

ارزیابی اثر بتائین جایگزین شده با درصدی از متیونین بر بیان ژن آنزیم مالیک در

مرغان تخمگذار با استفاده از تکنیک Real-time PCR

سوسن رادپور^{۱*}، محمدتقی بیگی نصیری^۲، محمود هاشمی تبار^۲، محمود نظری^۳ و فاطمه ثعلبی^۴

۱- دانشجوی ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان ۲- دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی

رامین خوزستان ۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپوراهواز ۴- مربی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین ۵- دانش آموخته

تغذیه دام

*نویسنده مسئول: سوسن رادپور، s.radpoor90@yahoo.com

چکیده

این تحقیق جهت بررسی نقش بتائین جایگزین شده با درصدی از متیونین جیره بر بیان ژن آنزیم مالیک در مرغان تخمگذار لگهورن واریته w-36 سویه های- لاین انجام شده است. تیمارها شامل دو سطح مختلف جایگزینی بتائین با متیونین (۰ و ۱۳ درصد جایگزینی بتائین آنهیدروس نوع خوراکی با متیونین) بود. در این روش، ژن بتاکتین به عنوان ژن خانگی (منبع) جهت نرمال نمودن داده ها استفاده شده است. بیان ژن آنزیم مالیک و بتاکتین با روش Real-time PCR نسبتی تعیین می گردد. پس از دو ماه تغذیه، در انتهای آزمایش چهار مرغ از هر تکرار کشتار شده و کبد آن ها سریعاً جدا گردید و به همراه ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۷۰- ذخیره شد. ابتدا کل RNA از بافت کبد با استفاده از کیت استخراج شد. به طور مختصر، cDNA با PCR تکثیر شده و با استفاده از سایبر گرین و دستگاه real time PCR تعیین کیفیت می گردد. نتایج حاصل نشان داد که افزودن بتائین به جیره سبب کاهش معنی داری ($P < 0/01$) در بیان ژن آنزیم مالیک در بافت کبد می گردد. بنابراین بتائین بیان ژن آنزیم مالیک را در سطح mRNA مهار می کند و می تواند نقش مهمی در کاهش میزان چربی کبد و حفره شکمی ایفا کند. این مطالعه به درک بیشتر در مورد عملکرد آنزیم مالیک و کاربرد بتائین در مرغ تخمگذار کمک می کند.

واژه های کلیدی: بتائین- بیان ژن- ژن آنزیم مالیک- مرغان تخمگذار

مقدمه

بتائین یک تری متیل مشتق شده از گلیسین است که اولین بار در چغندر قند کشف شد. بتائین ماده ای سفید رنگ و گرانوله است و یکی از متابولیت های کولین می باشد که در بسیاری از سلول ها یافت می شود (۸). علاوه بر این، بتائین نقش لیپوتروپیک و محافظت از کبد را نیز برعهده دارد. مواد لیپوتروپیک موادی هستند که از ذخیره چربی در کبد جلوگیری کرده و موجب افزایش سرعت حذف آن از کبد می گردند، همچنین از تجمع چربی در بافتها نیز جلوگیری می کنند (۳). بتائین موجب افزایش ترکیبات متیله شده می گردد و از طریق نقش در سنتز فسفاتیدیل کولین و اکسیداسیون اسید چرب در متابولیسم لیپیدها نقش ایفا می کند (۶). یکی از مهم ترین آنزیم های مسیر سنتز اسیدهای چرب آنزیم مالیک است. آنزیم مالیک یک پروتئین سیتوپلاسمی است که دکربوکسیلاسیون ملات به پیرووات را کاتالیز میکند که در این مرحله NADPH تولید می شود. NADPH یک واسطه برای تشکیل اسیدهای چرب بلند زنجیر است. بیش تر NADPH لازم برای سنتز اسیدهای چرب از فعالیت آنزیم مالیک ایجاد می شود. فعالیت آنزیم مالیک کبدی همبستگی مثبتی با سرعت سنتز اسیدهای چرب دارد (۹). نتایج گزارش شده نشان می دهد که تغذیه، سطح mRNA آنزیم مالیک را از طریق افزایش رونویسی ژن آنزیم مالیک و کاهش در تخریب mRNA آنزیم مالیک تنظیم می کند (۱). هدف از این تحقیق بررسی اثر بتائین جایگزین شده با درصدی از متیونین جیره بر بیان ژن آنزیم مالیک مرغان تخمگذار میباشد

