



مقایسه بیان ژن PNOY و NPY در جوجه خروس‌های گوشتی سویه راس تغذیه شده با عصاره گیاه

خرغه

رضا وکیلی^{1*}، سونیا زکی زاده²

¹ استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر

² استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی جهادکشاورزی خراسان رضوی

تاریخ دریافت: 1391/03/08، تاریخ پذیرش: 1391/11/16

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی میزان بیان ژن (NPY), neuropeptide Y (NPY), prepronociceptin (PNOY) در جوجه‌های تغذیه شده با عصاره گیاهی خرغه انجام شد، تعداد 250 قطعه جوجه نر یک روزه سویه راس 308 به صورت تصادفی به 5 تیمار غذایی هر کدام با 5 تکرار اختصاص یافتند. هر تکرار شامل تعداد 10 قطعه جوجه بود و اثر سطوح مختلف عصاره خرغه در قالب تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مؤثر بر اشتها، جوجه‌های گوشتی طی یک دوره 42 روزه بررسی شد. تیمارهای غذایی شامل 5 تیمار شاهد (جیره پایه بدون عصاره خرغه)، جیره پایه همراه 50، 100، 150 و 200 میلی گرم عصاره گیاه خرغه بودند. برای تعیین میزان بیان ژن‌های PNOY و NPY از روش لیواک استفاده شد. در پایان 42 روز 2 پرنده از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و کشتار شده و بافت ساقه مغز آنها برای تعیین اثر تیمارها بر میزان بیان ژن‌های PNOY و NPY استفاده شد. بیان ژن NPY در تیمارهای حاوی خرغه نسبت به شاهد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت، اگرچه در تیمار حاوی 200 میلی گرم خرغه بیشتر بود. بیان ژن PNOY در تیمار حاوی 200 میلی گرم خرغه بیشتر از شاهد بود ($p > 0.01$), در حالیکه سایر تیمارهای حاوی خرغه نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشتند. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که استفاده از 200 میلی گرم عصاره خرغه سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن PNOY و افزایش غیر معنی‌دار بیان ژن NPY گردید، لذا می‌توان عصاره خرغه را در افزایش بیان ژن‌های نوروپپتیدهای افزایش‌دهنده اشتها مؤثر دانست.

کلمات کلیدی: عصاره دانه خرغه، Prepronociceptin (PNOY)، Neuropeptide Y (NPY)، جوجه گوشتی، بیان ژن.

و آگونیست گیرنده‌های ORL1 است (آگونیست ماده ای است که به رسپتور متصل و تحریک فیزیولوژیک آن را باعث می‌شود). مطالعات اخیر نشان داده است که تزریق داخل بطن مغزی این ماده سبب افزایش اشتها می‌گردد (Pawel *et al.*, 2010). PNOc مولکول پیش‌سازی است که ساختار مشابه Nociceptin/OrphaninFQ دارد (Mollereau *et al.*, 1996).

داده‌های مقدار بیان ژن معمولاً توسط سطوح بیان ژن کنترل که اصطلاحاً ژن خانگی نامیده می‌شود، نرمال می‌گردند. گلسیرآلدئید تری فسفات دهیدروژناز یکی از رایج‌ترین ژن‌های خانگی است که برای مقایسه داده‌های بیان ژن کاربرد فراوانی دارد. در انسان مشخص شده است که سن و جنس تاثیری روی مقدار بیان mRNA بافت‌ها ندارند و می‌توان از مقایسه سطوح بیان شده این ژن برای داده‌های بیان ژن به عنوان کنترل داخلی استفاده نمود (Barber *et al.*, 2005).

نتایج مطالعات دیگری نشان داده است که عصاره اتانولی درصد ساقه و برگ خرفه با اثر بر سیستم اعصاب مرکزی و محیطی موجب افزایش اشتها، فعالیت ضد تشنجی، مهار انقباضات عصبی-عضلانی به دنبال تحریک الکتریکی فعالیت شل‌کنندگی عضلانی و فعالیت ضد دردی می‌شود که فعالیت ضد دردی عصاره به وسیله نالوکسان کاهش می‌یابد که احتمال دارد بر اثر ضددردی خرفه از طریق گیرنده اویپوئیدی باشد (Radhakrishnan *et al.*, 2001). با توجه به

