



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد چهارم، شماره چهارم، ۱۳۹۵

<http://ejrr.gau.ac.ir>

بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده

از Real Time qPCR

امیرحسین جعفری دره‌در^۱، *محمد رضا محمدآبادی^۲، علی اسمعیلی‌زاده کشکوئیه^۳ و

علی ریاحی مدوار^۴

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد، ^۲دانشیار و ^۳استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۴استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی،

دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۶

چکیده

سابقه و هدف: گوسفند کرمانی یکی از مهمترین نژادهای گوسفند بومی ایران است و به خوبی با شرایط محیطی خشن و نامطلوب قسمت جنوب شرقی کشور که آب و هوای گرم و خشک غالب است و مراتع کم و کم کیفیت هستند سازگار شده است. پروتئین CIB4 یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم و اینتگرین، یعنی CIB می‌باشد که در باروری بالا موثر است. ژن CIB4 دارای ۲ ترنسکرپت L-CIB4 و S-CIB4 می‌باشد. تا کنون وظایف بیولوژیکی CIB4 در پستانداران به خوبی مشخص نشده، ولی اخیراً به دلیل اثر بالقوه CIB4 در افزایش باروری توجه زیادی به این پروتئین شده است. لذا، با توجه به نقش و اهمیت این پروتئین بر باروری، در مطالعه حاضر بیان این ژن در گوسفند کرمانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بیان ژن CIB4 در بافت‌های مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد، تخمدان و بیضه (از هر بافت ۳ تکرار) در گوسفند کرمانی (۴ نر و ۲ ماده) بررسی شد. در ابتدا بافت‌های مختلف از گوسفند تهیه و در ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شد و سپس RNA کل از تمامی نمونه‌ها طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent استخراج و cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت

*مسئول مکاتبه: mrm2005@gmail.com

فرمت‌تاز ساخته شد. پس از تکثیر ژن CIB4 و GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی، نتایج منحنی‌های Real Time qPCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شد.

نتایج: نتایج اسپکتروفتومتری 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. مشاهده تک باند در محدوده ۵۷۴bp برای برای ژن CIB4 در بافت بیضه و عدم وجود باند ۵۷۴bp در بافت‌های دیگر و وجود باند در محدوده ۱۵۰bp برای ژن GAPDH در مورد همه نمونه‌ها نشان داد که ژن CIB4 فقط در بیضه گوسفند کرمانی بیان می‌شود و در بافت‌های مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد و تخمدان بیان نمی‌شود.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که ژن CIB4 فقط در بیضه گوسفند کرمانی بیان می‌شود و در بافت‌های مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد و تخمدان بیان نمی‌شود، لذا می‌توان پیشنهاد کرد که این ژن در باروری قوچ‌ها نقش دارد. اگر چه مشخص شد که این ژن مختص بیضه است و فقط در بیضه بیان می‌شود، ولی برای درک مکانیسم‌هایی که به وسیله آن‌ها بیان این ژن کنترل می‌شود باید مطالعات تکمیلی انجام شود.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، CIB4، گوسفند کرمانی، Real Time qPCR

مقدمه

گوسفند حیوان مهم تولیدکننده گوشت در نواحی گرمسیری، از قبیل کشورهای خاورمیانه است و عملکرد اقتصادی آن بستگی به توانایی رشد و تولید مثل مطلوب آن دارد (۱۹). بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند در ایران وجود دارد که شامل ۲۷ نژاد و اکوتیپ هستند (۸ و ۲۰). گوسفند کرمانی یکی از مهمترین نژادهای گوسفند بومی ایران است و به خوبی با شرایط محیطی خشن و نامطلوب قسمت جنوب شرقی کشور که آب و هوای گرم و خشک غالب است و مراتع کم و کم کیفیت هستند سازگار شده است. این گوسفند دنبه دار است و اندازه آن متوسط و دارای پشم سفید می باشد که برای تولید گوشت و پشم نگهداری می شود (۱۰) و در استان کرمان بسیاری از نیازهای مردم عشایر و دامپروران این استان را تأمین می کند. لذا، ضروری به نظر می رسد به صنعت گوسفندداری به عنوان یکی از منابع تأمین کننده گوشت، پشم، پوست و غیره توجه ویژه ای شود و در جهت شناسایی پتانسیل ها، استعدادها و نژادهای بومی، رفع موانع و مشکلات بهبود و اصلاح این نژادها اقدامات اصولی و قاطعی صورت گیرد.

