Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR

Mohammadreza Mohammadabadi

* Corresponding Author: Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: mrm@uk.ac.ir

Hojjat Asadollahpour Nanaei

Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Shaanxi Province, College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, 712100, China. Email: h.asadollahpour1988@gmail.com

Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Abstract

Objective

Raini Cashmere goat is one of the most important goat breeds in Iran. These animals are breed both for meat production and cashmere production. One of the basic measures in the domestic animals is the study of genes and proteins associated with economic traits and their study at cellular or chromosomal levels. One of these important genes is the leptin. Leptin is produced by white adipose tissue and plays an important role in the regulation of feed intake, energy balance, fertility and immune functions. The aim of this research was to study leptin gene expression in adipose tissue, liver, kidney, lung and heart of Raini Cashmere goat using Real Time PCR technique.

Materials and methods

Tissue sampling from heart, lung, liver, kidney and adipose tissue (3 replicates from each tissue) of 6 animals was performed and RNA was extracted. Extracted RNA were immediately stored at -80°C. The Quality and quantity of RNA were evaluated and cDNA was synthesized and Real Time PCR was performed. PCR Products were electrophoresed on 1.5% agarose gel. Melting

curves from Real Time PCR were examined and were evaluated different levels of expression in the studied different tissues.

Results

The results of Real Time PCR curves and observation of electrophoresis of PCR products on agarose gel showed that the leptin gene was expressed in all the tested tissues and the highest level of expression was observed in adipose tissue (4.5) and liver (3.7) and the lowest level was detected in heart (1.4).

Conclusions

These results may show that leptin plays a particular role in fat metabolism. Further studies are needed to clarify role of leptin in the physiology of fat metabolism and other materials. This would help us to better understand the mechanisms for the known effect of nutritional factors and body fatness on various functions.

Keywords: expression, tissue, leptin gene, Raini Cashmere goat.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohammadabadi MR (2021) Leptin gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (1), 197-214.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (1), 197-214. DOI: 10.22103/jab.2021.17334.1305

Received: March 14, 2021. Accepted: April 3, 2021.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

بیان ژن لپتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR

محمدرضا محمدآبادی

* نویسنده مسئول: استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۷۵۳۴، ایمیل: mrm@uk.ac.ir

حجت اسدالله پور نعنایی

آزمایشگاه ژنتیک، اصلاح نژاد و تولید مثل حیوانات استان شانگژی، دانشکده علوم و فنون حیوانات، دانشگاه شمال غرب چین، یانگلینگ، ۷۱۲۱۰۰ ، چین. ایمیل:h.asadollahpour1988@gmail.com

بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۴

چکیده

هدف: بز کرکی راینی یکی از مهمترین نژادهای بز در ایران است. این حیوانات هم برای تولید گوشت و هم برای تولید کرک نگهداری می‌شوند. یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است. یکی از ژن‌های مهم لپتین است. لپتین به وسیله بافت چربی سفید تولید می‌شود و نقش مهمی در تنظیم مصرف غذا، تعادل انرژی، باروری و فعالیت‌های ایمنی بازی می‌کند. هدف این پژوهش مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های چربی، کبد، کلیه، شش و قلب در بز کرکی راینی با استفاده از تکنیک Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها: از بافت‌های قلب، شش، کلیه، کبد و بافت چربی (از هر بافت ۳ تکرار) از ۶ بز کرکی راینی نمونه برداری انجام شد. از این بافت‌ها RNA کل استخراج شد. RNA استخراج شده در دمای منفی۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت RNA بررسی و سنتز cDNA انجام شد. واکنش Real Time PCR برای ژن لپتین و بتااکتین صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. منحنی‌های ذوب و سطوح مختلف بیان در بافت‌های ذکر شده، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نتایج منحنی‌های Real Time PCR و مشاهده نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز نشان داد نشان داد که این ژن در تمامی بافت‌های بررسی شده بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت چربی (۴/۵ برابر) و کبد (۳/۷ برابر) و کمترین سطح بیان در بافت‌های قلب (۱/۴ برابر) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: این نتایج می‌تواند نشان دهنده این امر باشد که لپتین در متابولیسم چربی نقش ویژه‌ای دارد. مطالعات بیشتری باید انجام شود تا نقش لپتین در فیزیولوژی ساخت و متابولیسم چربی و مواد دیگر مشخص شود. این امر کمک خواهد کرد تا مکانیسم‌هایی برای شناخت اثر فاکتورهای تغذیه‌ای و چربی‌های بدن در فرآیندهای مختلف درک شوند.