تحقیقات انجام گرفته در مورد سازوکار های کنترل اشتها پرندگان از سه دهه قبل آغاز شده است. ولی هنوز موارد بسیاری در این زمینه ناشناخته باقی مانده است. هیپوتالاموس نقش مهمی را در دریافت و پردازش سیگنال‌های مربوط به اشتها برعهده دارد و از دو گروه نورونی تشکیل شده است. یکی از این گروه‌ها اشتها را کم می‌کند. گروه دیگر دریافت غذا را از طریق تنظیم بیان ژن نوروپپتید وای (NPY) و پپتید مرتبط با ژن آگوتی (AgRP) تحریک می‌کند. NPY یکی از فراوان‌ترین میانجی‌های مغز است. میزان NPY در هیپوتالاموس تابعی از وضعیت تغذیه‌ای بدن است، به طوری که در طی گرسنگی میزان آن افزایش و پس از تغذیه کاهش می‌یابد. مهمترین بخش هیپوتالاموس که در آن NPY بیان می‌گردد، هسته‌ی کمانی است Bungo (et al., 2011). نورون‌های حاوی NPY در هسته‌ی کمانی به هسته‌ی مجاور بطنی (PVN) کشیده می‌شوند و تزریق مکرر درون بطن مغزی¹ NPY (ICV) به درون PVN پرخوری و چاقی ایجاد می‌کند. تزریق مرکزی NPY مصرف انرژی را نیز کاهش می‌دهد که منجر به کاهش میزان چربی قهوه‌ای، تضعیف فعالیت سمپاتیک و مهار محور هیپوتالاموس - هیپوفیزقدامی - تیروئید می‌گردد (Kiris *et al.*, Kelley *et al.*, 2002). ماده Nociceptin/orphanin FQ (2007). یک اویپوئید مرتبط باهپتا دکاپتید بوده

¹ - Intracerebroventricular

بافت‌ها تا زمان استخراج RNA در دمای 80 -
نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای استخراج RNA ابتدا نمونه‌های هر
تکرار به طور جداگانه هموژن گردید. بدین
منظور مقداری از بافت مورد نظر را خرد کرده در
هاون ریخته و با کمک نیتروژن مایع پودر
یکنواختی از آن تهیه شد RNA با استفاده از کیت
RNeasy Mini Kit (Qiagen، آلمان) طبق
دستور العمل شرکت سازنده استخراج و کمیت و
کیفیت آن توسط دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ
ND-2000 تعیین شد و عمل تیمار RNA
استحراجی با DNase و ساخت cDNA با استفاده
از کیت فرمنتاز لیتوانی انجام شد ساخت cDNA
تک رشته ای با استفاده از 1 میکروگرم از RNA
کل تیمار شده با DNase، آغازگرهای هگزامر و
آنزیم ترانس کریپتاز معکوس Revertaid H
Minus M-Mulvi در حجم 20 میکرولیتر طبق
دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های

GAPDH, prepronociceptin, neuropeptide
Y(NPY) ابتدا ژنوتیپ‌ها و توالی‌های مربوط به
ژن‌های **GAPDH, prepronociceptin (PNOC)**
neuropeptide Y(NPY) بطور جداگانه از بانک
اطلاعات ژنی (NCBI) جمع آوری شدند و با
استفاده از نرم‌افزار primer premier-5 نسبت به
طراحی آغازگرهای اختصاصی اقدام شد. سپس با
استفاده از ابزار Blast از یکتا بودن محل اتصال
جفت آغازگرها اطمینان حاصل شد. سنتز

اینکه تحریک گیرنده‌های اوپیوئیدی موجود در
دستگاه عصبی مرکزی سبب افزایش اشتها می-
گردد، لذا به نظر می‌رسد اثرات ضد دردی و
افزاینده اشتها عصاره دانه خرفه از طریق تداخل
با گیرنده های اوپیوئیدی باشد. هدف تحقیق
حاضر اثر سطوح مختلف عصاره خرفه بر بیان
ژن‌های مذکور و رابطه آن با اشتهای جوجه‌های
گوشتی بود.

مواد و روش ها

جامعه مورد مطالعه

تعداد 250 قطعه جوجه نر گوشتی یکروزه
سویه تجاری راس 308 به 25 گروه 10 قطعه‌ای
با میانگین وزن گروهی مشابه تقسیم شدند. هر 5
گروه به طور تصادفی تحت یک تیمار قرار
داشتند. تیمارهای غذایی شامل 5 تیمار شاهد
(جیره پایه بدون عصاره خرفه)، جیره پایه همراه
150، 100، 50 و 200 میلی گرم عصاره گیاه خرفه
بودند. تیمارهای غذا شامل نسبت های مختلف
گیاه خرفه، به مدت 42 روز اعمال گردید.

