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

Effect of DL- Methionine Replacement with L- Methionine and Different Dietary Protein Levels on Myostatin Gene Expression in Japanese Quails

Keyaram Koohgivi

MS Student of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Iran. Email: kia.koohgivi@yahoo.com

Hedaiat allah Rooshanfekr

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Email: roshanfekr_hd@yahoo.com

Mahmood Nazari

*Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Tel: 09166036404 , Email: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

Ahmad Tatar

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran. Email: Ahmadtatar@gmail.com

Abstract

Objective

Myostatin also known as growth differentiation factor 8, is a protein produced and released by myocytes that acts on muscle cells' autocrine function to inhibit myogenesis: muscle cell growth and differentiation. This research had been done in order to assess the

effect of DL-methionine replacement with L-methionine, and also the effects of varying dietary protein levels on Myostatin gene expression in Japanese quail.

Materials and methods

This experiment was carried in the form of a 2×2 factorial with 4 treatment. Treatments contained the replacement of DL-methionine with L- methionine, and different dietary protein levels, were 24 and 20 %. After about 35 days of feeding and keeping the quails, a piece of their chest has been removed immediately and were transferred to the laboratory. Myostatin gene expression measured by using RT-qPCR technique. In this method, $\boldsymbol{\beta}$-actin gene was used as a house-keeping gene to normalize the gene expression data in the quantitative real time PCR.

Results

DL-methionine replacement did not significantly effect on Myostatin gene expression. Whereas, reduction in protein surface from 24% to 20 %, led to significantly increased expression of Myostatin ($P<0.01$).

Conclusions

The results indicated that DL methionine could be replaced with L methionine, and the appropriate level of protein was 24% in the Japanese quail diet.

Keywords: Japanese quail, Myostatin, Methionine.

Citation: Keyaram K, Roshanfekr H, Nazari M, Tatar A (2019) Effect of DL- Methionine Replacement with L-Methionine and Different Dietary Protein Levels on Myostatin Gene Expression in Japanese Quails. Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 23-36

Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 23-36.
DOI: 10.22103/jab.2019.13274.1099
Received: February 24, 2019; Accepted: June 17, 2019
© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

تاثیر جایگزینی DL متیونین با L متیونین و سطوح مختلف پروتئین جیره بر بیان ژن میوستاتین در بلدرچین ژاپنی

کی آرام کوه گیوی

دانش آموخته ژنتیک و اصلاح دام گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی -دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان-ملاثانی-ایران. ایمیل: kia.koohgivi@yahoo.com

هدایت اله روشنفکر

استاد گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی -دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان-ملاثانی-ایران. ایمیل: roshanfekr_hd@yahoo.com

محمود نظری

*نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی -دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان-ملاثانی-ایران. تلفن ۰۹۱۶۶۰۳۶۴۰۴ ایمیل: M.Nazari@asnrukh.ac.ir

احمد طاطار

استادیار گروه علوم دامی –دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی -دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان-ملاثانی-ایران. ایمیل: Ahmadtatar@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۲۷

چکیده

هدف: میوستاتین یا فاکتور ۸ موثر بر رشد و تمایز، از سلول‌های ماهیچه‌ای تولید می‌شود و به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در رشد و توسعه توده ماهیچه اسکلتی عمل می‌کند و طی فرایندی به نام میوژنسیز باعث مهار رشد عضلات می‌شود. این تحقیق به

منظور ارزیابی تاثیر جایگزینی DL متیونین با L متیونین و همچنین اثرات سطوح مختلف پروتئین جیره، بر بیان ژن میوستاتین در بلدرچین ژاپنی انجام گرفت.

مواد و روش ها: به صورت فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار انجام شد. تیمارها شامل جایگزین DL متیونین با L متیونین و سطوح مختلف پروتئین (۲۴٪ و ۲۰٪) بودند. پس از ۳۵ روز تغذیه و نگهداری، از بافت سینه قطعه کوچکی نمونه‌گیری شد و فورا به آزمایشگاه منتقل گردید. میزان بیان ژن میوستاتین در بافت سینه بلدرچین ژاپنی با استفاده از تکنیک Real-time PCR اندازه گیری شد. در این روش ژن بتااکتین به عنوان ژن خانه دار (کنترل داخلی) جهت نرمال نمودن داده‌ها استفاده شد.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان داد که جایگزینی DL متیونین با L متیونین در جیره بلدرچین‌ها اثر معنی‌داری بر بیان ژن میوستاتین نداشته است. همچنین نشان داده شد که کاهش پروتئین جیره از ۲۴ به ۲۰ درصد منجر به افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن میوستاتین می‌شود ($P<۰/۰۱$).

