مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تمایز بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز (GLUT1) در زمان‌های متفاوت فیزیولوژیکی در غدد پستانی بزهای عدنی ایران

سالم مرمضی[۱]، علی اکبر مسعودی*[۲]، رسول واعظ ترشیزی[۳]، عباس پاکدل[٤]

[۱]دانشجوی دوره دکتری اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.
[۲] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.
[۳] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.
[٤] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰٤/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۲۳

چکیده

لاکتوز، به دلیل خاصیت اسمزی، تعیین کننده حجم شیر پستان می‌باشد. پیش ساز ضروری ساخت لاکتوز، گلوکز می‌باشد که در پستان غالباً توسط انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز از خون جذب می‌شود. در مطالعه اخیر، سطوح رونوشت برداری ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در غدد پستانی بزهای عدنی در پیش از زایمان، تولید شیر و زمان خشکی در دو گروه از دامهای با ارزشهای اصلاحی بالا و پایین برای صفت تولید شیر مورد مقایسه قرار گرفت. به همین منظور ابتدا ارزش‌اصلاحی به کمک روش رگرسیون تصادفی چند صفتی تخمین زده شد. سپس، از بافت پستانی توسط تفنگ بیوپسی نمونه‌برداری صورت گرفت و از روش Real Time PCR برای مطالعه بیان ژن مورد نظر استفاده گردید. براساس نتایج تحقیق حاضر، تمامی عوامل ثابت مدل که شامل گروه ارزش‌اصلاحی، مرحله نمونه‌برداری و اثر متقابل بین این دو عامل بودند، معنی‌دار گردید ($p<۰/۰۰۵$). همچنین، بیان این ژن فقط در زمان تولید شیر بین دو گروه ارزش‌اصلاحی متفاوت بود، به طوری که بیشترین سطح رونوشت برداری در گروه دارای ارزش‌اصلاحی بالا مشاهده شد. الگوی رونوشت برداری این ژن در غده پستانی بین دو گروه نیز متفاوت بود، به طوری که حداقل بیان این ژن در گروه با ارزش‌اصلاحی بالا در پیش از زایمان بود، اما در گروه دیگر کمترین بیان در زمان تولید شیر بود. مشاهده بیان متفاوت بین دو گروه در زمان تولید شیر می‌تواند حاکی از تغییرات نوکلئوتیدی در جایگاه فاکتورهای رونویسی و یا محل اتصال miRNAها باشد.

واژه‌های کلیدی: *انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز، بیان ژن، غده پستانی، تولید شیر، بز عدنی.*

* نویسنده مسئول: علی اکبر مسعودی تلفن: ۰۲۱۴۸۲۹۲۳۵۳ Email: masoudia@modares.ac.ir

مقدمه

گلوکز منبع مهم انرژی در زمان تولید شیر و پیش‌ساز ضروری برای ساخت لاکتوز در غده پستان محسوب می‌گردد. سرنوشت عمده گلوکز در سلول‌های اپیتلیال پستان برای سنتز لاکتوز در دستگاه گلژی می‌باشد. علاوه براین گلوکز برای سنتز دیگر اجزای شیر مانند اسیدهای چرب نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (Mepham, 1987). با توجه به این که لاکتوز مسؤول تعدیل اسمزی ترشحات غده پستان می‌باشد و حجم شیر تولیدی را تعیین می‌کند (Cant *et al*., 2002)، تامین مداوم گلوکز از خون اطراف غده پستان برای حفظ تولید شیر ضروری می‌باشد. به همین منظور بیش از ٨٥ درصد کل گلوکز بدن به هنگام تولید شیر به سمت غده پستان هدایت می‌گردد (Bickerstaffe & Annison, 1974). لذا جذب گلوکز از خون توسط غده پستان نقشی کلیدی در ساخت شیر ایفا خواهد نمود.

انتقال گلوکز از طریق غشاهای پلاسمایی سلول‌ها توسط دو خانواده متمایز از انتقال دهنده-های گلوکز انجام می‌گیرد (Wood & Trayhurn, 2003). در اکثر بافتها و سلول‌ها، گلوکز توسط فرایندهای دوجهتی و مستقل از انرژی یعنی توسط خانواده انتقال دهنده‌های تسهیل دهنده گلوکز[1] (GLUT) انتقال می‌یابند. با این وجود، در تعداد کمی از سلول‌ها، گلوکز به صورت فعال نیز انتقال می‌یابد، که توسط فرآیندهای انتقال متصل به سدیم و برعکس گرادیان الکتروشیمیایی (حامل‌های حل شده SLC5A) انجام می‌شود. جذب گلوکز توسط غده پستان بیشتر از طریق انتقال دهنده‌های تسهیل دهنده گلوکز انجام می-شود (Xiao & Cant, 2003; Zhao *et al*., 1996)، هر چند که انتقال دهنده‌های فعال نیز روی انتقال گلوکز در غده پستان تاثیر گذار می-باشند (Zhao *et al*., 1998; Shah *et al*., 1999). تاکنون ایزومرهای مختلفی از مولکول‌های انتقال دهنده گلوکز در غده پستان شناسایی گردیده‌اند، که شامل انتقال دهنده‌های نوع ١، ٣ و ٤ می‌باشند (Zhao *et al*., 1993). انتقال دهنده نوع ١ گلوکز (GLUT1) نوع غالب انتقال دهنده گلوکز در غده پستان در زمان تولید شیر به حساب می‌آید (Zhao *et al*., 1996). بنابراین انتقال دهنده نوع ١ گلوکز نقش مهمی در جذب گلوکز در طی دوره شیردهی دارا می‌باشد. ژن این انتقال دهنده، با علامت‌های GLUT1 و یا SLC2A1 نامگذاری گردیده و mRNAی این ژن در بز در برگیرنده ٢١٠٨ باز می‌باشد (Yu *et al*., 2013). این ژن دارای ١٠ اگزون و ٩ اینترون، یک ناحیه پروموتور و چندین افزاینده[2] می‌باشد (Ng *et al*., 2002)، که یک پروتئین ٤٩٢ اسیدآمینه‌ای را کد می‌کند (Mueckler *et al*., 1985). تاکنون چندین چند شکلی در این ژن در انسان شناسایی شده است، که با بیماری‌هایی نظیر دیابت در ارتباط

[1] Facilitative Glucose Transporters (GLUT)

[2] Enhancer

هستند (Hodgkinson *et al*., 2005; Zintzaras & Stefanidis, 2005).

