

تجزیه تبارزایی و تکاملی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن FASN

هاجر رضاخانی نژاد^۱، غلامرضا داشاب^{۲*} و مهدی وفای واله^۲

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم دامی، دانشگاه زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۰)

چکیده

در این بررسی به منظور آگاهی از روند تکاملی و مولکولی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن FASN در پستانداران شمار ۳۸ رأس گاو هلشتاین شیری (۱۸ رأس کم تولید و ۲۰ رأس پر تولید) انتخاب و خونگیری از ورید دمی آنها انجام شد. استخراج DNA از خون کامل به روش فنول-کلروفرم صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای افزایش قطعه ۷۵۰ جفت بازی واقع در ناحیه اکزون ۳۷ تا ۳۹ جایگاه ژن FASN با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت و محصول PCR تعیین توالی شدند. توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن FASN در جمعیت مورد بررسی با دیگر توالی‌های DNA جایگاه یادشده در پستانداران بر پایه جستجو در بانک اطلاعاتی ژنگان یا ژنوم (NCBI) به دست آمده و هم‌تراز شدند. درصد جانشینی و جایگزینی نوکلئوتیدها با استفاده از روش بیشترین درستی و همچنین ترسیم درخت تبارزایی (فیلوژنتیک) و تعیین روند انتخاب طبیعی به روش اتصال-همسایگی (Neighbor-Joining) NJ و UPGMA با نرم‌افزارهای MEGA6 و Dnasp5.1 انجام گرفت. نتایج به دست آمده از بررسی‌های داده‌های زیستی (بیوانفورماتیک) نشان داد، در درصد جانشینی در بازهای پورین بیشتر از بازهای پیریمیدین بود. میزان عددی نسبت جایگزینی d_N/d_S در مقایسه توالی جایگاه ژن FASN در بین دو گروه گاوهای شیری پر تولید و کم تولید و همچنین در مقایسه با دیگر گونه‌ها به ترتیب برابر با ۱/۱۶ و ۱/۱۲ محاسبه شدند که نشان‌دهنده انتخاب مثبت در فرآیند تکامل این ژن است. درخت تبارزایی برای ژن یادشده در موجودهای مختلف نشان داد، که در دسته پستانداران بوفالو و گاو میش، گربه و یوزپلنگ خویشاوندی بیشتری دارند (۹۸٪، ۵۷٪). نتایج نشان می‌دهد، تفرق و انتخاب در طی سالیان متمادی سبب به وجود آمدن رقم‌های جدید، پروتئین‌های جدید و از سویی سبب تثبیت عملکرد آنها در طی روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آنها شده است.

واژه‌های کلیدی: تبدیل ژنی، تکامل، توالی‌یابی، جهش تقاطعی، گاو هلشتاین.

Phylogenetic and evolutionary analysis of nucleotide sequence of FASN gene

Hagar Rezakhani Nejad¹, Gholam Reza Dashab^{2*} and Mehdi Vafaye Valleh²

1, 2. Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Animal Science, University of Zabol, Iran

(Received: Mar. 8, 2017 - Accepted: Jun. 10, 2017)

ABSTRACT

In this research, 38 Holstein dairy cows (18 heads low production and 20 heads high-production) were selected randomly and blood samples were taken from their tail vein. DNA was extracted from whole blood with phenol-chloroform. PCR amplification of 750bp from 37 to 39 exons of FASN gene was performed using one pair of special primers. Sequencing of the amplified region was performed by the Sanger method. Sequence data of other species was achieved and aligned by searching its genome database (NCBI). The nucleotide substitution rate of the sequences and molecular evolution of the FASN were calculated by maximum likelihood and neighbor-joining method, respectively and phylogenetic tree was constructed. Evolutionary and phylogenetic tree analysis was performed using MEGA6 and Dnasp5.1 software's. Bioinformatics analysis results showed that the substitution percentage of purines was more than pyrimidine nucleotides. The numerical value of d_N/d_S in two groups of dairy cow and in comparison with that of other species were 1.16 and 1.12, respectively which indicating positive selection during evolution of this gene. Phylogenetic tree for the FASN gene in mammals shows close relationship between Buffalo and Bison, as well as Cats and Cheetahs (98% and 57%, respectively). The results show that over the years segregation and selection of new varieties, 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.

Keywords: Evolution, gene conversion, sequencing, Holstein cow, transversal.

* Corresponding author E-mail: dashab@uoz.ac.ir

مقدمه

ساخت (سنتز) دوباره اسیدهای چرب در سیتوزول یاخته‌های حیوانی توسط یک آنزیم چندمنظوره (Multi-enzyme) به نام FAS (Fatty acid synthase) انجام می‌شود. این آنزیم سیتوزولی شکل‌گیری میریستیک، پالمیتیک و استئاریک اسید را از استیل کوآنزیم A و مالونیل کوآنزیم A در حضور NADH کاتالیز می‌کند (Smith et al., 2003). FAS در پستانداران از دو پلی‌پپتید با وزن مولکولی همسان تشکیل شده است که وزن مولکولی هر زیر واحد آن برابر با ۴۸۰۰۰۰ دالتون پس از جداسازی با سولفات سدیم دودسیل است. FAS پستانداران افزون بر اینکه آنزیم ضروری در ساخت اسید چرب و خون بندآوری (هموستازی) انرژی از راه تبدیل مواد غذایی به چربی و تأمین انرژی از راه اکسیداسیون است، بلکه نقش مهم در توسعه جنین دارد (Chirala et al., 2003). جایگاه ژن FASN روی کروموزوم ۱۹ گاو (Morris et al., 2007)، کروموزوم ۱۱ موش (Suburu et al., 2014)، کروموزوم ۱۷ انسان (Chakravarty et al., 2009)، کروموزوم ۱۸ مرغ (Yang et al., 1988)، کروموزوم ۱۲ خوک (Muñoz et al., 2003) و کروموزوم ۱۱ گوسفند (Qiao et al., 2007) نقشه‌یابی شده است. جایگاه ژن FASN انسان، موش و مرغ شامل ۴۳ اگزون، خوک ۴۲ و در گاو شامل ۴۲ اگزون و ۴۱ اینترون است (Oztabak et al., 2014)، که در آن QTL های تأثیرگذار بر میزان چربی پیه و میزان چربی شیر شناسایی شدند (Morris et al., 2007).

