

Dlk1 gene expression 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

Dlk1 plays an important role in regulating skeletal muscle development and regeneration, differentiation of adipocytes, regulation of muscle cell growth, hepatoblast proliferation and blood cells formation. The aim of this study was to investigate Dlk1 gene expression in different tissues of Raini cashmere goat using Real Time PCR.

Materials and Methods

Tissue samples (18) including muscle, kidney, spleen, brain, liver and back fat tissues were taken from 3 Raini cashmere goats. RNA was extracted and cDNA was synthesized. Real Time PCR was performed using SYBR Green method to study relative gene expression. Beta actin gene was used as housekeeping gene. Pfaffl method was used to analyze achieved data.

Results

Results of this study showed that Dlk1 gene is expressed in all studied (muscle, kidney, spleen, brain, liver and back fat) tissues and the highest level of expression was observed in muscle and kidney tissues and the lowest level was seen in spleen and brain tissues.

Conclusions

This study would lay a foundation for further Dlk1 research in Raini cashmere goat and other goat breeds and also native animal and poultry. It is suggested that this study be conducted with greater number of livestock, different sexes, different ages and different physiological stages in different breeds of goats in order to reach a comprehensive conclusion.

Keywords: Dlk1, gene expression, Raini cashmere goat, tissue.

Citation: Mohammadabadi MR (2019) Dlk1 gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 11(3), 191-205.

Agricultural Biotechnology Journal 11(3), 191-205.

DOI: 10.22103/jab.2019.14945.1180

Received: August 17, 2019; Accepted: September 23, 2019

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

بیان ژن Dlk1 در بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR

محمد رضا محمدآبادی

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱

چکیده

هدف: ژن Dlk1 نقش مهمی در تنظیم توسعه و تکامل و تولید مجدد ماهیچه اسکلتی، تمایز ادیپوسیت‌ها، در تنظیم رشد سلول عضله و در تکثیر هیپاتوبلاست و تشکیل گلبول‌های خون دارد. هدف این پژوهش بررسی میزان بیان ژن Dlk1 در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۸ نمونه بافتی شامل ماهیچه، کلیه، طحال، مغز، جگر و چربی (از هر بافت ۳ تکرار) از ۳ بز کرکی راینی در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. RNA کل استخراج و cDNA ساخته شد. برای بررسی میزان نسبی بیان ژن‌ها از واکنش Real Time PCR به روش SYBR Green استفاده شد. در این مطالعه از ژن بتا‌اکتین به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش پی‌فافل استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که ژن DLK1 در تمامی بافت‌های بررسی شده (بافت ماهیچه، چربی، کلیه، طحال، جگر و مغز) بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت ماهیچه و کلیه و کمترین سطح بیان در بافت طحال و مغز مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** این پژوهش اساسی را برای انجام پژوهش‌های بیشتر در مورد Dlk1 در بز کرکی راینی و سایر نژادهای دیگر بز و حتی دام و طیور بومی ایجاد نمود. پیشنهاد می‌شود که این مطالعه با تعداد دام بیشتر، جنس‌های مختلف، سنین متفاوت و مراحل فیزیولوژیکی گوناگون در نژادهای مختلف بز انجام شود تا بتوان به یک نتیجه‌گیری جامعی دست یافت.