در سلول‌های اپیتلیال غده پستان دامهای شیرده، با توجه به غلظت پایین داخل سلولی گلوکز و ارتباط بین میزان مصرف و جذب، پیشنهاد شده است که انتقال گلوکز از پلاسما به داخل سلول یک مرحله محدود کننده برای متابولیسم گلوکز و ساخت لاکتوز باشد (Kahn, 1992). بنابراین به نظر می‌رسد رونوشت برداری از ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در حیوانات با تولید شیر بالا و پایین می‌تواند متفاوت باشد، لیکن تاکنون گزارشی در این خصوص ارائه نشده است. بنابراین، در این مطالعه سعی شده است میزان رونوشت برداری ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز بین بزهای عدنی با ارزشهای اصلاحی تولید شیر بالا و پایین را در مراحل مختلف فیزیولوژیکی غده پستان به خصوص در زمان تولید شیر مورد بررسی قرار داده، تا بتوان از تفاوت مشاهده شده در بیان این ژن، برای انجام تحقیقات بعدی و نیز شناسایی چند شکلی‌های مرتبط در ناحیه کد کننده و یا پروموتور استفاده گردیده و حیوانات برتر را جهت انتخاب شناسایی نمود.

مواد و روشها

حیوانات

بز عدنی که در اصطلاح محلی به آن عیونی و عیانی هم گفته می‌شود، یکی از نژادهای بز مهم در جنوب ایران است. این نژاد در ناحیه ساحلی خلیج فارس در استان بوشهر پرورش داده می‌شود. طول دوره شیردهی این نژاد تقریباً ٤ ماه و کل تولید شیر آن نیز بین ۱۲۰ تا ۱۸۰ کیلوگرم شیر می‌باشد. در سال ۲۰۰۵ در شهرستان تنگستان واقع در استان بوشهر گله‌ای از بزهای عدنی ایجاد شد، که این حیوانات از سراسر استان بوشهر و از دامداری‌های کوچک خریداری شده بودند. این گله در شرایط اقلیمی گرم و مرطوب به منظور حفظ ذخایر ژنتیکی و بهبود ژنتیکی بزهای عدنی پایه‌گذاری شد. بزهای عدنی حیواناتی پلی‌استروس بوده و قابلیت جفتگیری در تمامی فصول سال را دارند، اما فصل عمده جفتگیری آنها از اوایل اردیبهشت تا اواخر خرداد ماه و نیز از اواسط شهریور تا اواسط آبان ماه می‌باشد. براساس اطلاعات موجود، بز عدنی می‌تواند در طی دو سال سه بار زایش داشته باشد. جفتگیری‌ها در این گله به صورت طبیعی بوده و هیچ‌گونه برنامه همزمان‌سازی فحلی در این گله اجرا نشده است. دو قلوزایی در این گله متداول بوده، به طوری که ٦۰ تا ۷۰ درصد دوقلوزایی در دام‌های با بیش از ۳ شکم زایش مشاهده می‌گردد. تغذیه گله بیشتر وابسته به مرتع بوده و عمده گیاهان آن توله، ترشک و درختچه اشک می‌باشد. علاوه بر این با توجه به شرایط مرتع، در فصول مختلف سال روزانه بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم جو نیز در اختیار بزهای شیرده قرار می‌گیرد.

ارزیابی ژنتیکی

به منظور انتخاب حیوانات برای مطالعه بیان ژن، از داده‌های سالهای ۱۳۸۵ تا ۱۳۹۱ که شامل

٢٣٦٤ رکورد روز آزمون تولید شیر متعلق به ٣ دوره اوّل شیردهی بزهای عدنی بوده است استفاده گردید. این رکوردها مربوط به ٣٧٥ بز ماده و ١٩ بز نر بوده که در مرکز اصلاح نژاد بز عدنی واقع در استان بوشهر نگهداری می‌شدند.

در درجه اوّل و برای برازش مدل بهینه از درجات متفاوت تابع لژاندر پلی‌نومیال برای اثر ژنتیکی افزایشی و محیطی دائمی استفاده شد. در نهایت مدل مورد استفاده برای ارزیابی ژنتیکی، مدل تابعیت تصادفی چند صفتی همراه با تابع لژاندر پلی نومیال درجه ٥ (هم برای اثر ژنتیکی افزایشی و هم برای اثر محیطی دائمی) بود، که در آن هر یک از دوره های شیردهی اوّل تا سوّم به عنوان یک صفت در نظر گرفته شدند. این آنالیز با استفاده از نرم افزار WOMBAT انجام گرفت (Meyer, 2007). با توجه به اینکه در این مطالعه هدف بررسی بیان ژن در حیوانات شکم اوّل می‌باشد، تنها از ضرایب بدست آمده برای صفت اوّل جهت محاسبه ارزش اصلاحی تولید شیر دوره اوّل شیردهی طبق رابطه زیر استفاده شد:

$$u_i = \sum_{5}^{90} \Phi_r . \alpha_{ir}$$

در این رابطه u_i مجموع ارزش اصلاحی روزهای شیردهی دوره اوّل شیردهی حیوان i ام از روز ٥ تا ٩٠ شیردهی می‌باشد. Φ_r ضرایب لژاندر پلی‌نومیال هر کدام از روزهای شیردهی است و α_{ir} ضرایب ارزش اصلاحی برآورد شده حیوان i ام برای دوره اوّل شیردهی است. با توجه به اینکه این تحقیق روی حیوانات بدون رکورد برای تولید شیر بوده است (حیواناتی که هنوز زایمان اوّل آنها صورت نگرفته است)، برای محاسبه ارزش اصلاحی تولید شیر آنها از ارزش‌های اصلاحی والدین آنها طبق رابطه زیر استفاده شد:

$$u_o = u_s + u_d$$

در این رابطه u_o ارزش اصلاحی فرزند برای تولید شیر در دوره اوّل شیردهی، u_s و u_d نیز به ترتیب ارزش اصلاحی پدر و مادر برای تولید شیر دوره اوّل شیردهی می‌باشد.

نمونه‌برداری از حیوانات

سه حیوان از بین ده حیوان شکم اول که والدین آنها واجد بالاترین ارزش اصلاحی برای صفت تولید شیر بودند و سه حیوان از بین ده حیوان شکم اولی که والدین آنها واجد پایین‌ترین ارزش اصلاحی برای صفت تولید بودند در دو گروه ارزش اصلاحی بالا و ارزش اصلاحی پایین در نظر گرفته شدند. نمونه‌برداری از بافت پستان توسط تفنگ بیوپسی[1] در سه مرحله زمانی متفاوت انجام شد. مرحله اوّل مرحله پیش از زایمان اوّل بود که تمامی حیوانات تحت نمونه‌برداری در محدوده دو تا شش روز پیش از زایمان و با میانگین چهار روز پیش از زایمان قرار داشتند. مرحله دوم نمونه‌برداری ٤٠ روز پس زایمان بود و مرحله سوم نمونه‌برداری نیز ١١٥ روز بعد از زایمان و در زمان خشکی حیوانات انجام گرفت. نمونه‌های اخذ شده بلافاصله در

[1] تفنگ بیوپسی با اندازه و طول سوزن cm10× g14 و با طول نمونه‌برداری ١٩ میلی‌متر، ساخت شرکت BARD

ازت مایع قرار داده شد و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

به منظور استخراج RNA از بافت پستان، از محلول TRIZOL (سیناژن) همراه با مراحل پیشنهاد شده برای این محلول استفاده گردید. غلظت RNAی حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر Genova[1] با طول موج ۲٦۰ nm تعیین شد و جهت ساخت cDNA از کیت دومرحله‌ای RT-PCR (VIVANTIS) استفاده شد.

طراحی آغازگر و اندازه‌گیری میزان بیان ژن

به منظور اندازه‌گیری میزان بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در بافت پستان بز عدنی از آغازگر رفت 5'GATGATGCGAGAGAAGAAGGT3' و آغازگر برگشت 5'AGTGAAGGCTGTGTTGACGAT3' استفاده شد. این جفت آغازگر براساس توالی این ژن که در پایگاه داده NCBI با شماره JQ343217 ثبت شده طراحی گردیدند (Yu *et al.*, 2013). همچنین GAPDH به عنوان ژن مرجع برای نرمال کردن بیان ژن مورد نظر در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای ژن GAPDH براساس توالی AJ431207 پایگاه داده NCBI طراحی شده‌اند (Hasvold, 2002) و شامل 5'AGTCAAGGCAGAGAACGGGAA3' و 5'ACAAACATGGGGGCATCAGCA3' به ترتیب به عنوان آغازگر رفت و آغازگر برگشت می‌باشند. به منظور سنجش کارایی این واکنش، از سریال رقت لگاریتمی (۵ رقت) و از هر رقت ۳ تکرار استفاده شد. در واکنش Real Time PCR از هر نمونه نیز ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

شرایط PCR استفاده شده

واکنش Real Time PCR توسط دستگاه مینی‌اُپتیکون (Bio-Rad Laboratories, USA) انجام گرفت. واکنش دربرگیرنده ٤ میکرولیتر محلول آماده 5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus دارای ROX ساخت شرکت SBD (Solis BioDyne)، ۱ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت اختصاصی ژن (غلظت ۱۰ پیکی مول در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر cDNA (غلظت ۲ نانوگرم در میکرولیتر) و آب تا حجم ۲۰ میکرولیتر بود. طبق پروتکل محلول آماده، مراحل واکنش به صورت ذیل انجام شد: ابتدا یک چرخه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، سپس ٤۰ چرخه به ترتیب در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و نهایتا یک چرخه پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

[1]JENWAY, England

مقایسات آماری

به منظور انجام مقایسات آماری در ابتدا C_t[1] ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز از C_t ژن مرجع کم شد و آنگاه حاصل تفریق به منظور انجام مقایسات آماری با استفاده از مدل آماری زیر مورد بهره برداری قرار گرفت.

$$y_{ijk} = S_i + B_j + (S*B)_{ij} + a(B)_k + (S*a(B))_{ik} + e_{ijko}$$

در این مدل y تفاوت C_t ژن مرجع و ژن مورد نظر (ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز)، S اثر ثابت مرحله نمونه‌برداری، B اثر ثابت گروه ارزش اصلاحی، S*B اثر متقابل بین مرحله نمونه‌برداری و گروه ارزش اصلاحی، a(B) اثر تصادفی حیوان در داخل گروه ارزش اصلاحی، و S*a(B) اثر متقابل بین مرحله نمونه‌برداری و حیوان داخل گروه ارزش اصلاحی بوده که به صورت عامل تصادفی در مدل در نظر گرفته شده است. این مدل با استفاده از رویه آماری GLM نرم افزار SAS9.1 و مقایسات بین سطوح توسط آزمون توکی در سطح ۵ درصد خطا انجام شد.

