ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۸۵- ۳۸۱

اثر جایگزینی بتائین با بخشی از متیونین بر بیان ژن آنزیم مالیک در مرغان تخمگذار تحت تنش با استفاده از روش Real –Time PCR

Effects of dietary betaine substitution to a part of methionine on malic enzyme gene expression in laying hens under heat stress using real-time PCR method

سوسن رادپور*[۱]، محمدتقی بیگی‌نصیری[۱]، هدایت‌اله روشنفکر[۱]، محمود نظری[۱]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، استاد، دانشیار و مربی دانشگاه کشاورزی رامین خوزستان، ایران

Radpoor S*[1], Beigi Nassiri MT[1], Roshanfekr HA[1], Nazari M[1]

1. Graduate Student, Professor, Associate Professor and Instructor, Khouzestan Ramin Agriculture and Natural Resources, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: S.Radpoor90@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۸- تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی اثر جایگزینی بتائین با بخشی از متیونین بر بیان ژن آنزیم مالیک در مرغان تخمگذارتحت تنش اجرا شد. ۹۶ قطعه مرغ (سویه تخمگذار تجاری های لاین W36 در سن ۶۰ هفتگی در چرخه دوم تولید) به صورت طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل با دو سطح جایگزینی بتائین با متیونین و دو سالن تیمار دمایی (تنش و بدون تنش) و سه تکرار و هشت‌مرغ در هر تکرار انجام شد. جهت اعمال تنش، مرغ های یک سالن را روزانه شش ساعت تحت دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. دو سطح آزمایشی بتائین شامل جیره حاوی صددرصد متیونین به عنوان گروه شاهد و جیره حاوی۸۷ درصد متیونین و ۱۳ درصد بتائین به عنوان آزمون مورد بررسی قرار گرفت. پس از دو ماه تغذیه، در انتهای آزمایش چهار مرغ از هر تکرار کشتار شده و پس از استخراج کل RNA از بافت کبد، و ساخت cDNA بیان ژن مورد نظر با کمک Real time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که افزودن بتائین به جیره سبب کاهش معنی دار بیان ژن آنزیم به میزان ۲/۴۷ واحد در بافت کبد شد ($P<۰/۰۱$). همچنین تحت تنش گرما بیان ژن آنزیم مالیک به طور معنی‌داری به میزان ۱/۹۶ واحد کاهش پیدا کرد ($P<۰/۰۱$). بنابراین بتائین و تنش گرما بیان ژن آنزیم مالیک را در سطح mRNA مهار کرده و قادر است نقش مهمی در کاهش میزان چربی کبدی ایفا کند.

واژه‌های کلیدی
آنزیم مالیک
بتائین
بیان ژن
تنش گرما
مرغان تخمگذار

Archive of SID

مقدمه

تنش به عنوان یک مشکل جدی در پرورش صنعتی طیور تلقی می‌شود. دمای محیطی بالا ممکن است با تغییر در حجم آب سلول از طریق دهیدراسیون، باعث اختلال در تعادل آبی و تغییرات اسمولیتیکی در سلول شود، به طوری که این امر می‌تواند فعالیت سلول را مختل سازد (Tucker et al. 2001). استفاده از مکمل‌های خوراکی در تغذیه طیور به عنوان راه حلی در بکارگیری هرچه بهتر خوراک به‌ویژه در شرایط تنش، محسوب می‌شود. از مکمل‌هایی که کاربرد آن در حال افزایش است بتائین می‌باشد (Tucker et al. 2001). بتائین یک تری متیل مشتق شده از گلیسین است که ماده‌ای سفید رنگ وگرانوله بوده و یکی از متابولیتهای کولین می‌باشد که در بسیاری از سلول‌ها یافت می‌شود و قادر است اثرات منفی تنش گرمایی را در طیور جبران کند (Konca et al. 2008). خاصیت متیل دهندگی بتائین حدود ۳/۷۵ برابر متیونین می‌باشد و هر ملکول بتائین قادر به تبدیل کردن ۳ ملکول هموسیستئین به متیونین است. بنابراین بتائین موثرترین ترکیب برای جایگزینی با آن بخش از متیونین جیره است که بعنوان گروه دهنده متیل عمل می‌کند (Sun et al. 2008). نقش بتائین را در متابولیسم لیپیدها مربوط به اثر آن در تحریک متابولیسم اکسیداتیو اسیدهای چرب از طریق شرکت در سنتز ترکیبات متیله شده نظیر کارنیتین و فسفولیپیدها می‌دانند که این ماده موجب افزایش ترکیبات متیله شده می‌شود و از راه نقش در سنتز فسفاتیدیل کولین و اکسیداسیون اسید چرب در متابولیسم لیپیدها نقش ایفا می‌کند (Carter et al. 1995). یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های مسیر سنتز اسیدهای چرب آنزیم مالیک است. آنزیم مالیک یک پروتئین سیتوپلاسمی است که دکربوکسیلاسیون مالات به پیرووات را کاتالیز می‌کند که در این مرحله NADPH تولید می‌شود. NADPH یک واسطه برای تشکیل اسیدهای چرب بلند زنجیر است. اغلب NADPH لازم برای سنتز اسیدهای چرب از فعالیت آنزیم مالیک ایجاد می‌شود. فعالیت آنزیم مالیک کبدی همبستگی مثبتی با سرعت سنتز اسیدهای چرب دارد (Kristin et al. 2001). بدین منظور به کمک روش Real-Time PCR اثر جایگزینی بتائین با بخشی از متیونین بر بیان ژن آنزیم مالیک در مرغان تخمگذار تحت تنش بررسی شد.