کلمات کلیدی: بافت، بز کرکی راینی، بیان ژن، Dlk1

ژن Dlk1^۱ به عنوان یک عامل پیش آدیپوسیت شناخته می‌شود و عضو پروتئین غشایی EGF^۲ است که شامل یک توالی سیگنال N ترمینال، شش توالی تکرار خارج سلولی فاکتور رشد اپیدرمال EGF، یک دومین غشایی و یک دنباله کوتاه سیتوپلاسمیک C ترمینال است. این ژن اولین بار در انسان و موش شناسایی شد و محل آن در انسان کروموزوم ۱۴، در موش کروموزوم ۱۲ و گوسفند کروموزوم ۱۸ است (Takada et al. 2000; Wylie et al. 2000; Murphy et al. 2005). DLk1 یک عضو غیر کانونیکال از مسیر سیگنالینگ Notch است که در طول تکامل حفاظت شده است این ژن در عملکرد سلول‌های بنیادی در طول تکامل دخیل است. گرچه DLk1 فاقد دومین DLS برای اتصال با تکرارهای EGF گیرنده‌های Notch است، اما همه ی لیگاندهای کانونیکال Notch را دارند (Yevtdiyenko and Schmidt, 2006). تعامل خاصی از DLk1 با گیرنده NOTCH1 وجود دارد. عملکرد Dlk1 بیشتر در سلول چربی موش مورد مطالعه قرار گرفته است که بیانگر شکل پروتئین غشایی و ترشحی Dlk1 است. پروتئین ترشحی DLk1 به عنوان یک مهارکننده آدیپوژنیز عمل می‌کند و مانع از تمایز پری آدیپوسیت در آدیپوسیت موش می‌شود. مطالعات مختلف نشان داده است که Dlk1 نقش مهمی در تنظیم توسعه و تکامل و تولید مجدد ماهیچه اسکلتی (Waddell et al. 2010)، تمایز آدیپوسیت‌ها (Espina et al. 2009; Albrecht et al. 2015) و تشکیل گلبول‌های خون دارد (Sakajiri et al. 2005). در تنظیم رشد سلول عضله و در تکثیر هیپاتوبلاست نقش دارد. به نظر می‌رسد Dlk1 مانع و یا باعث تمایز سلول‌های نابالغ بسته به زمینه سلولی می‌شود. Dlk1 به طور گسترده ای در طول رشد جنین پستانداران بیان می‌شود. اما در بزرگسالان بیان آن محدود می‌شود. Dlk1 یک ژن کاندیدا است که باعث ایجاد هایپرتروفی عضلانی در گوسفند می‌شود (Andersen et al., 2009). الگوی بیان این ژن به عنوان عملکرد ژنوتیپ، نوع و توسعه عضله به شدت با فنوتیپ هایپرتروفی ارتباط دارد. این ژن همچنین در سرطان‌های خاص (Li et al. 2014)، بهبود زخم (Samulewicz et al. 2002)، چاقی (Chacon 2008) و چندین مسیر سیگنال‌دهی (Falix et al. 2012) نقش دارد. پروتئین Dlk1 یک پروتئین ترشحی بین غشایی^۳ است، وزن ملکولی آن از ۴۵ تا ۶۰ کیلودالتون، غالباً به دلیل درجه‌های متفاوت گلیکوزیله شدن آن متغیر است و به نام‌های Pref-1، SCP-1، FA-1، Zog و pG2 نیز معروف است (Hu et al. 2016). ژن‌های ایمپرینت شده زیادی به مسیرهای بیوشیمیایی مختلفی پیوسته هستند تا رشد جفت، جنین و بعد از تولد را تنظیم کنند و تکامل سریع ژن‌های ایمپرینت شده اتفاق می‌افتد تا به صورت مختص گونه عمل نماید (Hu et al. 2016). Dlk1 یک ژن ایمپرینت شده مادری است و به ژن ایمپرینت شده پدری Gtl2 پیوسته است. این دو ژن به صورت متناوب (ضربدری) ایمپرینت می‌شوند و ابتداءً به صورت همراه در غدد هیپوفیز و ادرنال بیان می‌شوند و توسط اصلاح و تعدیل متیلاسیون DNA تنظیم می‌شوند (Schmidt et al. 2000). این پژوهشگران

¹ Delta-Like 1 Homolog

² epidermal growth factor

³ transmembrane and secreted protein

نشان دادند که در پروموتور و اولین اگزون ژن Gtl2 متیلاسیون افتراقی قابل توجهی اتفاق می‌افتد، درحالی‌که Dlk1 در این نواحی مذکور متیله نمی‌شود. اثرات متقابل بین متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون نیز می‌تواند حالت ایمپرینتینگ در جایگاه Dlk1-Gtl2 تنظیم شود (Carr et al., 2007). تا کنون ۷ واریته از Dlk1 در انسان، خوک، گاو و موش شناسایی شده‌اند که به طور متناوب و ویرایش^۱ می‌شوند و به نام‌های Dlk1-A, Dlk1-B, Dlk1-C, Dlk1-C2, Dlk1-D, Dlk1-D2, Dlk1-E شناخته می‌شوند (Hu et al. 2016).