تبارزایی (فیلوژنی) مولکولی از داده‌های توالی‌های DNA برای احیا کردن رابطه‌های تکاملی بین گونه‌های مختلف و برآورد زمان واگرایی موجودات استفاده می‌شود (Nei and Kumar, 2000). رابطه‌های تبارزایی میان ژن‌ها و موجودها را می‌توان با یک درخت تبارزایی شرح داد که قابل مقایسه با شجره‌نامه‌ای است که ژن‌ها یا موجودهای بسیار همانند را نشان می‌دهد. روش‌های ایجاد درختان تبارزایی از داده‌های مولکولی، نخست بر پایه این است که آیا روش مورد نظر همانندی‌های ناپیوسته یا

ماتریس فاصله‌ای را به کار می‌گیرد و دوم بر پایه این است که روش مورد نظر outها را به صورت تدریجی خوشه‌بندی می‌کند که منجر به تشکیل تنها یک درخت که بهترین است شود یا همه درختان را که از نظر فرضیه‌ای قابل انجام است، را در نظر می‌گیرد. روش اتصال مجاور (NJ) ^۱، درخت را با یافتن پی‌درپی جفت‌های نزدیک به هم ترسیم می‌کند که جفت outها با یک گره درونی به هم متصل می‌شوند. الگوریتم NJ با فرض یک درخت بوته مانند آغاز می‌شود که هیچ شاخه درونی ندارد. در گام نخست، نخستین شاخه درونی وارد و طول درخت حاصل محاسبه می‌شود. الگوریتم پی‌درپی هر جفت ممکن از outها را متصل می‌کند و سرانجام جفت outهایی که منجر به کوتاه‌ترین درخت شود را به هم متصل می‌کند (Li, 1997).

به همان اندازه که توالی DNA بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند، الگوهای تغییرپذیری‌های نوکلئوتیدی مورد استفاده برای ایجاد درختان تبارزایی پیچیده‌تر می‌شود که به خاطر شمار عامل‌های دخیل در جایگزینی‌هاست. اگر در جایگزینی، یک پورین به یک پیریمیدین یا برعکس تغییر کند، جهش تقاطعی ^۲ نامیده می‌شود، دیگر جایگزینی‌ها که میان نوکلئوتیدهای همسان رخ می‌دهد، جهش انتقالی ^۳ می‌گویند. جهش در ژن‌هایی که به نتاج می‌رسند و حضور همزمان آن‌ها با ژن‌های اصلی به چندریختی ^۴ می‌انجامد. تکامل، پیامد دگرگونی در فراوانی آلل‌هاست که فراوانی ژن نامیده می‌شود. نظر به اینکه برخی آلل‌ها در طول زمان از دست می‌روند و فراوانی دیگر آلل‌ها تا صد درصد افزایش می‌یابد، باعث می‌شود تا این آلل‌ها در جمعیت تثبیت می‌شوند. تکامل بلندمدت یک گونه، از تثبیت موفق آلل‌های خاص به دست می‌آید که بازتاب پایداری جهش‌ها است. آهنگ پایداری این جهش‌ها در جمعیت، نرخ تکاملی یا نرخ پایداری نامیده می‌شود (Oztabak et al., 2014).

به‌خوبی مشخص شده است که نیروهای پرشمار

1. Neighbor-Joining
2. Transversion
3. Transition
4. Polymorphism site

موجب شکل‌گیری خاصی در ساختاری ژنتیکی حیوان می‌شود، بنابراین، هدف از این بررسی ارزیابی تغییر نوکلئوتیدی و بررسی‌های تکاملی و تبارزایی جایگاه ژن FASN مسئول ساخت برخی از اسیدهای چرب ترکیب‌های شیر، در گاوهای شیری هلشتاین و مقایسه آن‌ها با دیگر گونه‌های پستانداران است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری خون و استخراج DNA

این تحقیق روی جمعیت گاو هلشتاین استان کرمان انجام گرفت. به‌منظور دستیابی به بیشترین تنوع (ورایانت)‌های ممکنه در جایگاه ژن FASN از بین گله‌هایی که رکورد منظم تولید شیر داشتند، یک گله به تصادف انتخاب و ارزش اصلاحی دام‌ها بر پایه رکوردهای تولید شیر ۳۰۵ روز و چربی ۳ درصد تصحیح‌شده، با مدل دام و روش REML و نرم‌افزار DMU برآورد شدند. دام‌هایی که بدون رکورد بودند و یا آن‌هایی که شمار رکورد پایینی داشتند و ارزش اصلاحی آن‌ها برای تولید شیر از رکوردهای خویشاوندان دور برآورد شده بود و همچنین خطای پیش‌بینی ارزش اصلاحی آن‌ها بالا بود (بیش از دو برابر میانگین خطای پیش‌بینی کل گله) حذف و دیگر دام‌ها بر پایه ارزش‌های اصلاحی رتبه‌بندی شدند و از بین دام‌هایی که در ۱۰ درصد بالایی (گروه پر تولید) و ۱۰ درصد پایین (گروه کم تولید) قرار گرفتند به ترتیب شمار ۲۰ و ۱۸ رأس گاو شیرده به تصادف انتخاب و خون‌گیری از ورید دمی انجام گرفت. میانگین و انحراف معیار تولید شیر روزانه دام‌ها برحسب چربی ۳ درصد در گروه کم تولید به ترتیب برابر با ۹/۷ و ۲/۲ کیلوگرم و در گروه پر تولید به ترتیب برابر با ۲۰/۲ و ۲/۵ کیلوگرم بودند. نمونه‌های خون تا زمان استخراج در لوله‌های حاوی EDTA (۱ درصد) در فریزر در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت Asia Denazist محصول شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده به روش طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتوفتومتر) سنجیده شد.

تکاملی بر توالی‌های DNA عمل می‌کند و باعث می‌شود توالی یک ژن در ظرف مدتی نه‌چندان طولانی دگرگون شود. بنابراین، هر دو توالی که از یک جد مشترک به‌طور مستقل تکامل می‌یابند، سرانجام از یکدیگر دور می‌شوند. اندازه این واگرایی، فاصله ژنتیکی نامیده می‌شود (Nei & Kumar, 2000). بر پایه نظریه‌ای که برای نرخ تکاملی پروتئین‌ها ارائه شده است، به نظر می‌رسد که فاصله ژنتیکی دو توالی رمزکننده پروتئین یکسان، اما جداشده از گونه‌های مختلف، با زمان انشعاب دو گونه به‌طور خطی نسبت داشته باشد. به علت اینکه ممکن است پروتئین‌های متفاوت رفتار همسانی نشان دهند، فرض می‌شود که نرخ تکاملی برای هر پروتئین معین در طول زمان ثابت است. این پیشنهاد اشاره به وجود یک نوع ساعت مولکولی دارد. فرضیه ساعت مولکولی پیشنهاد می‌کند که نرخ جایگزینی برای هر پروتئین ثابت است. همچنین، اختلاف‌های در توالی یک ژن برای دو موجود (ارگانیزم) باید فاصله تکاملی آن‌ها را منعکس کند (Oztabak *et al.*, 2014).