روش نمونه گیری

پس از کشتار جوجه‌ها در 42 روزگی، از
تکرارهای هر تیمار دو جوجه که میانگین هر
تکرار بودند، انتخاب (جمعا 50 جوجه) و پس از
جدا نمودن سر، ساقه مغز به کمک تیغ بیستوری
جدا شد. نمونه های بافت ساقه مغز از هر دو
جوجه، گرفته شد و با محلول 10PBS %
شستشو و به تانک ازت مایع منتقل شد. نمونه

آغازگرها توسط شرکت Bioneer کشور کره جنوبی انجام شد. از ژن گلیسرآلدئید-تری فسفات-دهیدروژناز یا GAPDH به عنوان ژن مرجع و مقایسه شاخص بیان سایر ژن‌ها با آن استفاده گردید (Huggett *et al.*, 2005; Tricarico *et al.*, 2002).

جدول 1- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های Real-Time PCR.

Table 1- Properties of primers used in Real-Time PCR.

توضیحات Definition	پرایمر Primer	طول قطعه تکثیر شده Product Len.bp	شماره دستیابی Accession No.
نوروپتیدوای Neuropeptide Y	F: 5`CAGGCAGAGATATGGAAAGAG 3` R: 5` CAGAGGAGTGGAGAATGAATTG 3`	176	NM_205473
پریپرونوسیسپتین Prepronociceptin	F: 5`CGGAAGTGGAAACAACCAGAAG 3` R: 5` ATCTCGTTGTGCTCGCTGAG 3`	113	NM_0011 85051
گلیسرآلدئید - 3- فسفات دهیدروژناز GPDH	F: 5' GCTGCTAAGGCTGTGGGGAA 3' R: 5' ACGGCAGGTCAGGTCAACAAC 3	108	NM_2043 05.1

PCR کیفی

بعد از استخراج RNA از بافت کبد PCR کیفی انجام شد. واکنش PCR در حضور یک مخلوط اصلی شامل بافر 10X آغازگرهای اختصاصی با غلظت 1/5 میکرومولار، dNTP و $MgCl_2$ و آنزیم Taq طبق برنامه زیر برای سه ژن GAPDH, prepronociceptin (PNOC), neuro peptide Y (NPY) و شش آغازگر انجام گرفت. رژیم حرارتی واکنش PCR در مرحله

واسرشته سازی یک چرخه 95 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه بود که در ادامه برای 40 سیکل از حرارت مرحله واسرشته سازی 95 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرها 60 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و بسط آغازگرها در 72 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه استفاده گردید. مرحله بسط نهایی آغازگرها دارای یک چرخه 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه بود.

گرین 12/5 میکرولیتر، آغازگر رفت. 0/15 میکرولیتر، آغازگر برگشت 0/15 میکرولیتر (10 پیکومول)، نمونه cDNA 2 میکرولیتر (100 نانوگرم بر میکرولیتر) و آب دوبار تقطیر شده 10/2 میکرولیتر در حجم کل 25 میکرولیتر می باشد.

آنالیز کمی داده‌ها و بیان ژن‌ها

در پایان انجام واکنش PCR، نرم افزار دستگاه به طور اتوماتیک خط آستانه را ترسیم نمود. تحلیل و تجزیه اطلاعات با استفاده از نرم افزار ABI 7300 sequence Detection system (Applied Biosystems) SDS Ver. 1.4 و نرم افزار Applied (آمریکا) انجام شد. پردازش داده‌ها با نرم افزار Excel انجام گرفت. برای تعیین میزان بیان ژن‌های NPY، PNOC و GAPDH از روش لیواک استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و 100 درصد است و از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT} = \text{مقدار هدف}$ استفاده شد در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و 100 درصد است (Livak et al., 1995; Livak & Schmittgen., 2001; Gentle et al., 2001; Yuan et al., 2006).

PCR کمی نسبی (Relative Quantitative) (PCR)

واکنش Real time-PCR کمی بر روی نمونه‌ها با 3 بار تکرار با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) شرکت فرمتاز کشور لیتوانی و با استفاده از دستگاه (ABI (Applied Biosystems) 7300 آمریکا (Malinen et al., 2003; Vandesompele et al., 2002) با شرایط زیر انجام گرفت. مخلوط واکنش (25 ماکرولیتر) شامل 12/5 میکرو لیتر SYBR Green Master Mix، 0/6 میکرومول از آغازگرهای رفت و برگشت، 500 نانوگرم از cDNA الگو بود. برنامه حرارتی زیر برای هر 3 ژن GAPDH, prepronociceptin (PNOC), neuropeptide Y (NPY) به طور یکسان استفاده شد.

بهینه کردن واکنش Real time PCR کمی نسبی

جهت آغاز بکار دستگاه از برنامه حرارتی شبیه برنامه RT-PCR کیفی که در بالا توضیح داده شد، استفاده گردید و مقدار مواد واکنش به علت نداشتن الگوی قبلی از مقادیر استاندارد گفته شده در کیت فرمتاز استفاده شد. اجزای واکنش استاندارد کیت بصورت زیر بهینه‌سازی گردید. اجزای واکنش شامل Mastermix، سایبر

جدول 2- سیکل های حرارتی واکنش PCR.