نتیجه گیری: بنابراین می‌توان DL متیونین را با L متیونین در جیره جایگزین نمود و سطح مناسب پروتئین جیره بلدرچین ژاپنی ۲۴ درصد می باشد.

کلمات کلیدی: بلدرچین ژاپنی، میوستاتین، متیونین

مقدمه

پرورش ماکیان در ایران و انتشار آن از طریق این کشور تاریخچه‌ای بسیار کهن دارد. ایران (پرشیا) یک امپراطوری بزرگ از قرن ۵ قبل از میلاد تا تقریبا قرن ۷ میلادی بود و از هند (دهلی) تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود. در آن زمان و بعد از آن، در قرون وسطی ایران در محل تقاطع راهها برای حمل و نقل محصولات، از قبیل ماکیان از شرق به غرب، هم از طریق خشکی و هم از طریق دریا قرار داشت. جنگ‌های زیادی در حوالی ایران و کشورهای همسایه در طی این دوره‌ها نیز توسعه و گسترش جمعیت‌های ماکیان را تسهیل کرد. حفاری‌های باستان شناسی حضور ماکیان را در ایران در زمان‌های باستان تأیید کرده است (Mohammadabadi et al. 2010). بر اساس تحقیقات دانشمندان استخوان‌های یافت شده در ایران در سه منطقه وجود داشته‌اند: دو کشف در تپه یحیی (جنوب شرقی ایران) به ترتیب متعلق به ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ قبل از میلاد و ۱۰۰۰ قبل از میلاد و دیگری در تخت سلیمان (شمال غربی ایران) متعلق به ۱۰۰۰ قبل از میلاد (Mohammadabadi et al. 2010).

در دو دهه اخیر پرورش طیور یکی از شاخه‌های مهم دامپروری محسوب شده است که با هدف تولید گوشت و تخم در حال توسعه است (Genchev et al. 2008). بلدرچین ژاپنی *(Coturnix Coturnix Japanica)* جزء خانواده قرقاول و یکی از انواع گوناگون پرندگان تجاری است که برای تولید گوشت و تخم پرورش داده می‌شود. این پرنده دارای ویژگی‌های بی‌نظیری

مانند رشد سریع، بلوغ جنسی زودرس، تولید زیاد تخم، دوره انکوباسیون کوتاه و امکان پرورش تعداد زیادی پرنده در فضایی محدود می‌باشد. مقاومت به بیماری‌ها در بلدرچین نسبتا بالاست و نیز استرس کمتری برای واکسیناسیون به پرنده وارد می‌شود (Kaur et al. 2008; Emami 1993). درآمدزایی بالا، سرمایه گذاری اولیه کم و گردش سرمایه در کوتاه مدت باعث شده است که پرورش بلدرچین روند رو به رشدی داشته باشد لذا جهت بهره‌وری حداکثر از این پرنده، شناخت نیازهای غذایی آن ضروری می‌باشد. در کتاب نیازهای غذایی طیور (NRC 1994) جدول نیازهای مواد مغذی مورد نیاز بلدرچین عمدتا براساس نیازهای دیگر پرندگان تنظیم شده است که از جمله این نیازها میزان پروتئین موردنیاز بلدرچین می‌باشد (Agaie 2018). میزان پروئین در NRC برای بلدرچین در حال رشد ۲۴ درصد در نظرگرفته شده است. پروتئین‌ها بخشی از مواد مغذی هستند که از واحدهای کوچک‌تری به‌نام اسیدهای‌آمینه تشکیل شده‌اند. پروتئین‌ها در بافت‌های ساختاری خون، آنزیم‌ها و نیز هورمون‌ها یافت می‌شوند. این بخش از جیره به‌دلیل گران بودن سبب افزایش قیمت جیره می‌شود. پروتئین، اسیدهای آمینه مورد نیاز برای رشد و تولید تخم را فراهم می‌آورند. اسیدهای آمینه نه‌تنها در تولید پروتئین بلکه در عملکردهای متابولیکی مهمی مانند بهبود عملکرد سیستم ایمنی و عملکرد دستگاه گوارش (Peiskerl & Dersjant 2011)، نقش بسزایی داشته و تاثیرگذار هستند. در تغذیه طیور اسیدهای آمینه برای افزایش میزان رشد، بهبود ضریب تبدیل خوراکی و بالا بردن کیفیت لاشه مورد نیاز هستند. DL متیونین ترکیبی است که شامل ۵۰ درصد ایزومر D متیونین و ۵۰ درصد ایزومر L متیونین می‌باشد. زمانی که از مکمل DL متیونین در جیره استفاده می شود هردو فرم D و L به بافت‌های بدن پرنده می‌رسند. هنگامی که D متیونین به کبد یا کلیه می‌رسد، به‌وسیله فرآیندی آنزیمی دو مرحله‌ای تبدیل به فرم L می‌شود که برای سنتز پروتئین در بافت‌های بدن استفاده می‌شود. بنابراین دسترسی زیستی فرم L بیشتر از فرم D می‌باشد (Huyghebaert 1993). از آنجایی‌که دسترسی و کارایی زیستی فرم L بیشتر است، بنابراین عملکرد طیور را بهبود بخشیده و خصوصا بر روی وزن گوشت سینه اثر بیشتری دارد.