تبدیل ژنی (Gene conversion) فرآیندی است که در آن یک توالی DNA جایگزین توالی همسان (همولوگ) آن می‌شود. این فرآیند می‌تواند به‌صورت آلی، به این معنی که یک آلل جایگزین یک آلل دیگر از همان ژن شود و یا به این صورت که یک توالی همساختار (پارالوگ) DNA تبدیل به دیگری شود، نیز تعریف می‌شود. تبدیل ژنی آلی در فرآیند میوز رخ می‌دهد که در آن نوترکیبی بین مکان‌های ناخالصی (هتروزیگوسیتی) منجر به نبود سازگاری در جفت شدن بازها می‌شود. این نداشتن سازگاری شناسایی شده و توسط فرآیندهای یاخته‌ای اصلاح‌شده که در نهایت منجر به تبدیل آلی به آلل دیگر خواهد شد. تبدیل ژنی یک فرآیند اساسی ژنتیکی در تفرق و جدایی گونه‌هاست که به‌عنوان شبکه 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 (Senaris *et al.*, 1997).

با توجه به اینکه هدف اصلاح نژاد در گاوهای شیری تأکید بر افزایش تولید شیر است و انتخاب

پرایمرهای مورد استفاده و افزایش

اختصاصی بنابر جدول ۱ است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای افزایش قطعه ۷۵۰ جفت بازی شامل ۳۵ چرخه (سیکل) بودند (جدول ۲). الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام شد.

طراحی آغازگر (پرایمر) برای افزایش بخشی از توالی ژن FASN شامل نواحی اگزون ۳۷ تا ۳۹ جایگاه ژن که در بررسی‌های پیشین بیشترین شمار جهش‌ها گزارش شده بود، با استفاده از نرم‌افزار Primer premier صورت گرفت که ویژگی‌های این آغازگر

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای افزایش جایگاه ژن FASN

Table 1. The sequences of oligo-nucleotides used for proliferation of FASN gene

Locus	Forward and Backward sequences	Length (bp)	Melting temperature (°C)
FASN	5'-GTCTCCGAGTCTGGTCT-3' 5'-TGAGCCGTGTCAAGGTC-3'	750	50.3 51.2

جدول ۲. برنامه گرمایی چرخه افزایش جایگاه ژن FASN در گاوهای هلشتاین

Table 2. Temperature program of proliferation cycles of FASN gene in Holstein cows

PCR reaction	Reaction cycle	Temperature (°C)	Time (second)	
FASN	primary denaduration	94	600	
	35 cycles	Secondary denaduration	94	45
		Annealing	63	60
		Primary extention	72	60
	Final extention	72	900	
holding		4	-	

در رابطه بالا؛ $d_{(i,j)}$ = فاصله بین شاخه i و j ، k = شاخه k درخت، r = شمار کل شاخه‌ها و $Q_{(i,j)}$ = میزان عددی شاخه‌های i و j است.

برای مقایسه توالی‌ها و اطلاع از فراسنجه‌های ژنتیکی مانند شمار جهش‌ها، حذف و القاء، تنوع نوکلئوتیدی و تبدیل ژنی (Gene conversion) از نرم‌افزار Dnasp5.1 استفاده شد (Librado & Rozas, 2009).

بررسی تغییر نوکلئوتیدی که باعث تغییرپذیری اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرپذیری نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه به دست آمده نداشته‌اند (d_S)، یک روش سودمند و بسیار کارآمد برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است (Tamura *et al.*, 2013). مقادیر d_N و d_S به ترتیب با استفاده از رابطه‌های ۲ و ۳ قابل محاسبه هستند.

$$d_N = -3/4 \ln(1 - 4/3P_N) \quad (2)$$

$$d_S = -3/4 \ln(1 - 4/3P_S) \quad (3)$$

در رابطه‌های بالا، P_N نسبت جایگاه‌های جایگزینی ناهمسان و P_S نیز نسبت جایگاه‌های جایگزینی همسان دارند. بنابراین، با استفاده از میزان عددی این

توالی‌یابی ناحیه ژنی FASN و رسم درخت تبارزایی

نمونه‌های DNA با استفاده از روش سانگر توسط شرکت بایونیر کره جنوبی توالی‌یابی شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit و ابزار قدرتمند BLAST در پایگاه NCBI میزان همسانی (همولوژی) توالی‌های به دست آمده سنجیده شد. همچنین، به منظور بررسی رابطه تبارزایی بین نمونه‌ها و مقایسه آن‌ها با دیگر گونه‌های پستانداران، نمودار درختی با استفاده از دو رویه Neighbor-Joining (NJ) و Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) توالی‌های هم‌ردیف‌شده و زمان واگرایی از رویه Tajima test نرم‌افزار MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) ترسیم شد. در ترسیم درخت تبارزایی با روش NJ از ماتریس Q (رابطه ۱) استفاده می‌شود که مشتمل بر کل شاخه‌ها بوده و کمترین میزان که بیان‌کننده همانندی بالای دوشاخه باشد را انتخاب کرده و در یک انشعاب از درخت تبارزایی به کار می‌برد. مقادیر Bootstrapping با ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری دوباره به دست آمدند.

$$Q_{i,j} = (r-2)d_{(i,j)} - \sum d_{(i,k)} - \sum d_{(j,k)} \quad (1)$$

جانشینی در بازهای پورین مربوط به تبدیل آدنین به گوانین ۱۱ درصد و در بازهای پیریمیدین مربوط به تبدیل تیمین به سیتوزین ۹/۸ و همچنین کمترین میزان جابه‌جایی، جایگزینی تقاطعی و برای تبدیل سیتوزین و تیمین به آدنین ۶/۲۲ درصد مشاهده شد، همچنین نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی (Transition/Transversion)، $R=0.59$ محاسبه شد که بیانگر بیشتر بودن درصد جایگزینی تقاطعی نسبت به جایگزینی انتقالی است.

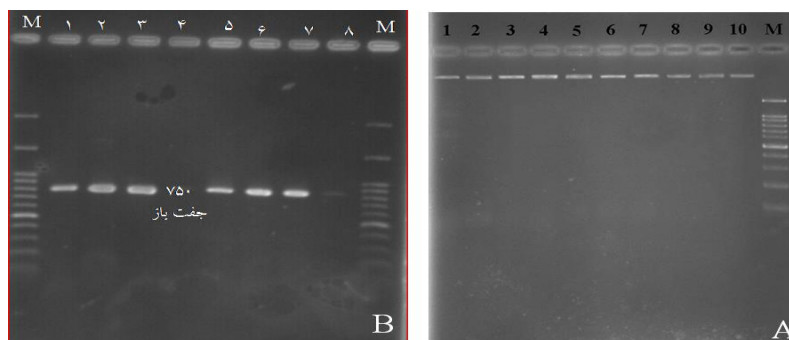
نتایج به‌دست‌آمده از تغییرپذیری‌های نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N) نسبت به تغییرپذیری نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه به‌دست‌آمده نداشته‌اند (d_S)، یک روش سودمند و بسیار کارآمد برای تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است (Nei & Kumar, 2000). اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در فرآیند تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (Li, 1997). در این بررسی میزان عددی این نسبت (d_N/d_S) برابر با $1/16$ (± 0.296) به دست آمد (جدول ۵)، که روند انتخاب مثبت در فرآیند تکامل برای این ژن را نشان می‌دهد، که نشانه ضروری بودن عملکرد این ژن در فرآیند تکامل و پیشرفت انتخاب در گاوهای شیری نژاد هلشتاین است. انتخاب مثبت سبب رخداد تغییر در جایگاه‌هایی می‌شود که با تغییر اسیدآمینه و تمایز پروتئین و تغییر نقش عملکردی آن همراه هستند.

