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

Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR

Mohammadreza Mohammadabadi

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

Abstract

Objective

The estrogen receptor (ER) is a transcription factor that mediates the function of the hormone estrogen in many physiological and pathological processes. The expression of the estrogen receptor (ESR1), which encodes the alpha estrogen receptor (ER-α), is tissue specific. For example, the expression of ESR1 in the endometrium and mammary gland is very high and low in the placenta and skin. The gene is located on human chromosome 6 and is also known as Era, ESRA, ESTRR, and NR3A1. Several studies have shown that genetic variants in this gene are associated with breast cancer sensitivity. The aim of this study was to investigate ESR1gene expression in different tissues of Raini Cashmere goat using Real Time PCR.

Materials and Methods

One male and one female goats were selected for tissue sampling. Samples were taken from tissues of the heart, kidneys, brain, ovaries, uterus, breast and testicles (3 repetitions of each tissue) during slaughter at the slaughterhouse. RNA was extracted and cDNA was synthesized. Real Time PCR was performed using SYBR Green method to study relative gene expression. GAPDH gene was used as housekeeping gene. Pfaffl method was used to analyze achieved data.

Results

The study of ESR1 gene expression in the tissues of the heart, kidney, brain, ovary, uterus, mammary gland and testis of goat using Real Time PCR showed that this gene is expressed in all studied tissues. The highest levels of expression were observed in the kidney, ovary, uterus and testis tissues, and the lowest levels of expression were observed in the brain and heart tissues.

Conclusions

Based on the results of the present study and the results of other researchers, it can be concluded that estrogen receptors play an important role in spermatogenesis and male fertility, because in the present study it was found that ESR1 is much more expressed in reproductive tissues than in non-reproductive tissues. Therefore, estrogen and its receptors are likely to be essential for male fertility, and the results of this study provide a basis for future research to describe the role of ESR1 gene as a candidate gene for better fertility and natural physiology in domestic animals, especially goats.

Keywords: ESR1, gene expression, Raini Cashmere goat, reproductive tissues

Citation: Mohammadabadi MR (2020) Expression of ESR1 gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 177-192.

Agricultural Biotechnology Journal 12(1), 177-192.

DOI: 10.22103/jab.2020.15791.1229

Received: December 7, 2019; Accepted: February 26, 2020

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

بیان ژن ESR1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR

محمدرضا محمدآبادی

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۰۷

چکیده

هدف: گیرنده استروژن (ER) یک فاکتور رونویسی است که واسطه عملکرد هورمون استروژن در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و آسیب شناختی است. بیان گیرنده استروژن (ESR1)، که گیرنده استروژن آلفا (ER-α) را کد می کند، مختص بافت است. به عنوان مثال، بیان ESR1 در آندومتر و غده پستانی بسیار زیاد است و در جفت و پوست کم است. این ژن روی کروموزوم شماره ۶ انسان قرار دارد و به نام‌های Era، ESRA، ESTRR، و NR3A1 نیز معروف است. در چندین پژوهش نشان داده شده است که واریانت‌های ژنتیکی در این ژن با حساسیت به سرطان پستان همبستگی دارند. هدف این پژوهش بررسی میزان بیان ژن ESR1 در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها: تعداد یک راس بز نر و یک راس بز ماده برای نمونه برداری از بافت‌ها انتخاب شدند. نمونه‌ها از بافت‌های قلب، کلیه، مغز، تخمدان، رحم، پستان و بیضه (از هر بافت ۳ تکرار) در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. RNA کل استخراج و cDNA ساخته شد. برای برررسی میزان نسبی بیان ژن ها از واکنش Real Time PCR به روش SYBR Green استفاده شد. در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش پی‌فافل استفاده شد.

نتایج: مطالعه بیان ژن ESR1 در بافت‌های قلب، کلیه، مغز، تخمدان، رحم، پستان و بیضه بز کرکی راینی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی نشان داد که این ژن در تمامی بافت‌های بررسی شده بیان شده است. بیشترین سطح بیان در بافت‌های کلیه، تخمدان، رحم و بیضه و کمترین سطح بیان در بافت مغز و قلب مشاهده شد

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نتایج سایر محققین می‌توان نتیجه گرفت که گیرنده‌های استروژن نقش مهمی در اسپرماتوژنز و باروری نرها دارند، چرا که در پژوهش حاضر مشخص شد که ESR1 در بافت‌های تولیدمثلی نسبت به بافت‌های غیرتولیدمثلی بسیار بیشتر بیان می‌شود. لذا، استروژن و گیرنده‌هایش به احتمال زیاد برای باروری نرها بسیار ضروری هستند و نتایج این پژوهش اساسی را برای پژوهش‌های آینده جهت توصیف نقش ژن ESR1 به عنوان یک ژن کاندیدا برای باروری بهتر و فیزیولوژی طبیعی در حیوانات اهلی، به ویژه بز فراهم کرده است.