کلمات کلیدی: بیان، بافت، ژن لپتین، بز کرکی راینی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۰) بیان ژن لپتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۱)، ۲۱۴-۱۹۷.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

انسان در پی اهلی‌سازی و استفاده از نیروی کار و فرآورده‌های گوناگون دام و پرندگان اهلی، روش‌های متعددی را به‌منظور بهبود تولیدات آن‌ها به کار بسته است. بخشی از این تغییرات ریشه در بهبود شرایط محیطی، بهداشت، تغذیه و مدیریت داشته است (Hadizadeh et al. 2013). علاوه بر تغییرات شرایط محیطی، تغییر ساختار ژنتیکی و بهبود آن نیز همواره از اهداف دیرین پرورش دهنده‌گان دام بوده است (Bagust 1994). بز کرکی راینی یکی از مهمترین نژادهای بز در ایران است (Askari et al. 2008) و کرکی با کیفیت بالا در رنگ‌های سفید، سیاه و زرد تولید می‌کند (Molaei Moghbeli et al. 2013)، لذا این بزها می‌توانند ارزش اقتصادی بالایی در بازار جهانی داشته باشند (Mohammadabadi 2019). تقریبا سه میلیون رأس از این نژاد در استان کرمان وجود دارد که اکثر جمعیت آنها در شهرستان بافت است و ۲۲ درصد (۶۵۱۵۴۹ رأس) از آنها را شامل می‌شوند و کمترین تعداد آنها در شهرستان راور (۶۵۹۸۵ رأس) پرورش می‌یابند (Mohammadabadi 2020). بز کرکی راینی در نواحی کوهستانی مرتفع و سرد پرورش داده می‌شود و به عنوان مهمترین نژاد بز کرکی در ایران شناخته شده است (Mohammadabadi 2021). این حیوانات هم برای تولید گوشت و هم برای تولید کرک نگهداری می‌شوند (Moghadaszadeh et al. 2015). نظر به اینکه

وجود یک خزانه ژنی بزرگ برای حفظ پتانسیل پرورش و اصلاح نژاد در آینده برای توسعه و تکامل سیستم تولیدات حیوانی پایدار مهم است، در سال‌های اخیر برای مطالعه و حفاظت از تنوع ژنتیکی این نژاد اقداماتی انجام شده است (Askari et al. 2009). با توجه به تولیدات مهم و استراتژیک بز در دنیا، صنعت پرورش بز دارای اهمیت است (Askari et al. 2010). به‌طوری که بخش اعظمی از تولیدات گوشت قرمز، شیر، کرک از این صنعت تامین می‌شود (Hadizadeh et al. 2014). عدم زیاد به سرمایه‌ی زیاد، تولید گوشت کم چرب، نیاز کم به جایگاه و تجهیزات، تولید مناسب شیر، بالا بودن نسبت دوقلوزایی، مصرف غذای کم، سهل الهضم بودن شیر بز، ایجاد اشتغال و کمک به اقتصاد خانواده از محاسن پرورش بز محسوب می‌شود (Mohammadabadi et al. 2012; Aminafshar et al. 2014). همچنین در کشورهای کمتر توسعه یافته شیر بز از شیر گوسفند از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد و به ۶۹ درصد از کل عرضه جهان کمک می‌کند (Abbaszadeh et al. 2011). علاوه بر این بزها دوره‌ی شیردهی طولانی‌تر از گوسفند، ۳۰۰ روز در مقابل ۲۵۰ روز را دارا می‌باشند و می‌تواند تا سه برابر شیر تولید کند (Scheepers 2009).

بنا بر نظر بعضی از دانشمندان در میان نشخوارکنندگان بز اولین حیوانی بوده است که بشر به اهلی کردن آن پرداخته است، تاریخچه اهلی شدن بز به ۱۱-۹ هزار سال پیش برمی‌گردد و گوسفند کمی بعد از بز مورد توجه قرار گرفته و تاریخچه اهلی شدن آن مربوط به ۱۰-۸ هزار سال پیش است (Hassani et al. 2010). کاوش‌های باستان‌شناسی نشان داده است که آثار اولیه مربوط به بز در اطراف مناطق کوهستانی سوئیس در اروپا و یا در اطراف رودخانه نیل در آفریقا به‌دست آمده است اما بعضی از تحقیقات نشان می‌دهد که آریایی‌ها اولین قومی بودند که به اهلی کردن بز پرداخته‌اند و آثار مربوطه مبین این واقعیت است که بز ابتدا درآسیا و در منطقه خاورمیانه و به‌ویژه در سرزمینی که امروزه قسمتی از کردستان می‌باشد، اهلی شده است (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). یکی از حوزه‌های ضروری در پژوهش‌های گونه‌های اهلی شناسایی ژن‌هایی است که صفات تولیدی مهم را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Pasandideh et al. 2016). در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Masoudzadeh et al. 2020). ماده ژنتیکی[1] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ گاه به طور همزمان بیان نمی‌شوند و در یک زمان خاص فقط تعداد کمی از آنها بیان شده و پروتئین یا آنزیم مورد نیاز سلول را تولید می‌نمایند (Jafari Darehdor et al. 2016). نیاز به بیان ژن توسط محیطی که در آن رشد می‌کند کنترل می‌شود و در صورت عدم نیاز به فرآورده ژن، آن ژن به صورت خاموش و غیرفعال باقی خواهد ماند. ساز و کار بیان ژن اولین بار در باکتری *E.coli* کشف شد. بیان ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می‌شود و نیز بیان ژن‌ها به مرحله نمو بستگی دارد. بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت اختصاصی است. همچنین مقدار محصولات ژن که در همان بافت و نیز در سایر بافت‌هایی که آن محصول را می‌سازند، ساخته شده سبب تنظیم

