Archive of

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Leptin Gene Expression in Subcutaneous Adipose Tissue of Holstein Dairy Cattle Using Real Time PCR

Mohammadreza Ahsani

PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: ahsani2001@gmail.com

Mohammadreza Mohammadabadi

* Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989133987534, Email: mrm@uk.ac.ir

Masoud Asadi fozi

Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: masadi@uk.ac.ir

Ali Esmailizadeh Koshkooieh

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

Amin Khezri

Associate Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: akhezri@uk.ac.ir

Hamid Reza Esmaeili

Faculty of Agriculture, Razi University of Kermanshah, Kermanshah, Iran.

Abstract

Objective

In dairy cattle, the increase in milk yield has been accompanied by a more negative energy balance during early lactation and a decrease in fertility. As the hormone leptin is involved in regulation of nutritional status and reproductive function, this hormone is an interesting protein to investigate during the periparturient period in dairy cattle when many changes take place both in energy metabolism and reproductive physiology. The

www.SID.ir

Archive of SID

aim of this research was to study leptin gene expression in adipose tissue of Holstein dairy cattle.

Materials and Methods

Tissue sampling from subcutaneous adipose tissue of 20 Holstein cattle on the 20th day of lactation, with the same gestational age (second pregnancy) and mean body weight of 680 ± 80 kg 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 2% agarose gel and were evaluated level of gene expression in the studied tissue.

Results

Results showed that the leptin gene was expressed in the subcutaneous adipose tissue. These results may show that leptin plays a particular role in fat metabolism.

Conclusions

During the periparturient period the cow mobilizes her fat reserves (i.e. adipose tissue) and it appears that all her energy is going to the production of milk, and that other processes like reproduction and immunity, get a lower priority. Because fertility, just as milk production, is also an economically important trait, fertility should be considered as part of a dairy cattle breeding program. Generally, 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: adipose tissue, expression, Holstein dairy cattle, leptin gene

Citation: Ahsani MR, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, Esmailizadeh Koshkooieh A, Khezri A, Esmaeili HR (2019) Leptin gene expression in subcutaneous adipose tissue of Holstein dairy cattle using Real Time PCR. Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 135-150.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (1), 135-150.
DOI: 10.22103/jab.2019.13778.1126
Received: February 11, 2019; Accepted: May 10, 2019
© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

 www.SID.ir

Archive of SID

بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرپوستی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR

محمدرضا احسنی

دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ایمیل: ahsani2001@gmail.com

محمدرضا محمدآبادی

* نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. تلفن: 09133987534، ایمیل: mrm@uk.ac.ir

مسعود اسدی فوزی

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ایمیل: masadi@uk.ac.ir

علی اسمعیلی زاده کشکوئیه

استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ایمیل: aliesmaili@uk.ac.ir

امین خضری

دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ایمیل: akhezri@uk.ac.ir

حمیدرضا اسماعیلی

دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: 1397/11/22، تاریخ پذیرش: 1398/02/20

چکیده

هدف: در گاو شیری با افزایش تولید شیر بالانس انرژی منفی در طی اولین شیردهی بیشتر می‌شود و باروری کاهش می‌یابد. از آنجاییکه هورمون لپتین در تنظیم حالت تغذیه‌ای و عملکرد تولیدمثلی دخیل است، این هورمون یک پروتئین جالب‌توجه در دوره-

www.SID.ir

Archive of SID

های قبل و بعد از زایش[1]، زمانی که تغییرات زیادی هم در متابولیسم انرژی و فیزیولوژی تولید مثل اتفاق می‌افتد در گاو شیری می‌باشد. هدف این پژوهش مطالعه بیان ژن لپتین در بافت چربی گاوهای شیری هلشتاین بود.