Table 2- PCR Cycles.

زمان نگهداری Hold Time	مرحله Segment	درجه حرارت C ⁰ Target Temperature	سیکل ها Cycles	
10min	---	95	1	قبل از تکثیر Pre- Incubation
15 s	واسرشت سازی Denaturation	95	45	تکثیر Amplification
30 s	اتصال Annealing	60		
30 s	بسط Extension	72		
15 s	واسرشت سازی Denaturation	95	1	منحنی ذوب Melting Curve
1min	اتصال Annealing	60		
15 s	بسط Extension	95		
15 s	ذوب Melting	60		

تعیین کمیت و کیفیت RNA های استخراج

شده

با اندازه گیری مقدار جذب نور فرابنفش در سه طول موج 260، 280 و 230 نانومتر، توسط دستگاه نانودراپ مشخص شد که کمیت و کیفیت RNA استخراج شده خلوص بالا و مطلوب داشته و عاری از آلودگی های پروتئین، بقایای فنلی و الکی بود (شکل 1).

$$\text{مقدار هدف} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$R = 2^{-[\Delta CT_{\text{نمونه}} - \Delta CT_{\text{کنترل}}]}$$

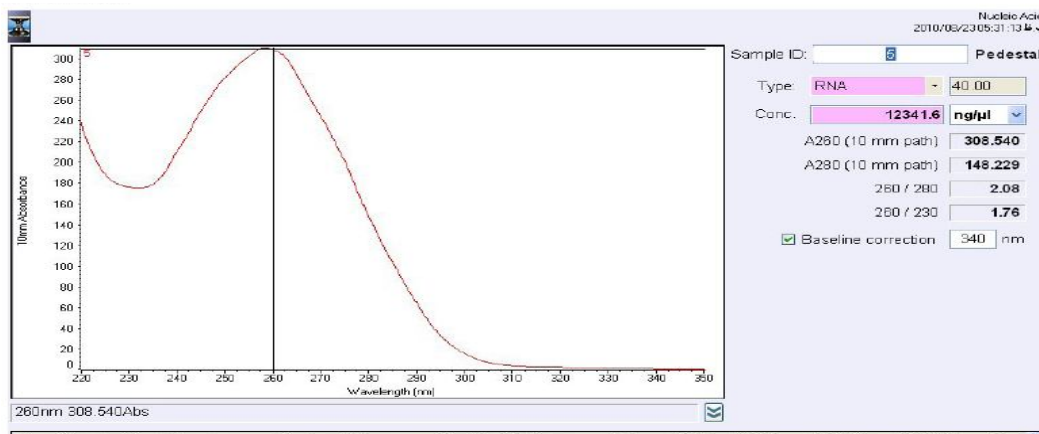
$$\Delta CT_{\text{هدف}} = (CT_{\text{نمونه}} - CT_{\text{مرجع}})$$

$$\Delta CT_{\text{کنترل}} = (CT_{\text{کنترل}} - CT_{\text{مرجع}})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{هدف}} - \Delta CT_{\text{کنترل}}$$

تجزیه آماری $\Delta\Delta CT$ نمونه های تیمار شده و شاهد با برنامه Excle آنالیز انجام گرفت. معنی داری تفاوت بین $\Delta\Delta CT$ نمونه ها توسط آزمون t-استیودنت در سطح $\alpha = 0/01$ آزمون شد.

نتایج و بحث



شکل 1- کمیت و کیفیت RNA استخراجی.

Figure 1- Quality and quantity of extracted RNA.

نظیر کشیده و نوک تیز بودن می باشد و همچنین منحنی ذوب تکرارهای یک نمونه کاملاً بر روی هم قرار می گیرند که در تصویر زیر این ویژگی‌ها به خوبی مشاهده می شود (Wang&Brown,2001;Gibson, *et al.*, 1996).