یکی از این اقدامات مطالعه ژن ها و پروتئین های مرتبط با صفات اقتصادی و مطالعه آن ها در سطح سلولی یا کروموزومی است. یک خانواده از این ژن ها، خانواده پروتئین باند شونده به کلسیم و اینتگرین (CIB¹) هستند. سلول ها به تغییرات سطوح یون کلسیم (Ca^{2+}) به وسیله پروتئین های ای اف-هند^۲، که دربرگیرنده خانواده CIB هستند پاسخ می دهند. خانواده CIB می تواند ساختارشان را تغییر دهند تا به پروتئین های هدف باند شوند و آن ها را فعال کنند تا به یون کلسیم باند شوند. از نظر عملکردی نشان داده شده است که اعضای این خانواده در پستانداران در هموستازی، پاسخ به آسیب DNA، مرگ برنامه ریزی شده سلول، جنین زایی، اندومیتوز و اسپرماتوژنز دخیل هستند (۱۶، ۱۹) که در اکثر آن ها به نوعی اتصال به یون کلسیم اثرگذار است. خانواده پروتئین CIB انسانی شامل چهار همولوگ CIB1، CIB2، CIB3 و CIB4 است که همه آن ها دامین هایی به نام ای اف- هند دارند که در باند کردن یون کلسیم مهم هستند. در پژوهشی نایک^۳ و همکاران (۱۹۹۷) اولین عضو خانواده پروتئین CIB، یعنی CIB1 را کشف کردند (۱۱). در ابتدا مشخص شد که این پروتئین ۲۲ کیلو دالتون

1- Calcium and integrin binding protein

2- EF-hand

3- Naik

وزن دارد و به دم سیتوپلاسمی اینتگرین α Iib پلاکت متصل می‌شود. تجمع پلاکت‌ها نقش مهمی را در هموستازی فیزیولوژیکی و ترومبوز پاتولوژیک بازی می‌کند. آگونیست‌های پلاکت مجموعه‌ای از حوادث را به نام سیگنال‌دهی داخلی - خارجی القا می‌کنند که منجر به فعال‌سازی اینتگرین α Iib می‌شود. فیبرینوژن باند شونده به اینتگرین فعال شده سیگنال‌هایی را تحت عنوان سیگنال‌دهی داخلی - خارجی تنظیم می‌کند که پایداری و رشد لخته را تنظیم می‌کند. CIB1 شامل چهار موتیف ای اف - هند است که دو تا از آن‌ها به کلسیم باند می‌شود (۳، ۱۵، ۲۱). آن همچنین به تعدادی از افکتورهای بالقوه، از قبیل GTPase Rac3 کوچک (۴)، Pax3 (۶)، کینازهای چوگان مانند^۱ Fnk و Snk^۷ (۷)، PAK1^۲ و FAK^۳ (۱۱) و پروتئین کیناز وابسته به DNA (۱۴) باند می‌شود. عملکردهای بعضی از این پروتئین‌های بالا به‌وسیله CIB1 تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۶، ۹). CIB1 ممکن است در فعال‌سازی اینتگرین Iib، پاسخ به آسیب دیدن DNA، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول^۴، تشکیل و توسعه جنین^۵ و تنظیم سیگنال‌های یون کلسیم دخیل باشد (۱۱، ۱۲، ۱۴). اخیراً نقش CIB1 در موش‌ها روشن شده است. موش‌های نر فاقد CIB1 به‌علت از بین رفتن فازهاپلوئید اسپرماتوزنز عقیم بودند. اگر چه در این موش‌ها اندازه بیضه‌ها و تعداد سلول‌های زایاً در لوله‌های سمینیفروس^۷ کاهش یافته بود، اما مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های زایگر افزایش یافته بود و طویل شدن اسپرماتیدها و اسپرم‌ها متوقف شده بود (۱۸). این امر بیانگر این است که CIB1 ممکن است یکی از ژن‌های عملکردی مهم در باروری نرها باشد. مشخص شده است که CIB2 در ماهیچه اسکلتی موش، محل تولید پروتئین بیان می‌شود و می‌تواند با زیرواحد α 7B اینتگرین اثر متقابل ایجاد کند (۵). همچنین مشخص شده که پروتئین‌های CIB1، CIB2 و CIB3 موش در شرایط آزمایشگاهی به زیرواحد α Iib اینتگرین موش باند می‌شوند (۲). علاوه بر این، غربال‌گری سیستماتیک در گوسفند نشان داده که ژن CIB2 در بافت‌های مختلفی، از قبیل جگر، قلب، کلیه، مغز، طحال، معده، تخمدان، بیضه و ماهیچه بیان می‌شود (۱۶). همچنین، بیان CIB2 در این بافت‌ها در مقایسه با CIB3 و CIB4 نسبتاً بالا است (۱۶).