کلمات کلیدی: بافت‌های تولیدمثلی، بز کرکی راینی، بیان ژن، ESR1

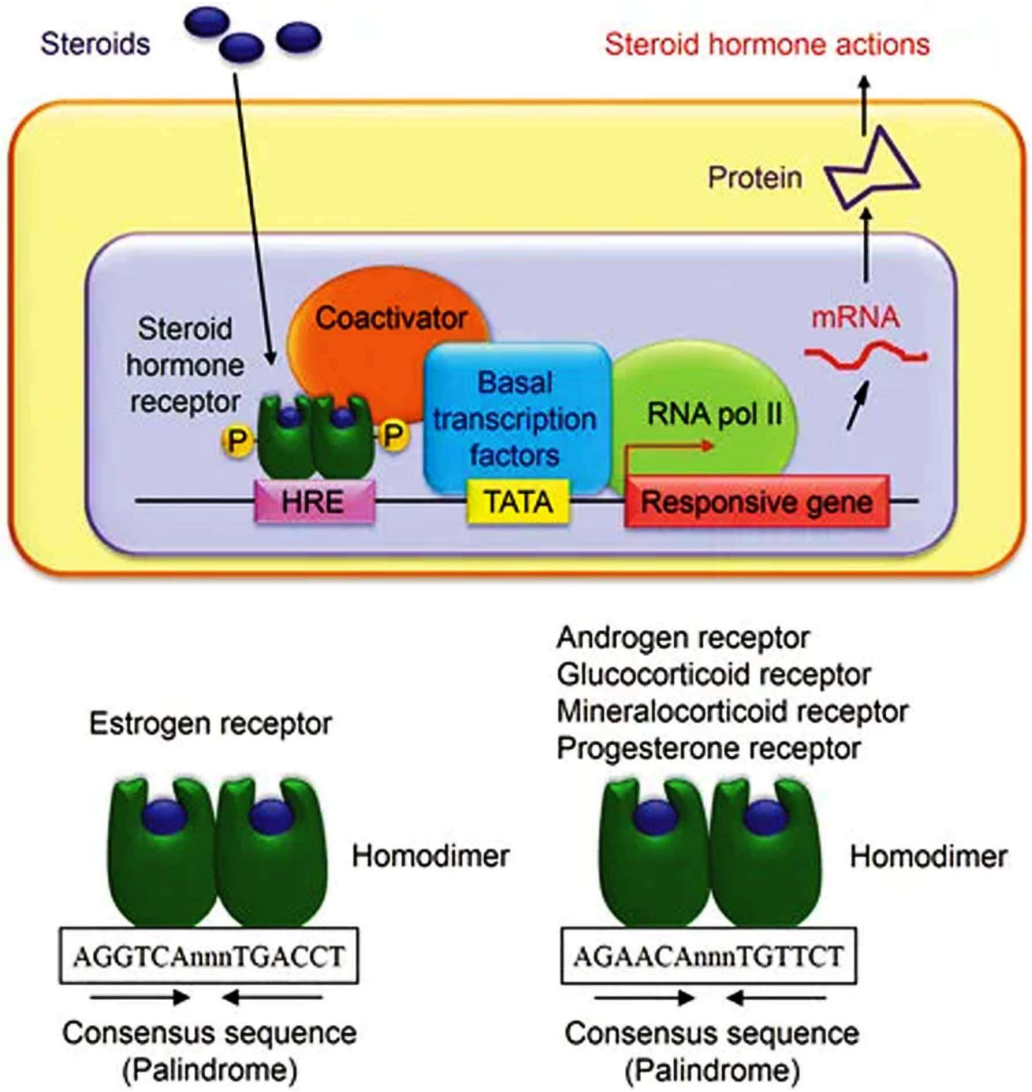
مقدمه

سیستم غدد درون ریز هورمون‌هایی تولید می‌کند که نقش مهمی در رشد و عملکرد بافت‌های مختلف دارند. به‌خصوص، هورمون‌های استروئیدی عملکردهایی را از طریق گیرنده‌های ناشناس خود انجام می‌دهند که به عنوان فاکتور رونویسی وابسته به هورمون عمل می‌کنند. استروژن، گلوکوکورتیکوئید، مینرالوکورتیکوئید، پروژسترون و آندروژن به ترتیب به گیرنده استروژن (ER)، گیرنده گلوکوکورتیکوئید (GR)، گیرنده مینرالوکورتیکوئید (MR)، گیرنده پروژسترون (PR)، و گیرنده آندروژن (AR) متصل می‌شوند (Kazuhiro et al. 2015). عملکردهای فیزیولوژیکی این هورمون‌های استروئیدی از طریق تنظیم رونویسی از ژن های هدف میانجیگری می‌شوند (Muramatsu and Inoue 2000). شبکه‌های رونویسی مربوط به گیرنده هورمون استروئید نیز در حالات مختلف آسیب شناختی، مانند سرطان، پوکی استخوان و التهاب نقش دارند. عقیده بر این است که استروژن به احتمال بسیار قوی در تولید و تقویت سرطان پستان، از طریق سیگنال‌دهی استروژن نقش دارد. پس از اتصال این هورمون در سلول به گیرنده‌های آن، ژن‌هایی که پاسخ دهنده به هورمون هستند فعال می‌شوند و سنتز DNA و تکثیر سلولی را افزایش می‌دهند (شکل ۱).