واکنش Real time PCR کمی نسبی

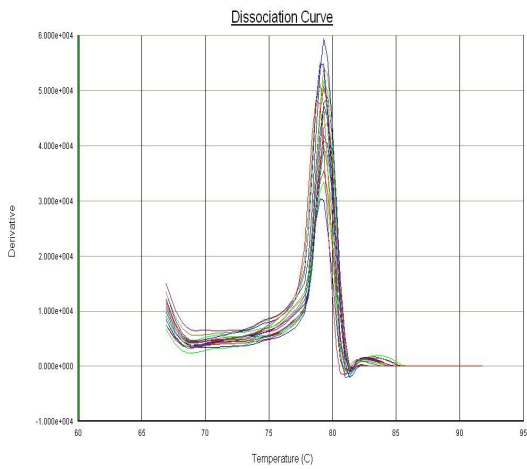
بعد از بهینه سازی دمای اتصال آغازگرها و بهینه سازی غلظت آغازگرها و سایر اجزاء واکنش نسبت به تکثیر قطعات اختصاصی ژن های GAPDH, PNO, NPY اقدام شد. همان طور که در شکل 3 دیده می شود محل تلاقی خط آستانه و منحنی های تکثیر نشان دهنده چرخه آستانه (Ct) می باشد (Heid *et al.*, 1996; Gluetti *et al.*, 2001; Wong& Medrano, 2005)

بهینه سازی واکنش Real-Time PCR

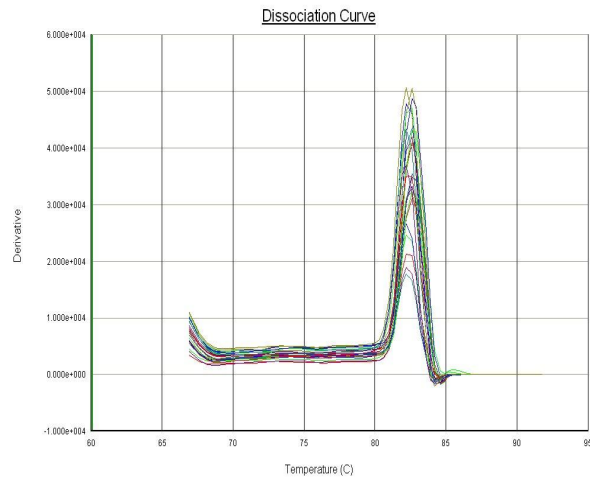
- دمای مناسب اتصال پرایمر در واکنش و بهینه سازی غلظت آغازگرها یکی از راه های کاهش میزان پرایمر دایمر بهینه نمودن اتصال و غلظت آغازگرها می باشد. لذا پس از بررسی های صورت گرفته، بهترین دمای اتصال آغازگر 60 درجه سانتیگراد و مناسب ترین غلظت آغازگر 0/15 میکرولیتر به دست آمد.

رسم منحنی ذوب

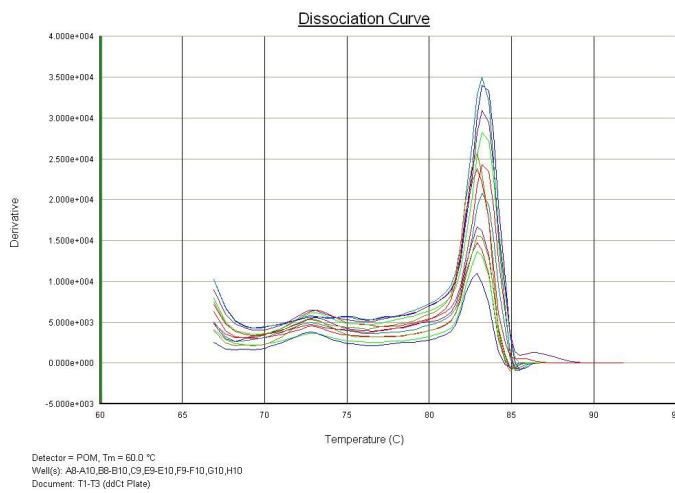
همانطور که در شکل 2 دیده می شود پیک اضافی کوچکتر از پیک محصولات که نشانگر وجود پرایمر دایمر می باشد وجود ندارد و این نشانگر این موضوع است که آغازگرها تقابلی با هم ندارند منحنی ذوب مناسب دارای ویژگی هایی



(b)



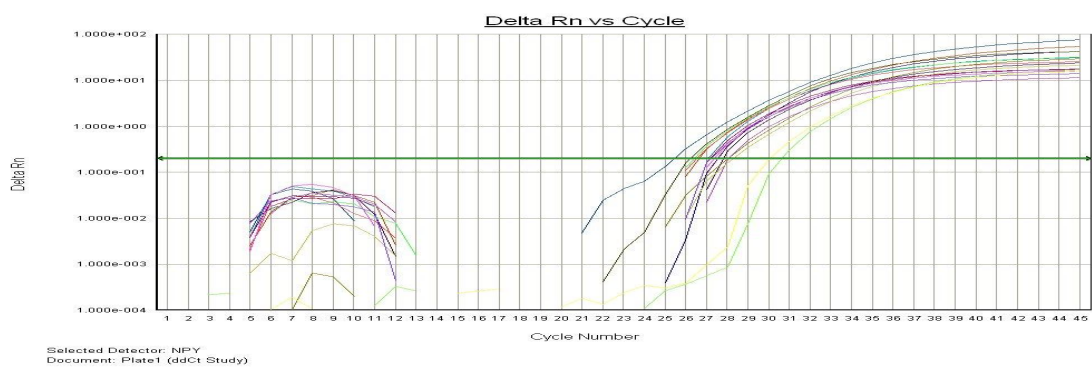
(a)



