های مورد مطالعه در (جدول ۴) آورده شده است. نتایج نشان داد که بالاترین مقدار این شاخص مربوط به کدون‌های AUC، GUG و AGG بوده که در واقع بیش‌ترین تأثیر در فرایند ترجمه را داشتند.

به‌طور کلی در این پژوهش، الگوی ترجیح کدونی در نتیجه تعادل بین عواملی از جمله ترکیبات نوکلئوتیدی (مقدار GC)، جهش و سطح بیان ژن به‌وجود آمده است که این اطلاعات در جهت بررسی روند تکاملی و تغییرات در ژنوم و پیش‌بینی سطوح بیان ژن در گونه‌ها مفید هستند. با توجه به فراوانی کدونی در ژن‌های با بیان زیاد می‌توان گفت که از مجموعه کدون‌های مترادف کدام کدون بیش‌ترین تأثیر را در فرایند ترجمه دارد و در این پژوهش کدون‌های AUC، GUG و AGG بیش‌ترین تأثیر در فرایند ترجمه را داشتند. از طرف دیگر کدون‌ها دارای پیامد عمیق در بازسازی فیلوژنتیک مبتنی بر کدون دارند که می‌تواند برای جلوگیری از برآوردهای بیش از حد تفرق در گونه‌های دور و برآوردهای کم‌تر از حد تفرق برای گونه‌های نزدیک به هم مؤثر باشند.

ارتباط بین شاخص‌های ENC و GC<sub>3S</sub> در بین ژن‌های با بیان متفاوت در شکل ۸ آورده شده است. از این ارتباط برای بررسی این که کدون مطلوب مورد استفاده تحت تأثیر عامل جهش و یا انتخاب شکل گرفته است، استفاده شد. در این پژوهش همبستگی معنی‌داری ۰/۷۴ بین این دو شاخص به‌دست آمد که نشان‌دهنده این است که جهش عامل مؤثر شکل‌گیری کدون‌های مطلوب بوده است. با توجه به شکل (۸)، در نقاط نزدیک به منحنی، جهش به‌عنوان عامل اصلی در شکل‌گیری کدون‌های مطلوب بوده و در نقاط دورتر از منحنی، انتخاب نیز عاملی در شکل‌گیری این کدون بوده‌اند. در مطالعه‌ای بر روی گونه گیاهی *Herbaceous peony* مقدار همبستگی بین این دو شاخص را ۰/۳۴ گزارش کردند [۲۱]. هم‌چنین در پژوهشی دیگر، همبستگی معنی‌داری را برای این دو شاخص در گونه *Taenia saginata* که به‌عنوان انگل روده‌ای در انسان شناخته می‌شود گزارش شده است [۲۲].

در این پژوهش شاخص RSCU جهت بررسی تنوع کدونی برای نواحی ORF ژن‌های مورد مطالعه، محاسبه شد. این شاخص در محدوده ۰-۱ قرار دارد و مقادیر بالاتر از یک برای هر کدون نشان‌دهنده ترجیح داده‌شدن

بررسی الگوی ترجیح کدونی و ارتباط آن با ژنهایی با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد



شکل ۸. ارتباط بین شاخصهای ENC و GC<sub>3s</sub> برای ژنهای با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای نژادهای خالص و آمیخته سیستانی و مونت بیلارد

جدول ۴. مقدار RSCU کدونهای مترادف در نواحی ORF ژنهای با بیان متفاوت در بین دو جمعیت گاوهای خالص و آمیخته

سیستانی								
RSCU	کدون	اسید آمینه	RSCU	کدون	اسید آمینه	RSCU	کدون	اسید آمینه
۱/۳	UCU		۰/۵۸	CAU		۰/۷۶	UUU	
۱/۴۰	UCC				هیستیدین			فنیل آلانین
۰/۷۸	UCA	سیرین	۱/۴۲	CAC		۱/۲۴	UUC	
۰/۵۸	UCG							
۰/۹۹	CCU		۰/۵۴	CAA	گلوتامین	۰/۲۸	UUA	لوسین
۱/۵۱	CCC	پرولین				۰/۵۸	UUG	
۰/۸۷	ACU		۰/۷۴	AAU		۰/۸۹	AUU	
۱/۵۹	ACC				آسپارژین			ایزولوسین
۰/۸۵	ACA	ترئونین	۱/۲۶	AAC		۱/۷۱	AUC	
۰/۶۹	ACG					۰/۴۰	AUA	
۰/۹۸	GCU		۰/۷۳	AAA				
۰/۷۳	GCC				لیزین	۱/۰۰	AUG	متیونین
۰/۷۷	GCA	آلانین	۱/۲۷	AAG				
۰/۵۳	GCG							
۰/۷۴	UGU		۰/۶۰	GAU		۰/۴۸	GUU	
		سیستین			آسپارتیک اسید	۱/۰۱	GUC	والین
۱/۲۶	UGC		۱/۴۰	GAC		۰/۲۷	GUA	
						۲/۲۳	GUG	
۱/۰۰	UGG	تریپتوفان	۰/۶۱	GAA	گلوتامیک اسید	۰/۴۶	UAG	تیروزین
			۱/۳۹	GAG		۱/۵۲	UGA	
			۰/۵۲	GGU		۰/۴۹	CGU	
			۱/۳۲	GGC		۱/۰۵	CGC	
			۱/۰۴	GGA	گلیسین	۰/۹۸	AGA	آرژنین
			۱/۱۱	GGC		۱/۷۵	AGG	