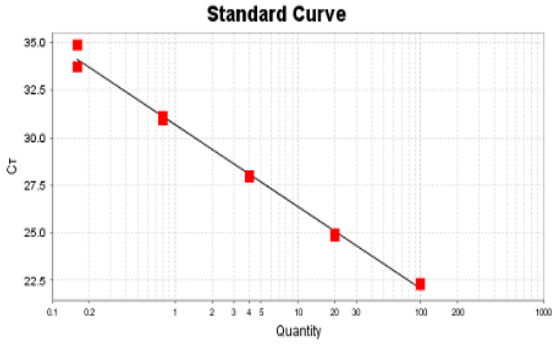
این پژوهش در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان با ۹۶ قطعه مرغ (سویه تخمگذار تجاری های لاین W 36 در سن ۶۵ هفتگی در سیکل دوم تولید) به صورت یک طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۲ با سه تکرار و هشت‌مرغ در هر تکرار اجرا شد. تیمارها شامل دو سطح جایگزینی بتائین با متیونین شامل جیره حاوی صد در صد متیونین به عنوان شاهد و (جیره حاوی۸۷ درصد متیونین + ۱۳ درصد بتائین) بودند. ۴۸ قطعه مرغ در یک سالن در دمای (۲۳ درجه سانتی‌گراد) و جهت انجام تنش، ۴۸ قطعه مرغ دیگر روزانه به مدت شش ساعت تحت دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت دو ماه پرورش یافتند. سپس مرغ ها کشتار شده و کبد آنها در ازت مایع نگهداری و به سردخانه منتقل شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از کیت SV Total RNA Isolation system شرکت پرومگا استخراج Total RNA انجام گرفته و میزان خلوص RNA به کمک دستگاه نانو دراپ ارزیابی شد. این نسبت در تمام RNA های استخراج شده در این پژوهش بین ۲/۲-۱/۹ بود. در مرحله بعد cDNA نمونه‌ها، با استفاده از آنزیم رونویس ساز معکوس و آغازگر الیگو (dT)، با استفاده از کیت RevertAid ^{TM} First strand cDNA synthesis Kit شرکت فرمنتاز ساخته شد. در نهایت توسط دستگاه step one plus مقدار بیان ژن با استفاده از تکنیک Real-time PCR Relative Quantitative اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از ژن بتا اکتین به عنوان ژن House keeping استفاده شد. اطلاعات آغازگرهای استفاده شده برای Real-time PCR در جدول۱ نشان داده شده است.

تفاوت نسبی نمونه مورد آزمایش در مقایسه با کنترل با فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ به روش (Pfaffl et al. 2002) محاسبه شد، و سپس مقادیر نهایی RQ توسط نرم‌افزار SAS بررسی شد. برای مقایسه میانگین‌ها نیز از مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری یک درصد استفاده شد. همچنین در این پژوهش برای بررسی کارایی واکنش و شرایط حاکم بر واکنش از نمودار استاندارد استفاده شد. برای این کار رقت‌های مختلف از cDNA تهیه شد و برای آن‌ها تست Real-Time PCR انجام شد (شکل۱).