محصولات Dlk1-A و Dlk1-B که هر دو شامل دو سایت تشخیص برشی پروتئولیز کننده هستند می‌توانند به ترتیب به دو پلی‌پپتید محلول ۵۰ و ۲۵ کیلودالتونی تبدیل شوند، اما Dlk1-C, Dlk1-C2, Dlk1-D, Dlk1-D2 و Dlk1-E پروتئین‌هایی با یک سایت پروتئولیز کننده را کد می‌کنند و فقط یک پروتئین محلول ۲۵ کیلودالتونی را می‌توانند تولید کنند (Mei et al. 2002). به علاوه، بیان بیش از حد Dlk1-C2 در موش در هایپرتروفی عضله در فوتیپ کالیبیج دخیل است (Davis et al. 2004). دو ترنسکرپت از Dlk1 یعنی Dlk1-C و Dlk1-C2 در بزهای بوئر شناسایی شده‌اند که به وسیله یک ایندل () در مرز اگزون‌های ۵ و ۶ از هم تفکیک می‌شوند (Cao et al. 2010). 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). 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 به دست 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 در آسیا و در منطقه خاورمیانه و به‌ویژه در سرزمینی که امروزه قسمتی از کردستان می‌باشد، اهلی شده است (Molaei et al. 2011; Askari et al. 2011; Moghadaszadeh et al. 2015; Barazandeh et al. 2012; 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 رابینی یکی از مهمترین نژادهای بز در ایران است (Askari et al. 2008) و کرک با کیفیت بالا با رنگ‌های سفید، سیاه و یا زرد تولید می‌کند (Molaei et al. 2013). لذا این بزها می‌توانند ارزش اقتصادی بالایی در بازار جهانی داشته باشند (Baghizadeh et al. 2009). تقریباً 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 رابینی 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

¹ alternatively, spliced Dlk1 variants

(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). به طوری که بخش اعظمی از تولیدات گوشت قرمز، شیر، کرک از این صنعت تامین می‌شود. عدم زیاد به سرمایه‌ی زیاد، تولید گوشت کم چرب، نیاز کم به جایگاه و تجهیزات، تولید مناسب شیر، بالا بودن نسبت دوقلو زایی، 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 بررسی‌های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad, 2017). ماده ژنتیکی^۱ یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می‌باشد که هیچ‌گاه 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 ژن‌های یوکاریوتی تحت کنترل موقت و چندبعدی می‌باشد. تنها یک مجموعه نسبتاً کوچک از تمام ژنوم در هر یک از انواع بافت‌ها 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 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 Dik1 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 Dik1 در این نژاد بررسی نشده است. لذا، هدف این مطالعه بیان ژن Dik1 در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

¹ DNA

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۸ نمونه بافتی شامل ماهیچه، کلیه، طحال، مغز، جگر و چربی (از هر بافت ۳ تکرار) از ۳ بز کرکی رایینی 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 در محیط عاری از RNase^۱ انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC^۲ (سیناژن، MR8244) از RNase عاری^۳ شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA One Step 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 فرمتاز استفاده شد (RerertAid™ H Minus First Strand). برای این منظور مقدار ۱۰ μg 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 RNA استفاده شد. برای انجام واکنش‌های RT-PCR باید نمونه RNA عاری از آلودگی به DNA باشد، به این منظور RNA با استفاده از DNase I تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. توالی آغازگرها برای تکثیر ژن DLK1 عبارت بودند از: 5'GACGGCTGGGACGGACACCT3' و 5'CCATTTCTGGCAATCCTTT3' و برای ژن بتاکتین هم عبارت بودند از 5'ACAGCACCGTGTGGCGTAGAG3' و 5'CCTGCGGCATTCACGAAACTAC3' (Hu et al., 2016). طول قطعه تکثیری برای دو ژن DLK1 و بتاکتین به ترتیب عبارت بودند از ۱۵۱ جفت باز و ۸۷ 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 SYBRPermixon 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 میکروتیوب ۰/۲ با هم مخلوط شدند. میکروتیوب‌ها 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 DLK1 و بتاکتین، واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۴ دقیقه، واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتیگراد ۶۰