ژن‌های پاسخ‌دهنده به گیرنده‌های هسته‌ای در مطالعات گسترده ژنوم[1] با تشریح آبشارهای شبکه‌های تنظیم رونویسی به‌طور گسترده‌ای تجزیه و تحلیل می‌شوند (شکل ۲). وظایف و عملکردهای استروژن از طریق شبکه‌های تنظیمی با واسطه ER[2] اعمال می‌شوند. در این شبکه‌ها از فاکتورهای تنظیم‌کننده رونویسی برای این گیرنده‌ها استفاده می‌شود. علاوه بر این، شبکه‌ها به صورت عملکردی با مسیرهای انتقال سیگنال به روشی ویژه بافت/سلول[3] تعدیل و تنظیم می‌شوند. تجزیه و تحلیل ژنوم گسترده با استفاده از تکنیک‌های پر توان برای توضیح دادن و شفاف‌سازی شبکه رونویسی مفید خواهد بود. به‌علاوه، تجزیه و تحلیل عملکردی و پاتوفیزیولوژیکی هر ژن درگیر در شبکه نقش ژن در عملکرد و بیماری‌های مختلف را نشان می‌دهد، که می‌تواند در توسعه دستگاه‌های جدید تشخیصی و درمانی در پزشکی بالینی اعمال شود (Kazuhiro et al. 2015).

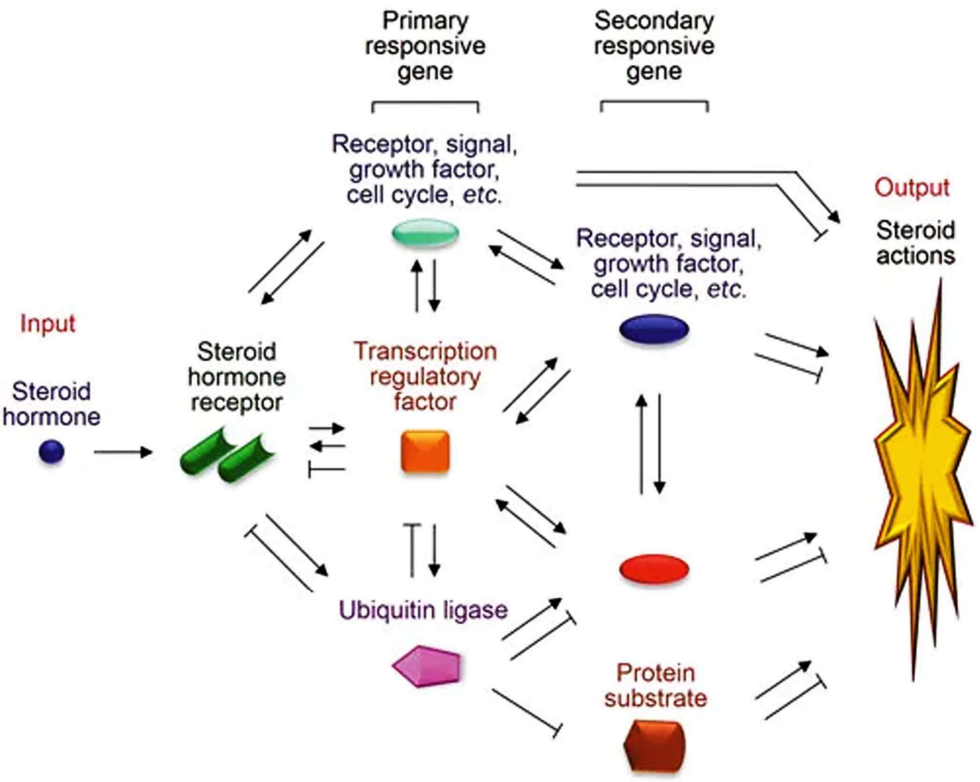
گیرنده استروژن (ER) یک فاکتور رونویسی است که واسطه عملکرد هورمون استروژن در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و آسیب شناختی است. بیان گیرنده استروژن ۱ (ESR1)، که گیرنده استروژن آلفا (ER-α) را کد می کند، مختص بافت است (Maekawa et al. 2016). به عنوان مثال، بیان ESR1 در آندومتر و غده پستانی بسیار زیاد است و در جفت و پوست کم است. این ژن روی کروموزوم شماره ۶ انسان قرار دارد و به نام‌های Era، ESRA، ESTRR، و NR3A1 نیز معروف است. در چندین پژوهش نشان داده شده است که واریانت‌های ژنتیکی در این ژن با حساسیت به سرطان پستان همبستگی دارند (Yu et al. 2011; Zhang et al. 2015; Li et al. 2016; Jahandoost et al. 2017).

