

Expression of calpastatin 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

Calpastatin has been found in skeletal muscle tissue of animals and could prevent unrestrained cellular growth by suppressing calpain activity. The involvement of calpains in apoptosis has been a subject of debate, although their involvement is limited to certain cell types and to specific stimuli. Various studies have shown that this gene is involved in growth performance and meat quality, therefore the aim of this study was to investigate Calpastatin gene expression in different tissues of Raini cashmere goat using Real Time PCR.

Materials and Methods

Totally 21 tissue samples including muscle, adipose, kidney, spleen, liver, lung and heart 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. GAPDH gene was used as housekeeping gene. Pfaffl method was used to analyze achieved data.

Results

For calpastatin gene 89bp fragment and for GAPDH 101bp fragment were observed in all studied tissues. Real Time PCR results of this study showed that Calpastatin gene is expressed in all studied (muscle, adipose, kidney, spleen, liver, lung and heart) tissues and

the highest level of expression was observed in heart, spleen and liver tissues and the lowest level was seen in adipose tissue.

Conclusions

Results showed that Calpastatin are widespread in different tissues of goat. This study would also lay a foundation for further Calpastatin research in Raini cashmere goat. 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: Calpastatin, gene expression, Raini cashmere goat, tissue.

Citation: Mohammadabadi MR (2019) Expression of calpastatin gene in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 11(4), 219-235.

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

DOI: 10.22103/jab.2020.15510.1210

Received: October 23, 2019; Accepted: December 5, 2019

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

بیان ژن کالپاستاتین 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: 1398/08/01 تاریخ پذیرش: 1398/09/14

چکیده

هدف: کالپاستاتین در بافت عضله اسکلتی حیوانات یافت شده است و می‌تواند با سرکوب فعالیت کالپاین مانع از رشد بی رویه سلولی شود. دخالت کالپاین‌ها در آپوپتوزیز موضوعی است که هنوز مورد بحث است، اگرچه دخالت آنها محدود به انواع خاصی از سلول‌ها و محرک‌های خاص است. مطالعات مختلف نشان داده که این ژن در عملکرد رشد و کیفیت گوشت نقش دارد، لذا هدف این پژوهش بررسی میزان بیان ژن کالپاستاتین در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها: در مجموع 21 نمونه بافتی شامل ماهیچه، کلیه، قلب، جگر، شش، طحال و چربی (از هر بافت 3 تکرار) از 3 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 گلیسرآلدئید 3 فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش پی‌فافل استفاده شد.

نتایج: برای ژن کالپاستاتین قطعه 89bp و برای GAPDH قطعه 101bp در همه نمونه‌ها مشاهده شد. نتایج Real Time PCR حاصل از این پژوهش نشان داد که ژن کالپاستاتین در تمامی بافت‌های بررسی شده (ماهیچه، کلیه، قلب، جگر، شش، طحال و چربی) بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت قلب، طحال و جگر و کمترین سطح بیان در بافت چربی مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که ژن کالپاستاتین در بافت‌های مختلف بز گسترده است. همچنین این پژوهش اساسی را برای انجام پژوهش‌های بیشتر در مورد کالپاستاتین در بز کرکی راینی 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، کالپاستاتین