9. Lesecque Y, Mouchiroud D and Duret L (2013) GC-biased gene conversion in yeast is specifically associated with crossovers: molecular mechanisms and evolutionary significance. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 1409-1419.
10. Misawa K and Kikuno RF (2011) Relationship between amino acid composition and gene expression in the mouse genome. *BMC Research Notes*, 20: 4.
11. Makedonka M, Michael CW, John M, Todd W, Yong Y, Allan L, John P, Robert HW, James PM (2006) Codon usage patterns in Nematoda: analysis based on over 25 million codons in thirty-two species. *Genome Biology*, 7(8): R75.
12. Novoa EM, Pavon-Eternod M, Pan T, de Poupiana LR (2012) A role for tRNA modifications in genome structure and codon usage. *Cell*, 149: 202-213.
13. Pasandideh M, Mohammadabadi M, Esmailzadeh A and Tarang A (2015) Association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk production and composition in Holstein cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 60: 97-104.
14. Plotkin JB and Kudla G (2011) Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12: 32.
15. Sahoo S, Das SS and Rakshit R (2019) Codon usage pattern and predicted gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, X2:100012.
16. Sharp PM and Li WH (1986) An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *Journal of Molecular Evolution*, 24: 28-38.
17. Stenico M, Lloyd AT and Sharp PM (1994) Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: delineation of translational selection and mutational biases. *Nucleic Acids Research*, 22: 2437-2446.
18. Sueoka N and Kawanishi Y (2000) DNA G+ C content of the third codon position and codon usage biases of human genes. *Gene*, 261: 53-62.
19. Wei Y, Wang J and Xia X (2016) Coevolution between stop codon usage and release factors in bacterial species. *J. Mol. Biol. Evol.* 33-9: 2357-2367.
20. Wright F (1990) The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene*, 87: 23-29.
21. Wu Y, Zhao D and Tao J (2015) Analysis of codon usage patterns in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall) based on transcriptome data. *Genes*, 6:1125-1139.
22. Yang X, Luo X and Cai X (2014) Analysis of codon usage pattern in *Taenia saginata* based on a transcriptome dataset. *Parasites and Vectors*, 7: 527.

## تشکر و قدردانی

این پژوهش طرح مشترک بین دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه زابل و مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران است و توسط کمیته علمی-فنی مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران با کد ۹۶۰۱۹۱-۰۱۰-۱۳-۱۳-۲ در سال ۱۳۹۶ تصویب شده است. به این وسیله از مؤسسه تحقیقات علوم دامی ایران به خاطر همکاری و تأمین مالی پروژه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

## منابع مورد استفاده

1. Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi M and Nezamabadipour H (2016) Predicting CpG islands and their relationship with genomic feature in cattle by hidden Markov model algorithm. *J. App. Anim. Sci.* 6: 571579. (in Persian)
2. Brandis G and Hughes D (2016) The selective advantage of synonymous codon usage bias in *Salmonella*. *PLoS Genetics*, 12: e926-1005.
3. Bulmer M (1991) The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics*, 129: 897-907.
4. Hajjari M, Sadeghi I, Salavaty A, Nasiri H and Birgani MT (2016) Tissue specific expression levels of apoptosis involved genes have correlations with codon and amino acid usage. *Genomics and Informatics*, 14: 234.
5. Hasanzadeh S, Askari H and Sadeghnejad E (2011) Relationship between codon usage and gene expression. (in Persian)
6. Hiraoka Y, Kawamata K, Haraguchi T and Chikashige Y (2009) Codon usage bias is correlated with gene expression levels in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells*, 14: 499-509.
7. Jalali P, Rahimi Mianji GH, Gholizadeh M, Pakdin Pariz A (2018) Codon usage deviations and bioinformatics analysis of encoding sequence of Calpastatin gene in some mammalian species. *J. of Ruminant Research*, 6: 3. (in Persian)
8. Kurland C (1991) Codon bias and gene expression. *FEBS Letters*, 285: 165-169.