نسبت (d_N/d_S) روند انتخاب طبیعی برای ژن FASN محاسبه شد. معنی‌دار بودن میزان عددی d_N/d_S با آزمون فیشر در سطح احتمال ۵ درصد با نرم‌افزار آنلاین HIV_SNAP v2.1.1 (Korber, 2000) محاسبه شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA از خون در همه نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. نتایج طیف‌سنجی نشان داد، DNA استخراج‌شده کیفیت مناسبی برای PCR دارد. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که آغازگر طراحی‌شده به خوبی فعالیت کرده و تولید یک قطعه اختصاصی برای ژن FASN به طول ۷۵۰ جفت باز کرد (شکل ۱).

نتایج مقایسه توالی‌های مختلف مورد بررسی در جمعیت گاوهای هلشتاین ۵۸ جایگاه چند شکل و ۱۳۲ جایگاه حذف و اضافه را در ژن FASN نشان داد. در جمعیت گاو هلشتاین مورد بررسی شمار ۳۰ هاپلوتیپ شناسایی شد که ۱۶ هاپلوتیپ در جمعیت پر تولید و ۱۴ هاپلوتیپ مربوط به جمعیت کم تولید بودند، همچنین بیشترین میزان تنوع هاپلوتیپی مربوط به جمعیت کم تولید مشاهده شد (جدول ۳).
جانشینی نوکلئوتیدی بر پایه الگوی Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) و به دو صورت جانشینی انتقالی و متقاطع محاسبه و در جدول ۴ آورده شده است. فراوانی نوکلئوتیدهای تیمین، سیتوزین، آدنین و گوانین به ترتیب برابر با ۲۴/۲، ۳۰/۸، ۱۹/۸ و ۲۵ درصد بودند. بالاترین درصد



شکل ۱. A: شماره‌های ۱ تا ده نمونه DNA استخراج‌شده از گاوهای هلشتاین؛ B: شماره‌های ۱ تا ۸ الکتروفورز قطعه ۷۵۰ جفت بازی افزایش‌شده از جایگاه ژن FASN در جمعیت گاوهای هلشتاین و M نشانگر اندازه ۱۰۰ جفت بازی است.

Figure 1. A: The numbers of 1 to 10 related to DNA extracted of different Holstein cows; B: The numbers of 1 to 8 related to electrophoresis of 750bp PCR products of FASN gene in the population of Holstein cows and M was 100 bp size marker.

جدول ۳. درصد تنوع هاپلوتیپی و نوکلئوتیدی جایگاه FASN درون جمعیت گاوهای هلشتاین

Table 3. The percent of haplotype and nucleotide polymorphism in FASN locus within Holstein cows

Population	Nucleotide polymorphism %	Haplotype polymorphism %
High production	18	98
Low production	32	1
Total population	29	99

جدول ۴. درصد جابجایی توالی نوکلئوتیدهای ژن FASN در گاوهای هلشتاین بر پایه روش بیشینه درست‌نمایی

Table 4. The percent of transition nucleotides in the sequence of FASN gene in Holstein cows based on Maximum likelihood method

Nucleotide	A	T	C	G
A	-	7.57	9.64	11.08
T	6.22	-	9.86	7.84
C	6.22	7.57	-	7.84
G	8.78	7.57	9.64	-

اعداد جدول بیانگر درصد جانشینی یک باز (ردیف) به باز دیگر (ستون) است. عددهای روی قطر بیانگر جانشینی انتقالی (سیاه پررنگ) و عددهای خارج قطر نشان‌دهنده جانشینی تقاطعی هستند (مورب).

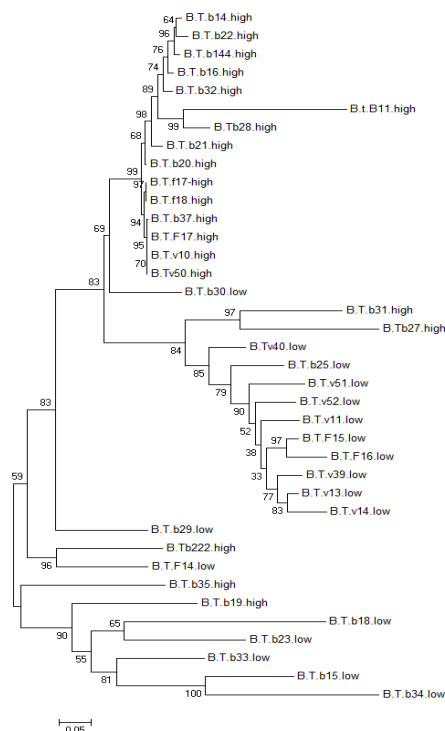
درخت تبارزایی توالی جایگاه ژن FASN گاوهای هلشتاین با استفاده دو روش UPGMA و NJ ترسیم شدند (شکل‌های ۲ و ۳). مقادیر Bootstrap بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد، که درخت تبارزایی مورد نظر درجه اعتماد بالایی دارد. در همه روش‌ها در هر دو نوع جمعیت تا حدودی منجر به طبقه‌بندی آن‌ها به دو گروه پر تولید و کم تولید شد و نمونه‌های هر گروه تا حدودی در یک رده سنی نزدیک به هم قرار دارند.

جدول ۵. فراسنجه‌های تعیین روند انتخاب طبیعی در جایگاه ژن FASN در دو گروه کم تولید و پر تولید گاوهای شیری هلشتاین

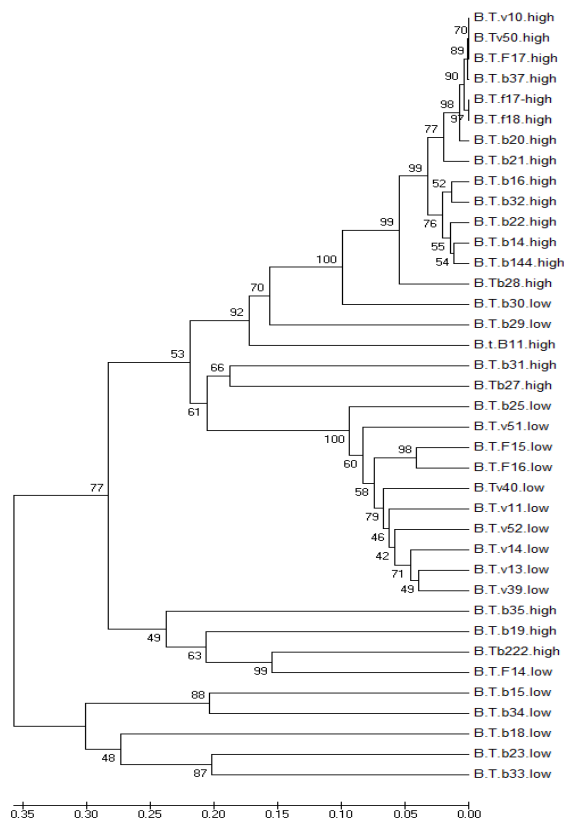
Table 5. The parameters of neutral selection trend in FASN gene in two groups of low and high milk production of Holstein cows

*Parameters	Estimation	Standard error
d_N	0.499	0.022
d_S	0.429	0.0319
d_N/d_S	1.16	0.0269

* تغییرپذیری نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N). تغییرپذیری‌های نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه به دست آمده نداشته‌اند (d_S). میزان عددی (d_N/d_S) نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی.