[1] DNA

بیان آن ژن می‌شود (Tohidi nezhad et al. 2015). یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadabadi and Soflaei 2020). یکی از این ژن‌های مهم لپتین است. لپتین از ریشه یونانی لپتوس (به معنای نازک یا کوچک) مشتق شده، وزنش ۱۶ کیلودالتون است، محصول ژن ob است، به وسیله بافت چربی سفید تولید می‌شود و نقش مهمی در تنظیم مصرف غذا، تعادل انرژی، باروری و فعالیت‌های ایمنی بازی می‌کند (Shojaei et al. 2010). این ژن ۳ اگزون و ۲ اینترون دارد، اما فقط ۲ اگزون آن به پروتئین ترجمه می‌شوند (Ahsani et al. 2019). این ژن هم عملکرد اندوکراینی در مغز و در بافت‌های پیرامونی دارد و هم بارده اتوکراین/پاراکراین در بافت‌ها دارد (Zieba et al. 2003). مشخص شده که لپتین در ادیپوسیت‌ها (Chilliard et al. 2001)، جنین (Yuen et al. 2002)، سینه (Bartha et al. 2005)، شکمبه و روده کوچک (Yonekura et al. 2002)، سلول‌های فولیکول تخمدان (Batista et al. 2013)، بافت چربی، جگر، کلیه، شش، و قلب (Mohammadabadi et al. 2018) و هیپوفیز (Yonekura et al. 2003) نشخوارکنندگان بیان می‌شود. این ژن منجر به کاهش مصرف غذا، کاهش وزن بدن، کاهش وزن چربی ذخیره شده و افزایش متابولیسم انرژی می‌شود (Mohammadabadi et al. 2021). لپتین ممکن است برای کنترل تولید مثل ضروری باشد و در این مسیر ژن لپتین ممکن است به عنوان نشانه‌ای برای سیستم تولیدمثلی عمل کند، چرا که چربی کافی و متناسب در بدن به لقاح و آبستنی موفق کمک می‌کند (Liefers and Veerkamp 2002). نشان داده شده که همبستگی مستقیمی بین سطح پلاسمایی لپتین و توده چربی بدن و تعادل انرژی در گاو و گوسفند وجود دارد (Aliabad Vazir et al. 2020). ژن لپتین بر عملکرد شیر در گاو شیری و تولیدمثل در گاو گوشتی اثر دارد. بیان این ژن در مراحل فیزیولوژیکی و رشد مختلف در حیوان تغییر می‌کند (Esmaeili et al. 2019)، بنابراین، لپتین می‌تواند به عنوان نشانگری برای رشد، بازده خوراک و سلامتی حیوان استفاده شود. اگر چه پژوهش‌های زیادی روی بزهای کرکی راینی انجام شده است ولی تاکنون بیان ژن لپتین در این نژاد بررسی نشده است، لذا هدف این مطالعه بررسی بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش ها

تعداد ۱۵ نمونه بافتی شامل قلب، شش، کلیه، کبد و بافت چربی (از هر بافت ۳ تکرار) از ۳ بز کرکی راینی در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از اندام‌های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس هر چند عدد از میکروتیوب‌ها در داخل یک فویل آلومینیومی قرار داده شد و سریعاً به داخل تانک ازت فرستاده شدند. پس از انجماد سریع نمونه‌ها در داخل فریزر ۸۰- نگهداری شدند. استخراج RNA بایستی

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

در محیط عاری از RNase[۲] انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC[۳] (سیناژن، MR8244) از RNase عاری[۴] شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیوبیسیک کانادا) صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. RNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد.

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز استفاده شد (RerertAid^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1631). برای این منظور مقدار ۱µg از RNA کل استفاده شد. ممکن است حین استخراج مقادیر متفاوتی RNA از هر بافت به دست آید، لذا جهت یکسان کردن RNA به کار رفته در ساخت cDNA، از مقدار ۱ میکروگرم از RNAاستفاده شد. برای انجام واکنش‌های RT-PCR باید نمونه RNA عاری از آلودگی به DNA باشد، به این منظور RNA با استفاده از DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. آغازگرها (جدول ۱) با واسطه شرکت تکاپوزیست (ایران) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) ساخته شدند (Batista et al. 2013).

جهت انجام واکنش، ۴/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۷/۵ میکرولیتر SYBRPermixTaq II و ۰/۳ میکرولیتر ROX به همراه ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت و مقدار ۱/۵ میکرولیتر cDNA الگو در میکروتیوپ ۰/۲ با هم مخلوط شدند. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن ۳۰۰۰ قرار داده شد. برای ژن لپتین و بتااکتین ، واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه، واسرشت ثانویه ۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، اتصال ۶۰ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل ۲-۴ و گسترش در دمای۷۲ درجه سانتی گراد ۴۵ ثانیه انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از Real Time PCR از روش .Pfaffl et al (2002) استفاده شد.