-
- 1- polo-like kinases
 - 2- p21-activated kinase
 - 3- Focal adhesion kinase
 - 4- Apoptosis
 - 5- Embryogenesis
 - 6- Germ cells
 - 7- Seminiferous tubules

مقابل، RNAهای CIB3 و CIB4 که در گوسفند شناسایی شده‌اند یک توزیع انتخابی را در بافت‌های مختلف نشان داده‌اند و مانند CIB2 بیان‌شان در همه بافت‌ها یکسان و بالا نیست. ژن CIB3 اصولاً^۱ در سطوح نسبتاً پایین در قلب، معده، تخمدان، بیضه و ماهیچه بیان می‌شود (۱۶). محصولات ژن CIB4 تا کنون فقط در بافت بیضه گوسفند شناسایی شده‌اند، که نشان‌دهنده نقش واحد و منحصر به فرد این پروتئین خاص در باروری گوسفند است (۱۷). با توجه به این‌که تا کنون هیچ یک از ژن‌های این خانواده در گوسفند کرمانی مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، هدف این پژوهش بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بافتی شامل مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد، تخمدان و بیضه (از هر بافت ۳ تکرار) از گوسفندان کرمانی (۴ نر و ۲ ماده) ایستگاه گوسفند و بز دانشگاه شهید باهنر کرمان در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. گوسفندان موجود در این گله فقط از نژاد کرمانی بودند. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از اندام‌های مورد نیاز توسط تیغ استریل جدا گردید و در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری 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 انجام سریع نمونه‌ها در داخل فریزر ۸۰- نگهداری شدند. استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase^۲ انجام شود. قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC^۳ (سیناژن، MR8244) از RNase عاری^۴ شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیویسیک کانادا) صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز^۵ و UV اسپکتروفتومتری^۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. RNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

- 1- Primarily
- 2- RNase-free environment
- 3- Di Etyhyl Pyro Carbonate water
- 4- RNase-free
- 5- Agarose gel electrophoresis
- 6- UV spectrophotometry

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز استفاده شد (RerertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit #K1631). برای این منظور از مقدار ۱ 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 DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه‌برداری معکوس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای طراحی آغازگرهای موردنظر (جدول ۱) از سایت www.ncbi.com و نرم‌افزار *gene runner* استفاده شد. آغازگرها با واسطه شرکت تکاپوزیست (ایران) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) ساخته شدند. برای این ژن در گوسفند دو ترنسکرپت بلند (L-CIB4) و کوتاه (S-CIB4) وجود دارد که در این پژوهش ترنسکرپت بلند تکثیر شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن CIB4 با شماره دسترسی KJ425421.1 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی.

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for CIB4 gene expression in different tissues of Kermani sheep with accession no. KJ425421.1.

طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)	توالی آغازگر Primer sequence	نام ژن Gene name
574	5'- CATGGGGCAATGTCTGAGGT -3' Sense Primer	ژن CIB4 CIB4 Gene
	5'- GGTATTTGTGTTACGTC AAC 3' Antisense Primer	
150	5'- CTGCTGACGCTCCCATGTTTGT -3' Sense Primer	ژن GAPDH GAPDH Gene
	5'-CTGCTGACGCTCCCATGTTTGT -3' Antisense Primer	