(c)

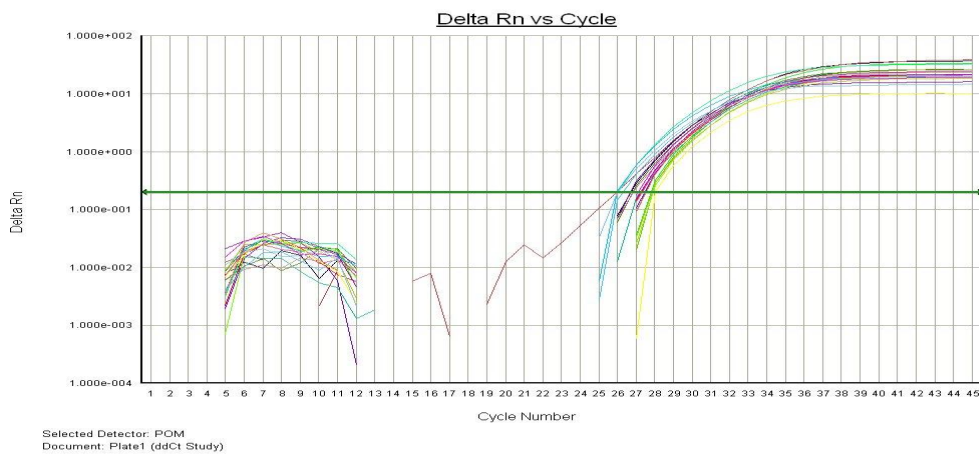
شکل 2- منحنی ذوب محصول ژن. GAPDH(a) ، NPY (b) ، PNOC (c).

Figure 2- Melting curve of (a) GAPDH, (b) NPY, (c) PNOC.



(b)

(a)



(c)

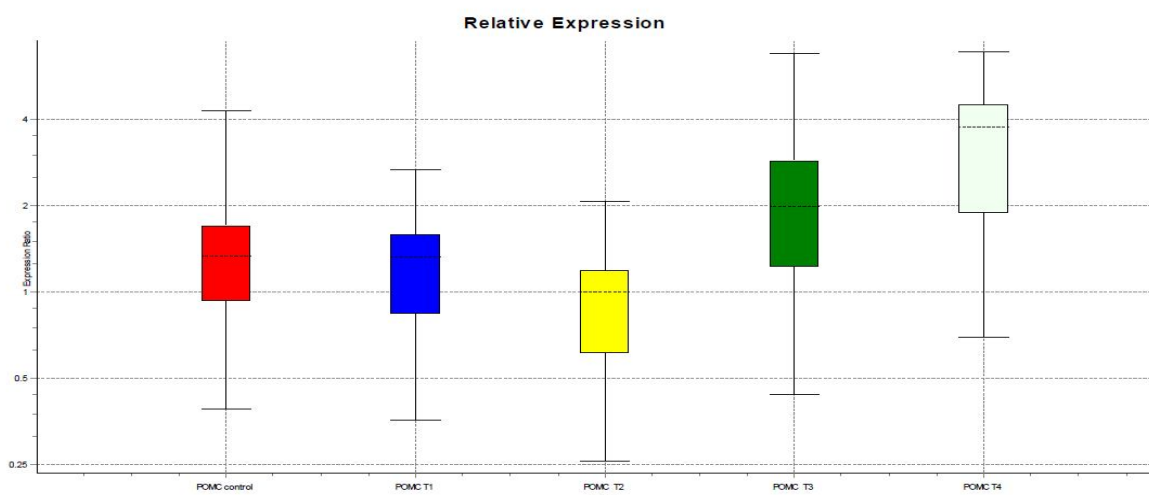
شکل 3- منحنی تکثیر ژن های (a) GAPDH، (b) NPY، (c) POM.

Figure 3- Amplification of (a) GAPDH, (b) NPY, (c) POM.

نتایج بیان ژن PNOG

سطح بیان ژن PNOG در تیمار حاوی 200 میلی گرم خرفه بیشتر از سایر تیمارهای حاوی نسبت‌های مختلف گیاه بود ($P < 0.01$) و باعث افزایش اشتها در جوجه‌های گوشتی شد (شکل 4). تزریق درون بطنی مغزی

Nociceptin/OrphaninFQ به عنوان لیگاند آندوژن گیرنده‌های شبه گیرنده‌های اپیوئیدی، مانند اپیوئیدهای کلاسیک، موجب افزایش اخذ غذا در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (Abbasnejad, et al., 2005).