در این روش برای بررسی درصد بازده واکنش PCR ابتدا نمودار استاندارد برای ژن‌های لپتین و بتااکتین ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت‌های مختلف cDNA (۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن های لپتین و بتااکتین به ترتیب ۹۸ و ۹۹ درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه‌های تیمار شده و نرمال واکنش‌های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول .Pfaffl et al (2002) محاسبه گردید.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target(control-sample)}}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref(control-sampl)}}}$$

[2]RNase-free environment
[3]Di Etyhyl Pyro Carbonate water
[4]RNase-free

در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. ΔCt حاصل تفریق[۵] Ct (حد آستانه) ژن لپتین از Ct ژن بتااکتین می‌باشد.

جدول ۱. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن لپتین با شماره دسترسی GU944974 **در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی**

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for leptin gene expression in different tissues of Raini Cashmere goat with accession no. GU944974

نام ژن **Gene name**		توالی آغازگر **Primer sequence**	طول قطعه تکثیر شده **Amplicon size (bp)**
ژن leptin leptin Gene	آغاز گر رفت Sense Primer	5'-**GCCTATGTGGGCATCCTTTA**-3'	199
	آغازگر برگشت Antisense Primer	5'-**TGGAACAGGGAGGAAGACTG** -3′	
ژن بتااکتین Beta actin Gene	آغاز گر رفت Sense Primer	5'-**ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT**-3'	200
	آغازگر برگشت Antisense Primer	5'-**TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC**-3'	

1 Threshold cycle

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

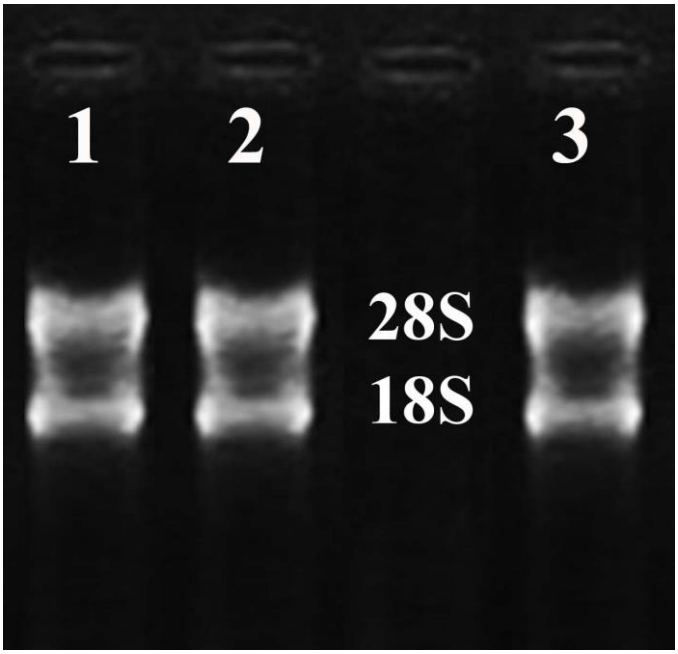
نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۸-۱/۹ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده بود و وجود دو باند 18S و 28S در RNA نشان دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن بود (شکل ۱). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (لپتین) و کنترل (بتااکتین)، واکنش PCR شیب دمایی[۶] انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۶۰°C) انتخاب گردید.

نتایج منحنی‌های Real Time PCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (۲ درصد) نشان داد که ژن لپتین در بافت‌های مختلف تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده ۱۹۹bp برای برای ژن لپتین در بافت‌های مختلف (شکل ۲) و وجود باند در محدوده ۲۰۰bp برای ژن بتااکتین در همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر بود. طی انجام واکنش، دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد. برای منحنی تکثیر همه نمونه ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است. منحنی ذوب ژن لپتین و بتااکتین، اختصاصی بودن و دمای Tm محصول (دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته ای خارج شده است) واکنش Real Time PCR این دو ژن را نشان می‌دهد (شکل ۳). در پژوهش حاضر بیان ژن لپتین در شش اندام مختلف بز کرکی راینی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت‌های بررسی شده (بافت چربی، جگر، کلیه، شش و قلب) بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت چربی (۴/۵) و کبد (۳/۷) و کمترین سطح بیان در بافت قلب (۱/۴) مشاهده شد (جدول ۲).