مواد و روش‌ها: از بافت چربی زیرپوستی 20 گاو در روز 20 شیردهی، آبستنی دوم و میانگین وزن بدن 80± 680 کیلوگرم نمونه برداری و RNA استخراج شد. RNA استخراج شده در دمای منفی80 درجه سانتیگراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت RNA بررسی و سنتز cDNA انجام شد. واکنش Real Time PCR برای ژن لپتین و GAPDH صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز 2 درصد نیز الکتروفورز شد و میزان بیان ژن‌ها در بافت مذکور، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در بافت چربی زیرپوستی بیان می‌شود. این نتایج می‌تواند نشان دهنده این امر باشد که لپتین در متابولیسم چربی نقش ویژه‌ای دارد.

نتیجه‌گیری: در دوره بلافاصله قبل و بعد از زایش گاو ذخایر چربی خود (برای نمونه، بافت چربی) را آزاد می‌کند و این به این دلیل است که تمام انرژی صرف تولید شیر می‌شود و دیگر فرآیندها از قبیل تولیدمثل و ایمنی در اولویت پایین‌تری قرار می‌گیرند. چون باروری به اندازه تولید شیر نیز یک صفت اقتصادی مهم است، این صفت هم باید به عنوان بخشی از برنامه اصلاح نژاد گاو شیری مدنظر قرار گیرد. به طور کلی، 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 شود.

کلمات کلیدی: بافت چربی، بیان، ژن لپتین، گاوهای شیری هلشتاین

مقدمه

در ایران حدود 7/9 میلیون راس گاو وجود دارد که از این تعداد 45/9 درصد بومی، 43/6 درصد دورگ و 10/51 درصد رجیستر شده (اکثرا هلشتاین) هستند. سهم حیوانات اهلی در اقتصاد ملی 4 درصد از درآمد ناخالص ملی (GDP) است. بر اساس گزارش FAO (1993)، تولیدات گاو شیری در طی دو دهه گذشته تغییرات ساختاری قابل توجه و مهمی داشته است و گله‌های بزرگتری از گاو ایجاد شده است (Ebrahimi et al. 2015a). تلقیح مصنوعی در مناطق مختلفی از جهان، به ویژه در ایران به طور قابل توجهی توسعه یافته و مورد استفاده قرار گرفته است (Ebrahimi et al. 2015b). به علاوه، طبق آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی، تعداد 18830 واحد صنعتی گاو داری با ظرفیت 2048563 راس گاو شیرده در کشور مشغول فعالیت هستند. طی سال های 1383 تا 1387 تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (Kharrati Koopaei et al. 2011). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین تر است (Kharrati Koopaei, et al.

[1] Periparturient period

www.SID.ir

Archive of SID

2012a). سرانه مصرف شیر در کشور برای هرنفر برابر با 95 کیلوگرم می باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با 169 کیلوگرم و در اروپا برابر با 350 کیلوگرم در سال است (Kharrati Koopaei, et al. 2011). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه ریزی شود. لذا مطالعه و بررسی نژادهای مختلف گاو در ایران اهمیتی دو چندان می یابد (Kharrati Koopaei et al. 2012b).

در اواخر دهه 80 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 نمی-شوند 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 پروتئین-های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Jafari Darehdor et al. 2016). یکی از این ژن‌های مهم لپتین است. لپتین از ریشه یونانی لپتوس (به معنای نازک یا کوچک) مشتق شده، وزنش 16 کیلودالتون است، محصول ژن *obese* (*ob*) است، به وسیله بافت چربی سفید تولید می‌شود و نقش مهمی در تنظیم مصرف غذا، تعادل انرژی، باروری و فعالیت‌های ایمنی بازی می‌کند (Javanmard et al. 2008). این ژن 3 اگزون و 2 اینترون دارد، اما فقط 2 اگزون آن به پروتئین ترجمه می‌شوند (شجاعی و همکاران 2010). این ژن هم عملکرد اندوکراینی در مغز و در بافت‌های پیرامونی دارد و هم بازده 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 (Javanmard et al. 2008). 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