مقدمه

گوشت بز و گوسفند یکی از مهم ترین منابع تامین پروتئین برای بشر است و علاوه بر این، برای ایرانیان طعم بسیار لذیذی دارد (Bahrapour et al. 2008). مصرف کنندگان تردی گوشت را از مهم ترین خصوصیات کیفیت گوشت و ترد نبودن آن را از مهم ترین مشکلات کیفیت آن می دانند (Bahrapour et al. 2008). اگر علت های تغییر در تردی گوشت شناسایی شوند، می توان با اصلاح ساز و کار موثر در فرآیند تردی، به اهداف مورد نظر رسید (Bahrapour et al. 2008). اگر چه بافت گوشت، بخصوص تردی آن در حیوانات مختلف بسیار متغیر است، اما دارای ساختارهای مشابه و خصوصیات شیمیایی یکسانی در کلیه مهره داران است. اکثر محققان معتقدند که با کنترل ژنتیکی می توان مشکل تردی گوشت را تا حدودی بهبود بخشید و در این میان سیستم آنژیومی کالپاین مهم ترین نقش را دارد (Mohammadabadi 2015). نتایج مطالعات نشان می دهد که از بین تمام سامانه های پروتئولیزکننده داخلی ماهیچه اسکلتی فقط سامانه آنژیومی کالپاین در تردی گوشت دخالت دارد (Koochmarraie 1996; Mohammadabadi 2015). در مجموع سیستم کالپاین شامل سه ملکول است: دو پروتئاز وابسته به کلسیم با نام های - μ کالپاین و یک پلی پپتید به نام کالپاستاتین که فعالیت دو پروتئاز ذکر شده را مهار می کند (Leal-Gutiérrez et al. 2018). همچنین سه عضو از خانواده نهای کالپاین یعنی m-کالپاین و μ -کالپاین و کالپاین 3 به دلیل دخالتشان در تجزیه پروتئین میوفیبریلی به خوبی مطالعه شده اند (Leal-Gutiérrez et al. 2018). مشخص شده که μ -کالپاین مسئول پروتئولیز عضله پس از مرگ در موش هایی است که در آن ها μ -کالپاین ناکاوت¹ (غیرفعال) شده است (Leal-Gutiérrez et al. 2018). به طور مشابهی، پروتئولیز پس از مرگ ماهیچه در موش های شاهد و موش هایی که کالپاین 3 در آن ها ناکاوت (غیرفعال) شده رخ می دهد (Geesink et al., 2005). کالپاستاتین، مهار کننده ویژه پروتئازهای وابسته به کلسیم، m-کالپاین و μ -کالپاین است (Juszczuk-Kubiak et al. 2008) و نشان داده شده که در زنده ماندن سلول ها و تکثیر سلولی در شرایط درون تنی نقش دارد (Van Ba et al. 2015). علاوه بر این، بیان بیش از حد کالپاستاتین به طور قابل توجهی فعالیت کالپاین در بافت های عضله، قلب و سلول های عصبی را مهار می کند (Liang et al. 2010). ژن کالپاستاتین (CAST) روی کروموزوم شماره 7 بز، گاو، کزگا² و کروموزوم شماره 5 گوسفند و انسان قرار دارد و شامل 4 اگزون و 3 اینترون است (Mohammadabadi 2015). کالپاستاتین با سرکوب فعالیت کالپاین می تواند از رشد نامحدود سلولی جلوگیری کند (Farr 2011). دخالت کالپاین ها در آپوپتوزیز موضوعی است که هنوز مورد بحث است، اگرچه دخالت آنها محدود به انواع خاصی از سلول ها و محرک های خاص است (Kidd et al. 2000). برخی از مطالعات، با استفاده از بیان بیش از حد کالپاستاتین، گزارش داده اند که در پاسخ به سیگنال های آپوپتوزیز خاص، کالپاین ها به طور واضحی در آپوپتوزیز نقش دارند (Ruizvela et al. 2001). گزارش شده است که کالپاین ها هم به عنوان تنظیم کننده منفی و هم مثبت آپوپتوزیز عمل می کنند (Nakagawa and Yuan 2000). همانطور که توسط برخی مطالعات گزارش شده

¹ knockout² Yak

است، دخالت احتمالی کالپاین‌ها در آپوتوزیز از طریق توانایی آنها در شکستن کاسپازهای خودشان است (McGinnis et al. 1999). برعکس، Chua et al. (2000) گزارش کرده‌اند که کالپاین‌ها به طور بالقوه می‌توانند کاسپازهای 7، 8 و 9 را شکسته و غیرفعال کنند. گزارش‌های متناقضی پیرامون دخالت سیستم کالپاین-کالپاستاتین در آپوتوزیز وجود دارد (Van Ba et al. 2015). RNA تداخلی (RNAi) با واسطه RNA تداخلی کوچک (siRNA) به طور گسترده‌ای در مطالعات عملکردی ژن مورد استفاده قرار گرفته است (Yang et al. 2012). در پژوهشی Van Ba et al. (2015) نقش اصلی کالپاستاتین را با سرکوب کالپاستاتین با استفاده از مدل RNAi در طول تکثیر سلول ماهواره‌ای مورد مطالعه قرار داده‌اند. نتایج آنها حاکی از آن بود که سرکوب کالپاستاتین منجر به افزایش بیان μ کالپاین، کاسپازها و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) می‌شود که به نوبه خود مرگ سلولی آپوتوتیک را تنظیم می‌کنند. از این رو، این نتایج دلالت بر این دارد که سیستم کالپاین/کالپاستاتین نقش مهمی در تکثیر/بقا سلولی دارد. به طور کلی، نتایج آنها نشان می‌دهد که کالپاستاتین یک تنظیم کننده منفی خانواده کالپاین و کاسپاز است. کالپاستاتین ناک‌داون شده¹ (کاهش فعالیت یافته) می‌تواند به طور انتخابی خانواده μ کالپاین و کاسپاز را از طریق تنظیم بالادستی (upregulation) ژن‌های μ کالپاین، کاسپاز 3، کاسپاز 7 و کاسپاز 9 باعث کاهش در زنده ماندن سلولی به معنای مرگ سلول شود. بنا بر نظر بعضی از دانشمندان در میان نشخوارکنندگان بز اولین حیوانی بوده است که بشر به اهلی کردن آن پرداخته است (Mohammadabadi 2019). تاریخچه اهلی شدن بز به 9-11 هزار سال پیش برمی‌گردد و گوسفند کمی بعد از بز مورد توجه قرار گرفته و تاریخچه اهلی شدن آن مربوط به 8-10 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 (Barazandeh 2013; Molaei Moghbeli et al. 2013; Askari et al. 2011; Moghadaszadeh et al. 2015; et al. 2012). حدود 30 میلیون راس بز کرکی در سراسر جهان وجود دارد که 4/5 تا 5 میلیون راس از آن‌ها (حدود 20 درصد بزهای جهان) در ایران پرورش داده می‌شوند (Baghizadeh et al. 2009; Gooki et al. 2019). بز کرکی راینی یکی از مهمترین نژادهای بز در ایران است (Askari et al. 2008; Gholamhoseini Gooki et al. 2018) و کرک با کیفیت بالا با رنگ‌های 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). تقریباً سه میلیون رأس از این نژاد در استان کرمان وجود دارد که اکثر جمعیت آنها در شهرستان بافت است و 22 درصد (651549 رأس) از آنها را شامل می‌شوند و کمترین تعداد آنها در شهرستان راور (65985 رأس) پرورش می‌یابند (Baghizadeh et al. 2009; Khorshidi et al. 2019). بز کرکی راینی در نواحی کوهستانی مرتفع و سرد پرورش