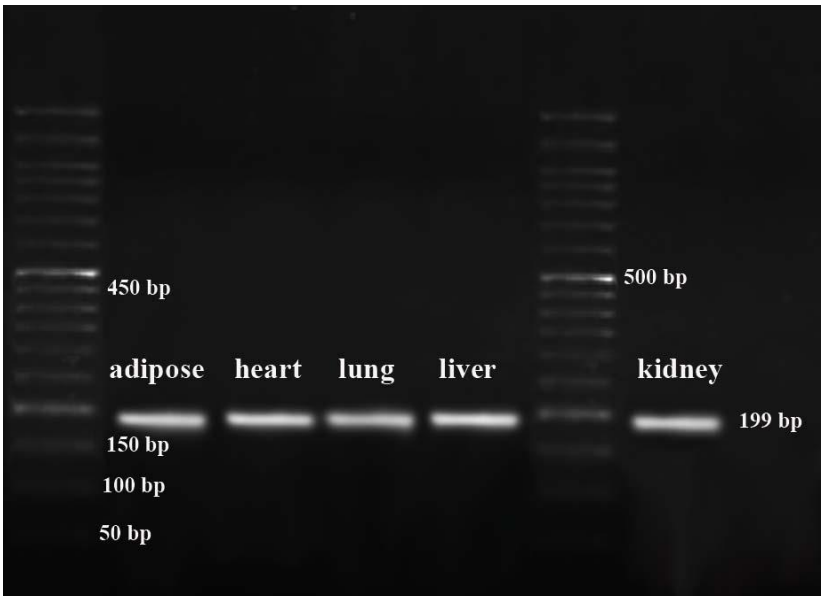
[6] Gradiant

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۱. نمونه هایی از کیفیت RNA استخراج شده از چند بافت بز کرکی راینی **روی ژل آگارز**

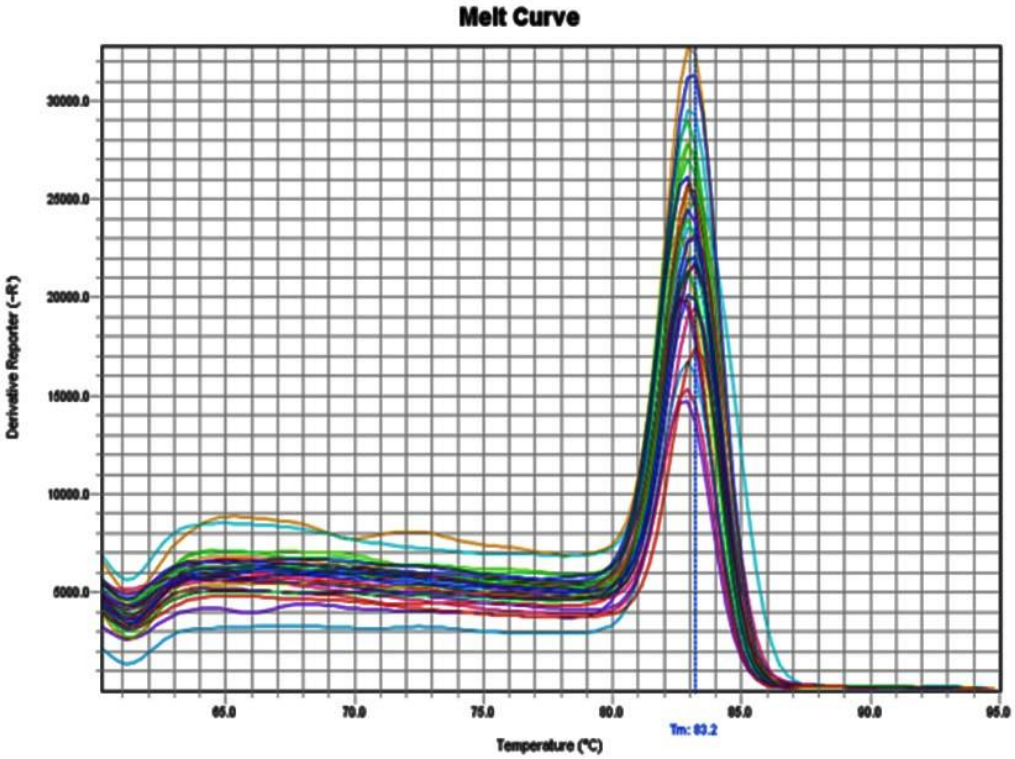
Figure 1. Quality of RNA extracted from some tissues of Raini Cashmere goat on agarose gel



شکل ۲. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای لپتین در بز کرکی راینی **روی ژل آگارز**

Figure 2. Electrophoresis of studied samples using leptin primers in Raini Cashmere goat on agarose gel

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۳. منحنی ذوب محصول ژن لپتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای بز کرکی راینی

Figure 3. Melting curve of leptin gene production using Real Time PCR for Raini Cashmere goat

جدول ۲. نسبت بیان برای ژن لپتین در بافت‌های مورد مطالعه

Table 1. Expression ratio of leptin gene in studied tissues

Tissue-Gene	Ct	Mean Ct	ΔCt	ΔΔCt	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
Adipose-Leptin-repeat 1	24.1				
Adipose-Leptin- repeat 2	24.3	24.4			
Adipose-Leptin- repeat 3	24.7		6.2	-2.2	4.5
Adipose-Beta actin- repeat 1	18.0				
Adipose-Beta actin- repeat 2	18.4	18.2			
Adipose-Beta actin- repeat 3	18.2				
Calibrator			8.4	0	1
Liver				-1.9	3.7
Heart				-0.5	1.4
Lung				-0.9	1.8
Kidney				-0.8	1.7