نتایج

پارامترها و اختصاصی بودن واکنش Real Time PCR

مطالعه میزان بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در مراحل مختلف فیزیولوژیکی غده پستان بین دو گروه ارزش اصلاحی تولید شیر بالا و پایین توسط Real Time PCR و روش نسبی بیان ژن انجام شد. آزمایش طبق نمودار منحنی استاندارد خطی می‌باشد. شیب خط منحنی استاندارد ۳/۱۹۵- محاسبه گردید، که نشان دهنده کارایی بالا (٪ ۱۰۵/٦) این مجموعه واکنش‌های شیمیایی می‌باشد. کارایی واکنش شیمیایی فوق نشان داد، که از این واکنش شیمیایی می‌توان با دقت بالا جهت محاسبات بیان ژن نسبی استفاده نمود. علاوه بر این، منحنی استاندارد نشان می‌دهد شناسایی غلظت‌های خیلی پایین mRNA انتقال دهنده نوع یک گلوکز توسط این واکنش امکان‌پذیر است، به عبارت دیگر این واکنش از حساسیّت بالایی برخوردار می‌باشد. پارامتر دیگر که برای سنجش کارایی Real Time PCR استفاده می‌گردد معیار R^2 می‌باشد. معیار R^2 این واکنش ۰/۹۹۹ است.

در Real Time PCR اختصاصی بودن محصول‌های تکثیر یافته با رسم منحنی دمای ذوب محصول‌ها بررسی می‌شود. منحنی دمای ذوب محصول تکثیر یافته نشان داده که پیک اختصاصی محصول ۹۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد، که نشان دهنده این مطلب است که محصول تکثیر یافته توسط این جفت آغازگر اختصاصی هستند.

بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز

بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز توسط Real Time PCR در بافت غده پستان بزهای عدنی شکم اوّل با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در زمانهای قبل از زایمان، تولید شیر و

[1] Threshold Cycle (Ct)

زمان خشکی و در بین دو دسته از بزهای با ارزش اصلاحی تولید شیر بالا و پایین مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج مدل آماری بکار رفته، تمام اثرات مورد بررسی در این مطالعه روی بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز اثر معنی-داری داشته‌اند (p<۰/۰۰۵)، هر چند که بیان ژن نوع ۱ انتقال دهنده گلوکز به طور معنی‌داری تحت تاثیر اثر گروه ارزش اصلاحی و اثر مرحله نمونه‌برداری قرار گرفته است (جدول ۱).

بیان انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز تنها در زمان تولید شیر بین دو گروه ارزش اصلاحی متفاوت بوده است (p<۰/۰۰۰۱)، به طوری که رونوشت برداری از این ژن در گروه با ارزش اصلاحی بالا بیشتر از گروه با ارزش اصلاحی پایین بوده است (جدول ۱). این در حالی است که در زمان قبل از زایمان و زمان خشکی بین این دو گروه ارزش اصلاحی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۰۵) (جدول ۱). از طرف دیگر مقایسه روند بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در مراحل مختلف نمونه‌برداری در هر دو گروه نیز نتایج جالب توجهی نشان داد. بیان این ژن در گروه با ارزش اصلاحی تولید شیر بالا در زمان قبل از زایمان در مقایسه با زمان‌های دیگر حداقل بوده است و حداکثر بیان این ژن در این گروه در زمان خشکی بوده است، در حالی که در زمان تولید شیر بیان این ژن حالت بینابینی داشته است. در گروه با ارزش اصلاحی پایین بیان این ژن الگوی متفاوتی را نشان داد، به طوری که در زمان تولید شیر بیان این ژن حداقل بوده و در زمان خشکی حداکثر بیان این ژن مشاهده گردید. بنابراین، الگوی بیان این ژن در مراحل مختلف بین دو گروه ارزش اصلاحی متفاوت می‌باشد. این الگوی متفاوت به دلیل بیان مقادیر متفاوت mRNA این ژن در زمان تولید شیر بین دو گروه ارزش اصلاحی است.

بحث

تولید شیر هم از لحاظ پرورش اقتصادی حیوانات اهلی و هم از لحاظ تغذیه نوزادان از اهمیت خاصی برخوردار است. تنوع زیادی بین حیوانات از لحاظ مقدار (حجم) تولید شیر مشاهده می‌گردد، که به طور کلی دلایل آن به عوامل مختلف محیطی و ژنتیکی نسبت داده شده است. بطور کلی گزارش شده که حجم شیر توسط مقدار لاکتوز سنتز شده تعیین می‌گردد (Cant *et al*., 2002). گلوکز سوبسترای ضروری سنتز لاکتوز شیر می‌باشد (Zhao & Keating, 2007). بنابراین، انتظار می‌رود تامین مقادیر زیاد گلوکز برای سنتز لاکتوز در سلول‌های اپیتلیال غده پستان یک مرحله محدود کننده باشد (Threadgold & Kuhn, 1984). با این وجود گلوکز نمی‌تواند از غشای پلاسمایی عبور و وارد سلول‌های اپی‌تلیال غده پستان (سلول‌های تولید و ترشح کننده شیر) شود (Wood & Trayhurn, 2003). انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز انتقال دهنده عمده‌ای است، که در غده پستان گلوکز را از غشا انتقال می‌دهد (Zhao *et al*., 2004). بر این اساس فرض شده است، که میزان رونوشت