[1] DNA

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

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 (Shojaei et al. 2010). 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، بنابراین، لپتین می‌تواند به عنوان نشانگری برای رشد، بازده خوراک و سلامتی حیوان استفاده شود. اگر چه پژوهش‌های زیادی روی گاوهای ایران انجام شده است (Mohammadabadi et al. 2004, Mohammadabadi et al. 2005, Sulimova et al. 2007, Alinaghizadeh et al. 2007, Mohammadabadi and Mohammadi 2010, Ruzina et al. 2010, Ghasemi et al. 2010, Askari et al. 2011, Mohammadabadi et al. 2011, Pasandideh et al. 2015, Barazandeh et al. 2016, Pasandideh et al. 2016) ولی تاکنون بیان ژن لپتین در این دام‌ها بررسی نشده است، لذا هدف این مطالعه بیان ژن لپتین در بافت چربی گاوهای هلشتاین با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش ها

از بافت چربی زیرپوستی 20 گاو در روز 20 شیردهی، آبستنی دوم و میانگین وزن بدن 80± 680 کیلوگرم نمونه برداری انجام شد. برای این امر، بعد از انجام شستشو و ضدعفونی کردن پوست، با استفاده از تیغ جراحی یک شکاف کوچک در سطح پوست ایجاد شد. بعد از برداشت دو نمونه کوچک از بافت چربی زیر پوستی، شکاف ایجاد شده بخیه شد. نمونه‌های بافتی بعد از شستشو در محلول سرم فیزیولوژیک در یک فویل آلومینیومی قرار گرفتند، در نیتروژن مایع گذاشته شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase[1] انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC[2] (سیناژن، MR8244) از RNase عاری[3] شدند. استخراج RNA کل از بافت با استفاده از کیت One Step RNA Reagent (Biobasic Co. Ltd., Germany; Representative of the company in Iran) انجام شد. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده، اسپکتروفتومتری در 260 نانومتر اجرا شد و برای مشخص کردن کیفیت آن از جذب در نسبت 260nm:280nm (دستگاه Thermo) و الکتروفورز روی ژل آگارز دو درصد استفاده گردید. کیت RerertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (#K1631, Fermentase Co., Germany; Representative of the company in Iran) برای سنتز cDNA از روی RNA کل مورد استفاده قرار گرفت. در هر واکنش از یک میکروگرم RNA کل استفاده شد. آغازگرهای 5'-GGTCACTGGTTTGGACTTCATC-3' و 5'-GACTGGTGAGGATCTGTTGGTAG-3' برای ژن لپتین (GenBank accession number; JQ711179.1)

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

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

و آغازگرهای '5-GTTCAACGGCACAGTCAAGG-3' و '5-GTTGATGTTGGCAGGATCTCG-3' برای ژن GAPDH (GenBank accession number; NM_001034034.2) با واسطه شرکت تکاپوزیست (ایران) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) برای اجرای RT-PCR استفاده شدند. برای تکثیر نمونه‌ها از SYBR Green PCR Master Mix (شرکت تکاپوزیست، ایران) استفاده شد و واکنش‌ها در حجم 15 میکرولیتر اجرا شد.

هر میکروتیوب شامل، 7/5 میکرولیتر 2X SYBR Green PCR Master Mix، 1/5 میکرولیتر cDNA الگو، یک میکرولیتر از 10 µM آغازگرهای زفت و برگشت، 0/3 میکرولیتر ROX و 4/7 میکرولیتر ddH2O بود. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن 3000 قرار داده شد. برای ژن لپتین و GAPDH، گام اول شامل واسرشت اولیه 94 درجه سانتیگراد برای 3 دقیقه، گام دوم در سه مرحله واسرشت ثانویه 94 درجه سانتیگراد برای 60 ثانیه، اتصال 57 درجه سانتیگراد برای 60 ثانیه و سنتز 72 درجه سانتیگراد برای 60 ثانیه با اجرای 35 سیکل و گام سوم سنتز نهایی در دمای72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه بود. برای حذف آلودگی محصولات PCR غیراختصاصی، مانند دایمرهای پرایمری آنالیز منحنی ذوب برای تمام محصولات اجرا 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 GAPDH ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت های مختلف cDNA (1، 10/1، 100/1، 1000/1) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن های لپتین و GAPDH 99 درصد برآورد شد. نتایج واکنش های PCR 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 Ct[1] (حد آستانه) ژن لپتین از Ct ژن GAPDH می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین 1/8-1/9 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 1). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (لپتین) و کنترل