^۱ RNase-free environment^۲ DiEtyhyl Pyro Carbonate water^۳ RNase-free

ثانیه، اتصال ۶۱ درجه سانتیگراد ۶۰ ثانیه، ۳۵ سیکل تکرار مراحل ۲-۴ و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد ۴ دقیقه 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 ژن های DLK1 و بتاکتین ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت های مختلف cDNA (۱، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن های DLK1 و بتاکتین به ترتیب ۹۷ و ۹۸ درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه ها واکنش های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول Pfaffl et al. (2002) محاسبه گردید.

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

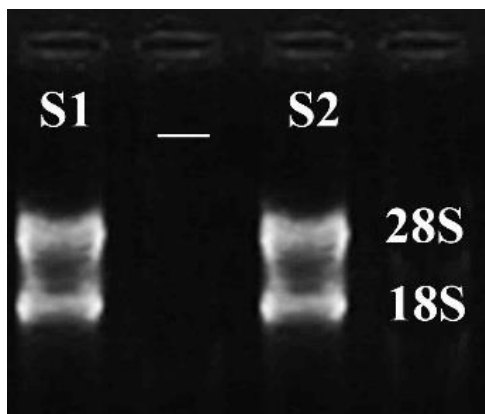
در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می باشد. $\Delta C t$ حاصل تفریق $C t^1$ (حد آستانه) ژن لپتین از $C t$ ژن DLK1 می باشد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۸-۱/۹ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNA های 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 (DLK1) و کنترل (بتاکتین)، واکنش PCR شیب دمایی^۲ انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۵۷°C) انتخاب گردید. نتایج منحنی های Real Time PCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (۲ درصد) نشان داد که ژن DLK1 در بافت های مختلف تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده ۱۰۲bp برای ژن DLK1 در بافت های مختلف (شکل ۲) و وجود باند در محدوده ۲۰۶bp برای ژن بتاکتین در همه نمونه ها، 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 می دهد. 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 DLK1 و بتاکتین، اختصاصی بودن و دمای T_m 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 می دهد (شکل ۳).