برداری ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در بین حیوانات دارای ارزش اصلاحی تولید شیر بالا و پایین ممکن است متفاوت باشد. در مطالعه حاضر نتایج نشان داد، که تفاوت زیادی بین بزهای عدنی با ارزش اصلاحی تولید شیر بالا و پایین از لحاظ رونوشت برداری از ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز وجود دارد و این تفاوت ممکن است یکی از دلایل بالقوه تاثیر گذار بر میزان تولید شیر باشد. بنابراین، ضرروی است که عوامل موثر بر بیان این ژن مورد مطالعه قرار بگیرد تا بتوان از آن جهت شناسایی بزهای عدنی برتر استفاده نمود. در گاوهای شیری توسط USDA در سال ۲۰۱۲ پروژه‌ای روی این ژن شروع شده است، که تا به حال گزارشی از نتایج آن منتشر نشده است. با این حال، این اوّلین مطالعه در این زمینه است که در آن ارتباط ارزش‌های اصلاحی تولید شیر با میزان بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز مورد بررسی قرار گرفته و نتایج آن انتشار یافته است. علاوه بر این تاکنون هیچ گونه چند شکلی در ناحیه کد کننده این ژن در حیوانات اهلی گزارش نشده است. بنابراین، فرصت مطالعه ارتباط این ژن با صفات اقتصادی نظیر تولید شیر پیش نیامده است. چند شکلی در این ژن در انسان گزارش شده است و ملاحظه شده است که این ژن با بیماری‌هایی نظیر دیابت و دیگر بیماری‌ها در ارتباط می‌باشد (Hodgkinson *et al*., 2005; Zintzaras & Stefanidis, 2005). دیابت بیماری است که با میزان نفوذ پذیری گلوکز به داخل سلول‌ها در ارتباط می‌باشد.

در مطالعه حاضر ملاحظه شد که در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت غده پستان، میزان رونوشت برداری ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز نیز متفاوت بوده است. در مطالعات دیگر رونوشت برداری متفاوت این ژن در زمان‌های فیزیولوژیکی مختلف نیز مشاهده شده است (Mattmiller *et al*., 2011; Zhao *et al*., 2004). در مطالعه حاضر مشاهده شد که بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در گروه با ارزش اصلاحی بالا در زمان تولید شیر نسبت به زمان قبل از زایمان (زمان آبستنی) افزایش یافته است. در این راستا، در گاوهای شیرده ملاحظه شده است که روند بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز طی دو هفته قبل از زایمان تا اوج تولید شیر الگوی افزایشی دارد و پس از آن کاهش می‌یابد، به طوری که هم سطح زمان زایمان خواهد ماند (Zhao *et al*., 1996; Komatsu *et al*., 2005; Zhao & Keating, 2007; Mattmiller *et al*., 2011). افزایش بیان این ژن در زمان شیردهی نسبت به زمان قبل از زایمان در گروه با ارزش اصلاحی بالا، شاید به دلیل نیاز زیاد به گلوکز جهت تامین انرژی و ساخت مقادیر زیاد لاکتوز در حیوانات با توان بالا می‌باشد. در این خصوص گزارش شده که با توجه به نیاز بالای غده پستان گاو شیری به گلوکز در زمان تولید شیر بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز طی اوایل شیردهی نسبت به دوره آبستنی در بافت غده پستان گاو در حدود ۱۰۰ برابر بیشتر بوده است (Zhao *et al*., 2004). در مطالعات دیگر نیز چنین یافته‌هایی مشاهده شده است، به طوری که بیان این ژن در طی اواخر

دوره شیردهی و اوج تولید شیر زمانی که جذب گلوکز بیشتری مورد نیاز است، بیشتر بوده است (Nemeth *et al*., 2000). علاوه بر این، در مطالعه کنونی ملاحظه می‌شود، که بر خلاف گروه با ارزش اصلاحی بالا، در گروه با ارزش اصلاحی پایین رونوشت برداری از ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در زمان تولید شیر در مقایسه با زمان قبل از زایمان کاهش یافته است. این نتیجه نشان می-دهد که غده پستان حیوانات با توان تولید شیر پایین نیاز کمی به ساخت این انتقال دهنده در زمان تولید شیر دارند و می‌توان گفت که انتقال دهنده‌هایی که در زمان قبل از زایمان ساخته شده‌اند توانایی تامین نیاز غده پستان به گلوکز را دارند. علاوه بر این، این نتایج نشان می‌دهند که با اجرای برنامه انتخاب براساس ارزش‌های اصلاحی تولید شیر، رونوشت برداری از ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در غده پستان بزهای عدنی عامل محدود کننده جهت تامین انرژی، سنتز اسیدهای چرب، ساخت لاکتوز و تعیین حجم شیر نخواهد بود.

علاوه بر نتایج فوق، در تحقیق حاضر ملاحظه شد که رونوشت برداری این ژن در زمان قبل از زایمان بین دو گروه ارزش اصلاحی متفاوت نبوده است. این نتیجه گویای این است شرایط رونوشت برداری از این ژن بین دو گروه ارزش اصلاحی در زمان قبل از زایمان یکسان بوده است. علاوه بر این، رونوشت برداری کم این ژن در زمان قبل از زایمان نسبت به زمان تولید شیر، در غدد پستان گروه با ارزش اصلاحی بالا مشاهده شده است. با توجه به اینکه در تحقیقات دیگر نشان داده شده است، که در مرحله آخر آبستنی تقریباً ٦٠ درصد رشد جنین اتفاق می‌افتد (Twardock *et al*., 1973) و در این زمان ۳۳ تا ٣٦ درصد گلوکز بدن به سمت جفت و به منظور تامین نیازهای انرژی جنین هدایت می‌شود (Hay *et al*., 1983). بنابراین انتظار می‌رود که بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در بافت غده پستان بزهای عدنی با ارزش اصلاحی بالا نیز در زمان اواخر آبستنی نسبت به دوره شیردهی کمتر باشد تا جنین فرصت ببیشتری جهت دریافت گلوکز داشته باشد.