در اواخر دهه ۸۰ میلادی مطالعات و بررسی های به عمل آمده روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشتمل بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Mohammadabadi and Tohidinejad 2017). ماده ژنتیکی[۱] یک سلول دارای تعداد زیادی ژن می باشد که هیچ گاه 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 اشرشیاکلی 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

[۱] DNA

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

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). یکی از این ژن‌های مهم میوستاتین (MSTN) است. در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که متیونین اثر خود را از طریق بیان ژن‌هایی مانند میوستاتین و ژن‌های میوژنیک اعمال می‌کند و بیان آن‌ها را تغییر می‌دهد (Wen et al. 2014).

میوستاتین (MSTN) یا فاکتور ۸ موثر بر رشد و تمایز (GDF8)، عضو خانواده فاکتور رشد (TGF-β) می‌باشد. این ژن به عنوان یک تنظیم کننده منفی در رشد و توسعه توده ماهیچه اسکلتی عمل می‌کند. جهش‌های طبیعی که در ژن کد کننده آن در طول تکامل نژادها رخ داده است، رابطه معنی‌داری را با حجم و رشد عضله نشان می‌دهند (Soufy et al. 2009). این جهش‌ها به دو صورت، تخریب ژن میوستاتین و یا کاهش سطح رونوشت آن، موجب ایجاد فنوتیپ "عضله مضاعف" در برخی نژادهای گاو، گوسفند و سگ می‌شوند. حیواناتی که فاقد این پروتئین هستند یا از طریق درمان توسط مهارکننده‌های میوستاتین فاقد این پروتئین شده‌اند دارای رشد عضلانی بسیار قابل توجهی هستند (Soufy et al. 2009). این یافته‌ها این فرضیه را تقویت می‌کنند که با استفاده از تکنیک‌های زیست فن‌آوری برای تخریب ژن میوستاتین، می‌توان فنوتیپ عضله مضاعف را در دیگر نژادهای حیوانات مزرعه‌ای و از جمله نژادهای بومی کشور ایجاد نمود. در مقایسه آنالوگ‌های D و L متیونین در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی بهبود معنی‌دار ضریب تبدیل خوراکی در گروه دریافت‌کننده L متیونین مشاهده شده است (Ribero et al. 2005). اثر متیونین بر رشد و عملکرد جوجه‌های گوشتی و چگونگی اثر متیونین بر تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با آن نشان داد که بیان ژن میوستاتین در این جوجه‌ها کاهش پیدا کرده و حجم عضلات سینه در آن‌ها افزایش داشته است (Wen et al., 2014). اگرچه مطالعات ملکولی متعددی روی طیور در ایران انجام شده است (Zandi et al. 2014; Mohammadifar et al. 2011; Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017; Shahdadnejad et al. 2016; Moazeni et al. 2016a; Moazeni et al, 2016b)، اما تاکنون بیان ژن میوستاتین در آن‌ها انجام نشده است. بنابراین این مطالعه جهت بررسی اثرات جایگزینی اسیدهای آمینه DL متیونین با L متیونین و همچنین بررسی اثرات جیره حاوی ۲۰ درصد پروتئین و ۲۴ درصد پروتئین بر بیان ژن میوستاتین در بلدچین ژاپنی با استفاده از تکنیک Real-Time PCR انجام شد.