حضور لپتین و گیرنده‌هایش در تخمدان‌های انسان (Cioffi et al. 1997)، گوسفند (Munoz-Gutiérrez et al. 2005)، گاو (Sarkar et al. 2010) و بز (Batista et al. 2013) گزارش شده است. اما در مورد امکان تولید موضعی لپتین در تخمدان‌ها، به ویژه در لایه‌های سلولی گرانولوزا و تکا بحث و اختلاف نظر وجود دارد. برای نمونه در گوسفند، لپتین فقط در سلول‌های گرانولوزای تخمدان‌ها به میزان ضعیفی بیان می‌شود، اما تلاش برای شناسایی mRNA لپتین در سلول‌های گرانولوزا موفقیت آمیز نبوده است (Munoz-Gutierrez et al. 2005; Pisani et al. 2008). در همین راستا در پژوهشی Batista et al. (2013) برای اولین بار نشان دادند که لپتین و گیرنده‌هایش در سطوح mRNA و پروتئین در تمام کمپارتمنت‌های فولیکول‌های آنترال بز بیان می‌شود. آنها مشخص کردند که سطوح mRNA لپتین در سلول‌های گرانولوزای فولیکول‌های آنترال بز به طور معنی‌داری در فولیکول‌های کوچک نسبت به فولیکول‌های بزرگ بالاتر است. این نتایج در گاو هم توسط Sarkar et al. (2010) هم گزارش شده است. آنها نیز نشان دادند که سطوح بیان لپتین و گیرنده‌های لپتین در سلول‌های گرانولوزا و تکای فولیکول‌های آنترال گاو در فولیکول‌های کوچک‌تر به طور معنی‌داری بالاتر است و با افزایش اندازه فولیکول سطوح بیان لپتین و گیرنده‌های لپتین به طور معنی داری کاهش می‌یابد. در پژوهشی Bonnet et al. (2002) توانایی غدد پستانی گوسفند برای سنتز لپتین در طی آبستنی و شیردهی را بررسی کردند. آنها بیان ژن را در غدد پستانی در روزهای مختلف آبستنی و شیردهی بررسی کردند. بیان آن در آغاز و پایان آبستنی بالا و در اواسط آبستنی و در طی شیردهی پایین بود. بیان ژن لپتین در گوسفند اولین بار توسط Dyer et al. (1997) با استفاده از تکنیک نورترن بلات مطالعه شد پس از آن Bocquier et al. (1998) به وسیله ارزیابی پروتئین ریبونوکلئاز و RT-PCR بیان آن را در گوسفند بررسی کردند. پژوهشگران نشان داده‌اند که بیان ژن لپتین در زن و مرد با استفاده از مقایسات دو متغیره تفاوتی ندارد (Schoof et al. 2004)، اما با آنالیز رگرسیون چند متغیره نشان دادند که جنس می‌تواند به عنوان یک فاکتور مستقل، که سطوح لپتین پلاسما را تحت تأثیر قرار می‌دهد در نظر گرفته شود، چرا که سطوح لپتین پلاسما در زنان بالاتر از مردان است (Ostlund et al. 1996). این امر دو دلیل می‌تواند داشته باشد، اول این که تستوسترون مهار تولید لپتین را القا می‌کند و دوم این است که توزیع رسوب و ذخیره چربی در زنان و مردان متفاوت است. آنها همچنین نشان دادند که چربی زیر پوستی نسبت به چربی شکمی برای ساخت لپتین ظرفیت بالاتری دارد که این امر می‌تواند باعث شود سطوح پلاسمایی لپتین در زنان بالاتر باشد. در پژوهشی Mohammadabadi et al. (2018) نشان دادند که ژن لپتین در بافت‌های چربی، جگر، کلیه، شش و قلب گوسفند بیان می‌شود. ما برای اولین بار بیان ژن لپتین را در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی مطالعه کردیم و نشان دادیم که بیان آن در بافت چربی و کبد بیشترین و در قلب کمترین است. این نتایج می‌تواند نشان دهنده این امر باشد که لپتین در متابولیسم چربی نقش ویژه‌ای دارد. پیشنهاد می‌شود که این مطالعه با تعداد دام بیشتر، جنس‌های مختلف، سنین متفاوت و مراحل فیزیولوژیکی گوناگون انجام شود تا بتوان با اطمینان بالا نتیجه‌گیری کرد.

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی در راستای اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

احسنی محمدرضا، محمدآبادی محمدرضا ، اسدی فوزی و همکاران (۱۳۹۸) بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۱)، ۱۵۰-۱۳۵.

پسندیده محمد، محمدآبادی محمدرضا، ترنگ علیرضا و همکاران (۱۳۹۰). ارتباط چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی T/C و A/C از ژن PPARGC1A با ترکیب و تولید شیر در گاوهای هلشتاین ایران. مجله ژنتیک نوین ۶(۳)، ۳۶۷-۳۵۶.