شکل ۲. درخت تبارزایی به روش NJ دو جمعیت کم تولید (low) و پر تولید (high) گاوهای هلشتاین در جایگاه ژن FASN
Figure 2. Phylogenetic tree based on NJ for high and low milk production Holstein cows in FASN gene.



شکل ۳. درخت تبارزایی به روش UPGMA دو جمعیت کم تولید (low) و پر تولید (high) گاوهای هلستاین در جایگاه ژنی FASN
Figure 3. Phylogenetic tree based on UPGMA for high and low milk production Holstein cows in FASN gene

انحراف معیار فاصله ژنتیکی در بین افراد به ترتیب ۱/۶۹ و ۱/۲۱ بود) قرار دارد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین نمونه b32 از جمعیت پر تولید با b14 از جمعیت کم تولید بود (شکل ۴).

نتایج مقایسه داده‌های ژنتیکی میان جفت نواحی ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده نشان داد که فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی در دامنه ۰ بین تا ۳/۸۶ جفت باز (میانگین و

B.T.v14.low	
B.T.v50.high	0.92
B.T.v51.low	0.21 0.94
B.T.v51.low(2)	2.43 3.76 2.61
B.T.v40.low	0.16 1.04 0.20 2.58
B.T.f17-high	0.81 0.07 0.87 3.81 1.01
B.lB11.high	1.14 0.92 1.27 1.58 1.33 0.89
B.T.b14.high	2.45 3.04 3.44 0.46 3.13 2.98 1.88
B.T.b15.low	1.51 0.67 1.51 3.58 1.69 0.68 1.37 2.86
B.T.b16.high	0.86 0.07 0.95 3.52 1.07 0.09 0.87 3.06 0.67
B.T.b18.low	0.66 1.45 0.68 3.40 0.69 1.38 1.68 3.32 1.55 1.42
B.T.b19.high	3.28 3.38 3.73 0.71 3.67 3.21 1.98 0.27 2.56 3.41 2.99
B.T.b20.high	0.60 0.02 0.91 3.76 1.00 0.06 0.82 3.16 0.66 0.06 1.41 3.44
B.T.b21.high	0.85 0.23 0.93 3.11 1.04 0.24 1.03 2.35 0.66 0.24 1.32 3.15 0.24
B.T.b22.high	0.87 0.08 0.99 3.59 1.09 0.11 0.89 3.13 0.70 0.03 1.47 3.44 0.07 0.26
B.T.b25.low	2.72 3.48 3.11 0.18 3.08 3.41 1.55 0.38 3.23 3.29 3.00 0.63 3.49 2.39 3.37
B.T.b27.high	0.32 0.99 0.30 2.86 0.31 0.93 1.27 3.06 1.47 1.07 0.69 3.55 0.96 1.02 1.09 2.70
B.T.b28.high	0.84 0.26 0.95 2.11 1.05 0.27 0.77 1.95 0.78 0.25 1.39 2.55 0.26 0.38 0.28 2.08 0.98
B.T.b29.high	3.26 3.72 3.63 0.54 3.52 3.73 1.70 0.21 3.00 3.73 3.44 0.27 3.76 3.09 3.75 0.50 3.23 2.09
B.T.b30.high	0.83 0.18 0.94 3.21 1.09 0.19 0.92 2.66 0.68 0.23 1.46 3.18 0.20 0.25 0.26 2.56 1.00 0.36 3.08
B.T.b31.high	1.03 0.35 1.08 3.71 1.12 0.36 1.15 2.40 0.52 0.41 1.33 2.64 0.36 0.44 0.43 3.16 0.99 0.52 2.90 0.36
B.T.b32.high	0.66 0.06 0.95 3.67 1.09 0.10 0.86 3.21 0.68 0.02 1.42 3.47 0.06 0.23 0.03 3.47 1.04 0.25 3.78 0.24 0.41
B.T.b33.low	0.45 1.08 0.43 2.64 0.43 1.02 1.34 3.02 1.31 1.05 0.59 2.88 1.03 1.10 1.09 2.82 0.34 1.00 2.65 1.13 1.08 1.05
B.T.b34.low	1.97 2.28 1.73 1.29 1.82 1.22 2.19 1.15 1.42 1.57 1.73 0.92 2.14 1.96 1.62 1.18 1.80 1.65 1.12 2.21 2.51 1.58 1.31
B.T.b35.high	1.34 0.78 1.53 1.55 1.47 0.77 1.41 1.02 0.82 0.78 1.35 1.01 0.78 0.76 0.82 1.52 1.44 1.01 1.10 0.77 0.78 0.77 1.45 1.01
B.T.b37.high	0.82 0.01 0.92 3.71 1.03 0.07 0.91 3.16 0.65 0.06 1.42 3.47 0.02 0.24 0.08 3.49 1.00 0.26 3.80 0.17 0.33 0.06 1.07 2.15 0.78
B.T.b144.high	0.86 0.14 0.93 3.45 1.07 0.08 0.89 2.88 0.69 0.08 1.40 3.30 0.13 0.23 0.09 3.12 1.02 0.28 3.44 0.26 0.43 0.09 1.04 1.62 0.81 0.13
B.T.b222.high	3.13 3.51 3.79 0.80 3.50 3.64 2.17 0.30 2.84 3.50 2.83 0.26 3.62 3.04 3.41 0.72 3.14 3.16 0.29 3.61 2.96 3.40 3.22 1.02 1.06 3.65 3.40
B.T.f14.low	0.73 3.66 0.64 2.41 0.57 3.51 1.73 2.96 2.61 3.81 0.82 3.23 3.75 3.52 3.84 2.85 0.66 2.73 2.81 3.31 3.19 3.86 0.60 1.73 2.15 3.63 3.56 3.06
B.T.f15.low	0.17 0.88 0.20 2.85 0.14 0.83 1.14 3.19 1.39 0.90 0.68 3.65 0.84 0.93 0.92 3.20 0.25 0.88 3.37 0.89 1.01 0.90 0.38 1.73 1.42 0.87 0.88 3.54 0.67
B.T.f16.low	1.24 0.47 1.32 3.72 1.28 0.49 1.31 2.64 0.60 0.56 1.79 3.08 0.50 0.65 0.59 3.33 1.24 0.76 3.07 0.53 0.39 0.55 1.41 2.20 1.00 0.47 0.53 2.99 2.46 1.18
B.T.f17.high	2.61 3.53 3.52 0.39 3.09 3.39 1.62 0.07 3.05 3.28 3.43 0.30 3.47 2.59 3.26 0.37 3.42 1.68 0.20 2.60 2.49 3.37 3.25 1.16 1.03 3.41 2.93 0.35 2.66 3.08 3.03
B.T.v10.high	2.25 3.56 2.45 0.10 2.20 3.65 1.57 0.46 3.43 3.43 3.00 0.66 3.54 2.86 3.30 0.21 2.60 2.10 0.52 3.24 3.62 3.55 2.78 1.21 1.38 3.60 3.28 0.76 2.20 2.55 3.50 0.37
B.T.v11.high	0.39 2.73 0.34 2.10 0.25 2.50 1.76 2.66 3.27 3.08 0.72 3.39 2.49 2.13 3.15 2.39 0.42 2.80 3.35 2.94 2.39 3.06 0.51 1.88 2.47 2.72 2.75 3.24 0.31 0.34 2.68 2.87 2.02
B.T.v11.low	2.70 3.43 2.47 0.23 2.56 3.25 1.65 0.60 2.85 3.22 2.84 0.70 3.45 3.17 3.26 0.31 3.03 2.11 0.60 2.75 3.43 3.41 3.22 1.19 1.54 3.25 3.13 0.77 2.26 2.87 3.77 0.49 0.23 2.38
B.T.v52.low	1.17 0.42 1.21 3.17 1.18 0.43 1.25 2.41 0.56 0.50 1.63 2.91 0.44 0.57 0.53 2.77 1.16 0.64 2.78 0.43 0.32 0.49 1.30 2.07 0.92 0.42 0.48 3.00 2.47 1.10 0.23 2.73 2.99 2.46 3.26
B.T.b23.low	0.50 1.16 0.49 2.95 0.48 1.15 1.35 3.02 1.43 1.16 0.53 2.46 1.14 1.12 1.15 3.00 0.42 1.11 2.77 0.98 1.09 1.14 0.27 1.45 1.44 1.16 1.12 3.04 0.61 0.48 1.51 3.21 2.82 0.61 2.43 1.36
B.T.f17-high(2)	0.81 0.07 0.87 3.81 1.01 0.00 0.89 2.98 0.68 0.09 1.38 3.21 0.06 0.24 0.11 3.41 0.93 0.27 3.73 0.19 0.36 0.10 1.02 2.12 0.77 0.07 0.08 3.64 3.51 0.83 0.49 3.39 3.65 2.50 3.25 0.43 1.15