شکل 4- نتایج بیان ژن PNOG به صورت نسبی.

Figure 4- Relative gene expression of PNOG.

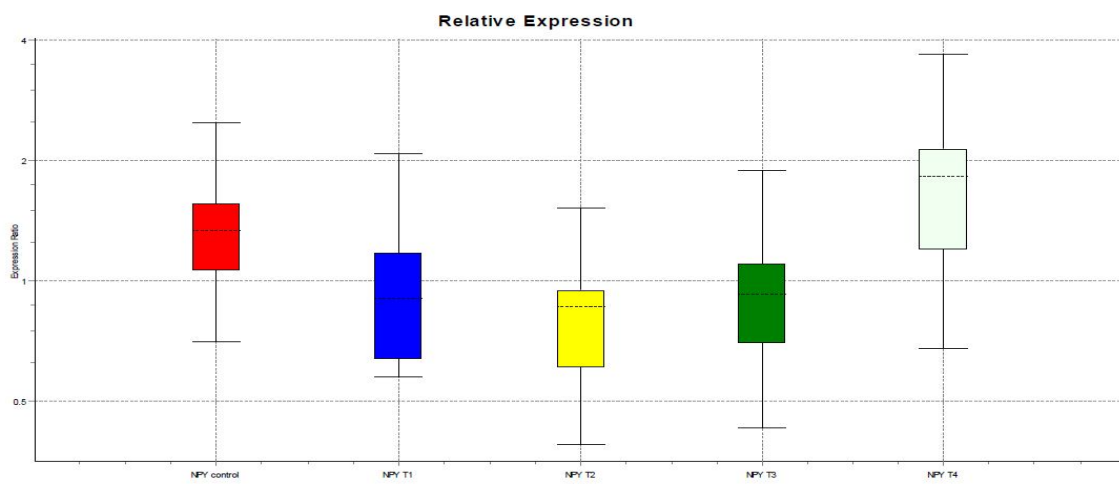
نتایج بیان ژن NPY

بررسی بیان ژن NPY در تیمارهای حاوی خرفه نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و در تیمار حاوی 200 میلی گرم خرفه بیشتر بود اگرچه از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل 5). اگرچه به نظر می‌رسد که NPY یک سیگنال مهم افزایش دهنده‌ی اشتها است، اما احتمالاً در صورت فقدان این سیستم به علت وجود مکانیسم‌های جبرانی و یا دیگر مسیرهای

افزایش دهنده اشتها مانند سیگنال‌های پپتید مرتبط با آگوتی AgRP، وزن بدن و میزان چاقی دستخوش تغییر چندانی نمی‌شود. گیرنده‌های Y_4 ، Y_1 ، Y_2 ، و Y_5 نوروپپتید Y همگی در هیپوتالاموس وجود دارند و اثرات تغذیه‌ای NPY را وساطت می‌کنند (Wayne et al., 2005). مشخص شده AgRP آنتاگونیست آندوژن رسپتورهای ملانوکورتین-3 (MC3) و ملانوکورتین-4 (MC4) است و تزریق مرکزی

باقی می ماند. NPY احتمالاً غذا خوردن را از طریق رسپتورهای Y1 و Y5 تحریک می کند (Kiris et al., 2007; Kelley et al., 2002).

AgRP دریافت غذا را به طور چشمگیری افزایش می دهد (آنتاگونیست رسپتور را مهار می کند). همچنین NPY یک عامل ارکسیژنیک (افزاینده اشتها) قوی است، اگرچه اثراتش کمتر از AgRP



شکل 5- نتایج بیان ژن NPY به طور نسبی.

Figure 5- Relative gene expression of NPY.

است. افزایش نوروپپتید Y (NPY) در هسته کمانی (Actuate nucleus) هیپوتالاموس سبب پرخوری حیوان می شود. یک منبع مهم NPY در مغز هسته کمانی می باشد. به نظر می رسد که این نوروترانسمیتر اثرات افزایش اشتها را با اثر بر ناحیه هسته کمانی در هیپوتالاموس اعمال نموده است. بنابراین عصاره خرفه را می توان موثر بر بیان ژن های نوروپپتید های افزایش اشتها و در نتیجه افزایش دریافت خوراک دانست.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر بیان ژن prepronociceptin در تیمار حاوی 200 میلی گرم خرفه بیشتر بود که نشان می دهد عصاره خرفه می تواند باعث افزایش اشتها در جوجه های گوشتی شود. همچنین بیان ژن NPY در تیمارهای حاوی خرفه نسبت به شاهد تفاوت معنی داری نداشت، اگرچه در تیمار حاوی 200 میلی گرم خرفه بیان ژن بیشتر بود. مطالعات زیادی در مورد اثر NPY بر اشتها انجام شده