مواد و روش

این پژوهش در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. ۲۴۰ قطعه بلدرچین ژاپنی یک روزه بطور تصادفی به ۴ گروه آزمایشی با ۶۰ جوجه در هر گروه تقسیم شدند. هر گروه آزمایشی شامل ۴ تکرار و هر تکرار دارای ۱۵ قطعه جوجه بلدرچین بودند که بر روی بستر پوشال پرورش داده شدند. جیره‌نویسی براساس سطح توصیه شده

انجمن ملی تحقیقات (NRC 1994) و با استفاده از نرم افزار UFFDA انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار انجام شد. تیمارها شامل، جیره حاوی ۲۴ درصد سطح پروتئین توصیه شده به همراه ۰/۵ درصد ایزومر L متیونین، جیره حاوی ۲۴ درصد سطح پروتئین توصیه شده به همراه ۰/۵ درصد ایزومر DL متیونین، جیره حاوی ۲۰ درصد سطح پروتئین توصیه شده به همره ۰/۵ درصد ایزومر L متیونین و جیره حاوی ۲۰ درصد سطح پروتئین توصیه شده به همراه ۰/۵ درصد ایزومر DL متیونین است.

جوجه‌ها تا سن ۳۵ روزگی پرورش یافتند. در پایان دوره آزمایش، به دنبال ۸ ساعت گرسنگی، دو قطعه جوجه بلدرچین از هر قفس بطور تصادفی انتخاب و کشتار شدند. قطعه کوچکی از بافت سینه هر پرنده به وسیله تیغ استریل سریعا جدا و در تانک ازت به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در این پژوهش، استخراج RNA از ۳۰ میلی‌گرم بافت سینه با استفاده از کیت استخراج SV Total RNA Isolation System محصول شرکت (پرومگا، آمریکا) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت RNA با استفاده از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ (ترمو، آمریکا) محاسبه گردید و چنانچه نسبت جذب ۲۶۰/ ۲۸۰ بالای ۱/۸ بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند لازم به ذکر است RNA های استخراج شده تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. برای ساخت، cDNA، از کیت سنتز Revert Aid Tm M-MuLV Reverse Transcriptase محصول شرکت فرمنتاز استفاده گردید. اولین رشته‌ی cDNA با کمک آغازگر الیگو dT سنتز شد. جهت سنتز cDNA مقدار ۵ میکرولیتر RNA با غلظت ۰/۵ نانوگرم به میکروگرم همراه با ۱ میکرولیتر آغازگر الیگو dT به میکروتیوپ اضافه و حجم محلول با استفاده از آب عاری از نوکلئاز به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه ها تا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سرد شده و ۴ میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میکرومول و ۱ میکرولیتر Ribolock^{TM} RNase Inhibitor به هر تیوب افزوده شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شدند و پس از آن ۱ میکرولیتر آنزیم M-MuLV Reverse Transcriptase به محلول فوق اضافه و مخلوط شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. آن گاه به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن به‌منظور غیرفعال نمودن واکنش، تیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. جهت طراحی آغازگر برای ژن میوستاتین و ژن خانه دار بتا اکتین از نرم افزار vector NTI advance 11استفاده گردید. توالی و خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای ژن میوستاتین و بتا اکتین در جدول ۱ ارائه شده است.

به منظور تعیین دمای اتصال آغازگر به رشته‌های DNA ی هدف، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز همراه با شیب دمایی انجام شد. جهت تکثیر ژن میوستاتین و بتااکتین ($\boldsymbol{\beta}$–actin) دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۲ دقیقه، دناتوراسیون

ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد.

جدول۱. لیست توالی و خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. The sequence and characteristics of the primer used in this study.

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence		طول قطعه تکثیری Amplicon size
میوستاتین Myostatin	آغازگر رفت SensePrimer	F: 5–GGGACGTTATTAAGCAGC–3	153
	آغازگر برگشت Antisense Primer	R: 5–ACTCCGTAGGCATTGTGA–3	
بتااکتین β-actin	آغازگر رفت Sense Primer	F:5 TGCTGTGTTCCCATCTATCG-3	150
	آغازگر برگشت Antisense Primer	–TTGGGACAATACCGTGTTCAT–3 R:5	