شکل ۴. ماتریس فاصله ژنتیکی بین گاوهای هلستاین بر پایه روش بیشترین درستنمایی در جایگاه ژنی FASN
Figure 4. The matrix of genetic distance between Holstein cows based on Maximum likelihood method in FASN gene

شاخص‌های ژنتیکی توالی نوکلئوتیدی گاوهای هلشتاین با دیگر گونه‌های پستانداران

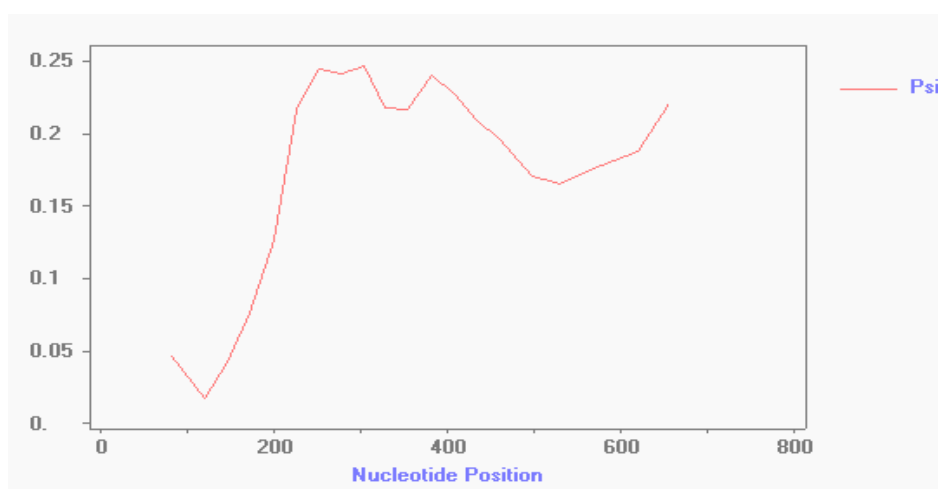
نتایج مقایسه جمعیت مورد بررسی با توالی‌های نوکلئوتیدی ژن FASN با جستجو در بانک داده‌های ژنگان (NCBI) (جدول ۷) با نرم‌افزار Dnasp5.1، در مجموع ۵۴۲ جهش، ۲۳۷ جایگاه چند شکل و ۷۹ جایگاه حذف و اضافه شناسایی شد، در این جمعیت شمار هاپلوتیپ و تنوع هاپلوتیپی به ترتیب ۱۱ و ۱ به دست آمد.

در این تحقیق، بر پایه تجزیه و تحلیل صورت گرفته برای شناسایی ناحیه‌هایی که در آن‌ها تبدیل صورت گرفته، بیست ناحیه در بین توالی‌ها شناسایی شدند که در آن‌ها تبدیل ژنی رخ داده است، که به ترتیب از احتمال رخداد بیشتر به کمتر مرتب شده‌اند، در چهار ناحیه آغازین در سطح احتمال ۵ درصد احتمال رخداد بیشتر و معنی‌دار هستند، ولیکن در دیگر نواحی احتمال رخداد پایین‌تری محاسبه شد که معنی‌دار نیست (جدول ۶ و شکل ۵).

جدول ۶. ناحیه‌هایی تبدیل ژنی در جایگاه ژن FASN در بین دو گروه گاوهای کم تولید و پر تولید گاوهای شیری هلشتاین

Table 6. The gene conversion regions in FASN gene in two groups of high and low milk production Holstein cows

Number	Gene conversion (Window)	Midpoint	Mean (Psi)
1	1-145	81	0.046
2	54-172	120	0.018
3	82-199	145	0.042
4	121-226	172	0.077
5	146-251	199	0.126
6	173-277	226	0.217
7	200-303	251	0.245
8	227-328	277	0.242
9	252-353	303	0.247
10	379-382	328	0.218
11	304-408	353	0.217
12	329-434	382	0.241
13	354-459	408	0.227
14	383-497	434	0.210
15	409-530	459	0.197
16	435-577	497	0.171
17	460-620	530	0.165
18	500-660	577	0.178
19	531-707	620	0.188
20	585-757	655	0.222



شکل ۵. ناحیه‌هایی از جایگاه ژن FASN در دو گروه گاوهای شیری پر تولید و کم تولید گاوهای هلشتاین که در معرض تبدیل ژنی قرار گرفته‌اند.