¹ knockdown

داده می‌شود و به عنوان مهمترین نژاد بز کرکی در ایران شناخته شده است (Mohammadabadi 2019). 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). 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 دوقلوزایی، مصرف غذای کم، سهل الهضم بودن شیر بز، ایجاد اشتغال و کمک به اقتصاد خانواده از محاسن پرورش بز محسوب می‌شود (Noori et al. 2017). همچنین در کشورهای کمتر توسعه یافته شیر بز از شیر گوسفند از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد و به 69 درصد از کل عرضه شیر جهان کمک می‌کند (Mohammadabadi 2019). علاوه بر این بزها دوره‌ی شیردهی طولانی‌تر از گوسفند، 300 روز در مقابل 250 روز را دارا می‌باشند و می‌تواند تا سه برابر شیر تولید کند. از طرفی، در اواخر دهه 80 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 1 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 کالپاستاتین 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 کالپاستاتین در این نژاد بررسی

¹ DNA

نشده است. از طرفی مطالعات مختلف نشان داده که این ژن در عملکرد رشد و کیفیت گوشت نقش دارد، لذا هدف این مطالعه بیان ژن کالپاستاتین در بافت‌های مختلف بز کرکی راینی با استفاده از Real Time PCR بود.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری: در مجموع 21 نمونه بافتی شامل ماهیچه، کلیه، قلب، جگر، شش، طحال و چربی (از هر بافت 3 تکرار) از 3 بز کرکی راینی در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از اندام‌های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب‌های 1/5 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 80- نگهداری شدند.

استخراج RNA: استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase¹ انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC² (سیناژن، MR8244) از RNase عاری³ شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیویسیک 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 80- درجه سانتی گراد منتقل شد.

سنتز cDNA: برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز استفاده شد (RerertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1631). برای این منظور مقدار 1µg 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 1 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 DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

آغازگرهای مورد استفاده: توالی آغازگرها برای تکثیر ژن کالپاستاتین شامل 3'GCACCCCTCAGATACAAGAAGC و 5'TTTGGTTTTGTTGATTCTCTG با طول قطعه تکثیری 89 جفت باز و شماره دسترسی 1.1 GU944861 (Wang et al. 2015) و برای ژن گلیسرآلدئید 3 فسفات دهیدروژناز (GAPDH)

¹RNase-free environment

²Di Etyhyl Pyro Carbonate water

³RNase-free

آغازگرها شامل 3'ACCTTCACTACATGGTCTAC و 5'CTTTCCATTGATGACGAGCTTC با طول قطعه تکثیری 101 جفت باز و شماره دسترسی 1.AJ431207 (Wang et al. 2015).

انجام Real Time PCR: جهت انجام واکنش، 4/7 میکرولیتر آب دو بار تقطیر، 7/5 میکرولیتر SYBRPermixTaq II و 0/3 میکرولیتر ROX به همراه 0/5 میکرولیتر آغازگر رفت، 0/5 میکرولیتر آغازگر برگشت و مقدار 1/5 میکرولیتر cDNA الگو در میکروتیوپ 0/2 با هم مخلوط شدند. 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 ژنهای کالپاستاتین و GAPDH، واسرشت اولیه 95 درجه سانتیگراد برای 2 دقیقه و یک سیکل، واسرشت ثانویه 95 درجه سانتیگراد 60 ثانیه، اتصال 58 درجه سانتیگراد 60 ثانیه، و گسترش در دمای 72 درجه سانتیگراد 60 ثانیه در 34 سیکل انجام شد.

آنالیز داده‌ها: برای تجزیه و تحلیل داده‌های 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 کالپاستاتین و GAPDH ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت‌های مختلف cDNA (1، 0/1، 0/01، 0/001) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژنهای کالپاستاتین و GAPDH به ترتیب 98 و 99 درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه‌ها واکنش‌های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول Pfaffl et al. (2002) محاسبه گردید.