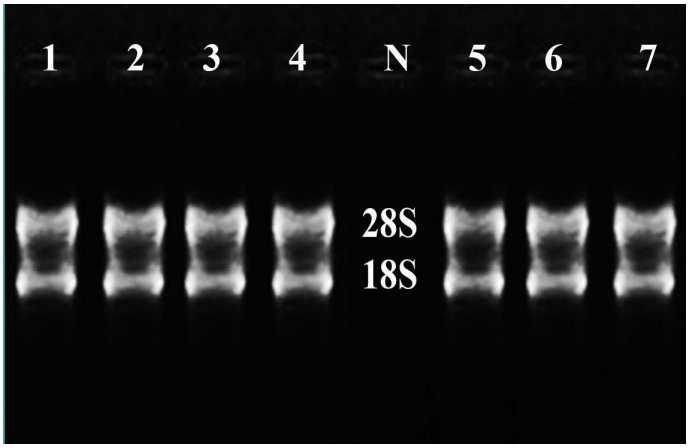
1 Threshold cycle

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

(GAPDH)، واکنش PCR شیب دمایی[1] انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای 57°C) انتخاب گردید.

نتایج منحنی‌های Real Time PCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (2 درصد) نشان داد که ژن لپتین در بافت چربی تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده 98bp برای برای ژن لپتین (شکل 2) و وجود باند در محدوده 94bp برای ژن GAPDH 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 GAPDH، 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 (شکل‌های 3 و 4). در پژوهش حاضر بیان ژن لپتین در بافت چربی گاوهای هلشتاین با استفاده از روش PCR در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در بافت چربی بیان شده است.



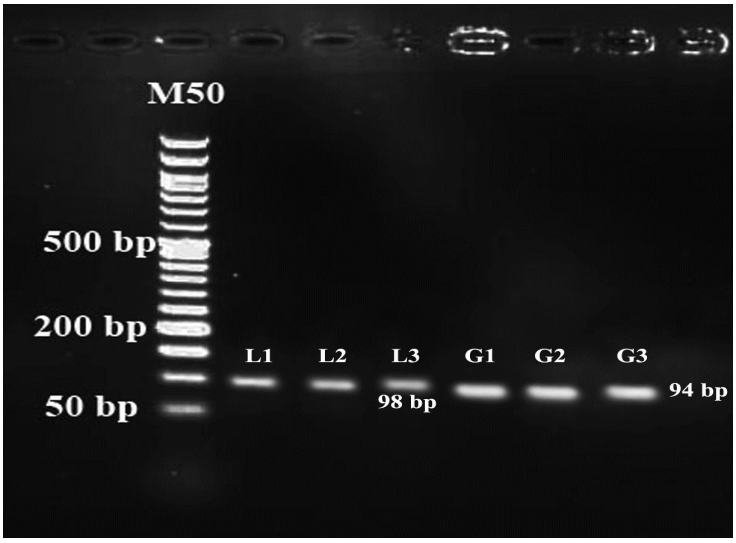
شکل 1. نمونه هایی از کیفیت RNA استخراج شده از بافت چربی گاوهای مطالعه شده. لاین‌های 1 تا 7 نمونه‌های مطالعه شده و N کنترل منفی

Figure 1. Quality of RNA extracted from adipose tissue of studied cattle. 1-7 lines are studied samples and N is negative control