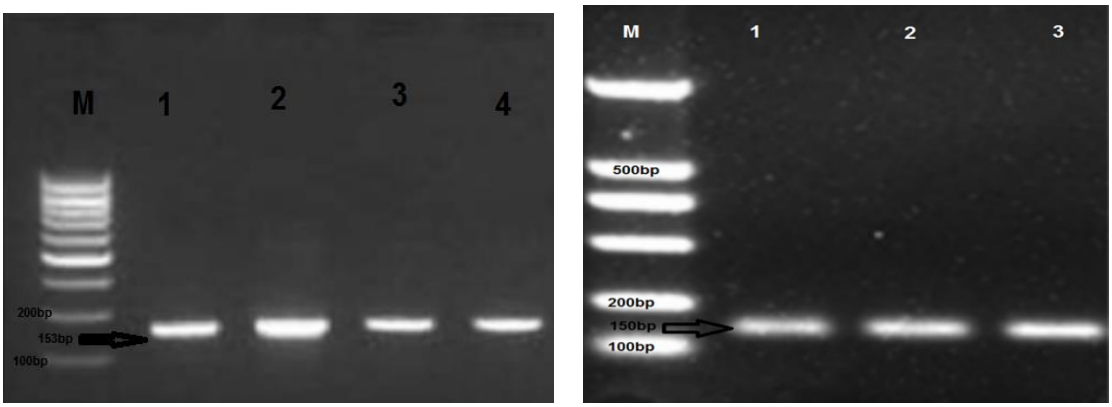
جهت بررسی میزان بیان ژن میوستاتین از تکنیک Real time PCR به روش Syber green استفاده شد که برای انجام آن از دستگاه Step one plus ساخت شرکت Applied Biosystem آمریکا استفاده گردید. جهت انجام واکنش ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، ۴ میکرولیتر آغازگر رفت، (غلظت ۴ پیکومول به میکرولیتر)، ۴میکرولیتر آغازگر برگشت (غلظت ۴ پیکومول به میکرولیتر)، ۳/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱ میکرولیتر cDNA به هر میکروتیوپ اضافه گردید. واکنش ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. سپس تیوپ‌ها در دستگاه قرار داده شد و PCR طبق پروتکلی که توضیح داده شد، در ۴۰ سیکل انجام شد.

در این تحقیق جهت بررسی کارآیی و شرایط حاکم بر واکنش زنجیرهای پلیمراز، از نمودار استاندارد استفاده گردید. برای این منظور، رقت‌های مختلف از cDNA را تهیه کرده و برای انجام Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور cDNA سنتز شده به‌عنوان رقت ۱۰۰ در نظر گرفته شد، سپس چهار رقت دیگر نسبت به cDNA اولیه به ترتیب با مقادیر رقت‌های ۲۰، ۴، ۰/۸، ۰/۱۶ تعیین شدند. روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش $\Delta\Delta C_T$ (آستانه‌ی مقایسه‌ای) و

نسبت به بیان ژن بتا اکتین بود. در روش مقایسه‌ی نسبی تفاوت نسبی نمونه‌ی موردآزمایش در مقابل نمونه‌ی کنترل با فرمول $^{-}$ $۲^{\Delta\Delta CT}$ به روش Pfaffl و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام گردید .بررسی آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

به منظور اندازه‌گیری میزان RNA استخراج شده و نیز میزان خلوص آن، ۲ میکرولیتر از هر RNA توسط دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان خلوص آن با نسبت جذب نوری A_{260} به A_{280} بررسی شد. این نسبت در تمام RNAهای استخراج شده در این پژوهش بین ۱/۹ تا ۲/۲ بود لازم به ذکر است که تکنیکReal–Time PCR از حساسیت بالایی برخوردار است از این رو RNA مورد استفاده برای سنتز cDNA باید تا حد امکان عاری از هرگونه آلودگی با DNA باشد. برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (میوستاتین) و کنترل (***β***–actin)، واکنش PCR شیب دمایی انجام شد و مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۵۹) انتخاب گردید. محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل اگارز (۲٪) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده تک باند در محدوده‌ی ۱۵۳ جفت نوکلئوتید برای ژن میوستاتین و در محدوده‌ی ۱۵۰ جفت نوکلئوتید برای ژن بتااکتین در مورد همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه‌ی مورد نظر می‌باشد (شکل ۱). در طی انجام واکنش Real-time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد.