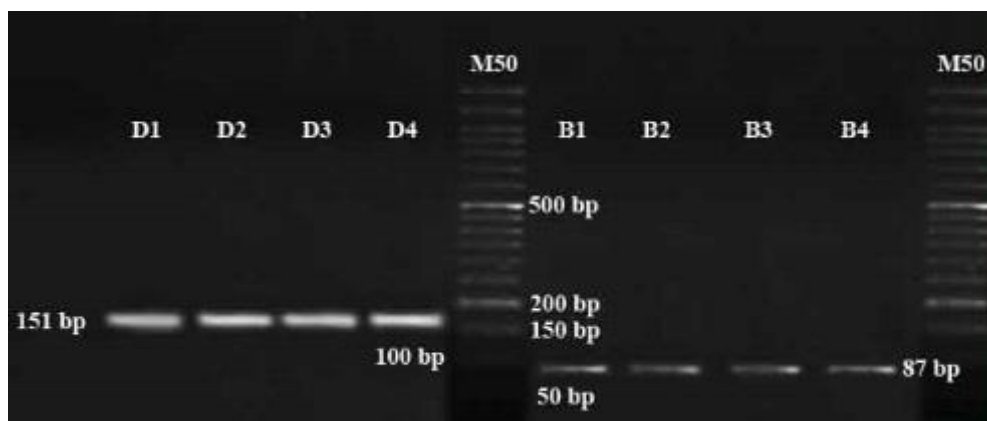
1 Threshold cycle

2 Gradient



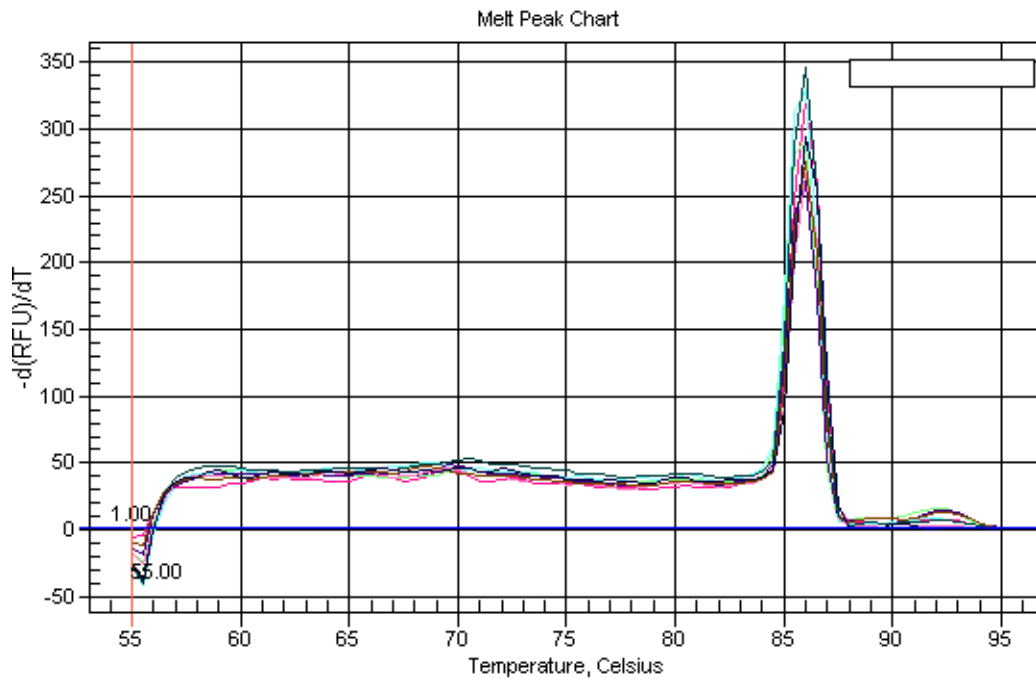
شکل ۱. نمونه هایی از کیفیت RNA استخراج شده از چند بافت بز کرکی راینی روی ژل آگارز. S1 و S2 دو نمونه بافتی و ___ کنترل منفی

Figure 1. Quality of RNA extracted from some tissues of Raini Cashmere goat on agarose gel. S1 and S2 are 2 tissue samples and ___ is negative control



شکل ۲. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای DLK1 و بتاکتین در بز کرکی راینی روی ژل آگارز. B1, B2, B3 و B4 قطعات مربوط به بتاکتین (۸۷ جفت باز) و D1, D2, D3 و D4 قطعات مربوط به DLK1 (۱۵۱ جفت باز) و M50 نشانگر اندازه هستند.

Figure 2. Electrophoresis of studied samples using DLK1 and Beta actin primers in Raini Cashmere goat on agarose gel. B1, B2, B3 and B4 are Beta actin fragments (87 bp), D1, D2, D3 and D4 are Dlk1 fragments (151 bp) and M50 is size marker.