نکته قابل استنتاج دیگر از نتایج این تحقیق این است که رونوشت برداری از این ژن در اوائل دوره خشکی نسبت به زمان تولید شیر و قبل از زایمان بیشتر بوده است و بین دو گروه از لحاظ رونوشت برداری این ژن تفاوت معنی داری نبوده است. با توجه به اینکه در این زمان بافت غده پستان در مرحله تجدد سلول‌های اپیتلیال به منظور جایگزین شدن با سلول‌های فرسوده می-باشد و به گلوکز و انرژی زیادی نیاز دارد، بیان بالای این ژن در این زمان قابل توجیه می‌باشد.

جدول ١- مقایسه بیان ژن انتقال دهنده نوع ١ گلوکز در بین سطوح اثرات عوامل ثابت.

Table 1- Comparison of BLG gene transcription between different levels of fixed effects.

مقایسات ΔCt^{*} ΔCt comparisons	سطح Level	عامل Effect
-1.94[a]	گروه ارزش اصلاحی بالا High breeding value group	اثر گروه‌های ارزش اصلاحی Breeding value groups effect
-2.41[b]	گروه ارزش اصلاحی پایین Low breeding value group	
0.10	خطای استاندارد میانگین Standard error of mean	
-3.42[b]	قبل از زایمان Before Calving	اثر مراحل نمونه برداری Sampling times effect
-3.10[b]	شیردهی Lactation time	
-0.01[a]	خشکی Drying time	
٠.١٢	خطای استاندارد میانگین Standard error of mean	
-3.25[c]	گروه ارزش اصلاحی بالا*قبل از زایمان High breeding value group*before calving	اثرات متقابل بین گروه‌های ارزش اصلاحی و مراحل نمونه برداری Interactions between breeding value groups and sampling times
-3.59[c]	گروه ارزش اصلاحی پایین*قبل از زایمان Low breeding value group*before calving	
-2.24[b]	گروه ارزش اصلاحی بالا*شیردهی High breeding value group*lactation time	
-3.96[c]	گروه ارزش اصلاحی پایین*شیردهی Low breeding value group*lactation time	
-0.34[a]	گروه ارزش اصلاحی بالا*خشکی High breeding value group*drying time	
0.31[a]	گروه ارزش اصلاحی پایین*خشکی Low breeding value group*drying time	
٠.١٨	خطای استاندارد میانگین Standard error of mean	

*** ΔCt حاصل تفاوت بین Ct ژن مورد نظر و Ct ژن مرجع می‌باشد.**

به طور کلی، بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیان نمود که میزان بیان ژن انتقال دهنده نوع ١ گلوکز با رشد و توسعه بافت پستان در ارتباط می‌باشد. علاوه بر این پیشنهاد می‌شود

که این ژن به هنگام شیردهی در غده پستان نقش حمایتی ایفاء می‌نماید و ممکن است هورمون‌های لاکتوژنیک میزان بیان آن را تنظیم کنند. علاوه بر مطالب فوق الذکر، میزان بیان متفاوت این ژن در زمان‌های مختلف فیزیولوژیکی غده پستان شاید به دلیل وجود چندین جایگاه فاکتور رونویسی در ناحیه پروموتور این ژن باشد، چرا که تاکنون فاکتورهای رونویسی که اثر آنها روی بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز مشخص شده است زیاد می‌باشند که برای نمونه می‌توان به فاکتورهای نوع-TBP و فاکتور TBP-مرتبط با TAF (II) ۲۵۰ اشاره نمود (Santalucia *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2010). این فاکتورهای رونویسی در شرایط فیزیولوژی متفاوت و در پاسخ به عوامل دیگر میزان رونوشت برداری این ژن را تعیین می‌کنند. بنابراین بروز هر گونه جهش در جایگاه اتصال این فاکتورهای رونویسی در ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز ممکن است میزان رونوشت برداری این ژن در حیوانات مختلف را تحت تاثیر قرار دهد. علاوه بر این، این جهش‌ها ممکن است میزان رونوشت برداری در زمان‌های مختلف را تحت تاثیر قرار بدهد. در این مطالعه مشاهده شد که بین بزهای عدنی با ارزش اصلاحی بالا و پایین در زمان تولید شیر از لحاظ رونوشت‌برداری این ژن تفاوت وجود دارد که ممکن است دلیل آنها بروز جهش در جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی مربوط به زمان تولید شیر و یا جایگاه اتصال miRNA مخصوص زمان تولید شیر باشد.

تاکنون مطالعات گسترده‌ای در خصوص عوامل موثر بر میزان بیان این ژن و افزایش انتقال گلوکز گزارش شده است. گزارش شده که با تیمار کردن سلول‌های اپیتلیال غده پستان با فعال کننده AMPK (۵ آمینو ایمیدازول ۵ کربوکسیدآمید ۱ B ریبوفورانوززید) جذب گلوکز و mRNAی انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز به وضوح افزایش می‌یابد (Zhang *et al.*, 2011). این مطلب نشان می‌دهد که افزایش در جذب گلوکز ممکن است به دلیل افزایش در بیان ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز باشد. در تعدادی از مطالعات پیشنهاد شده است که Akt بر روی عملکرد انتقال دهنده‌های گلوکز تاثیر گذار می‌باشد، چرا که مقدار رونویسی ژن انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز را افزایش داده است (Schwertfeger *et al.*, 2003). بنابراین، این امکان وجود دارد که Akt بیان انتقال دهنده‌های گلوکز نظیر انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در سلول‌های اپی‌تلیال غده پستان را تحت تاثیر قرار دهد. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد که ایجاد وقفه در تولید پرولاکتین در غده هیپوفیز، منجر به کاهش انتقال دهنده گلوکز در غده پستان موش صحرایی شده است (Fawcett *et al.*, 1992)، از طرف دیگر گزارش شده است که پرولاکتین منجر به افزایش ۵ برابری سطح انتقال دهنده نوع ۱ گلوکز در غده پستان می‌گردد (Baldwin *et al.*, 1994). بنابراین، هورمون پرولاکتین عامل دیگری است که بر میزان رونوشت برداری این ژن تاثیرگذار می‌باشد. علاوه بر موارد فوق،