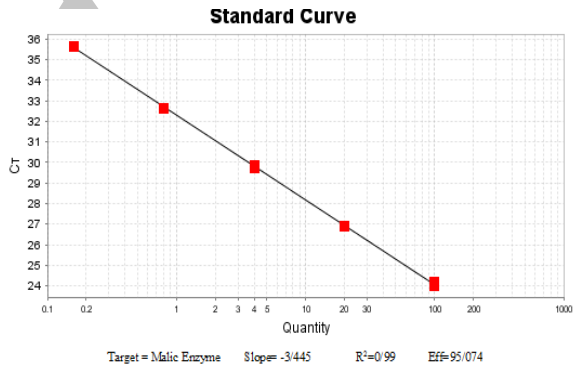
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- نام، توالی و مشخصات ژن اختصاصی و ژن خانه دار برای انجام Real time PCR

نام ژن	شماره دسترسی	توالی آغازگر ژن (5′-3′)	طول محصول	دمای اتصال(°C)
آنزیم مالیک	AF408407	F: AGTGCCTACCTGTGATGTTG R: GGCTTGACCTCTGATTCTCT	۱۰۱ bp	۵۹
بتا اکتین	NM-205518	F: GTGATGGACTCTGGTGATGG R: TGGTGAAGCTGTAGCCTCTC	۱۵۰ bp	۵۹



(الف)



(ب)

شکل ۱- نمودار استاندارد ژن بتااکتین (الف) و ژن آنزیم مالیک (ب)

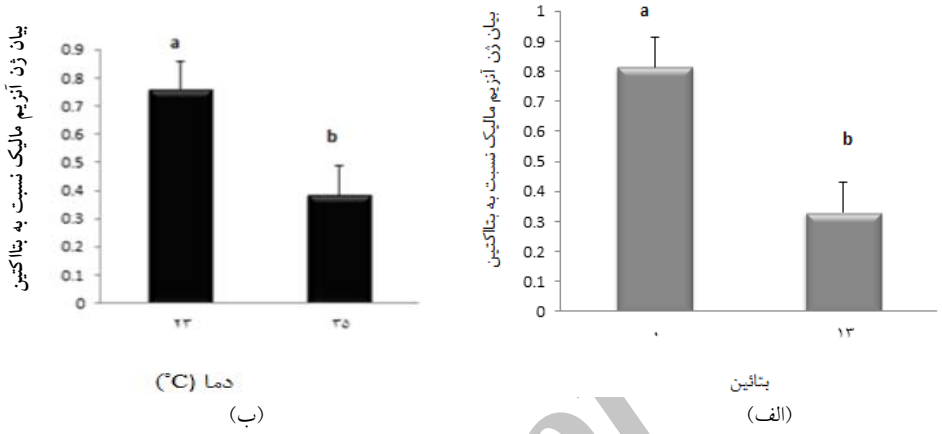
نتایج حاصل از اثرات متقابل جیره بتائین و تنش بر بیان ژن آنزیم مالیک در طیور تخمگذار نشان داد که اثر متقابل جیره بتائین و تنش بربیان ژن آنزیم مالیک معنی‌دار نبوده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم مالیک در گروه دریافت کننده بتائین در شرایط بدون تنش ۰/۰۹۸±۰/۳۲۹ بوده که این میزان نسبت به کنترل که دارای میانگین تغییرات ۰/۰۹۸±۰/۸۱۴ است (جدول۲) به میزان ۲/۴۷ واحد کاهش یافته است (P<۰/۰۱) (شکل۲). اثر اصلی بتائین بر کاهش چربی، افزایش لیپولیز است، در طیور لیپوژنز در بافت کبد انجام می‌گیرد. تغییرات القا شده هورمونی - تغذیه‌ای در فعالیت آنزیم مالیک بواسطه تغییر در غلظت آنزیم مالیک است. سنتز آنزیم مالیک با تنظیم سطح mRNA آنزیم مالیک کنترل می‌شود که در آغاز رونویسی تنظیم می‌شود (Goodridg et al. 1989). میزان سنتز اسیدهای چرب، درصد چربی بدن و درصد چربی حفره شکمی ارتباط مستقیمی با فعالیت آنزیم مالیک کبدی در طیور دارد، که گلوکاگون ممکن است نقش میانجی در بیان mRNA آنزیم مالیک در پاسخ به مصرف پروتئین جیره در طیور داشته باشد. ناحیه ′۵ ژن آنزیم مالیک دارای عناصر پاسخ به cAMP است که این عناصر واسطه-ای برای اثر گلوکاگون برسنتز mRNA آنزیم مالیک می‌باشد (Chendrimada et al. 2006). بیان mRNA آنزیم مالیک کبدی ممکن است بوسیله نیتروژن جیره تنظیم شود (Chendrimada et al. 2007). وقتی که جیره غذایی شامل متیل کافی باشد می‌تواند باعث کاهش مقادیر زیادی از چربی کبد شود. بنابراین بتائین شاید مانع از ایجاد کبد چرب شود (Xing and Jiang 2012). کنترل رژیم غذایی، رونویسی ژن‌های اسید چرب سنتاز و آنزیم مالیک را با استیل‌کوآ موجود در کبد طیور هماهنگ می‌کند. تغییرات تطبیقی کوتاه‌مدت در فعالیت آنزیم استیل‌کوآ می‌تواند بوسیله تغییر در پیوند کووالانسی در ساختار پروتئین (مانند فسفوریلاسیون) و کنترل آلوستریک (بوسیله سیترات) و نیز تنظیم بلند مدت رونویسی بوسیله انسولین، گلوکز و T3 و گلوکاگون ایجاد شود (Richards et al. 2003). جایگزینی ۲۵ درصد متیونین جیره با بتائین، غلظت هورمون رشد و فاکتور رشد انسولین مانند (IGF-1) را در سرم افزایش داده و از این طریق باعث افزایش در میزان پروتئین و گوشت سینه و کاهش میزان چربی کبد و حفره شکمی می‌شود (Sun et al. 2008). مکمل بتائین باعث افزایش غلظت هورمون رشد سرم می‌شود که این پیشنهاد می‌کند که بتائین شاید فعالیت و بیان ژن آنزیم‌های لیپوژنیک را با بالا بردن غلظت هورمون رشد کاهش دهد (Huang et al. 2007).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲- اثر بتائین و تنش دمایی بر بیان ژن آنزیم مالیک