جهت انجام واکنش، با در نظر گرفتن استانداردهای MIQE ارایه شده توسط بوستین و همکاران (۲۰۰۹) (۱) 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 میکروتیوپ ۰/۲ با هم مخلوط شدند. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن ۳۰۰۰ قرار داده شد. برای ژن CIB4 و GAPDH، واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه، واسرشت ثانویه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، ۴۰ سیکل تکرار مراحل ۲-۴ و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه و در مرحله ذوب افزایش دما از ۷۲ تا ۹۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real time PCR از روش پی‌فافل و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد (۱۳). در این روش برای بررسی درصد بازده واکنش PCR ابتدا نمودار استاندارد برای ژن‌های CIB4 و GAPDH ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت‌های مختلف cDNA (۱، ۱۰/۱، ۱۰۰/۱، ۱۰۰۰/۱) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن‌های CIB4 و GAPDH به ترتیب ۹۸ و ۹۹ درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه‌های تیمار شده و نرمال واکنش‌های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول پی‌فافل و همکاران (۲۰۰۲) محاسبه گردید (۱۳).

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

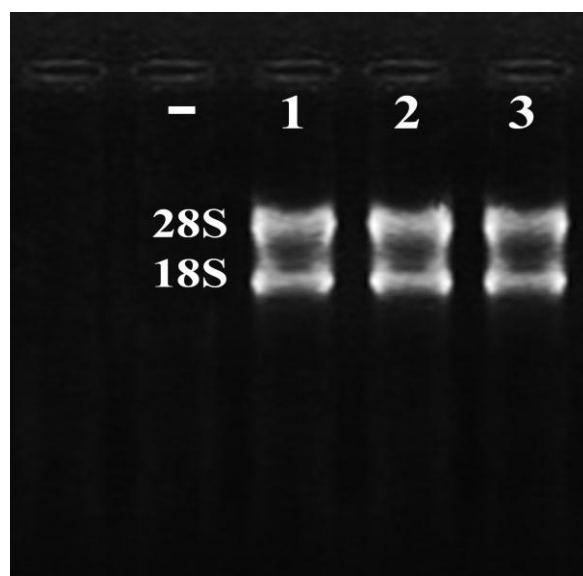
در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. ΔCt حاصل تفریق Ct (حد آستانه) ژن CIB4 از Ct ژن GAPDH می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۷۷-۱/۹ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده بود و وجود دو باند 18S و 28S در RNA نشان‌دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان‌دهنده خلوص آن بود (شکل ۱). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (CIB4) و کنترل (GAPDH)، واکنش PCR

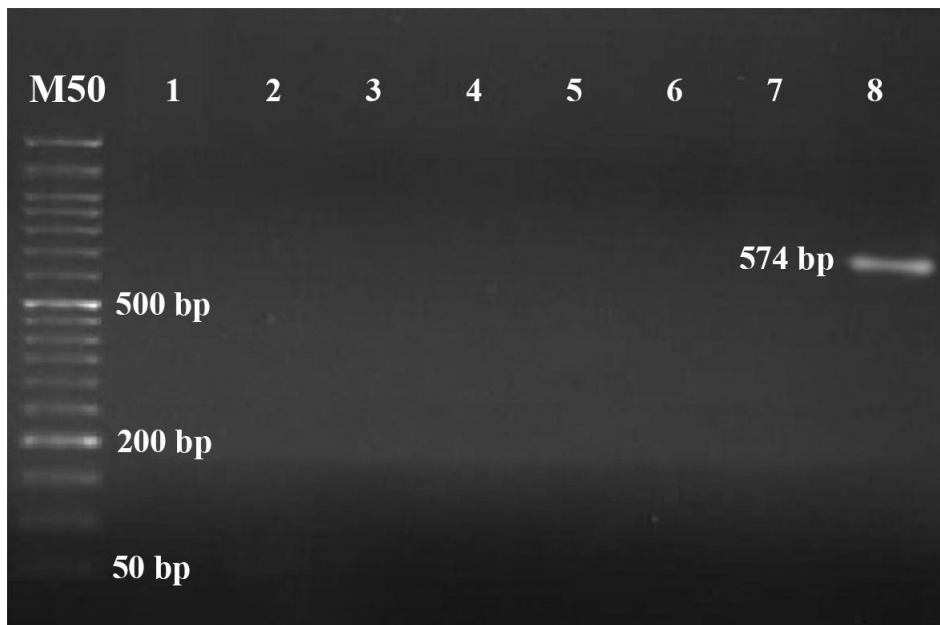
شیب دمایی^۱ انجام شد و مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۵۹°C) انتخاب گردید.