[1] genome-wide studies
[2] ER-mediated regulatory networks
[3] tissue/cell-specific manner



شکل ۱. مکانیسم تنظیم رونویسی گیرنده های هورمون استروئیدی. اتصال گیرنده‌های هورمون استروئیدی به عنصر پاسخ دهنده هورمون (HRE) در قسمت پایین شکل نشان داده شده است (Lonard et al. 2012).

Figure 1. Transcriptional regulation mechanism of steroid hormone receptors. Binding of steroid hormone receptors to the hormone responsive element (HRE) is shown in the lower panel (Lonard et al. 2012).



شکل ۲. شبکه رونویسی گیرنده‌های هورمون استروئیدی و اثر متقابل آن متقاطع با سیگنال‌های دیگر (Kazuhiro et al. 2015).

Figure 2. Transcriptional network of steroid hormone receptors and crosstalk with other signals (Kazuhiro et al. 2015).

مشاهدات بالینی در یک مرد ناقص گیرنده استروژن آلفا (ER-α) عبارت بودند از پیشرفت هایپرینسولینمی، اختلال در تحمل گلوکز[1] (IGT)، مقاومت به انسولین (IR) و افزایش وزن بدن (Smith et al. 1994). مطالعات روی جوندگان نشان داده که حذف گیرنده استروژن آلفا در کل بدن باعث افزایش وزن بدن، مقاومت به انسولین و اختلال در تحمل گلوکز می‌شود (Jones et al., 2006 and 2007). در پژوهشی Ogorevc and Dovc (2016) بیان کمی گیرنده استروژن ۱ (ESR1) و گیرنده پروژسترون (PGR) و ارزیابی چگونگی تاثیر شرایط رشد (پایه و لاکتوژنیک) بر بیان و جایابی گیرنده‌های استروئیدی را در کشت‌های سلولی اولیه پستان بز انجام داده‌اند. آن‌ها نشان دادند که لاین‌های سلولی مختلف با تنظیم بالادستی متغیر ESR1 و تنظیم پایین دست ثابت‌تر بیان PGR به شرایط لاکتوژنیک پاسخ می‌دهند. به نظر می‌رسد تغییرات در بیان ESR1 و PGR به سطح پروتئین ترجمه می‌شود. آن‌ها پیشنهاد دادند که شرایط لاکتوژنیک سرنوشت سلولی را به سمت تمایز و تکثیر لاین لومینی هدایت می‌کند و

[1] impaired glucose tolerance

گیرنده استروژن آلفا می‌تواند در تمایز عملکردی سلولهای لومینی نقش داشته باشد. از سوی دیگر، 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 (Barazandeh et al. 2012; Mohammadabadi 2019). 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 (Barazandeh et al. 2012; Moghadaszadeh et al. 2015; Askari et al. 2011; Molaei Moghbeli et al. 2013). حدود ۳۰ میلیون راس بز کرکی در سراسر جهان وجود دارد که ۴/۵ تا ۵ میلیون راس از آن‌ها (حدود ۲۰ درصد بزهای جهان) در ایران پرورش داده می‌شوند (Baghizadeh et al., 2009). بز کرکی راینی یکی از مهمترین نژادهای بز در ایران است (Askari et al. 2008) و کرک با کیفیت بالابا رنگ های سفید، سیاه و یا زرد تولید می‌کند (Molaei Moghbeli et al. 2013)، لذا این بزها می‌توانند ارزش اقتصادی بالایی در بازار جهانی داشته باشند (Baghizadeh et al. 2009). 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 (Baghizadeh et al. 2009). بز کرکی راینی در نواحی کوهستانی مرتفع و سرد پرورش داده می‌شود و به عنوان مهمترین نژاد بز کرکی در ایران شناخته شده است (Baghizadeh et al. 2009). 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. 2011; Molaei Moghbeli et al. 2013). با توجه به تولیدات مهم و استراتژیک بز در دنیا، صنعت پرورش بز دارای اهمیت است (Shamsalddini et al. 2016). به‌طوری که بخش اعظمی از تولیدات گوشت قرمز، شیر، کرک از این صنعت تامین می‌شود. عدم نیاز 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. 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. 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. از طرفی، در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن ها) هستند

(Mohammadabadi and Tohidinejad, 2017). ماده ژنتیکی[1] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد 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 (Tohidi nezhad et al. 2015). 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 ژن های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت ها بیان می شود 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 بیان آن ژن می‌شود (Mohammadabadi et al. 2017). یکی از اقدامات اساسی در حیوانات اهلی مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari et al. 2016). از این ژن‌های مهم می‌توان به ژن کلیدی گیرنده استروژن ۱ (ESR1) که نقش مهمی در بافت‌های مختلف دارد اشاره کرد. اگر چه پژوهش‌های زیادی روی بزهای کرکی راینی انجام شده است (Askari et al. 2008; Askari et al. 2009; Alinaghizadeh et al. 2010; Askari et al. 2010; Hassani et al. 2010; Askari et al. 2011; Mohammadabadi 2012; Moghadaszadeh et al. 2015; Shamsalddini et al. 2016)، ولی تاکنون بیان ژن گیرنده استروژن ۱ (ESR1) در این نژاد بررسی نشده است. لذا، هدف این مطالعه بیان ژن گیرنده استروژن ۱ (ESR1) در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها

تعداد یک راس بز نر و یک راس بز ماده برای نمونه برداری از بافت‌ها انتخاب شدند. از بافت‌های قلب، کلیه، مغز، تخمدان، رحم، پستان و بیضه (از هر بافت ۳ تکرار) در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از اندام های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شدند. سپس هر چند عدد از میکروتیوب ها در داخل یک فویل آلومینیومی قرار داده شد و سریعاً به داخل تانک ازت فرستاده شدند. پس از انجماد سریع نمونه ها در داخل فریزر ۸۰- نگهداری شدند. استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase۲ انجام شود. قبل از انجام استخراج RNAتمامی وسایل توسط آب DEPC۳ (سیناژن، MR8244) از RNase عاری۴ شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیوبیسیک کانادا) صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA

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

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 (RerertAidTM 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 واکنش های 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.

توالی آغازگرها برای تکثیر ژن ESR1 عبارت بودند از: '5'-ACAGCATGAAGTGCAAGAACGTGG-3 و '5'- TGCAAGGAATGCGATGAAGTGCAG-3' و برای ژن GAPDH هم عبارت بودند از '5'- CATGTTTGTGATGGGCGTGAACCA-3' و '5'- TAAGTCCCTCCACGATGCCAAAGT-3' (Ogorevc and Dovc 2016). طول قطعه تکثیری برای دو ژن ESR1 و GAPDH به ترتیب عبارت بودند از ۱۶۳ جفت باز و ۱۳۷ جفت باز. آغازگرها با واسطه شرکت تکاپوزیست (ایران) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) ساخته شدند.

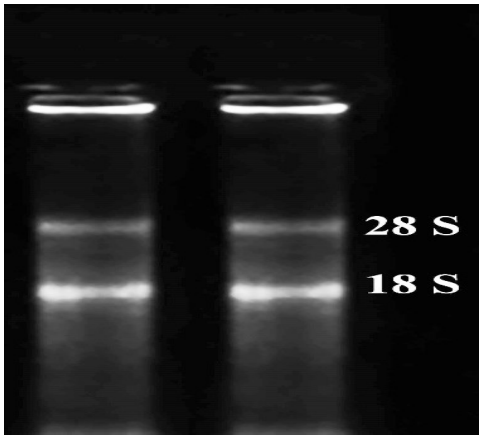
جهت انجام واکنش، ۴/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۷/۵ میکرولیتر SYBRPermixTaq II و ۰/۳ میکرولیتر ROX به همراه ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت و مقدار ۱/۵ میکرولیتر cDNA الگو در میکروتیوپ ۰/۲ با هم مخلوط شدند. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن ۳۰۰۰ قرار داده شد. برای ژن‌های ESR1 و GAPDH، واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه (برای فعال‌سازی پلیمراز و واسرشت اولیه)، واسرشت ثانویه ۹۵ درجه سانتیگراد ۱۵ ثانیه، اتصال و سنتز ۶۰ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل ۲ و ۳ انجام شد. منحنی ذوب در ۱۵ ثانیه برای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱ دقیقه برای ۵۸ درجه سانتیگراد و ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد تعیین 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 ESR1 و GAPDH 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 ESR1 و GAPDH ۹۸ درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه‌ها واکنش های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول .Pfaffl et al (2002) محاسبه گردید.

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

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[1] Ct (حد آستانه) ژن GAPDH از Ct ژن ESR1 می‌باشد.

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 ۳). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (ESR1) و کنترل (GAPDH)، واکنش PCR شیب دمایی[2] 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 ESR1 در بافت‌های مختلف تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده ۱۶۳bp برای برای ژن ESR1 در بافت‌های مختلف (شکل ۴) و وجود باند در محدوده ۱۳۷bp برای ژن GAPDH در همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر بود.

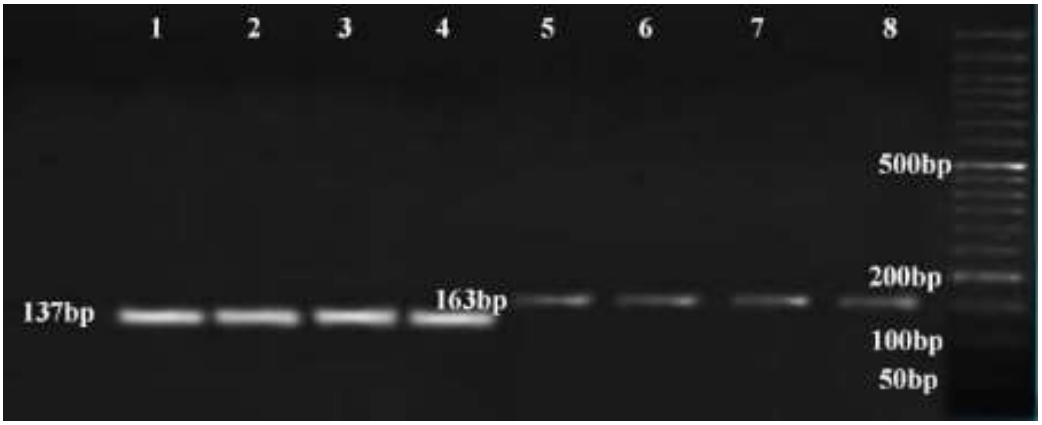


شکل ۳. نمونه‌ای از کیفیت RNA استخراج شده از بافت‌های بز کرکی راینی روی ژل آگارز

Figure 3. Quality of RNA extracted from tissues of Raini Cashmere goat on agarose gel