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

در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. ΔC_{T} حاصل تفریق C_{T}^1 (حد آستانه) ژن لپتین از C_{T} ژن کالپاستاتین است.

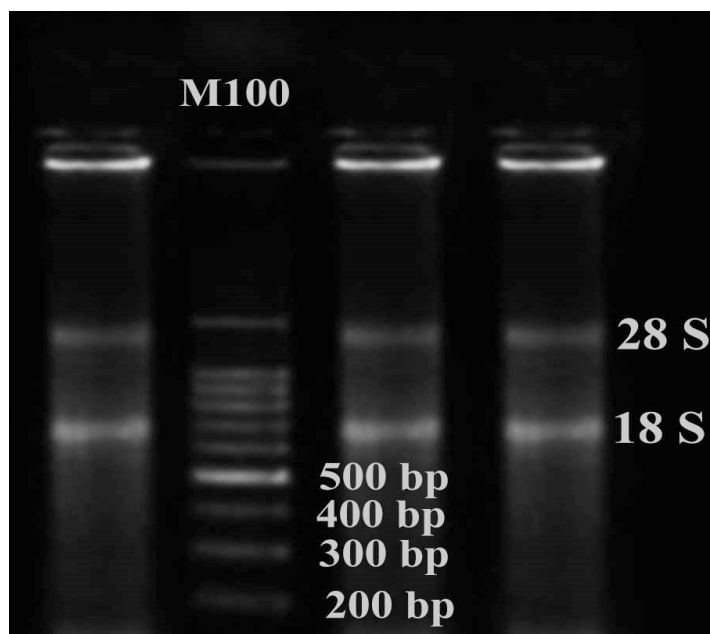
نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین 1/9-1/8 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 (کالپاستاتین) و کنترل (GAPDH)، واکنش PCR شیب دمایی² انجام شد و مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای 58°C) انتخاب گردید. نتایج منحنی‌های Real Time PCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (2 درصد) نشان داد که ژن کالپاستاتین در بافت‌های مختلف تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده 89bp برای ژن کالپاستاتین در بافت‌های

1 Threshold cycle

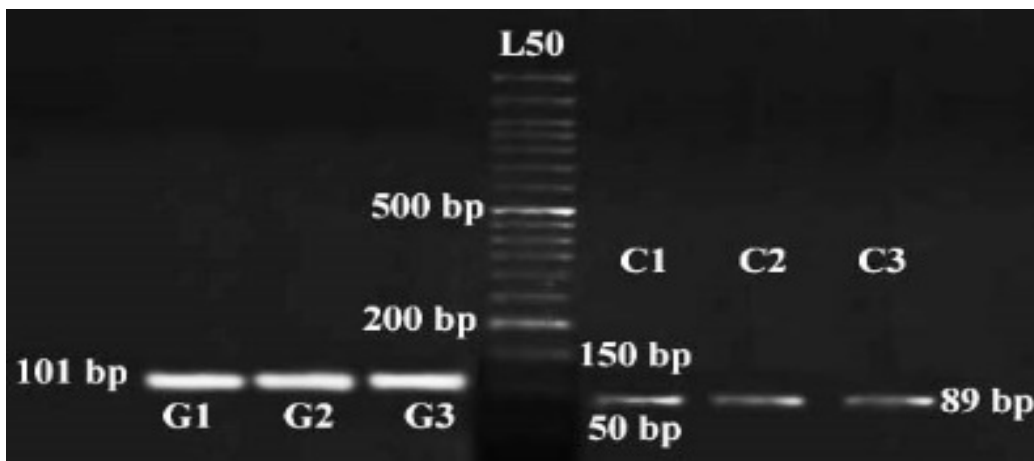
2 Gradient

مختلف (شکل 2) و وجود باند در محدوده 101bp 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 (شکل 3 و 4). برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمای تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است. منحنی ذوب ژن کالپاستاتین و GAPDH، اختصاصی بودن و دمای Tm محصول (دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج شده است) واکنش Real Time PCR این دو ژن را نشان می‌دهد (شکل 5). در این پژوهش بیان ژن کالپاستاتین در هفت بافت 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 (ماهیچه، کلیه، قلب، جگر، شش، طحال و چربی) بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت قلب، طحال و جگر و کمترین سطح بیان در بافت چربی مشاهده شد (شکل 5). این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد (Wang et al. 2015; Zheng et al. 2011).