	بتائین			دما		
	٪۰	٪۱۳	SEM	۲۳ °C	۲۳ °C	SEM
آنزیم مالیک	۰/۸۱۴[a]	۰/۳۲۹[b]	۰/۰۹۸	۰/۷۵۷[a]	۰/۳۸۶[b]	۰/۰۹۸

حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی داری در سطح یک درصد. SEM خطای استاندارد میانگین‌ها می‌باشد.



شکل۲- اثر بتائین (الف) و تنش (ب) بر بیان ژن آنزیم مالیک در مرغان تخمگذار

در این پژوهش میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم مالیک در تیمار دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۰/۰۹۸±۰/۳۸۶ بوده که این میزان نسبت به کنترل که دارای میانگین تغییرات ۰/۰۹۸ ±۰/۷۵۷ است (جدول ۲) به میزان ۱/۹۶ واحد کاهش یافته است و این کاهش در سطح یک درصد معنی‌دار می‌باشد ($P<0/01$) (شکل۲). تغذیه باعث افزایش و گرسنگی باعث کاهش آنزیم مالیک بواسطه تغییر در نسخه برداری ژن در پرندگان می‌شود. قابل توجه است که سطح بالای نسخه‌برداری و پایداری mRNA عامل افزایش آنزیم مالیک در مرغ‌های محدود شده نسبت به مرغ‌های با سطح بالای تغذیه، می‌باشد (Goodridg et al. 1989). در دسترس بودن گلوکز می‌تواند سطح mRNA، اسید چرب سنتاز را کنترل کند بدون اینکه تاثیری بر آغاز رونویسی داشته باشد. در دسترس بودن گلوکز بر پایداری mRNA تاثیرگذار است. این مشاهده به آسانی تغییرات مرتبط با فعالیت آنزیم مالیک و عدم تغییرات در بیان ژن‌های آنزیم مالیک، اسید چرب سنتاز یا استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز در جوندگان را بیان می‌کند (Semenkovich et al. 1993). ترشح گلوکاگون از پانکراس توسط عوامل متعددی در جوجه‌ها، از جمله تنش تحت‌تاثیر قرار می‌گیرد (Chendrimada et al. 2006) همچنین غلظت هورمون‌های تیروئیدی T3 و T4 در سرم با افزایش دمای محیط کاهش می‌یابد ولی غلظت هورمون کورتیکوسترون در پلاسما افزایش پیدا می‌کند (Salabi 1389). در نتیجه تنش موجب کاهش مصرف خوراک و رشد می‌شود. وقتی میزان گلوکز خون کاهش می‌یابد، هورمون گلوکاگون پیام تولید، رهاسازی و توقف مصرف گلوکز را به کبد می‌دهد. در دسترس بودن کربوهیدرات (گلوکز) و در نتیجه فعالیت لیپوژنز در مقایسه با طیوری که خوراک کمتری مصرف کرده‌اند بیشتر بوده و بیان ژن‌های اسید چرب سنتاز و آنزیم مالیک بیشتر می‌شود. آنزیم مالیک باعث تغییر در سنتز اسیدهای چرب می‌شوند. آنزیم‌های لیپوژنیک به تناسب تغییر در میزان سنتز اسیدهای چرب تغییر می‌کند و به تبع آن تغییر در میزان اسید چرب باعث تغییر در فعالیت آنزیم می‌شود (Yu-Yan et al. 1969).