1 Threshold cycle
2 Gradiant

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.



شکل ٤. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای ESR1 و GAPDH در بز کرکی راینی روی ژل آگارز. نمونه‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ قطعات مربوط به GAPDH (۱۳۷ جفت باز) و نمونه‌های ٥، ٦، ۷ و ۸ قطعات مربوط به ESR1 (١٦٣ جفت باز) هستند و نشانگر اندازه استفاده شده M50 است

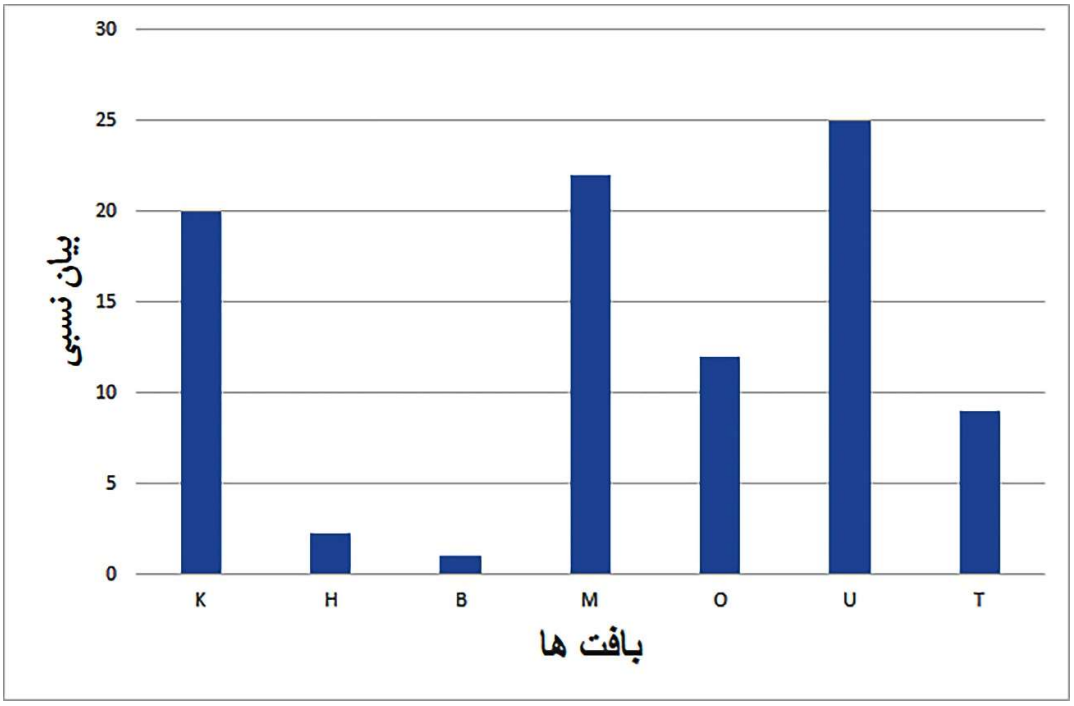
Figure 4. Electrophoresis of studied samples using ESR1and GAPDH primers in Raini Cashmere goat on agarose gel. 1, 2, 3 and 4 are GAPDH fragments (137 bp), 5, 6, 7 and 8 are ESR1 fragments (163 bp), and size marker is M50

مطالعه بیان ژن ESR1 در بافت‌های قلب، کلیه، مغز، تخمدان، رحم، پستان و بیضه بز کرکی راینی با استفاده از روش PCR در زمان واقعی نشان داد که این ژن در تمامی بافت‌های بررسی شده بیان شده است. بیشترین سطح بیان در بافت‌های کلیه، تخمدان، رحم و بیضه و کمترین سطح بیان در بافت مغز و قلب مشاهده شد (شکل ٥). این نتایج با نتایج Hutson et al. (2019) مطابقت دارد. آن‌ها بیان ژن ESR1 را در چهار بافت قلبی–عروقی (قلب، آئورت، کلیه و فوق کلیه)، سه ناحیه از مغز (somatosensory cortex، hippocampus و prefrontal cortex) و بافت‌های تولیدمثلی (تخمدان‌ها، غده پستانی، رحم و بیضه) از موش‌های نر و ماده بالغ ارزیابی کردند. در مطالعه آن‌ها بیشترین بیان مربوط به کلیه و گنادها و کمترین متعلق به مغز بود. آن‌ها نتیجه گرفتند که در بافت‌های یک سیستم بیان این ژن ثابت است اما بین سیستم‌ها تفاوت‌های زیادی وجود دارد و بسیار متغیر است. در پژوهشی دیگر Maekawa et al. (2016) نشان دادند که بیان ESR1 مختص بافت است (به عنوان نمونه، بیان زیاد در آندومتر و غده پستانی و بیان کم یا بدون بیان در جفت و پوست) و بیشتر توسط متیلاسیون DNA در T-DMR1[1] (ناحیه