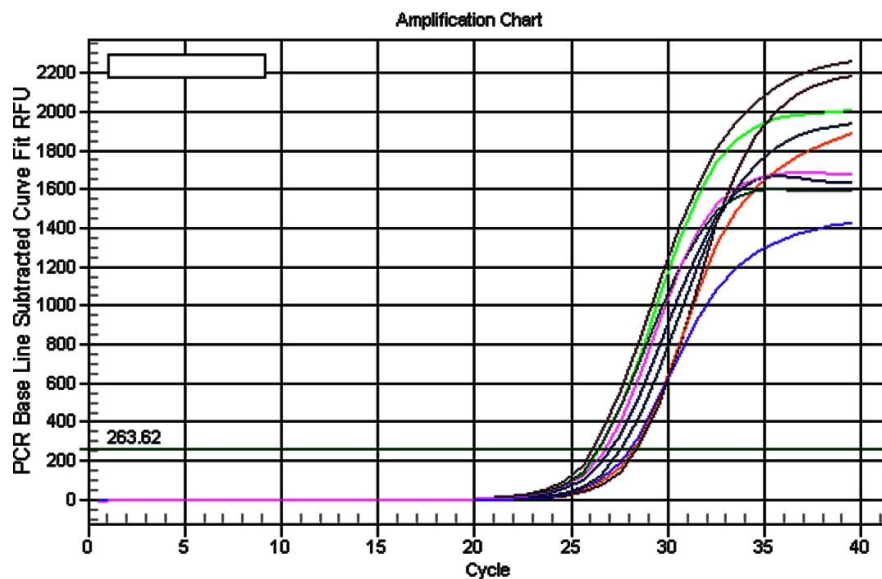
شکل 1. دو نمونه از کیفیت RNA استخراج شده از دو بافت بز کرکی راینی روی ژل آگارز. M100 نشانگر اندازه.

Figure 1. Quality of RNA extracted from 2 tissues of Raini Cashmere goat on agarose gel. M100, size marker.



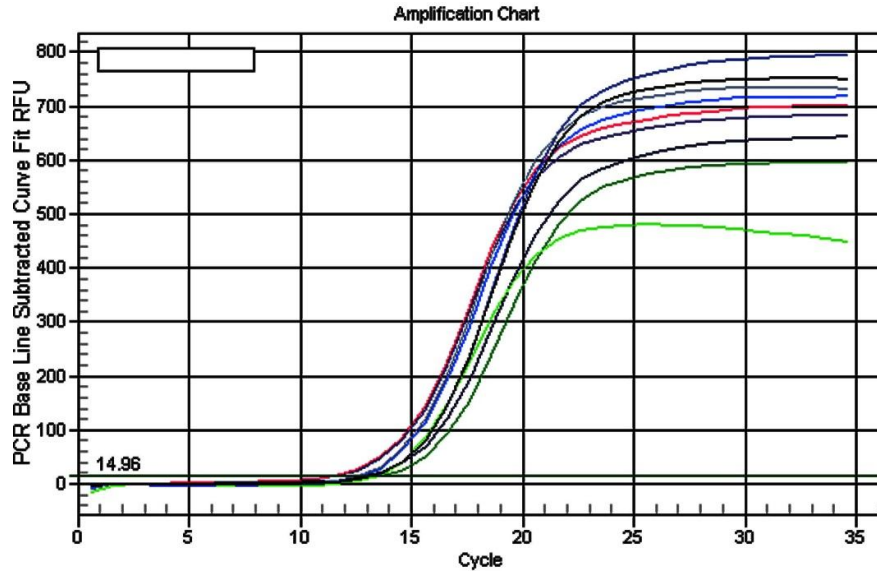
شکل 2. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای کالپاستاتین و GAPDH در بز کرکی راینی روی ژل آگارز. G1، G2 و G3، قطعات مربوط به GAPDH (101 جفت باز) و C1، C2 و C3 قطعات مربوط به کالپاستاتین (89 جفت باز) و L50 نشانگر اندازه هستند

Figure 2. Electrophoresis of studied samples using calpastatin and GAPDH primers in Raini Cashmere goat on agarose gel. G1, G2 and G3 are GAPDH fragments (101 bp), C1, C2 and C3 are calpastatin fragments (89 bp) and L50 is size marker



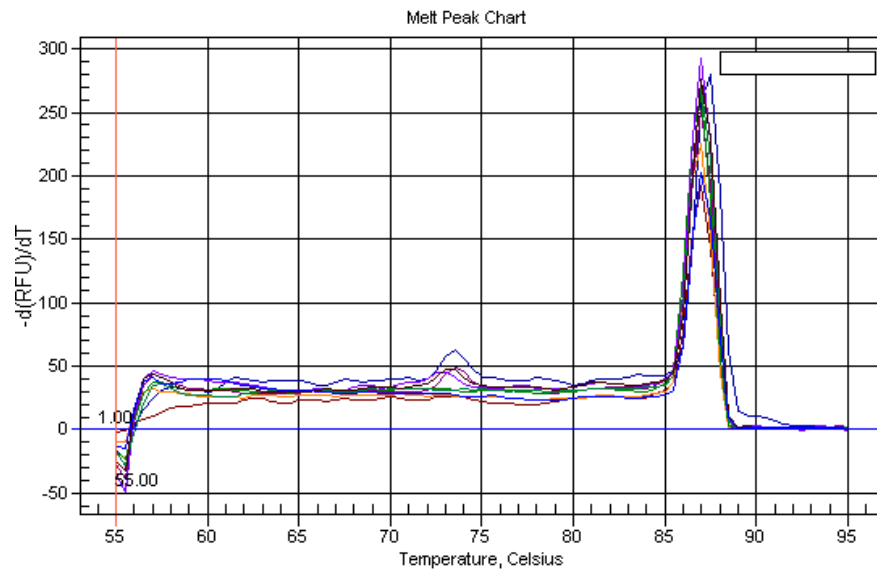
شکل 3. منحنی تکثیر استاندارد ژن کالپاستاتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای بز کرکی راینی