مواد و روشها

این آزمایش در ایستگاه دامپروری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان با ۴۸ قطعه مرغ تخمگذار لگهورن واریته w-36 سویه های- لاین (Hy-line) در هفته ۶۵ تولید اجرا گردید. این آزمایش با ۲ تیمار، ۳ تکرار و ۸ قطعه مرغ در هر تکرار به انجام رسید. دو سطح مختلف جایگزینی بتائین با متیونین (۰ و ۱۳ درصد جایگزینی بتائین آنهیدروس نوع خوراکی با متیونین) در نظر گرفته شد. در انتهای آزمایش ۴ پرنده از هر تکرار به طور تصادفی کشتار شده و کبد آنها در ازت مایع نگهداری و به سردخانه منتقل گردید و در دمای ۸۰- نگهداری شد. با استفاده از کیت SV Total RNA Isolation system شرکت پرومگا استخراج mRNA انجام گرفته و cDNA نمونه‌ها، با استفاده از آنزیم رونویس ساز معکوس و پرایمرالیگو (dT)، با استفاده از کیت RevertAid™ First strand cDNA synthesis Kit شرکت فرمتاز ساخته شد. در نهایت توسط دستگاه step one plus میزان بیان ژن با استفاده از روش Real-time PCR Relative Quantitative اندازه گیری شد. در این آزمایش از ژن بتا اکتین به عنوان ژن House keeping استفاده شد. اطلاعات پرایمرهای استفاده شده برای Real-time PCR توسط نرم افزار advance 11 vector NTI طراحی شده و توسط شرکت تولیدی و تحقیقاتی سیناژن ساخته شده است. خصوصیات این پرایمر در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱:

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (جفت باز)	دمای اتصال
آنزیم مالیک	Sense: ۵-AGTGCCTACCTGTGATGTTG-3 Antisense: ۵-GGCTTGACCTCTGATTCTCT-3	۱۰۱	۵۹
بتا اکتین	Sense: ۵-GTGATGGACTCTGGTGATGG-3 Antisense: ۵-TGGTGAAGCTGTAGCCTCTC-3	۱۵۰	۵۹

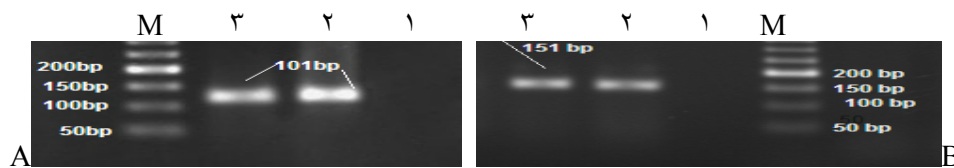
مواد مورد استفاده برای انجام Real time PCR به روش سایبر گرین شامل ۱۰ میکرولیتر power SYBER Green mix (ساخت شرکت ABI)، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت، ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت، ۷ ماکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱ میکرولیتر نمونه cDNA بود که با حجم کل ۲۰ میکرولیتر طبق جدول ۲ در ۴۰ سیکل انجام شد.

جدول ۲- پروتکل دمایی PCR

فعال سازی اولیه آنزیم	۹۵ درجه سانتی گراد	۲ دقیقه	1X
دنانوره شدن	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ ثانیه	۴۰X
اتصال	۵۹ درجه سانتی گراد	۱ دقیقه	
تکنیر	۶۰ درجه سانتی گراد	۳۰ ثانیه	

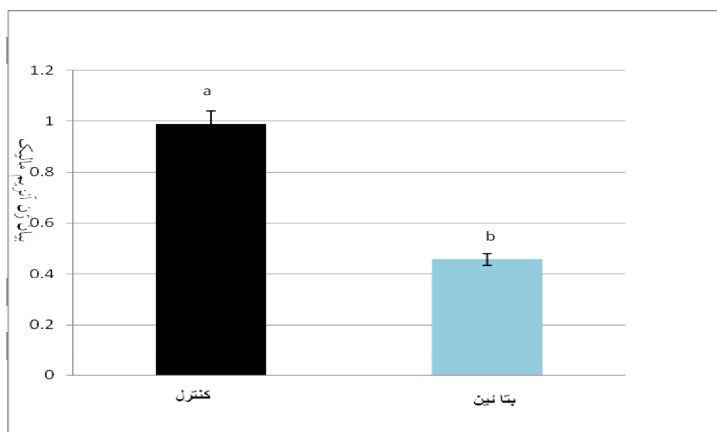
نتایج و بحث

در این پژوهش در ابتدا به منظور کاهش هزینه ها، کار آبی پرایمر های طراحی شده، غلظت مناسب پرایمر های مورد استفاده در واکنش و نیز دما و زمان اتصال هر پرایمر، واکنش PCR توسط دستگاه ترمال سایکلر انجام گرفت. پس از انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز ۸، ماکرو لیتر از محصول، با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. نتایج حاصل از الکتروفورز در تصویر ۱ نشان داده شده است.



تصویر ۱: الکتروفورز واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن آنزیم مالیک (A)، و ژن بتا اکتین (B) بر روی ژل آگارز با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه. M: مارکر ۵۰bp، چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک ۲ تیمار شاهد، چاهک ۳ تیمار بتائین جایگزین شده با متیونین.