نتایج منحنی‌های Real Time PCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (۲ درصد) نشان داد که ژن CIB4 فقط در بافت بیضه تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده ۵۷۴bp برای ژن CIB4 در بافت بیضه و عدم وجود باند ۵۷۴bp در بافت‌های دیگر (شکل ۲) و وجود باند در محدوده ۱۵۰bp برای ژن GAPDH در مورد همه نمونه‌ها (شکل ۳)، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه موردنظر 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 نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.



شکل ۱- نمونه‌هایی از کیفیت RNA استخراج شده از بیضه گوسفند کرمانی روی ژل آگارز. ۱، ۲ و ۳ نمونه‌ها. - کنترل منفی.

Figure 1. Quality of RNA extracted from testis of Kermani sheep on agarose gel. 1, 2 and 3 present samples. - is negative control.

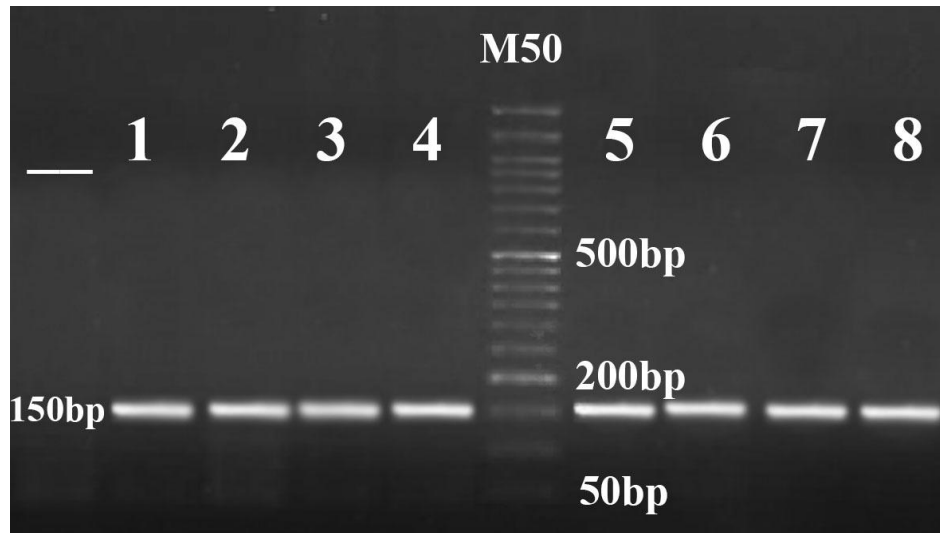


شکل ۲- الکتروفورز نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای CIB4 در گوسفند کرمانی روی ژل آگارز. M50؛ نشانگر اندازه. چاهک‌های ۱ تا ۸ به ترتیب مربوط به مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد، تخمدان و بیضه هستند.

Figure 2. Electrophoresis of studied samples using CIB4 primers in Kermani sheep on agarose gel. M50; size marker. Lanes 1-8 present brain, heart, lung, spleen, kidney, liver, ovary and testis, respectively.

نتایج Real Time PCR نشان داد که ژن CIB4 فقط در بیضه گوسفند کرمانی (۷۴ درصد) بیان شد و در بافت‌های مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد، تخمدان بیان نشد که با نتایج یو^۱ و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد (۱۷). آن‌ها نشان دادند که سطح بیان ترنسکرپت L-CIB4 در گوسفندان دم کوتاه‌ها با دورست تفاوت معنی‌داری ندارد، ولی سطح بیان آن در این دو نژاد با تکسل تفاوت معنی‌داری دارد ($P < 0/05$). آن‌ها همچنین مشاهده کردند که ترنسکرپت S-CIB4 فقط در گوسفندان دم کوتاه‌ها بیان می‌شود و پیشنهاد کردند که CIB4 به طریقی ممکن است با باروری بالای این نژاد ارتباط داشته باشد. با توجه به این که ژن CIB4 فقط در بیضه گوسفندان کرمانی، دم کوتاه‌ها، تکسل و دورست بیان شده است، می‌توان پیشنهاد کرد که این ژن در باروری قوچ‌ها نقش دارد.