Figure 3. Standard amplification curve of calpastatin gene production using Real Time PCR for Raini Cashmere goat



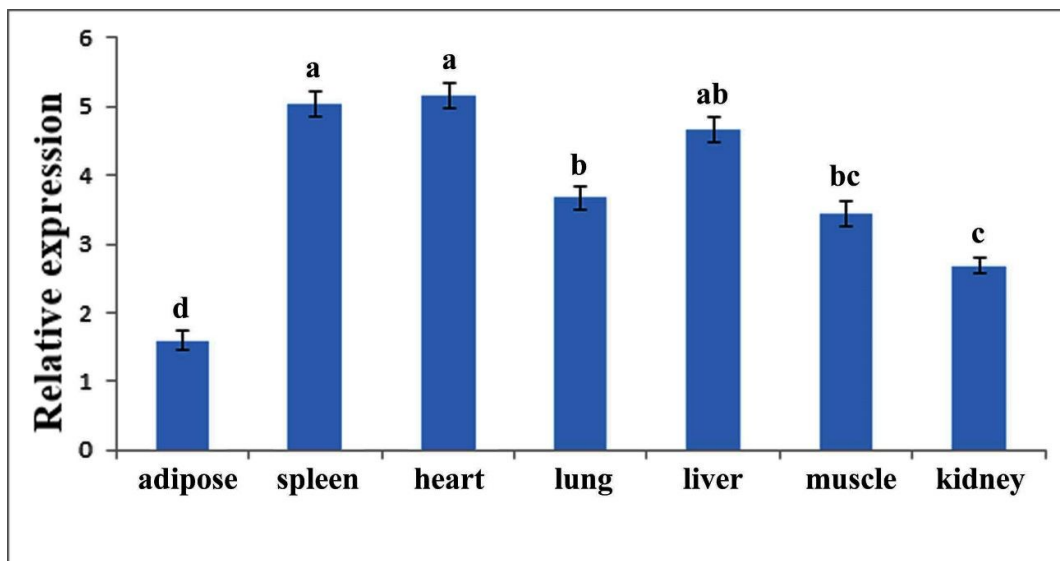
شکل 4. منحنی تکثیر استاندارد ژن GAPDH حاصل از واکنش Real Time PCR برای بز کرکی رایینی

Figure 4. Standard amplification curve of GAPDH gene production using Real Time PCR for Raini Cashmere goat



شکل 5. منحنی ذوب محصول ژن کالپاستاتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای بز کرکی رایینی

Figure 5. Melting curve of calpastatin gene production using Real Time PCR for Raini Cashmere goat



شکل 6. بیان ژن کالپاستاتین در بافت‌های ماهیچه، کلیه، جگر، شش، طحال و چربی بز کرکی رایینی

Figure 6. Expression of calpastatin gene in muscle, adipose, kidney, spleen, liver, lung and heart tissues of Raini Cashmere goat

در پژوهشی Zheng et al. (2011) بیان ژن کالپاستاتین را در بافت‌های مختلف کزگاو اهلی¹ را بررسی کردند و بیشترین سطح بیان را در بافت‌های قلب، جگر و طحال و کمترین آن را در بافت چربی مشاهده نمودند. آن‌ها گزارش کردند که بیان ژن کالپاستاتین در ماهیچه لانژیسیموس² کزگاو جوان نسبت به کزگاوه‌های بالغ کمتر است که می‌تواند منعکس کننده این باشد که رشد ماهیچه لانژیسیموس کزگاوه‌های جوان نسبت به کزگاوه‌های بالغ کمتر مهار می‌شود که مطابق با سرعت رشد سریع‌تر حیوانات جوان است. از آنجا که ژن کالپاستاتین تنظیم کننده منفی رشد عضلات اسکلتی است (Barnoy et al. 1997)، بنابراین پیشنهاد می‌شود که کالپاستاتین حداقل در عضلات لانژیسیموس فاکتور کلیدی موثر در اندازه بدن کزگاو نیست. در پژوهش حاضر مشاهده شد که سطح بیان ژن کالپاستاتین در قلب و طحال بالاتر است (شکل 4) که ممکن است مربوط به کنترل ساختار طبیعی و عملکرد قلب و طحال با جلوگیری از فعالیت کنترل نشده پروتئاز وابسته به یون کلسیم باشد (Zheng et al. 2011). کالپاستاتین مهار کننده پروتئاز وابسته به یون کلسیم در سلول‌ها است و می‌تواند از تخریب پروتئین ماهیچه‌ها جلوگیری کند و تأثیر منفی بر تردی گوشت دارد (Koochmaraie 1996; Zheng et al. 2011). در پژوهشی دیگر Wang et al. (2015) تأثیر سطوح غذایی جیره‌ها را بر کیفیت گوشت و بیان ژن مرتبط با آن در بز سیاه هاینان³ چینی بررسی کردند و نشان دادند که سطح بیان mRNA کالپاستاتین