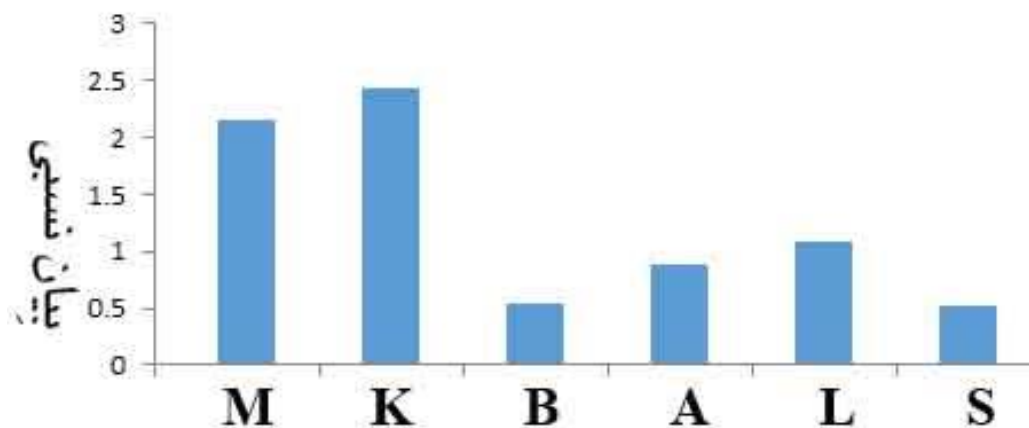


شکل ۳. منحنی ذوب محصول ژن DLK1 حاصل از واکنش Real Time PCR برای بز کرکی راینی.

Figure 3. Melting curve of DLK1 gene production using Real Time PCR for Raini Cashmere goat.

در پژوهش حاضر بیان ژن DLK1 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 ماهیچه، چربی، کلیه، طحال، جگر و مغز) بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت ماهیچه و کلیه و کمترین سطح بیان در بافت طحال و مغز مشاهده شد. این نتایج با نتایج Hu et al. (2016) مطابقت دارد. این پژوهشگران از تکنیک qPCR و وسترن بلات برای مطالعه بیان ژن Dlk1 در بزهای دو ماهه استفاده کردند و نشان دادند که در همه بافت‌ها بیان می‌شود و سطح بیان آن در کلیه بالاتر از بقیه بافت‌ها بود، در حالیکه سطح بیان در بافت‌های طحال و مغز به طور معنی‌داری هم در سطح پروتئین و هم در سطح mRNA پایین‌تر بود. آنها گزارش کردند که این بیان بیش از حد ژن Dlk1 باعث هایپرتروفی عضله می‌شود و نتیجه گرفتند که می‌تواند به عنوان تنظیم کننده مهم توسعه و تکامل ماهیچه عمل کند. همچنین White et al. (2008) وقتی فنوتیپ هایپرتروف را مطالعه کردند متوجه شدند که ژن Dlk1 در فیبرهای ماهیچه‌ای بیش از حد بیان شده است و پیشنهاد کردند که Dlk1 در سلول‌های پیش‌ساز ماهیچه اسکلتی، سلول‌های ماهواره‌ای ماهیچه اسکلتی و مایوبیوب‌ریل‌ها نقش ایفا می‌کند. از آن جا که بیان این ژن در مطالعه ما هم در ماهیچه بیش از بافت‌های دیگر بود نشان دهنده آن است که مطالعه ما نتایج قبلی را تایید می‌نماید. در پژوهشی Kluth et al. (2010) نشان دادند که بیان Dlk1 در کبد جنین حاکی از عملکرد آن در تکثیر و یا تمایز سلول‌های کبدی است. نتایج پژوهش حاضر، که نشان دهنده بیان ژن Dlk1 در بافت کبد است نیز تایید کننده نتایج قبلی است. در پژوهش‌های جداگانه‌ای Murphy