[1] tissue-dependent and differentially methylated region (T-DMR)

دارای متیلاسیون افتراقی و وابسته به بافت)، که از TSS [1] (سایت آغاز نسخه برداری) فاصله دارد تنظیم می‌شود تا توسط متیلاسیون DNA در منطقه پروموتور. متیلاسیون DNAی T-DMR1 به شدت با پایین آمدن بیان ESR1 در بافت‌های عادی همراه است و رونویسی ESR1 را در شرایط آزمایشگاهی سرکوب می‌کند. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که متیلاسیون DNAی T-DMR2 رونویسی از بالادست اگزون C را تنظیم می‌کند، زیرا واریانت شماره سه mRNA وقتی که پروموتر C هایپومتیله شده و T-DMR2به طور متوسط و به طور زیادی در جفت و پوست متیله شده بیان نمی‌شود. اگر چه آن‌ها نتوانستند به طور مستقیم نشان دهند که متیلاسیون DNA در T-DMR2 رونویسی از اگزون C بالادست را کاهش می‌دهد. به طور کلی نتایج آن‌ها نشان داد که ESR1 دارای T-DMRs هایی است و T-DMRها بیان ESR1 مختص بافت را از طریق متیلاسیون DNA در بافت‌های طبیعی تنظیم می‌کنند. آن‌ها همچنین دریافتند که هر اگزون بالادست دارای یک T-DMR مربوط به خود است که رونویسی را از اگزون بالادست تنظیم می‌کند. در مطالعه‌ای Ogorevc and Dovc (2016) محیط کشت‌های سلولی اولیه‌ای از پستان تهیه کردند و RT-qPCR را نیز اجرا کردند تا کیفیت و کمیت بیان ESR1 و PGR را در pgMECs [2] (سلول‌های پوششی اولیه پستان بز) تعیین کنند و نقش احتمالی آن‌ها در طول رشد و عملکرد غده پستان ارزیابی کنند. لاین‌های سلولی مشتق شده از بزهای نوجوان، در مقایسه با سلول‌های مشتق شده از بافت بزهای شیرده بیان نسبی ESR1 و PGR بالاتری را نشان دادند. آن‌ها نشان دادند که لاین‌های سلولی مختلف با تنظیم بالادستی متغیر ESR1 و تنظیم پایین دست ثابت‌تر بیان PGR به شرایط لاکتوژنیک پاسخ می‌دهند. به نظر می‌رسد تغییرات در بیان ESR1 و PGR به سطح پروتئین ترجمه می‌شود. آن‌ها پیشنهاد دادند که شرایط لاکتوژنیک سرنوشت سلولی را به سمت تمایز و تکثیر لاین لومینی هدایت می‌کند و گیرنده استروژن آلفا می‌تواند در تمایز عملکردی سلولهای لومینی نقش داشته باشد. نشان داده شده که استروژن به پروتئین‌های موجود در بافت‌های تولید مثلی نر، به‌خصوص اپیدیدیم متصل می شود و ژن‌های ESR1 و ESR2 در سلول‌های خاص بیضه، مجاری وابران و اپیدیدیم با ویژگی‌های خاص گونه‌ای متمرکز شده‌اند (Carreau and Hess 2010). همچنین ثابت شده است که ESR2 در سرتاسر سیستم تولید مثلی نرها بیان می‌شود، اما ESR1 دارای اختصاصیت گونه‌ای است و در سلول‌های لایدیگ بیضه و اپیتلیوم مجاری وابران، محل اتصال شبکه بیضه به سر اپیدیدیم بیان می‌شود (Hess et al. 2002; Saraswat et al. 2015). در بیضه، گزارش‌های بیان ESR1 و ESR2در بین گونه‌ها و همچنین بین افراد درون یک گونه بسیار متغیر است. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و نتایج سایر محققین می‌توان نتیجه گرفت که گیرنده‌های استروژن نقش مهمی در اسپرماتوژنز و باروری نرها دارند، چرا که در پژوهش حاضر مشخص شد که ESR1 در بافت‌های تولیدمثلی نسبت به بافت‌های غیرتولیدمثلی بسیار بیشتر بیان می‌شود. لذا، استروژن و گیرنده‌هایش به احتمال زیاد برای باروری نرها بسیار ضروری هستند و نتایج این پژوهش اساسی را برای پژوهش‌های آینده جهت توصیف نقش ژن ESR1 به عنوان یک ژن کاندیدا برای باروری بهتر و فیزیولوژی طبیعی در حیوانات اهلی، به ویژه بز فراهم کرده است.