- Abbasnejad M, Jonaidi H, Denbow DM, Pour Rahimi AM (2005). Feeding and locomotion responses to centrally injected nociceptin/ orphan FQ In chicks. *Physiology Behavior* 85:383-386.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005). GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics*. 21(3):389-95.
- Bungo T, Shiraishi J, Kawakami S (2011). Hypothalamic Melanocortin System and Feeding Regulation in birds: A Review. *Journal of Poultry Science* 48:1-13.
- Gentle AF, Anastasopoulos Mc, Brien NA (2001). High resolution semi quantitative real time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* 31: 502-508.
- Gibson U, Heid ECA, Williams PM (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001.
- Giulietti, A, Overbergh D, Valckx, Decallonne B, R. Bouillon, Mathieu C (2001). An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25: 386-401.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6: 279–284.
- Kelley A, Swanson CJ, Stratford TR (2002). Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. *Behavior Brain Research*. 93: 43-50.
- Kiris GA , Kumlu M, Dikel S (2007). Stimulatory effects of neuropeptide Y on food intake and growth of *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 264 383–389.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applications journal* 4: 357-362.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Malinen E, Kassinen A, Rinttila T, Palva A (2003). Comparison of real time PCR with SYBR green I and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149: 269-277.
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8666 –70.
- Pawel K. Olszewski (2010). Central nociceptin/orphanin FQ system elevates food consumption by both increasing energy intake and reducing aversive responsiveness. *American Journal Physiology Regulation Integrated Comparative Physiology* 299: R655–R663
- Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distante V, Pazzagli M, Bustin SA, Orlando C (2002). Quantitative real time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Analytical Biochemistry* 309: 293-300.
- Radhakrishnan MN, Zakaria MW, Islam H.B Chen , Kamil M , Chan K , Al-Attas A (2001). Neuropharmacological actions of *Portulaca oleraceae* L v. *sativa* (Hawk). *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 76, Issue 2, July 2001, Pages 171–176
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F (2002). Elimination of primerdimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical*

Biochemistry 303: 95-98.

Wang T, Brown MJ (1999). mRNA quantification by real-time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Analytical Biochem*, 269: 198-201.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S (2005). Appetite control. *Journal of Endocrinology* 184:291–318.

Wong ML, Medrano JF (2005). Real-Time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39: 63-68.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioin*.

Comparison the mRNA Expression Levels of PNOC and NPY Genes in Broilers fed Purslane Seed Extract

Vakili R.*¹ Zakizadeh S.²

¹Assistant Professor, Department of Animal Science, Islamic Azad University, Kashmar Branch

²Assistant Professor, Department of Animal Science, Higher Education Center of Jihad and Agriculture, Mashhad, Iran

Abstract

This experiment was conducted to investigate the PNOC and NPY mRNA expression levels in broiler chicks fed with purslane seed extracts. Two-hundred-fifty day-old broiler chicks were used and randomly allotted equally into five experimental groups with five replications comprised 10 chicks in each replication. The effect of various levels of purslane seed extract investigated on mRNA expression levels of PNOC and NPY genes during a 42-day period, Dietary treatments included a control basal diet (without adding purslane seed), basal diet + 50, 100, 150 and 200 mg/kg purslane seed. Livak method was used to determine mRNA expression levels of PNOC and NPY genes. At 42 days of age two birds of each replicate were randomly selected, slaughtered and their brain stem tissue were used to assess the effect of treatments on PNOC and NPY mRNA expression levels. The mRNA expression of NPY in treatments containing purslane seed extract was not significant in compare with control treatment, although it was higher in treatment containing 200 mg/kg purslane seed. The mRNA expression of PNOC in treatment containing 200 mg/kg purslane seed extract was significantly higher than the control treatment ($p > 0.01$); meanwhile the other treatments had no effect in compare with control. The results showed that use of 200 mg/kg levels *portulaca oleracea* extract led to the significant increase of PNOC mRNA expression and non significant increase of NPY mRNA expression. Therefore, *portulaca oleracea* extract could be effective on the mRNA level expression of accelerated neuropeptides of appetite in broiler chicks.

Keywords: Purslane seed extract, *Prepronociceptin* (PNOC), *Neuropeptide Y* (NPY), broiler, gene expression

* Corresponding Author: Reza Vakili

Tel: 09153168510

Email: rezavakili2010@yahoo.com