[6]Gradiant

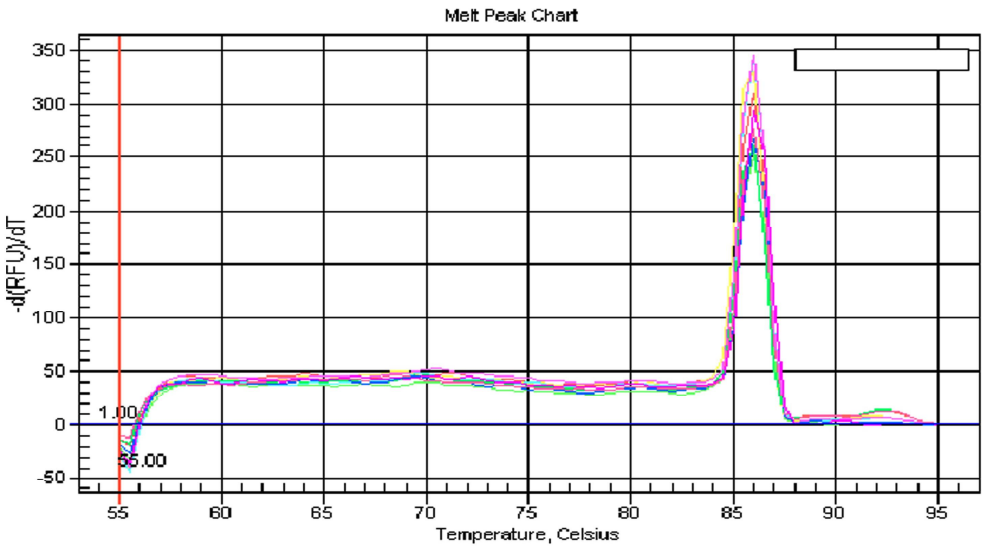
Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای لپتین و GAPDH در دام‌های مطالعه شده. M50 نشانگر اندازه، لاین‌های L1-L3 نمونه‌های لپتین (قطعه 98 جفت بازی) و لاین‌های G1-G3 نمونه‌های GAPDH (قطعه 94 جفت بازی)

Figure 2. Electrophoresis of studied samples using leptin and GAPDH primers in studied animals. L1-L3 lines are leptin samples (98 bp fragment) and G1-G3 lines are GAPDH samples (94 bp fragment)