گلوکوکورتیکوئیدها روی انتقال گلوکز از جفت جنین انسان، موش صحرایی و موش تاثیر گذار بوده‌اند (Hahn *et al*., 1999; Langdown & Sugden, 2001). هر گونه بروز اختلال یا جهش در عوامل ذکر شده فوق نیز می‌تواند دلیل مشاهده بیان متفاوت بین گروه‌های ارزش اصلاحی در بزهای عدنی باشد. بنابراین توصیه می‌شود مطالعات تکمیلی در این خصوص انجام شود.

نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر و به منظور شناسایی حیوانات برتر و کاهش هزینه‌های اصلاح نژادی تمرکز ویژه‌ای بر مطالعات ژنتیک مولکولی شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد، که تفاوت زیادی از لحاظ میزان رونوشت برداری از ژن انتقال دهنده نوع ١ گلوکز، انتقال دهنده غالب گلوکز در غده پستان، بین بزهای عدنی با ارزش اصلاحی تولید شیر بالا و پایین وجود دارد. علاوه بر این مشاهده شد که میزان رونوشت برداری این ژن در زمان‌های مختلف فیزیولوژیکی در غده پستان نیز با هم متفاوت می‌باشد. این تفاوت در حدّی است که الگوی متفاوتی برای بزهای با ارزش اصلاحی بالا و پایین مشاهده شده است. این الگوی بیان ژن در دو گروه به شدّت تحت تاثیر زمان تولید شیر قرار گرفته است. بنابراین به نظر می‌رسد ناحیه کدکننده و یا پروموتور ژن انتقال دهنده نوع ١ گلوکز در جمعیت بزهای عدنی ایران متغیّر بوده که باید در مطالعات تکمیلی مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگذاری

در این تحقیق از داده‌های گردآوری شده توسط سازمان جهاد کشاورزی استان بوشهر استفاده شد، همچنین نمونه برداری از بافت پستان با هماهنگی این سازمان از ایستگاه پرورش بز عدنی اخذ شد که به این وسیله از مسؤولین این مرکز بخصوص آقای مهندس نکیسا صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از مسؤولین آزمایشگاه‌های علوم دامی و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس که همکاری صمیمانه‌ای در به ثمر رسیدن آزمایشات این تحقیق داشته‌اند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Baldwin SA, Kan O, Whetton AD, Martin S, Fawcett HA, Flint DJ, Wilde CJ (1994). Regulation of the glucose transporter GLUT1 in mammalian cells. Biochemical Society Transactions 22: 814-817.

Bickerstaffe R, Annison EF (1974). The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. Journal of Agriculture Science 82:71-85.

Cant JP, Trout DR, Qiao F, Purdie NG (2002). Milk synthetic response of the bovine mammary gland to an increase in the local concentration of arterial glucose. Journal of Dairy Science 85: 494-503.

Fawcett HA, Baldwin SA, Flint DJ (1992). Hormonal regulation of the glucose transporter GLUT I in the lactating rat mammary gland. Biochemical Society Transactions 20: 17S.

Hahn T, Barth S, Graf R, Engelmann M, Beslagic D, Reul JM, Holsboer F, Dohr G, Desoye G (1999). Placental glucose transporter expression is regulated by glucocorticoids. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84: 1445-1452.

Hasvold HJ (2002). Partial caracterization of caprine glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AJ431207.1.

Hay WW, Sparks JW, Wilkening RB, Battaglia FC, Meschia G (1983). Partition of maternal glucose production between conceptus and maternal tissues in sheep. American Journal of Physiology 245: E347-E350.

Hodgkinson AD, Page T, Millward BA, Demaine AG (2005). A novel polymorphism in the 5' flanking region of the glucose transporter (GLUT1) gene is strongly associated with diabetic nephropathy in patients with Type 1 diabetes mellitus. Journal of Diabetes and its Complications 19: 65-69.

Kahn BB (1992). Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. Journal of Clinical Investigation 89: 1367-1374.

Komatsu T, Itoh F, Kushibiki S, Hodate K (2005). Changes in gene expression of glucose transporters in lactating and nonlactating cows. Journal of Animal Science 83:557-564.

Langdown ML, Sugden MC (2001). Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. Molecular and Cellular Endocrinology 185: 109-117.

Mattmiller SA, Corl CM, Gandy JC, Loor JJ, Sordillo LM (2011). Glucose transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary gland of transition dairy cattle. Journal of Dairy Science 94: 2912-2922.

Mepham TB (1987). Physiology of Lactation.Open University Press. Philadelphia, PA.

Meyer K (2007). WOMBAT: a tool for mixed model analyses in quantitative genetics by restricted maximum likelihood (REML). Journal of Zhejiang University Science B 8:815-821.

Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. Science 229: 941-945.

Muller F, Zaucker A, Tora L (2010). Developmental regulation of transcription initiation: more than just changing the actors. Current Opinion in Genetics & Development 20: 533-540.