1- Yu



شکل ۳- الکتروفورز نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای GAPDH در گوسفند کرمانی روی ژل آگارز. M50؛ نشانگر اندازه. چاهک‌های ۱ تا ۸ به ترتیب مربوط به مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد، تخمدان و بیضه هستند. - کنترل منفی.

Figure 3. Electrophoresis of studied samples using GAPDH primers in Kermani sheep on agarose gel. M50; size marker. Lanes 1-8 present brain, heart, lung, spleen, kidney, liver, ovary and testis, respectively. - is negative control.

نتیجه‌گیری

در نتیجه، مطالعه ملکولی ترنسکریپت‌های دیگر ژن CIB4 در توسعه و درک ما از عملکرد این ژن در گوسفند مفید خواهد بود. اگر چه ما متوجه شدیم که این ژن مختص بیضه است و فقط در بیضه بیان می‌شود، ولی برای درک مکانیسم‌هایی که به وسیله آن‌ها بیان این ژن کنترل می‌شود، باید مطالعات تکمیلی انجام شود.

منابع

1. Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *J. Clin. Chem.* 55: 4.1-12.
2. DeNofrio, J.C., Yuan, W.P., Temple, B.R., Gentry, H.R., and Parise, L.V. 2008. Characterization of calcium- and integrin-binding protein 1 (CIB 1) knockout

- platelets: Potential compensation by CIB family members. *Thromb. Haemost.* 100: 5.847–856.
3. Gentry, H.R., Singer, A.U., Betts, L., Yang, C., Ferrara, J.D., Sondek, J., and Parise, L.V. 2005. Structural and biochemical characterization of CIB1 delineates a new family of EF-hand-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 280: 8407–8415.
 4. Haataja, L., Kaartinen, V., Groffen, J., and Heisterkamp, N. 2002. The small GTPase Rac3 interacts with the integrin-binding protein CIB and promotes integrin alpha (IIb) beta (3)-mediated adhesion and spreading. *J. Biol. Chem.* 277: 8321–8328.
 5. Hager, M., Bigotti, M.G., Meszaros, R., Carmignac, V., Holmberg, J., Allamand, V., Akerlund, M., Kalamajski, S., Brancaccio, A., Mayer, U., and Durbeej, M. 2008. CIB2 binds integrin alpha7Bbeta1D and is reduced in laminin alpha2 chain-deficient muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.* 283: 24760–24769.
 6. Hollenbach, A.D., McPherson, C.J., Lagutina, I., and Grosveld, G. 2002. The EF-hand calcium-binding protein calmyrin inhibits the transcriptional and DNA-binding activity of Pax3. *Biochim. Biophys. Acta* 1574: 321–328.
 7. Kauselmann, G., Weiler, M., Wulff, P., Jessberger, S., Konietzko, U., Scafidi, J., Staubli, U., Bereiter-Hahn, J., Strebhardt, K., and Kuhl, D. 1999. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca²⁺- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *J. EMBO.* 18: 5528–5539.
 8. Khodabakhshzadeh, R., Mohammadabadi, M.R., Esmailizadeh, A.K., Moradi Shahrehabak, H., Bordbar, F. and Ansari Namin, S. 2016. Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Pol. J. Vet. Sci.* 19: 2.281–289.
 9. Ma, S., Liu, M.A., Yuan, Y.L., Erikson and R.L. 2003. The serum-inducible protein kinase Snk is a G1 phase polo-like kinase that is inhibited by the calcium- and integrin-binding protein CIB. *Mol. Cancer Res.* 1: 376–384.
 10. Mohammadabadi, M.R., and Sattayimokhtari, R. 2013. Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in Kermani sheep. *Slovak J. Anim. Sci.* 46: 2.45-51.
 11. Naik, M.U., and Naik, U.P. 2003. Calcium- and integrin-binding protein regulates focal adhesion kinase activity during platelet spreading on immobilized fibrinogen. *Blood.* 102: 3629–3636.
 12. Naik, U.P., Patel, P.M., and Parise, L.V. 1997. Identification of a novel calcium binding protein that interacts with the integrin alphaIIb cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 272: 4651–4654.

13. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and 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.
14. Wu, X., and Lieber, M.R. 1997. Interaction between DNA-dependent protein kinase and a novel protein, KIP. *Mutat. Res.* 385: 13–20.
15. Yamniuk, A.P., Ishida, H., and Vogel, H.J. 2006. The interaction between calcium- and integrin-binding protein 1 and the alphaIIb integrin cytoplasmic domain involves a novel C-terminal displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* 281: 26455–26464.
16. Yu, Y., Song, X.M., Du, L.X., and Wang, C.D. 2009. Molecular characterization of the sheep CIB1 gene. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1799–1809.
17. Yu, Y., Zhang, Y.A., Song, X.M., Jin, M., Guan, Q., Zhang, Q., Li, Sh., Wei, C., Lu, G., Zhang, J., Ren, H., Sheng, X., Wang, Ch., and Du, L. 2010. Alternative splicing and tissue expression of CIB4 gene in sheep testis. *J. Anim. Reprod. Sci.* 120: 1–4.1–9.
18. Yuan, W., Leisner, T.M., McFadden, A.W., Clark, S., Hiller, S., Maeda, N., O'Brien, D.A., and Parise, L.V. 2006. CIB1 is essential for mouse spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 26: 8507–8514.
19. Zamani, P., Akhondi, M., and Mohammadabadi, M.R. 2015. Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Res.* 132: 123–127.
20. Zamani, P., Akhondi, M., Mohammadabadi, M.R., Saki, A.A., Ershadi, A., Banabazi, M.H., and Abdolmohammadi, A.R. 2011. Genetic variation of Mehraban sheep using two inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afr J Biotechnol.* 10: 1812-1817.
21. Zhu, J., Stabler, S.M., Ames, J.B., Baskakov, I., and Monteiro, M.J. 2004. Calcium binding sequences in calmyrin regulates interaction with presenilin-2. *Exp. Cell Res.* 300: 440–454.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Ruminant Research, Vol. 4(4), 2016
<http://ejrr.gau.ac.ir>

Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR

A.H. Jafari Darehdor¹, *M.R. Mohammadabadi²,
A. Esmailzadeh Kashkoueieh³ and A. Riahi Madvar⁴

¹M.Sc. Student, ²Associate Prof., ³Professor, Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, ⁴Assisant Prof., Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman

Received: 09/08/2016; Accepted: 12/16/2016

Abstract

Background and objectives: Kermani sheep is one of the most important Iranian native sheep breeds and is well-adapted to harsh environmental conditions of south-eastern part of country, where dry and hot weather is prevalent and pastures are of low quality and quantity. CIB4 protein is one member of the calcium and integrin- binding proteins family, CIB proteins which are effective in high fertility. This protein has two nucleotides' sequence including L-CIB4 and S-CIB4. CIB4 biological functions in mammals are not well defined yet, however, a lot attentions has been received to these proteins due to their potential effects in increasing fertility. Considering the importance of this protein in fertility, we examined the expression of this gene in Kermani sheep.

Materials and methods: In this study gene expression of CIB4 in brain, heart, lung, kidney, liver, ovary and testis (3 repeats from each tissue) in Kermani sheep (4 males and 2 females) were analyzed. Initially, the various tissues of sheep supplied and in liquid nitrogen, transported to the laboratory and then total RNA from all samples were extracted based on One Step RNA Reagent kit manual and

PCR were analyzed and PCR products were separated on 2% agarose gel.

Results: Spectrophotometry results confirmed good quality of extracted RNA and observation of two bands, 28S and 18S on gel electrophoresis of RNA showed that

*Corresponding author: mrm2005@gmail.com

RNA is intact and absence of additional bands represents purity of RNA. Observation of 574 bp fragment for CIB4 gene in testis tissue and absence of this band in other tissues and observation of 150 bp fragments for GAPDH gene in all tissues indicated that this gene is only expressed in testes and in brain, heart, lung, kidney, liver and ovary is not expressed.

Conclusion: According to the results CIB4 gene expressed only in testis tissue of Kermani sheep and in brain, heart, lung, kidney, liver and ovary was not expressed, hence may suggest a role of the gene in ram fertility. Although we indicated that this is a testis-specific gene and express only in the testis, but the mechanisms by what CIB4 expression is regulated need to be elucidated.

Keywords: Gene expression, CIB4, Kermani Sheep, Real Time qPCR