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

Carter AL, Abney TO, Lapp DF (1995) Biosynthesis and metabolism of carnitine. Iranian Journal of Child Neurology. 10 (suppl2) 3-7.

Chendrimada TP, Freeman ME, Davis AJ (2007) Dietary nitrogen intake regulates hepatic malic enzyme messenger ribonucleic acid expression. Poultry Science. 86: 1980-1987.

Chendrimada T, Adams K, Freeman F, Davis AJ (2006) The role of glucagon in regulating chicken hepatic malic enzyme and histidase messenger ribonucleic acid expression in respons to increase in dietary protein intake. Poultry Science 85: 753-760.

Goodridg AG, Crish J, Hillgrtner F, Bradley F, Wilson SB (1989) Nutritional and hormonal regulation of the gene for avian malic enzyme. American Institute of Nutrition 119: 299-308.

Huang QC, Xu ZR, Han XY, Li WF (2007) Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. Animal Feed Science and Technology140: 365-375.

Konca Y, Kirkpinar F (2008) Effect of betaine on performance, carcass, bone and blood characteristics of broilers during natural summer temperatures. Journal of Animal and Veterinary Advances 7: 930-937.

Kristin A, Adams Adam J, Davis (2001) Dietary protein concentration regulates the mRNA expression of chicken hepatic malic enzyme. Journal of Nutrition. 131: 2269-2274.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research. 29: 45.

Pfaffl Michael W, Horgan Grahan W, 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 Research 30:1-10.

Richards Mark P, Poch Stephan M, Coon Craig N, Rosebrough Robert W, Ashwell Christopher M, Mcmurtry JP (2003) Feed restriction significantly alters lipogenic gene expression in broiler breeder chickens. Journal of Nutrition 133:707-71.

Salabi F (1389) Effect of zinc and betaine substitution for methionine on performance and carcass characteristics of broilers under heat stress. Dissertation, University of Khuzestan Ramin Agricultural and Natural Resources. Iran. (In Farsi).

Semenkovich CF, Coleman T, Goforth R (1993) Physiologic concentrations of glucose regulate fatty acid synthase activity in HepG2 cells by mediating fatty acid synthase mRNA stability. Journal of Biological Chemistry. 268: 6961-6970.

Sun HR, Yang ZB, Yang Y, Wang SZ, Jiang Zhang G (2008) Effects of betaine supplementation to methionine deficient diet on growth performance and carcass characteristics of broilers. American Journal of Animal and Veterinary Sciences 3: 78-84.

Tucker LA, Remus J (2001) The effect of betaine on performance, water balance and gut Integrity of coccidiosis-infected poultry and its potentioal benefit in AGP-free diets. British Poultry Scince 42: 108-109

Xing J, Jiang Y (2012) Effect of dietary betaine supplementation on mRNA level of lipogenesis genes and on promoter CpG methylation of fatty acid synthase (FAS) gene in laying hens. African Journal of Biotechnology. 11:6633-6640.

Yu-Yan Y, Gilbert L (1969) Effect of dietary protein on hepatic lipogenesis in the growing chick. Journal of Nutrition 98: 356-366.

Archive of SID

www.SID.ir