Figure 5. The gene conversion regions FASN gene in two groups of high and low milk production Holstein cows

جدول ۷. گونه، نام علمی، اندازه ژن و شماره دستیابی توالی‌های ژن FASN استفاده‌شده در تجزیه تبارزایی و روند تکاملی

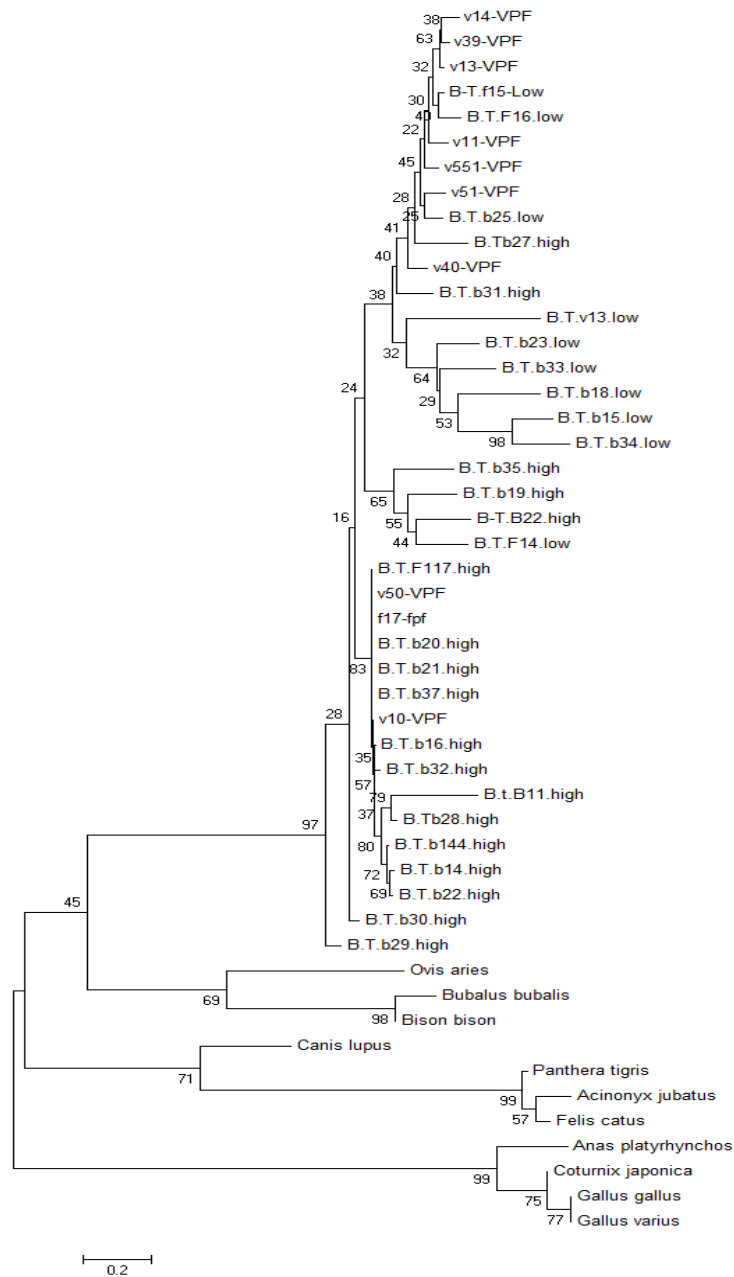
Table 7. Specie, scientific name, gene length and accession number of nucleotide sequencing of FASN gene in analysis of phylogenetic and evolution trend

Species	Accession number	Length (bp)
<i>Bos tauru</i>	JN570752.2	19760
<i>Bubalus bubalis</i>	JX104761.1	1812
<i>Bison bison</i>	XM_010856543.1	7755
<i>Ovis aries</i>	JN570752.2	18744
<i>Gallus varius</i>	AB495730.1	1224
<i>Gallus gallus</i>	NM_205155.2	10642
<i>Coturnix japonica</i>	CM003797.1	8971
<i>Anasplatyrhynchos</i>	KF185112.1	7654
<i>Feliscatus</i>	XM_011289483.1	8038
<i>Acinonyxjubatus</i>	XM_015084481.1	5513
<i>Pantheratigris</i>	XM_015536187.1	6044
<i>Canis lupus</i>	XM_005624145.2	8545

(شکل ۶). نتایج درخت تبارزایی منجر به ایجاد دو گروه شد، در گروه اول یک تقسیم مجزایی از شاخه‌ها وجود دارد به طوری که پستانداران یادشده به طور کامل در یک زیرشاخه جداگانه‌ای نسبت به گاو هلشتاین قرار دارند. جمعیت مورد بررسی گاوهای شیری هلشتاین، گاو میش، بوفالو، گوسفند در یک گروه قرار گرفتند که وجود جد مشترک بین این نژادها بوده و به لحاظ تبارزایی به هم نزدیک هستند و با نتایج گزارش شده برای بوفالو، گاو و گوسفند در یک زیر گروه همخوانی دارد (Niranjan *et al.*, 2016). بین پستانداران و در دسته نشخوارکنندگان گاو میش و بوفالو خویشاوندی بیشتری داشتند. در گروه دوم از پستانداران، گربه و یوزپلنگ قرار گرفتند و بیانگر خویشاوندی بیشتر آنها نسبت به دیگر پستانداران است. همچنین، در گروه سومی که به طور مجزا نسبت به دسته نشخوارکنندگان قرار داشت، گونه‌های پرندگان بود که فاصله بیشتری با گروه پستانداران داشتند، اما در این گروه خویشاوندی نزدیکی در بین نژادهای مختلف مرغ وجود دارد که درخت تبارزایی آن را تأیید کرد و با نتایج گزارش شده در پرندگان و پستانداران در بررسی رابطه‌های تکاملی در جایگاه ژن FASN همخوانی داشت (Niranjan *et al.*, 2016). نتایج نشان می‌دهد که تفرق و انتخاب در طی سالیان متمادی سبب به وجود آمدن رقم‌های جدید، پروتئین‌های جدید و از سویی سبب تثبیت عملکرد آنها در روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آنها شده است.

جاننشینی نوکلئوتیدی بر پایه الگوی Tamura-Nei (Tamura *et al.*, 1993) model و به صورت میزان جاننشینی‌های نوع انتقالی و متقاطع محاسبه شد که در جدول ۸ آورده شده است. بیشترین میزان جاننشینی مربوط به بازهای پورین بود، به طوری که این میزان برای تبدیل آدنین به گوانین برابر ۱۶/۵۷ محاسبه شد. فراوانی نوکلئوتیدهای مختلف در بین کل توالی‌ها تیمین ۱۹/۱۰، سیتوزین ۳۲/۷۲، آدنین ۱۹/۲۹ و گوانین ۲۸/۸۸ درصد محاسبه شد. همچنین، کمترین میزان جایگزینی تقاطعی مربوط به تبدیل آدنین و گوانین به تیمین بود (۴/۷۱ درصد). نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی در بین گونه‌های مختلف $R=0/97$ بود. نسبت جایگزینی نوکلئوتیدهایی که باعث تغییر در اسیدآمیننه شده‌اند به تغییر نکردن در اسیدآمیننه محصول (d_N/d_S) برابر ۱/۱۲ محاسبه شد (جدول ۹)، که روند انتخاب مثبت در فرآیند تکامل برای ژن FASN در بین گونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. این نوع انتخاب سبب به وجود آمدن رقم‌های جدید، پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید برای این پروتئین‌ها می‌شود، همچنین از سوی دیگر سبب تثبیت عملکرد آنها در روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آنها شده است، که ناشی از تبدیل ناحیه‌های غیر کدکننده ژنی (اینترون‌ها) به نواحی کدکننده ژنی است.