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (۱۳۹۳). مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۶(۴)، ۵۰-۳۵.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵). بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۳۲-۱۱۹.

حسنی محمدنبی، اسدی فوزی مسعود، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) آنالیز ژنتیکی صفات رشد در بز کرکی راینی با استفاده از مدل حیوانی چند متغیره. مجله علوم دامی ایران ۴۱، ۳۲۹-۳۲۳.

شجاعی مسلم، محمدآبادی محمدرضا، اسدی فوزی مسعود و همکاران (۱۳۸۹). چگونگی استفاده از روش PCR-SSCP برای بررسی چند شکلی ژن لپتین گوسفند کرمانی. پژوهش‌های علوم دامی ۲۰(۴)، ۱۲۲-۱۱۵.

عباس زاده مهرآبادی اسماعیل، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، علی نقی زاده روح الله (۱۳۸۹). مطالعه چندشکلی اگزون۲ ژن GOLA-DRB3 در بز ندوشن با استفاده از روشPCR-RFLP. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۳(۳)، ۲۷۹-۲۷۴.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۵۶-۴۹.

عسکری ناهید، محمدآبادی محمدرضا، بیگی نصیری محمدتقی و همکاران (۱۳۷۸). مطالعه تنوع ژنتیکی بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ربزماهواره. مجله دانش کشاورزی ۱۸، ۱۶۱-۱۵۵.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) ارتباط چندشکلی ژن IGFBP-3 با صفات کرک در بز کرکی راینی. مجله ژنتیک نوین ۷، ۱۲۰-۱۱۵.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸) بیان ژن کالپاستاتین در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۱(۴)،۲۳۴-۲۱۹.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۱)،۱۹۲-۱۷۷.

محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۹) پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن ESR2 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۴)، ۱۸۱-۱۶۷.

محمدآبادی محمدرضا، سفلایی محمد (۱۳۹۹). پروفایل بیانی mRNA مختص بافت ژن BMP15 در بز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۲(۳)، ۲۰۸-۱۹۱.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (۱۳۹۷) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۳)، ۱۲۲-۱۱۱.

هادی زاده مرتضی، محمدآبادی محمدرضا، نیازی علی و همکاران (۱۳۹۲) استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی در مطالعه اگزون شماره ۲ ژنGDF ۹ در بزهای تالی و بیتال. ژنتیک نوین ۸(۳)، ۲۸۸-۲۸۳.

هادی زاده مرتضی، نیازی علی، محمدآبادی محمدرضا و همکاران (۱۳۹۳). بررسی بیوانفورماتیکی اگزون شماره دو ژن *BMP15* در بزهای تالی و بیتال. ژنتیک نوین ۹(۱)، ۱۲۰-۱۱۷.

References

Abbaszadeh E, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh A, Alinaghizadeh R (2011) The Polymorphism of Exon 2 of GOLA-DRB3 Gene in Nadushan Goat Using PCR-RFLP. Iran J Anim Sci Res 3), 274-279 (In Persian).

Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2019) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 135-150 (In Persian).

Aliabad Vazir NE, Koshkooieh AE, Mehrjerdi AA, et al. (2020) Genetic diversity of leptin gene intron 2 in wild and exotic goat breeds in Iran. J Microbiol Biotechnol Food Sci 9, 1110-1113.

Aminafshar M, Bahrampour V, Baghizadeh A, et al. (2014) CD44 gene expression in mature, immature oocytes and fetal kermani, baluchi sheep and rayeni, tali goats. J cell Anim Biol 8, 156-160.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2008) Analysis of the genetic structure of Iranian indigenous Raeni Cashmere goat populations using microsatellite markers. Biotechnol 2,

1-4.

Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini Cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5, 49-56 (In Persian).

Askari N, Mohammadabadi MR, Beygi Nassiry MT, et al. (2009) Study of Genetic Diversity of Raeini Cashmere Goat Based on Microsatellite Markers. J Agric Sci 18, 155-161.

Bagust TJ (1994) Improvmenting for a poultry industry in Asia: a develop-mental perspective. Avian Pathol 23, 394-404.

Bartha T, Sayed Ahmed A, Rudas P (2005) Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. Domest Anim Endocrinol 29, 193-202.

Batista AM, Silva DMF, Rêgo MJBM, et al. (2013) The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. Anim Reprod Sci 141, 142-147.

Bocquier F, Bonnet M, Faulconnier Y, et al. (1998) Effect of photoperiod and feeling level on perirental adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. Reprod Nutr Develop 38, 489-498.

Bonnet M, Gourdou I, Leroux C, et al. (2002) Leptin expression in the ovine mammary gland: Putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. J Anim Sci 80, 723–728.

Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, et al. (2001) Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland regulation of plasma concentration. Domest Anim Endocrinol 21, 271-295.

Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, et al. (1997) The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatoryhuman follicles. Mol Hum Reprod 3, 467–472.