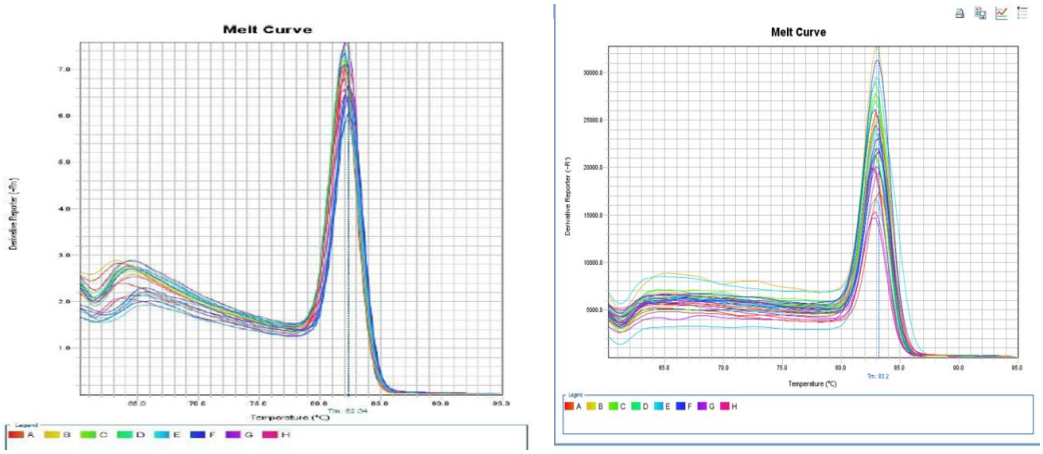


الف–ژن بتااکتین (B-actin gene) ب– **ژن میوستاتین (Myostatin gene)**

شکل ۱. الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ژن‌های بتا اکتین (الف) میوستاتین(ب) روی ژل آگارز ۲ درصد. M: مارکر bp ۱۰۰

Figure 1. A sample of electrophoresis of PCR products for (A) B-actin (B) Myostatin on the 1% Agarose gel. M: size marker 100bp

وجود تنها یک قله (پیک) در منحنی ذوب ژن میوستاتین و بتااکتین، اختصاصی بودن پرایمر برای این دو ژن را تایید می‌کند. منحنی ذوب این دو ژن در شکل ۲ ارائه شده است.



الف- ژن میوستاتین (Myostatin gene) **ب- ژن بتااکتین (B-actin gene)**

شکل ۲. منحنی ذوب ژن‌های میوستاتین و بتا اکتین. ژن میوستاتین (الف) و ژن بتااکتین (ب)

Figure 2. The melting curves for Myostatin (right) and *β*-actin (left) genes.

بررسی تاثیر جایگزینیDL متیونین با L متیونین بر بیان ژن میوستاتین در بلدرچین ژاپنی نشان می‌دهد که بیان ژن میوستاتین در گروه DL متیونین که گروه کنترل و برابر ۱ است نسبت به گروه L متیونین که دارای میانگین تغییرات ۱/۰۹ است، تغییری نداشته است. در نتیجه جایگزینی DL متیونین با L متیونین اثر معنی‌داری بر بیان ژن میوستاتین ندارد (جدول ۲). در این ارتباط گزارشی از تحقیقات قبلی برای مقایسه یافت نشد.

تاثیر افزایش سطح پروتئین از۲۰٪ به ۲۴٪ بر بیان ژن در بلدرچین ژاپنی در جدول ۲، نشان داده شده است. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که میانگین تغییرات بیان ژن میوستاتین در گروه تغذیه شده با پروتئین ۲۴٪ (حاوی DL متیونین) نسبت به گروه تغذیه شده با پروتئین ۲۰٪ (حاوی DL متیونین) به‌طور معنی‌داری به ۰/۵۵ کاهش یافته است ($P < ۰/۰۱$). همچنین میانگین تغییرات بیان ژن میوستاتین در گروه تغذیه شده با پروتئین ۲۴٪ (حاوی L متیونین) نسبت به گروه تغذیه شده با پروتئین ۲۰٪ (حاوی L متیونین) به‌طور معنی‌داری به ۰/۶۴ کاهش یافته است ($P < ۰/۰۱$). این موضوع نشان می دهد که با افزایش سطح پروتئین جیره از ۲۰ به ۲۴ درصد به‌طور معنی‌داری بیان ژن میوستاتین کاهش می‌یابد.

پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که، افزودن مقدار کمی از اسیدهای‌آمینه محدود کننده سبب بهبود کیفیت پروتئین جیره می‌شود. به این ترتیب افزودن متیونین به عنوان اولین اسیدآمینه محدود کننده، باعث افزایش ظرفیت پروتئین بافتی شده، امکان کاهش سطح پروتئین خام در جیره را فراهم کرده و به استفاده مناسب از مواد مغذی و در نتیجه کاهش استرس در پرندگان کمک می‌کند.