[1] transcription start site
[2] primary goat mammary epithelial cells



شکل ۵. بیان ژن ESR1 در بافتهای کلیه (K)، قلب (H)، مغز (B)، پستان (M)، تخمدان (O)، رحم (U) و بیضه (T) بز کرکی راینی.

Figure 5. Expression of ESR1 gene in kidney (K), heart (H), brain (B), mammary gland (M), ovary (O), uterus (U) and testis (T) of Raini Cashmere goat.

منابع

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدر ضا، ا سمعیلی زاده ک شکوئیه 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.

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.

علینقی‌زاده روح‌الله، محمدآبادی محمدرضا، زکی‌زاده سونیا (۱۳۸۹) چند شکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز قرمز جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۲(۱)، ۸۰-۶۹.

محمدآبادی محمدر ضا (۱۳۹۰) ارتباط چند شکلی 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.

References

Alinaghizadeh R, Mohammadabadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphismin Jabal Barez Red Goat. Agric Biotechnol J, 2, 69-80 (In Persian).

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, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iran J Biotechnol 9, 222-229.

Askari N, Mohammadabadi MR, Beygi Nassiry MT et al. (2009) Study of Genetic Diversity of Raeini Cashmere Goat Based on Microsatellite Markers. Journal of Agricultural Science 18, 155-161 (In Persian).

Baghizadeh A, Bahaaddini M, Mohamadabadi MR, Askari N (2009) Allelic Variations in Exon 2 of Caprine MHC Class II DRB3 Gene in Raeini Cashmere Goat. Am-Eurasian J Agric Environment Sci 6, 454-459.

Barazandeh A, Moghbeli SM, Vatankhah M, Mohammadabadi MR (2012) Estimating non-genetic and genetic parameters of pre-weaning growth traits in Raini Cashmere goat. Trop

Anim Health Prod 44, 811-817.

Carreau S, Hess RA (2010) Oestrogens and spermatogenesis. Phil Trans R Soc B 365, 1517-1535.

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 (In Persian).

Hess RA, Zhou Q, Nie R (2002) The role of estrogens in the endocrine and paracrine regulation of the efferent ductules, epididymis and vas deferens. Pp. 317-338 in the Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. B. Robaire and B.T. Hin-ton, Eds. Kluwer Academic/Plenum Press, New York.

Hutson DD, Gurrala R, Ogola BO et al. (2019) Estrogen receptor profiles across tissues from male and female Rattus norvegicus. Biol Sex Differ 10, e4.

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).

Jahandoost S, Farhanghian P, Abbasi S (2017) The effects of sex protein receptors and sex steroid hormone gene polymorphisms on breast cancer Risk. J Natl Med Assoc 109, 126–38.

Jones ME, Boon WC, McInnes K et al. (2007) Recognizing rare disorders: aromatase deficiency. Nat Clin Pract Endoc Metab 3, 414–421.

Jones ME, Boon WC, Proietto J, Simpson ER (2006) Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. Trends Endocrinol Met 17, 55–64.

Kazuhiro I, Kuniko H I, Satoshi I (2015) Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. Acta Pharmacologica Sinica 36, 24–31.

Li T, Zhao J, Yang J et al. (2016) A meta-analysis of the association between ESR1 genetic variants and the risk of breast cancer. PLoS ONE 11, e0153314.

Lonard DM, O'Malley BW (2012) Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. Nat Rev Endocrinol 8, 598–604.

Maekawa R, Sato S, Okada M et al. (2016) Tissue-Specific Expression of Estrogen Receptor 1 Is Regulated by DNA Methylation in a T-DMR. Mol Endocrinol 30, 335–347.

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 the 3rd Millennium 13, 4062-4067.

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. Agricultural Biotechnology Journal 11 (4), 219-235 (In Persian).

Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Medic Biol Res 5, e6177.

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.

Muramatsu M, Inoue S (2000) Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? Biochem Biophys Res Commun 270, 1–10.

Ogorevc J, Dovc P (2016) Expression of estrogen receptor 1 and progesterone receptor in primary goat mammary epithelial cells. Anim Sci J 7, 1464-1471.

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.

Saraswat S, Rout PK, Kharche SD et al. (2015). Estrogen receptor gene 1 expression in male goat. Iranian J Vet Res 17, 56-58.

Shamsalddini S, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Polymorphism of the prolactin gene and its effect on fiber traits in goat. Russ J Genet 52, 461–465.

Smith EP, Boyd J, Frank GR et al. (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. N Engl J Med 331, 1056–1061.

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).

Yu KD, Rao NY, Chen AX et al. (2011) A systematic review of the relationship between polymorphic sites in the estrogen receptorbeta (ESR2) gene and breast cancer risk. Breast Cancer Res Treat 126, 37–45.

Zhang Y, Zhang M, Yuan X, et al. (2015) Association between ESR1 PvuII, XbaI, and P325P polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis. Med Sci Monit 21, 2986–2996.