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH (1997) cDNA cloning and tissue specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor and NPY-Y2 receptor. Domest Anim Endocrynol 14, 295-303.

Esmaeili AVN, Koshkooieh AE, Mehrjerdi AA, et al. (2019) Comparison of genetic diversity of leptin gene between wild goat and domestic goat breeds in Iran. Malaysian Appl Biol J 48, 85-93.

Hadizadeh M, Mohammadabadi MR, Niazi A et al. (2013) Use of bioinformatics tools to study exon 2 of *GDF9* gene in Tali and Beetal goats. Modern Genetics 8, 283-288 (In Persian).

Hadizadeh M, Niazi A, Mohammadabadi MR et al. (2014) Bioinformatics analysis of the BMP15 exon 2 in Tali and Beetal goats. Modern Genetics 9, 117-120 (In Persian).

Hassani MN, Asadi Fozi M, Esmailizadeh AK, Mohammadabadi MR (2010) A genetic analysis of growth traits in Raieni Cashmere goat using multivariate animal model. Iran J Anim Sci

41, 323-329.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

Liefers SC, Veerkamp RF (2002) Association between leptin gene polymorphism and production, live weight energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. J Dairy Sci 85, 1633–1638.

Masoudzadeh SH, Mohammadabadi MR, Khezri A, et al. (2020) Dlk1 Gene Expression in Different Tissues of Lamb. Iran J Appl Anim Sci 10, 669-677.

Moghadaszadeh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A (2015) Association of Exon 2 of BMP15 Gene with the Litter Size in the Raini Cashmere Goat. Genet 3rd Millennium 13, 4062-4067.

Mohammadabadi M (2021) Tissue-specific mRNA expression profile of ESR2 gene in goat. Agric Biotechnol J 12 (4), 167-181 (In Persian).

Mohammadabadi M, Bordbar F, Jensen J, et al. (2021) Key Genes Regulating Skeletal Muscle Development and Growth in Farm Animals. Animals 11 (3), e835.

Mohammadabadi M, Soflaei M (2020) Tissue-specific mRNA expression profile of BMP15 gene in goat. Agric Biotechnol J 12, 191-208 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2012) Relationships of IGFBP-3 gene polymorphism with cashmere traits in Raini Cashmere goat. Modern Genet J 7, 115-120 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2019) Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 11, 219-235 (In Persian).

Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 12, 177-192 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2018) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time PCR. Agric Biotechnol J 10, 111-122 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Tohidinejad F (2017) Charachteristics determination of Rheb gene and protein in Raini Cashmere goat. Iran J Appl Anim Sci 7, 289-295.

Molaei Moghbeli S, Barazandeh A, Vatankhah M, Mohammadabadi MR (2013) Genetics and non-genetics Parameters of body Weight for Post Weaning Traits in Raini Cashmere goats. Trop Anim Health Prod 45, 1519-24.

Munoz-Gutiérrez M, Findlay PA, Adam CL, et al. (2005) The ovar-ian expression of mRNAs for

aromatase, IGF-I receptor, IGF-bindingprotein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes afterthree days of leptin infusion. Reprod 130, 869–881.

Ostlund REJr, Yang JW, Klein S, Gingerich R (1996) Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. J Clinic Endocrinol Metabol 81, 3909–3913.

Pasandideh M, Kharrati Koopaee H, Mohammad Abadi MR, et al. (2016) Association of the OPN and PPARGC1A Alleles with Milk Somatic Cell Count in Iranian Holstein cattle. Modern Genet J 11, 357-365 (In Persian).

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res 30, e36.

Pisani LF, Antonini S, Pocar P, et al. (2008) Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels ofdevelopmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. Reprod 136, 303-312.

Sarkar M, Schilffarth S, Schams D, et al. (2010) Theexpression of leptin and its receptor during different physiologicalstages in the bovine ovary. Mol Reprod Devlop 77, 174–181.

Scheepers RC (2009) Genetic variation of Kappa-casein in South African goats (Doctoral dissertation, University of Pretoria).

Schoof E, Stuppy A, Harig F, et al. (2004) Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. Eur J Endocrinol 150, 579–584.

Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi FM, et al. (2010) Using PCR-SSCP technique to investigate polymorphism of Leptin gene in Kermani sheep J Anim Sci Res 20, 115-122 (In Persian).

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rheb gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agric Biotechnol J 6, 35-50 (In Persian).

Yonekura S, Kitade K, Furukawa G, et al. (2002) Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. Domest Anim Endocrinol 22, 25-35.

Yonekura S, Senoo T, Kobayashi Y, et al. (2003) Effect of acetate and butyrate on the expression of leptin and short form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells. Gen Comp Endocrinol 133, 165-172.

Yuen BS, Owens PC, McFarlane JR, et al. (2002). Circulating leptin concentration are positively related to leptin messenger RNA expression in adipose tissue of fetal sheep in pregnant

ewe fed at or below maintenance requirements during late gestation. Biol Reprod 67, 911-916.

Zieba AD, Amstalden M, Morton S, et al. (2003) Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status. J Endocrinol 178, 83-89.