Chen et al. (2011) و (2005) et al. نشان دادند که Dlk1 ممکن است به عنوان تنظیم کننده منفی در فرایند تمایز مزودرمی نقش ایفا کند. از طرفی Hu et al. (2016) مشاهده کردند که mRNA و پروتئین Dlk1 در بافت‌های اندودرمی (جگر)، مزودرمی (کلیه) و اکتودرمی (مغز) وجود دارد. در پژوهش حاضر نیز بیان این ژن در بافت‌های اندودرمی (جگر)، مزودرمی (کلیه) و اکتودرمی (مغز) گزارش شد. در پژوهش حاضر مشخص شد که Dlk1 در بافت چربی پشت بیان می‌شود که با نتایج Hu et al. (2016) که نشان دادند این ژن در چربی‌های محیطی، احشایی و اومنتال بیان می‌شود مطابقت دارد. اما، Vuocolo et al. (2003) گزارش کردند که پروتئین Dlk1 در بافت چربی احشایی وجود دارد، اما در بافت‌های چربی زیر جلدی و سینه‌ای وجود ندارد. بنابراین، نیاز است که پژوهش‌های بیشتری انجام شود تا بتوان نقش Dlk1 را در توسعه و تکامل بافت‌های اندودرمی و اکتودرمی و بافت‌های چربی محیطی، احشایی و اومنتال به طور دقیق مشخص کرد. ما برای اولین بار بیان ژن Dlk1 را در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی مطالعه کردیم و نشان دادیم که این ژن در بافت‌های ماهیچه، چربی، کلیه، طحال، جگر و مغز بیان می‌شود و بیشترین سطح بیان در بافت ماهیچه و کلیه و کمترین سطح بیان در بافت طحال و مغز مشاهده شد. این پژوهش اساسی را برای انجام پژوهش‌های بیشتر در مورد Dlk1 در بز کرکی راینی و سایر نژادهای دیگر بز و حتی دام و طیور بومی ایجاد نمود. پیشنهاد می‌شود که این مطالعه با تعداد دام بیشتر، جنس‌های مختلف، سنین متفاوت و مراحل فیزیولوژیکی گوناگون در نژادهای مختلف بز انجام شود تا بتوان به یک نتیجه‌گیری جامعی دست یافت.



شکل ۴. بیان ژن DLK1 در بافت ماهیچه (M)، چربی (A)، کلیه (K)، طحال (S)، جگر (L) و مغز (B) بز کرکی راینی.

Figure 4. Expression of DLK1 gene in muscle (M), adipose (back fat) (A), kidney (K), spleen (S), liver (L) and brain (B) of Raini Cashmere goat.

منابع

- 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 (۴)۶، ۳۵-۵۰.
- جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان (۴)۴، ۱۱۹-۱۳۲.
- حسینی 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، ۳۲۹-۳۳۳.
- 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، ۴۹-۵۶.
- عسکری ناهید، محمدآبادی محمدرضا، بیگی نصیری محمدتقی و همکاران (۱۳۷۸). مطالعه تنوع ژنتیکی بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله دانش کشاورزی ۱۸، ۱۶۱-۱۵۵.
- علینقی زاده روح الله، محمدآبادی محمدرضا، زکی زاده سونیا (۱۳۸۹) چند شکلی اگزون ۲ ژن BMP15 در بز قرمز جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (۱)۲، ۶۹-۸۰.
- محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰) ارتباط چند شکلی ژن IGFBP-3 با صفات کرک در بز کرکی راینی. مجله ژنتیک نوین ۷، ۱۲۰-۱۱۵.