جدول۲. اثر جایگزینی DL متیونین با L متیونین و سطوح مختلف پروتئین بر بیان ژن میوستاتین

Table 2. Effect of DL- methionine replacement with L- methionine and dietary protein levels on Myostatin gene expression

٪24		٪20	
L	DL	L	DL
0.64 [b]	0.55 [b]	1.09 [a]	1 [a]

حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 1 درصد است.

همچنین متیونین به‌عنوان یک دهنده گروه متیل و گوگرد برای واکنش‌های ترانس- متیلاسیون و ترانس سولفوراسیون عمل می‌کند (Parvin et al. 2010). افزایش متیونین در جیره، وزن زنده را تحت تاثیر قرار می‌دهد و استفاده از مکمل متیونین نیز ترکیب اسیدهای‌آمینه جیره را بهبود می‌بخشد و سبب ساخت پروتئین‌های بیشتری در ماهیچه‌ها و کاهش ذخیره چربی در جوجه می‌شود (Bomgardt and Baker 1973). محققین نشان دادند که حذف مکمل متیونین جیره با وجود افزایش بیان ژن IGF1 سبب کاهش وزن بدن بلدرچین می‌گردد (Rostamzade et al. 2016). در مقایسه آنالوگ‌های D و L متیونین در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی بهبود معنی‌دار ضریب تبدیل خوراکی در گروه دریافت کننده L متیونین وجود دارد (Ribeiro et al. 2005).

متیونین در ایمنی سلول‌ها و بافت‌های بدن جوجه‌های تازه تفریخ شده که در دو هفته اول زندگی مستعد عفونت هستند، برای فعالیت مکانیسم‌های ایمنی ذاتی (پوست و مخاط) و اختصاصی (لنفوسیت‌های B و T) ضروری است (Koutsos et al. 2001; Rubin et al. 2007). متیونین اثر خود را از طریق بیان ژن میوستاتین اعمال می‌کند و بیان آن را تغییر می‌دهد. وظیفه میوستاتین تنظیم میزان رشد عضلات از زمان جنینی می‌باشد و این روند در سرتاسر زندگی یک دام ادامه خواهد یافت. میوستاتین به‌عنوان یک مهار کننده رشد عضلات فعالیت می‌کند و از افزایش بیش از حد حجم آن‌ها جلوگیری می‌کند. نتایج نشان می‌دهد که جیره حاوی ۲۴ درصد پروتئین سطح پایین‌تری از ژن میوستاتین را نسبت به جیره حاوی ۲۰ درصد پروتئین بیان می‌کند. پس می‌توان نتیجه گرفت که سطح ۲۴ درصدی پروتئین در جیره بلدرچین مناسب‌تر بوده و می‌توان انتظار داشت به افزایش بافت ماهیچه بلدرچین منجر شود.

نتیجه گیری: نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان میدهد که با تبدیل متیونین از فرم DL به فرم L، تاثیر معنی‌داری در بیان ژن میوستاتین نداشته است. پس می‌توان پیشنهاد کرد به‌جای استفاده از فرم تجاری مخلوط L و DL می‌توان از فرم L متیونین استفاده کرد و از اتلاف وقت و هزینه جلوگیری کرد. همچنین نتایج بدست آمده در این پژوهش بیان‌کننده این موضوع است که سطح ۲۴ درصد پروتئین می‌تواند سطح مناسب‌تری نسبت به ۲۰ درصد پروتئین باشد. کاهش سطح پروتئین

می‌تواند سبب افزایش بیان ژن میوستاتین گردد که این موضوع سبب کاهش تولید ماهیچه می‌گردد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در جیره بلدرچین از سطح ۲۴ درصد پروتئین استفاده گردد.

سپاسگزاری: از مسئولین پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه این تحقیق را تامین نمودند تشکر بعمل می‌آید.

منابع

آقائی علی، خسروی نیا حشمت اله، مموئی مرتضی و همکاران (۱۳۹۷) اثر مکمل عنصر روی و ویتامینE بر آنزیم های آنتی اکسیدان، هورمون های جنسی و برخی فراسنجه های بیوشیمیایی در گله های مادر بلدرچین ژاپنی. مجله دامپزشکی ایران ۱۴(۲)، ۲۴-۱۴.

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 ۶(۴)، ۳۵-۵۰.

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (۱۳۹۵) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان ۴(۴)، ۱۱۹-۱۳۲.