Nemeth BA, Tsang SW, Geske RS, Haney PM (2000). Golgi targeting of the GLUT1 glucose transporter in lactating mouse mammary gland. Pediatric Research 47: 444-450.

Ng DP, Canani L, Araki S, Smiles A, Moczulski D, Warram JH, Krolewski AS (2002). Minor effect of GLUT1 polymorphisms on susceptibility to diabetic nephropathy in type 1 diabetes. Diabetes 51: 2264-2269.

Santalucia T, Sanchez-Feutrie M, Felkin LE, Bhavsar PK, Barton PJ, Zorzano A, Yacoub MH, Brand NJ (2005). Phenylephrine requires the TATA box to activate transcription of GLUT1 in neonatal rat cardiac myocytes. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 38: 677-684.

Schwertfeger KL, McManaman JL, Palmer CA, Neville MC, Anderson SM (2003). Expression of constitutively activated Akt in the mammary gland leads to excess lipid synthesis during pregnancy and lactation. Journal of Lipid Research 44: 1100-1112.

Shah SW, Zhao H, Low SY, McArdle HJ, Hundal HS (1999). Characterization of glucose transport and glucose transporters in the human choriocarcinoma cell line, BeWo. Placenta 20: 651-659.

Threadgold LC, Kuhn NJ (1984). Monosaccharide transport in the mammary gland of the intact lactating rat. Biochemical Journal 218: 213-219.

Twardock AR, Symonds HW, Sansom BF, Rowlands EJ (1973). The effect of litter size upon foetal growth rate and the placental transfer of calcium and phosphorus in superovulated Scottish half-bred ewes. British Journal of Nutrition 29: 437-446.

Wood IS, Trayhurn P (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. British Journal of Nutrition 89: 3-9.

Xiao C, Cant JP (2003). Glucose transporter in bovine mammary epithelial cells is an asymmetric carrier that exhibits cooperativity and trans-stimulation. American Journal of Physiology: Cell Physiology 285: C1226-1234.

Yu Q, Zhu L, Lin J, Zhang Q, Tian Q, Hu W, Yang Q (2013). Functional Analyse of GLUT1 and GLUT12 in Glucose Uptake in Goat Mammary Gland Epithelial Cells. PLoS One 8:e65013.

Zhang N, Li QZ, Gao XJ, Yan HB (2011). Potential role of adenosine monophosphate-activated protein kinase in regulation of energy metabolism in dairy goat mammary epithelial cells. Journal of Dairy Science 94: 218-222.

Zhao FQ, Dixon WT, Kennelly JJ (1996). Localization and gene expression of glucose transporters in bovine mammary gland. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology 115: 127-134.

Zhao FQ, Glimm DR, Kennelly JJ (1993). Distribution of mammalian facilitative glucose transporter messenger RNA in bovine tissues. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 25: 1897-1903.

Zhao FQ, Keating AF (2007). Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. Journal of Dairy Science 90 Suppl 1:E76-86.

Zhao FQ, Miller PJ, Wall EH, Zheng YC, Dong B, Neville MC, McFadden TB (2004). Bovine glucose transporter GLUT8: cloning, expression, and developmental regulation in mammary gland. Biochimca et Biophysica Acta 1680: 103-113.

Zhao FQ, Okine EK, Cheeseman CI, Shirazi-Beechey SP, Kennelly JJ (1998). Glucose transporter gene expression in lactating bovine gastrointestinal tract. Journal of Animal Science 76: 2921-2929.

Zintzaras E, Stefanidis I (2005). Association between the GLUT1 gene polymorphism and the risk of diabetic nephropathy: a meta-analysis. Journal of Humman Genetics 50: 84-91.

Differential Gene Expression of Glucose Transporter 1 (GLUT1) in Different Physiological Times in Mammary Glands of Iranian Adani Goats

Morammazi S.[1], Masoudi A.A.[*2], Vaez-Torshizi R.[3], Pakdel A.[4]

[1] PhD Student in Animal Genetics and Breeding, Agricultural Faculty, Tarbait Modares University.
[2] Assistant professor in Molecular Genetics, Agricultural Faculty, Tarbait Modares University.
[3] Associate professor in Animal Genetics and Breeding, Agricultural Faculty, Tarbait Modares University.
[4] Associate professor in Animal Genetics and Breeding, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, University College of Agricultural and Natural Resources, Agricultural Science and Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

Lactose determines the milk volume of mammary gland due to osmotic property. Glucose is essential precursor for lactose synthesis, which is mainly absorbed by glucose transporter 1 from blood to mammary gland. In the current study, the transcription levels of GLUT1 have been investigated during prenatal, milking and drying times in mammary glands of Adani goats having high and low breeding values. At the first, breeding values of the animals were estimated by multi-trait random regression model. Then, the samples were taken by biopsy gun and Real-Time PCR method was applied to study the expression of GLUT1. The results indicated that all fixed factors including breeding value groups, sampling times and interaction between them were significant ($p<0.005$). In addition, the expression of the gene only was different at milking times between two breeding value groups, so that the high breeding value group showed more transcription levels compared with the other group. The expression pattern of this gene in mammary gland was also different between two breeding value groups. Minimum expression of GLUT1 was observed at the prenatal time in high breeding value group, however low breeding value group presented the lowest expression at the milking time. The expression differences observed between the two groups in milking time could be due to the nucleotide variations in transcription factor or miRNA binding sites. Therefore, analysis of nucleotide polymorphisms need to be investigated in coding and promoter regions of this gene in further studies on Adani goats.

Keywords: *Glucose Transporter 1- Gene Expression - Mammary gland - Milk Yield Breeding Value- Adani Goats.*

[*] Corresponding Author: Masoudi A.A. Tel: 02148292353 Email: masoudia@modares.ac.ir