References

- Albrecht E, Kuzinski J, Komolka K et al. (2015) Localization and abundance of early markers of fat cell differentiation in the skeletal muscle of cattle during growth- are DLK1-positive cells the origin of marbling flecks? *Meat Sci* 100, 237-245.
- Alinaghizadeh R, Mohammadabadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. *Agric Biotechnol J*, 2, 69-80 (In Persian).
- Andersen DC, Petersson SJ, Jørgensen LH, et al. (2009) Characterization of DLK1+ Cells Emerging During Skeletal Muscle Remodeling in Response to Myositis, Myopathies, and Acute Injury. *Stem Cell* 27, 898-908.
- 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 Raeni 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.
- Cao G, Zhang Y, Wang J, Jiang Y (2010) Analysis on cDNA sequence, mRNA expression and imprinting status of Dlk1 gene in goats. *Mol Biol Rep* 37:2259–2264
- Carr MS, Yevtodiynko A, Schmidt CL, Schmidt JV (2007) Allele-specific histone modifications regulate expression of the Dlk1-Gtl2 imprinted domain. *Genomics* 89, 280–290.
- Chacon MR, Miranda M, Jensen CH, et al. (2008) Human serum levels of fetal antigen 1 (FA1/Dlk1) increase with obesity, are negatively associated with insulin sensitivity and modulate inflammation in vitro. *Int J Obes (Lond)* 32, 1122–1129.
- Chen L, Qanie D, Jafari A, et al. (2011) Delta-like 1/fetal antigen-1 (Dlk1/FA1) is a novel regulator of chondrogenic cell differentiation via inhibition of the Akt kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 286, 32140–32149.
- Davis E, Jensen CH, Schroder HD, et al. (2004) Ectopic expression of DLK1 protein in skeletal muscle of padumnal heterozygotes causes the callipyge phenotype. *Curr Biol* 14, 1858–1862.
- Espina AG, Mendez-Vidal C, Moreno-Mateos MA, et al. (2009) Induction of Dlk1 by PTTG1 inhibits adipocyte differentiation and correlates with malignant transformation. *Mol Biol Cell* 20, 3353–3362.
- Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC (2012) Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822, 988–995.
- 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).

- Hu J, Zhao W, Zhan S et al. (2016) Delta-like 1 homolog in *Capra hircus*: molecular characteristics, expression pattern and phylogeny. *Mol Biol Rep* 43, 563–571.
- 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).
- Kluth SM, Buchheiser A, Houben AP, et al. (2010) DLK-1 as a marker to distinguish unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stromal cells in cord blood. *Stem Cells Dev* 19, 1471–1483.
- Li L, Tan J, Zhang Y, et al. (2014) DLK1 promotes lung cancer cell invasion through upregulation of MMP9 expression depending on Notch signaling. *PLoS ONE* 9, e91509
- Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS (2002) Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J* 364, 137–144.
- 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, Askari N, Baghizadeh A, Esmailizadeh A (2009) A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. *Small Rumin Res* 81, 146-51.
- 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) Characteristics 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.
- Murphy SK, Freking BA, Smith TP, et al. (2005) Abnormal postnatal maintenance of elevated DLK1 transcript levels in callipyge sheep. *Mamm Genome* 16, 171–183.
- 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.
- Sakajiri S, O'Kelly J, Yin D, et al. (2005) Dlk1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Leukemia* 19, 1404–1410

- Samulewicz SJ, Seitz A, Clark L, Heber-Katz E (2002) Expression of preadipocyte factor-1 (Pref-1), a delta-like protein, in healing mouse ears. *Wound Repair Regen* 10, 215–221.
- Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, et al. (2000) The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev* 14, 1997–2002.
- Shamsalddini S, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh AK (2016) Polymorphism of the prolactin gene and its effect on fiber traits in goat. *Russ J Genet* 52, 461–465.
- Takada S, Tevendale M, Baker J, et al. (2000) Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr Biol* 10, 1135–1138.
- Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailzadeh 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).
- Vuocolo T, Pearson R, Campbell P, Tellam RL (2003) Differential expression of Dlk-1 in bovine adipose tissue depots. *Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol* 134, 315–333.
- Waddell JN, Zhang P, Wen Y, et al. (2010) Dlk1 is necessary for proper skeletal muscle development and regeneration. *PLoS ONE* 5, e15055.
- White JD, Vuocolo T, McDonagh M, et al. (2008) Analysis of the callipyge phenotype through skeletal muscle development; association of Dlk1 with muscle precursor cells. *Differentiation* 76, 283–298.
- Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, Jirtle RL (2000) Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res* 10, 1711–1718.
- Yevtodiyenko A, Schmidt JV (2006) Dlk1 expression marks developing endothelium and sites of branching morphogenesis in the mouse embryo and placenta. *Develop Dynamic* 235, 1115–1123.