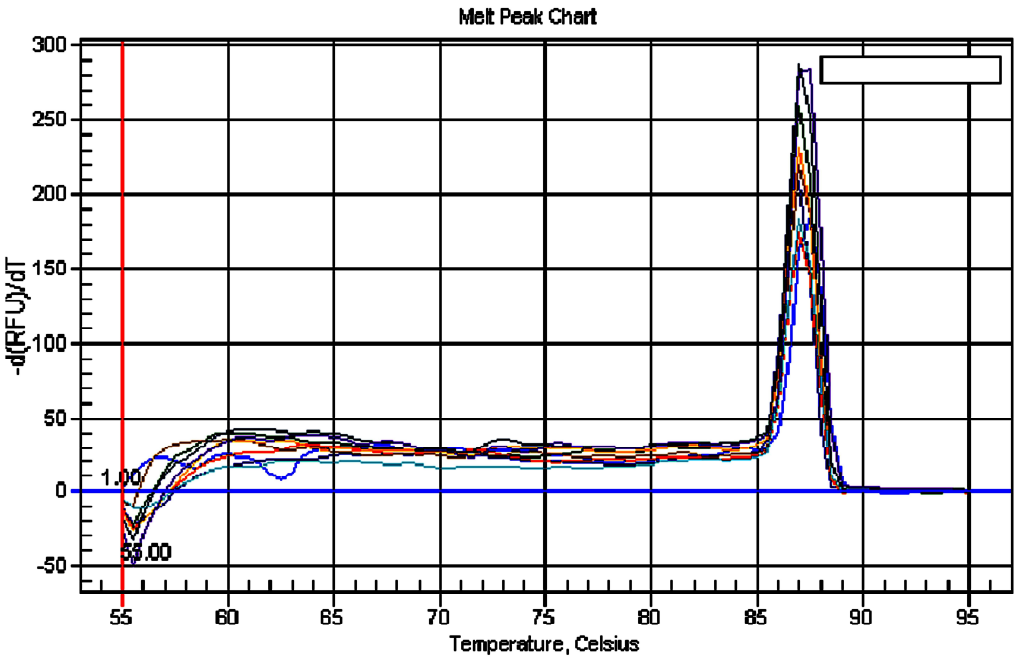


شکل 3. منحنی ذوب محصول ژن لپتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای گاوهای مطالعه شده

Figure 3. Melting curve of leptin gene production using Real Time PCR for studied cattle

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 4. منحنی ذوب محصول ژن GAPDH حاصل از واکنش Real Time PCR برای گاوهای مطالعه شده

Figure 4. Melting curve of GAPDH gene production using Real Time PCR for studied cattle

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 سلول-های گرانولوزای تخمدان‌ها به میزان ضعیفی بیان می‌شود، اما تلاش برای شناسایی mRNA لپتین در سلول‌های گرانولوزا موفقیت آمیز نبوده است (Munoz-Gutiérrez 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 معنی داری 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

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

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. در پژوهش حاضر برای اولین بار بیان ژن لپتین در بافت چربی گاوهای هلشتاین ایران مطالعه شد و مشخص شد که در بافت چربی بیان می‌شود. این نتایج می‌تواند نشان دهنده این امر باشد که لپتین در متابولیسم چربی نقش ویژه‌ای دارد. از آنجاییکه در گاو شیری با افزایش تولید شیر بالانس انرژی منفی در طی اولین شیردهی بیشتر می‌شود و باروری کاهش می‌یابد و نیز هورمون لپتین در تنظیم حالت تغذیه‌ای و عملکرد تولیدمثلی دخیل است، این هورمون یک پروتئین جالب برای پژوهش در طی دوره بلافاصله قبل و بعد از زایش[1]، زمانی که تغییرات زیادی هم در متابولیسم انرژی و فیزیولوژی تولید مثل اتفاق می‌افتد در گاو شیری می‌باشد. در این دوره گاو ذخایر چربی خود (برای نمونه، بافت چربی) را آزاد می‌کند و این به این دلیل است که تمام انرژی صرف تولید شیر می‌شود و دیگر فرآیندها از قبیل تولیدمثل و ایمنی در اولویت پایین‌تری قرار می‌گیرند. چون باروری به اندازه تولید شیر نیز یک صفت اقتصادی مهم است، این صفت هم باید به عنوان بخشی از برنامه اصلاح نژاد گاو شیری مدنظر قرار گیرد. به طور کلی، 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 شود.

منابع

پسندیده مجید، خراتی کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا، اسماعیلی زاده کشکوئیه علی (1395) ارتباط آلل‌های ژن‌های OPN و PPARGC1A با تعداد سلول‌های بدنی شیر در گاوهای هلشتاین ایران. مجله ژنتیک نوین 11(3)، 357-365.

[1] Periparturient period

www.SID.ir

Archive of SID

توحیدی نژاد فاطمه، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، نجمی نوری عذرا (1393) مقایسه سطوح مختلف بیان ژن Rheb در بافت های مختلف بز کرکی راینی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 6(4)، 35-50.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (1395) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان 4(4)، 132- 119.

خراتی کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا، انصاری مهیاری سعید، اسماعیلی زاده کشکوئیه علی، ترنگ علیرضا، نیکبختی مهدی (1390) بررسی تنوع ژنتیکی جایگاه ژن DGAT1 و میزان ارتباط آن با تولید شیر در جمعیت گاو های هلشتاین ایران.مجله پژوهش‌های علوم دامی ایران 3(2)، 185-192.