روش بررسی تغییرات بیان ژن در این پژوهش روش $\Delta\Delta CT$ یا آستانه ای مقایسه ای و نسبت به بیان ژن بتا اکتین بود. در نهایت مقدار نهایی تغییرات بیان ژن که با RQ (Relative Quantification) نشان داده می شود برای هر نمونه محاسبه گردید و سپس مقادیر نهایی RQ توسط نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت ($RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$). نتایج این بررسی در نمودار زیر نشان داده شده است.



نمودار ۱- تغییرات بیان ژن آنزیم مالیک را در دو گروه مختلف نشان می دهد.

جدول ۳- اثر بتائین بر بیان ژن آنزیم مالیک در مرغان تخمگذار

تیمار	میانگین	SEM
کنترل	۰/۹۸۹۱۲ ^a	۰/۰۳۶
بتائین	۰/۴۵۷۵۳ ^b	۰/۰۳۶

حروف غیر مشترک در جدول دارای اختلاف معنی داری در سطح ($P < 0.01$) می باشد.

همان طور که مشخص است میانگین تغییرات بیان ژن آنزیم مالیک در گروه دریافت کننده بتائین 0.45753 ± 0.03 بوده که این میزان نسبت به کنترل که دارای میانگین تغییرات 0.98912 ± 0.03 است به میزان $2/16$ واحد کاهش یافته است و این کاهش در سطح ۱ درصد معنی دار می باشد. در تحقیقات متعددی مشخص شده است که افزودن بتائین به جیره طیور می تواند باعث بهبود گوشت لخم از طریق افزایش گوشت سینه و کاهش چربی حفره شکمی گردد (۵ و ۴). 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 می گردد (۲). همچنین مشخص شده است که افزودن بتائین به جیره خوک سبب کاهش فعالیت آنزیم مالیک و آنزیم اسید چرب سنتاز گردیده و ۲۵ درصد بیان mRNA آنزیم اسید چرب سنتاز را کاهش داده است (۷).

1. Mitchel J.Goldman,Donald W.Back,and Alan G.Goodridge. 1985.Nutritional Regulation of the Synthesis and Degradation of Malic Enzyme MessengerRNA in Duck Liver .J.of Biological Chemistry.vol260.pp.4404-4408
2. Sun, H., R. Yang, Z. B. Yang, Y. Wang, S. Z. Jiang and G. G. Zhang. 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 (3): 78-84.
3. Ueland, P. M., Holm, P. and Hustad, S. 2005. Betaine: a key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. ClinChem Lab Med. 43(10):1069–1075.
4. Wang, Y., Z. Xu and J. Feng. 2004. The effect of betaine and methionine on growth performance and carcass characteristics in meat ducks. Animal Feed Science Technology. 116: 151-159.
5. Zhan, X. A., J. X. Li, Z. R. Xu and R. Q. Zhao. 2006. Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. British Poultry Science. 47(5): 576-580.
6. Carter, A. L., Abney, T. O. and Lapp, D. F. 1995. Biosynthesis and metabolism of carnitine. Journal of Child Neurol. 10 (suppl2), 3–7.
7. Huang, Q. C., Z. R. Xu, X. Y. Han and W. F. Li. 2007. Effect of dietary betaine supplementation on lipogenic enzyme activities and fatty acid synthase mRNA expression in finishing pigs. Animal Feed Science and Technology.140: 365-375
8. Konca, Y.,and F. Kirkpinar. 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.
9. Kristin A., Adams and Adam J. Davis. 2001. Dietary protein concentration regulates the mRNA expression of chicken hepatic Malic enzyme. Journal of Nutrition. 131: 2269–2274.

Evaluation the effect of dietary Betaine substitution to methionine on Malic enzyme gene expression in Laying Hens by real- time PCR technique

S. Radpoor^{1*}, M.T. Nassiri², M. Hashemi tabar³, M. Nazari⁴ and F. Salabi⁵

* **Corresponding E-mail address: s.radpoor90@yahoo.com**

Abstract

This study carried out to determine the roles different levels of Betaine (Bet) substitution to Methionine (Met) on Malic enzyme gene expression by 65-wk-old Hy –Line Leghorn hens. There were 2 dietary treatments including of two doses of Bet (0 and 13%) substitute to Met. In this procedure, β -actin was used as a house-keeping gene to normalize the gene expression data in the quantitative real time PCR. The Malic enzyme and β -actin genes expression in the liver were determined by relative quantitative real time PCR. After feeding two month, four hens euthanasia by cervical dislocation and the livers were removed, frozen in liquid N₂ and stored at –70 °C. Total RNA was extracted using a kit. In short, transcribed cDNA was amplified by PCR and DNA products quantitated using the power SYBER Green mix and detected by real time PCR Machine . Results of this study indicated that Supplementation of the basal diets with Betaine lead to decrease significantly in Malic enzyme gene expression. Therefore, Betaine can repress Malic enzyme gene expression in mRNA level and has important role in decreasing abdominal and liver fat. This study has helped us understand more about the function of Malic enzyme and application of Betaine in laying hen

Key words: Betaine- Gene expression- Malic enzyme gene- Laying hens