¹ *Bos grunniens*

² *longissimus muscle*

³ Hainan black goat

با افزایش سطح پروتئین خام به میزان قابل توجهی افزایش یافته و با افزایش سطح انرژی هضمی به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. جالب توجه است، که سطح بیان mRNA کالپاین μ در تضاد با سطح بیان mRNA کالپاستاتین بود. بیان mRNA کالپاین μ به طور قابل توجهی با افزایش سطح انرژی هضمی افزایش یافته و با افزایش سطح پروتئین خام به طور قابل توجهی کاهش یافته بود. این نتایج ممکن است به این واقعیت مربوط شود که کالپاستاتین یک مهار کننده اندوژنوس اختصاصی کالپاین است. مطالعات نشان داده که جیره‌های با سطح غذایی پایین تمایل به افزایش مقدار چربی بین ماهیچه‌ای و کاهش نیروی برشی وارنر-برتزler¹ (WBSF) گوشت خوک و افزایش سطح mRNA کالپاین μ ماهیچه اسکلتی دارند (Tang et al. 2010). این نتایج نشان می‌دهد که یک جیره غذایی با انرژی و پروتئین نسبتاً کاهش یافته می‌تواند تردی گوشت و چربی درون عضلانی را افزایش دهد. در پژوهشی Leal-Gutiérrez et al. (2018) نشان دادند که تاثیر اصلی μ -کالپاین و کالپاستاتین بر نیروی برشی وارنر-برتزler² (WBSF) در گاو از طریق پروتئولیز کردن عضلات است. به منظور بررسی اثرات خسارت‌های پخت و پز بر تردی غیروابسته به پروتئولیز عضلانی (Kończak et al., 2007; Bouhrara et al., 2011, 2012)، آن‌ها خسارت پخت و پز را به عنوان یک متغیر وابسته³ در آنالیز همبستگی وارد کردند. آنها ارتباط بسیار معنی داری بین نشانگر Cast5 و ظرفیت نگهداری آب در گوشت خام مشاهده کردند. اما، نشانگر Cast5 هیچ تأثیر معنی‌داری بر خسارت پخت و پز نداشت. در جمعیت گاوهای مورد بررسی آن‌ها ARSUSMARC116 با نیروی برشی وارنر-برتزler (WBSF) همبسته بود و این ارتباط چه هنگامی که SNP به صورت جداگانه یا چه به عنوان یک اسنیپ تگ⁴ برای کالپاستاتین LD-block 3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت معنی‌دار بود. هنگام در نظر گرفتن کل کالپاستاتین LD-block 3، دیپلوتایپ‌های ساخته شده بر اساس اسنیپ تگ قادر به تقسیم‌بندی جمعیت برای نیروی برشی وارنر-برتزler (WBSF) با اختصاصیت بالاتر بودند. ما برای اولین بار بیان ژن کالپاستاتین را در بافت‌های مختلف بز کرکی رابینی مطالعه کردیم و نشان دادیم که این ژن در بافت‌های ماهیچه، کلیه، قلب، جگر، شش، طحال و چربی بیان می‌شود و بیشترین سطح بیان در بافت قلب، طحال و جگر و کمترین سطح بیان در بافت چربی مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که ژن کالپاستاتین در بافت‌های مختلف بز گسترده است. همچنین این پژوهش اساسی را برای انجام پژوهش‌های بیشتر در مورد کالپاستاتین در بز کرکی رابینی 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.

1 Warner-Bratzler shear force

2 Warner-Bratzler shear force

3 Covariate

4 tag SNP

منابع

- بهرام پور وحید، محمدآبادی محمدرضا، میرزایی حمیدرضا و همکاران (1387) آنالیز ملکولی ژن کالپاستاتین در گله های گوسفند کرمانی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی 15(4)، 124-131.
- 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 رایینی. 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 بافت های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان 4(4)، 119-132.
- حسینی محمدنبی، اسدی فوزی مسعود، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، محمدآبادی محمدرضا (1389) آنالیز ژنتیکی صفات رشد در بز کرکی رایینی با استفاده از مدل حیوانی چند متغیره. مجله علوم دامی ایران 41، 323-329.
- عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (1389). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی رایینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین 5، 49-56.
- عسکری ناهید، محمدآبادی محمدرضا، بیگی نصیری محمدتقی و همکاران (1378). مطالعه تنوع ژنتیکی بز کرکی رایینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. مجله دانش کشاورزی 18، 155-161.
- علینقی زاده روح الله، محمدآبادی محمدرضا، زکی زاده سونیا (1389) چند شکلی اگزون 2 ژن BMP15 در بز قرمز جبال بارز. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 2(1)، 69-80.
- محمدآبادی محمدرضا (1390) ارتباط چند شکلی ژن IGFBP-3 با صفات کرک در بز کرکی رایینی. مجله ژنتیک نوین 7، 120-115.
- محمدآبادی محمدرضا (1394) تنوع آلی ژن کالپاستاتین در گوسفند سنجابی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) 28(3)، 395-402.
- محمدآبادی محمدرضا (1398) بیان ژن Dlk1 در بز کرکی رایینی با استفاده از Real Time PCR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 11(3)، 191-205.