خراتی کوپایی حامد، محمدآبادی محمدرضا، ترنگ علیرضا، خراتی کوپایی محمود، اسماعیلی زاده کشکوئیه علی (1391) بررسی ارتباط چند شکلی آللی ژن DGAT با بیماری ورم پستان در جمعیت گاوهای هلشتاین ایران. مجله ژنتیک نوین 7(1)، 104-101.

محمدآبادی محمدرضا، کرد محبوبه، نظری محمود (1397) مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 10(3)، 111-122.

محمدآبادی محمدرضا، محمدی اکرم (1389) بررسی ژنوتیپ های بتالاکتوگلوبولین در گاوهای بومی و هلشتاین استان کرمان. مجله تولیدات دامی 12(2)، 61-67.

References

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bosindicus) using PCR-RFLP. Pak J Biol Sci, 10, 4291-4294.

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.

Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi M, Nezamabadipour H (2016) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. Iran J App Anim Sci 6, 571-579.

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 Nut 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 Human Reprod 3, 467–472.

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

Ebrahimi Z, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK et al. (2015a) Association of PIT1 gene with milk fat percentage in Holstein cattle. Iran J Appl Anim Sci 5, 575-582.

Ebrahimi Z, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK (2015b) Association of PIT1 gene and milk protein percentage in Holstein cattle. J Livest Sci Technol 3, 41-49.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4, 5758-5760.

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).

Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE et al. (2008) Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus). Russ J Genet 44, 495-497.

Kharrati Koopaei H, Mohammad Abadi MR, Ansari Mahyari S et al. (2012a) Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. Anim Sci Papers Report 30, 231-240.

Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mehyari S et al. (2011) Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. Iran J Anim Sci Res 3, 185-192 (in Persian).

 www.SID.ir

Archive of SID

Kharrati koopaei H, Mohammadabadi MR, Tarang A et al. (2012b) Study of the association between the allelic variations in DGAT1 gene with mastitis in Iranian Holstein cattle. Modern Genet J 7, 101-104 (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.

Mohammad Abadi MR, Mohammadi A (2010) Study of beta-lactoglobulin genotypes in native and Holstein cattle of Kerman province. J Anim Prod 12, 61-67 (in Persian).

Mohammadabadi M R, Shaikhaev GO, Sulimova GE et al. (2004) Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in Yaroslavsl, Mongolian and black pied cattle by PCR. Cell Mol Biol Letter 9, 766-768.

Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M (2011) Using PCR for early diagnosis of bovine leukemia virus infection in some native cattle. Genet Mol Res 10, 2658-2663.

Mohammadabadi MR, Kovalenko TA, Nasiri MR, Sulimova GE (2005) inter-Simple-Sequence Repeat (ISSR)-PCR for the identification of polymorphism in some native cattle breeds. Proceeding of the 3rd Moscow international congress: Biotechnology: state of the art and prospects of development, Moscow, Russia.

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

Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. Brazil J Med Biol Res 50, e6177.

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).

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, Esmailizadeh Koshkoiyeh A (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).

Pasandideh M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Tarang A (2015) Association of

 www.SID.ir

Archive of SID

bovine PPARGC1A and OPN genes with milk production and composition in Holstein cattle. Czech J Anim Sci 60, 97-104.

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.

Ruzina MN, Shtyfurko TA, Mohammadabadi MR et al. (2010) Polymorphism of the *BoLA-DRB3* gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. Russ J genet 46, 456-463.

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.

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

Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M et al. (2010) Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. J Cell Mol Res 2, 67-73.

Sulimova GE, Abani MA, Rostamzadeh J et al. (2007) Allelic polymorphism of kappa-casein gene (CSN3) in Russian cattle breeds and its informative value as a genetic marker. Russ J Genet 43, 88-95.

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.

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. General Comparative 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.

 www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500 www.SID.ir