رستم زاده الهه، اسدی فوزی مسعود، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، اسدی ملک حسین (۱۳۹۵) بررسی اثر محدودیت متیونین بر بیان ژن IGF-1 در عضله سینه بلدرچین ژاپنی. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۸(۱)، ۴۷-۶۰.

محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمدرضا، سفلایی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن ۳TGFβ بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

صوفی بهاره، محمدآبادی محمدرضا، شجاعیان کمال و همکاران (۱۳۸۸) ارزیابی چند شکلی ژن میوستاتین در گوسفند نژاد سنجابی با استفاده از روش PCR-RFLP . مجله پژوهشهای علوم دامی ۱۹(۱)، ۸۹-۸۱.

References

Aghaei A, Khosravinia H, Mamoei M et al. (2018) Effects supplementation of zinc and Vitamin E on antioxidant enzyme, sexual hormone and some biochemical parameters in breeder flock of Japanese Quails. Iran Vet J 4, 14-24 (In Persian).

Bomgaardt J, Baker D (1973) Effect of age on the lysine and sulfur amino acid requirement of growing chickens. Poult Sci 52, 592-597.

Dersjant-Li Y, Peisker M (2011) A Review on Recent Findings on Amino Acids Requirements in Poultry Studies. Iran J Appl Anim Sci 1, 73-79.

Emami Meybodi M (1993) Breeding quail in Bangladesh. J Res Dev 30, 132-134.

Genchev G, Mihaylova S, Ribarski A et al. (2008) Meat quality and composition in Japanese quails. Trakia J Sci 6, 25-29.

Huyghebaert G, Pack M (1996) Effects of dietary protein content, addition of nonessential amino acids and dietary methionine to cysteine balance on responses to dietary sulphur-containing amino acids in broilers. Poultry Sci 37, 623-639.

Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR et al. (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. J Rumin Res 4, 119-132 (In Persian).

Kaur S, Mandal A, Singh K, Kadam M (2008) The response of Japanese quails (heavy body weight line) to dietary energy levels and graded essential amino acid levels on growth performance and immunocompetence. Livestock Sci 117, 255-262.

Koutsos E, Klasing K, Garnsworthy P, Wiseman J (2001) Interactions between the immune system nutrition and productivity of animals. Recent Adv Anim Nut 173-190.

Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016a) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Open J Anim Sci 6, 1-8.

Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016b) Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. J Livest Sci Technol 4, 51-56.

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

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

Mohammadabadi MR, Nikbakhti M, Mirzaee HR et al. (2010) Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Russ J Genet 46, 505-509.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. Agric Biotechnol J 5, 125-136 (In Persian).

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. Iran J Appl Anim Sci 7, 679-685.

Parvin R, Mandal A, Singh S, Thakur R (2010) Effect of dietary level of methionine on growth performance and immune response in Japanese quails (Coturnix coturnix japonica). J Sci Food Agric 90, 471-481.

Pfaffl M, Horgan G, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nuc Acid Res 30, 1-10.

Ribeiro A, Dahlke F, Kessler A (2005) Methionine sources do not affect performance and carcass yield of broilers fed vegetable diets and submitted to cyclic heat stress. Brazilian J Poul Sci 7, 159-164.

Rostamzade E, Asadi Fozi M, Esmailizadeh AK, Asadi MH (2016) Effect of Methionine restriction on IGF-1 gene expression in breast muscle of Japanese Quails. Agric Biotechnol J 8, 47-60 (In Persian).

Rubin L, Canal C, Ribeiro A, Kessler A, Silva I et al. (2007) Effects of methionine and arginine dietary levels on the immunity of broiler chickens submitted to immunological stimuli. Brazil J of Poul Sci 9, 241-247.

SAS Institute, 1999. SAS/STAT Users Guide. SAS Inc, NC.

Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M (2016) Typing of Clostridium Perfringens Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Genetics in the 3rd millennium 14, 4368-4374.

Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K et al. (2009) Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Anim Sci Res 19, 81-89 (In Persian).

Tohidi nezhad F, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Najmi Noori A (2015) Comparison of different levels of Rhe b gene expression in different tissues of Raini Cashmir goat. Agri Biotech J 6, 35-50 (In Persian).

Wen C, Chen X, Chen G et al. (2014) Methionine improves breast muscle growth and alters myogenic gene expression in broilers. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing. 210095.

Zandi E, Mohammadabadi MR, Ezzatkhah M, Esmailizadeh AK (2014) Typing of Toxigenic Isolates of Clostridium Perfringens by Multiplex PCR in Ostrich. Iranian J Appl Anim Sci 4, 509-514.