References

- 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).
- 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.
- Bahrampour V, Mohammadabadi MR, Mirzaei HR et al. (2008) Molecular analysis of Calpastatin gene in Kermani sheep herds. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 1, 124-131 (In Persian).
- 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.
- Barnoy S, Glaser T, Kosower NS (1997) Calpain and calpastatin in myoblast differentiation and fusion: effects of inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1358, 181-188.
- Bouhrara M, Clerjon S, Damez J et al. (2011). Dynamic MRI and thermal simulation to interpret deformation and water transfer in meat during heating. *J Agric Food Chem* 59, 1229-1235.
- Bouhrara M, Lehallier B, Clerjon S et al. (2012) Mapping of muscle deformation during heating: in situ dynamic MRI and nonlinear registration. *Magn Reson Imaging* 30, 422-430.
- Chua BT, Guo K, Li P (2000) Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* 275, 5131-5135.
- Farr C (2011) Calpain and Calpastatin in a Mouse Model of Acute Myeloid Leukemia. Dissertation, University of Toronto
- Geesink, G. H., Taylor, R. G., and Koohmaraie, M. (2005). Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. *J. Anim. Sci.* 83, 1646-1652.
- Gholamhoseini Gooki F, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M (2018) Polymorphism of the growth hormone gene and its effect on production and reproduction traits in goat. *Iran J Appl Anim Sci* 8, 653-659.
- Gooki FG, Mohammadabadi M, Fozi MA, soflaei M (2019) Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. *Walailak J Sci Technol* 16, 499-508.
- 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).

- 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).
- Juszczuk-Kubiak E, Wyszyńska-Koko J, Wicińska K, Rosochacki S (2008) A novel polymorphism in intron 12 of the bovine calpastatin gene. *Mol Biol Rep* 35, 29-35.
- Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T (2000) Proteolytic regulation of apoptosis. *Cell Dev Biol* 11, 191-201
- Khorshidi M, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK et al. (2019) Comparison of artificial neural network and regression models for prediction of body weight in Raini Cashmere goat. *Iran J Appl Anim Sci* 9, 453-461.
- Koohmaraie M (1996) Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci* 43, S193-S201.
- Leal-Gutiérrez JD, Elzo MA, Johnson DD et al. (2018) Association of m-Calpain and Calpastatin Polymorphisms with Meat Tenderness in a Brahman-Angus Population. *Front Genet* 9, 00056e.
- Liang B, Duan BY, Zhou XP et al. (2010) Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 285, 27737-27744.
- McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH et al. (1999) Procaspase-3 and poly (ADP) ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 94-99.
- 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 (2015) Allelic Diversity of Calpastatin Gene in Sanjabi Sheep. *J Mol Cell Res (Iran J Biol)* 28, 395-402 (In Persian).
- Mohammadabadi MR (2019) Dlk1 gene expression in Raini Cashmere goat using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 11, 191-205 (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) 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.
- Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.
- Noori AN, Behzadi MRB, Mohammadabadi MR (2017) Expression pattern of Rheb gene in Jabal Barez Red goat. *Indian J Anim Sci* 87, 1375-1378.
- 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.

- Ruiz-vela A, Serrano F, Gonzalez MA et al. (2001) Transplanted long-term cultured pre-B1 cells expressing calpastatin are resistant to B cell receptor-induced apoptosis. *J Exp Med* 194, 247–254.
- 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.
- Tang R, Yu B, Zhang K et al. (2010) Effects of nutritional level on pork quality and gene expression of micro-calpain and calpastatin in muscle of finishing pigs. *Meat Science* 85, 768–771.
- 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).
- Van Ba H, Reddy BV, Hwang I (2015) Role of calpastatin in the regulation of mRNA expression of calpain, caspase, and heat shock protein systems in bovine muscle satellite cells. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim* 51, 447-454.
- Wang D, Zhou L, Zhou H et al. (2015) Effects of Nutritional Level of Concentrate - Based Diets on Meat Quality and Expression Levels of Genes Related to Meat Quality in Hainan Black Goats. *Anim Sci J* 86,166-173.
- Zheng YC, Lin YQ, Yue Y et al. (2011) Expression profiles of myostatin and calpastatin genes and analysis of shear force and intramuscular fat content of yak longissimus muscle. *Czech J Anim Sci* 56, 544–550.