به منظور بررسی رابطه تبارزایی گونه‌ها و نژادهای مختلف پستانداران در این بررسی، نمودار درختی با استفاده از توالی‌های هم‌ردیف‌شده، ترسیم شد



شکل ۶. درخت تبارزایی به روش NJ در گونه‌های مختلف پستانداران و پرندگان در جایگاه ژن FASN
Figure 6. Phylogenetic tree based on NJ for different mammals and birds for FASN gene

جدول ۹. فراسنجه‌های تعیین روند انتخاب طبیعی در

جایگاه ژن FASN در بین گونه‌های مختلف

Table 9. The parameters of neutral selection trend determination in the locus of FASN gene in between different species

*Parameters	Estimation	Standard error
d_N	0.559	0.011
d_S	0.50	0.015
d_S/d_N	1.12	0.013

* تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (d_N), تغییرپذیری نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه به دست آمده نداشته‌اند (d_S), میزان عددی (d_N/d_S) نشان دهنده روند انتخاب طبیعی.

جدول ۸. درصد جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن FASN

در گونه‌های مختلف بر پایه روش بیشینه درست‌نمایی

Table 8. The percent of transition nucleotides in the sequence of FASN gene in different species based on Maximum likelihood method

Nucleotide	A	T	C	G
A	-	4.71	8.7	16.57
T	4.76	-	14.55	7.12
C	4.76	8.49	-	7.12
G	11.07	4.71	8.7	-

عددهای جدول بیانگر درصد جانشینی یک باز (ردیف) به باز دیگر (ستون) است. عددهای روی قطر بیانگر جانشینی انتقالی (سیاه پررنگ) و عددهای خارج قطر نشان دهنده جانشینی تقاطعی هستند (مورب).

نتیجه‌گیری

در بین گونه‌های مختلف تنها بخش بسیار کوچکی از کل توالی‌ها را تشکیل داد که نشان‌دهنده چندشکلی بالای این جایگاه و مستعد بودن به انواع تغییرپذیری‌های نوکلئوتیدی و جهش است که سبب به وجود آمدن پروتئین‌های جدید و عملکرد جدید آن برای سازگاری با شرایط محیطی متفاوت است. همچنین، روند انتخاب طبیعی جایگاه ژن FASN در بین دو گروه گاوهای شیری پر تولید و کم تولید و همچنین مقایسه توالی‌های یادشده با توالی این ژن در گونه‌های مختلف به ترتیب ۱/۱۶ و ۱/۱۲ را نشان داد که دلالت بر روند تکاملی مثبت در این جایگاه ژنی درون و بین گونه‌های مختلف است.

درخت تبارزایی توالی نوکلئوتیدی جایگاه ژن FASN گاوهای شیری را به دو گروه پر تولید و کم تولید مجزا کرد که دلیل تفاوت عملکرد این جایگاه بر حسب سطح تولید است. همچنین، توالی جایگاه یادشده در بین گونه‌های متفاوت مسیرهای تکاملی متمایزی را نشان می‌دهد. شمار کل جهش‌هایی که در فرآیند تکامل در این جایگاه ژنی در بین گونه‌های متفاوت رخ داده است برابر ۵۴۲ و همچنین شمار جایگاه‌های چند شکل نیز ۲۳۷ جایگاه محاسبه شد، که روند انتخاب مثبت در این ژن‌ها را توجیه می‌کند. بخش حفاظت‌شده ناحیه مورد بررسی در جایگاه ژن FASN

REFERENCES

- Chakravarthy, M. V., Zhu, Y., Yin, L., Coleman, T., Pappan, K. L., Marshall, C. A. & Semenkovich, C. F. (2009). Inactivation of hypothalamic FAS protects mice from diet-induced obesity and inflammation. *Journal of Lipid Research*, 50(4), 630-640.
- Chirala, S. S., Chang, H., Matzuk, M., Abu-Elheiga, L., Mao, J., Mahson, K., Finegold, M. & Wakil, S. J. (2003). Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100, 6358-6363.
- 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, MA.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Journal of Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Morris, C. A., Cullen, N. G., Glass, B. C., Hyndman, D. L., Manley, T. R., Hickey, S. M., McEwan, J. C., Pitchford, W. S., Bottema, C. D. & Lee, M. A. (2007). Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mammalian Genome*, 18, 64-74.
- Muñoz, G., Ovilo, C., Noguera, J. L., Sánchez, A., Rodríguez, C. & Silio, L. (2003). Assignment of the fatty acid synthase (FASN) gene to pig chromosome 12 by physical and linkage mapping. *Animal Genetics*, 34(3), 234-235.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. (pp. 51-72).
- Niranjan, S. K., Goyal, S., Dubey, P. K., Kumari, N., Mishra, S. K., Mukesh, M., & Kataria, R. S. (2016). Genetic diversity analysis of buffalo fatty acid synthase (FASN) gene and its differential expression among bovines. *Gene*, 575(2), 506-512
- Oztabak, K., Gursel, F. E., Akis, I., Ates, A., Yardibi, H. & Turkay, G. (2014). FASN Gene Polymorphism in Indigenous Cattle Breeds of Turkey. *Folia Biologica (Krakow)*, 62, 29-35.
- Qiao, Y., Huang, Z., Li, Q., Liu, Z., Hao, C., Shi, G. & Xie, Z. (2007). Developmental changes of the FAS and HSL mRNA expression and their effects on the content of intramuscular fat in Kazak and Xinjiang sheep. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(10), 909-917.
- Senaris, R., Garcia-Caballero, T., Casabiell, X., Gallego, R., Castro, R., Considine, R.V., Dieguez, C. & Casanueva, F. F. (1997). Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*, 138, 4501-4504.
- Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog Lipid Research*, 42, 289-317.
- Suburu, J., Shi, L., Wu, J., Wang, S., Samuel, M., Thomas, M. J. & Chen, Y. Q. (2014). Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306(10), 1132-1143.
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.

16. 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.
17. Techenmacher, H. & Koch, G. (1991). Opioids in the milk, *Endocrine Regulation*, 25, 147-150.
18. Yang, C. Y., Huang, W. Y., Chirala, S. & Wakil, S. J. (1988). Complete amino acid sequence of the thioesterase domain of chicken liver fatty acid synthase. *Biochemistry*, 27(20), 7773-7777.