DOI: 10.22055/ivj.2019.152644.2078

تأثیر سطوح مختلف پروتئین و جایگزینی DL متیونین با L متیونین بر بیان ژن‌های میوژنیک در بلدرچین ژاپنی

کی‌آرام کوه‌گیوی [۱]، هدایت‌الله روشنفکر [۲]، محمود نظری [۳*] و احمد طاطار [۳]

[۱] دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد ژنتیک دام، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
[۳] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۳

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر سطوح مختلف پروتئین (۲۰ و ۲۴ درصد) و جایگزینی DL متیونین با L متیونین، بر بیان ژن‌های میوژنیک (آتروژین-۱ و MYF-5) با اسفاده از تکنیک RT-qPCR در بلدرچین ژاپنی انجام شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار و ۱۵ قطعه بلدرچین در هر تکرار به اجرا در آمد. تیمار اول شامل DL متیونین و پروتئین ۲۰ درصد بوده که گروه کنترل ما بود. تیمار دوم شامل L متیونین و پروتئین ۲۴ درصد، همچنین تیمار سوم شامل L متیونین و پروتئین ۲۰ درصد بوده و تیمار چهارم شامل DL متیونین و پروتئین ۲۴ درصد بودند. پس از ۳۵ روز تغذیه و نگهداری بلدرچین‌ها، به دنبال ۸ ساعت گرسنگی، از هر تکرار ۲ بلدرچین کشتار و قطعه‌ای از بافت ماهیچه سینه‌ی آن‌ها به همراه ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- سانتی‌گراد ذخیره شدند. پس از استخراج RNA کل، کیفیت آن اندازه‌گیری گردید و برای تولید و سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت بیان ژن‌های آتروژین-۱ و MYF-5 با استفاده از تکنیک Real-time qPCR ارزیابی شد. در این روش ژن بتااکتین به عنوان ژن خانه‌دار (منبع) جهت نرمال نمودن داده‌ها استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که با کاهش سطح پروتئین از ۲۴ درصد به ۲۰ درصد بیان ژن آتروژین-۱ افزایش و بیان ژن MYF-5 کاهش پیدا کرده است. به علاوه، جایگزینی DL متیونین با Lمتیونین تأثیری بر بیان ژن‌های آتروژین-۱ و MYF-5 ندارد. نتایج بیان‌کننده‌ی این موضوع بود که می‌توان DL متیونین جیره را با Lمتیونین در جیره‌ی بلدرچین ژاپنی جایگزین کرد و سطح پروتئین ۲۴ درصد در جیره از ۲۰ درصد مناسب‌تر است.

کلمات کلیدی: بلدرچین ژاپنی، بیان ژن، آتروژین-۱ و ژن‌های میوژنیک

مقدمه

بلدرچین ژاپنی (*Coturnix Coturnix Japanica*) جزء خانواده‌ی 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، دوره‌ی انکوباسیون کوتاه و امکان پرورش تعداد زیادی پرنده در فضایی محدود

*نویسنده مسئول : محمود نظری، استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
E-mail: m.nazari@asnrukh.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

است که از آن یک پرنده مناسب در بین گونه‌های مزرعه‌ای ساخته است (Kaur et al, 2008). سود بالا، سرمایه‌گذاری اولیه‌ی 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 عمدتاً بر اساس نیازهای دیگر پرندگان تنظیم شده است که از جمله این نیازها میزان پروتئین مورد نیاز بلدرچین می‌باشد (Agaie et al, 2018). میزان پروتئین در NRC برای بلدرچین در حال رشد ۲۴ درصد در نظرگرفته شده است. پروتئین‌ها بخشی از مواد مغذی هستند که از واحدهای کوچک‌تری به نام اسیدهای آمینه تشکیل شده‌اند. پروتئین‌ها در بافت‌های ساختاری خون، آنزیم‌ها و نیز هورمون‌ها یافت می‌شوند. این بخش از جیره به دلیل گران بودن سبب افزایش قیمت جیره می‌شود؛ به همین دلیل مطالعاتی در جهت کاهش سطح پروتئین جیره انجام شده است زیرا احتیاجات واقعی پروتئین نیاز به اسیدهای آمینه ضروری و نیتروژن کافی برای ساخت اسیدهای آمینه غیرضروری می‌باشد. گزارش‌ها نشان می‌دهند میزان پروتئین موردنیاز جیره در سنین مختلف پرورش بلدرچین متفاوت است (Agaie et al, 2018). لذا یکی از اهداف این مطالعه بررسی اثرات سطوح مخلف پروتئین (۲۰ و ۲۴ درصد) بر بیان ژن‌های میوژنیک و در نتیجه انتخاب سطح مطلوب بود.

اسیدهای آمینه نه تنها در تولید پروتئین بلکه در عملکردهای متابولیکی مهمی مانند بهبود عملکرد سیستم ایمنی و عملکرد دستگاه گوارش نقش به سزایی داشته و تأثیرگذار هستند (Dersjant and Peiskerl, 2011). در تغذیه‌ی طیور اسیدهای آمینه برای افزایش میزان رشد، بهبود ضریب تبدیل خوراکی و بالا بردن کیفیت لاشه لازم هستند (Nasiri et al, 2007). افزودن مقدار کمی از اسیدهای آمینه محدودکننده سبب بهبود کیفیت پروتئین جیره می‌شود. به این ترتیب افزودن متیونین به عنوان اولین و مهم‌ترین اسیدآمینه‌ی 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. همچنین متیونین به عنوان یک دهنده‌ی گروه متیل و گوگرد برای واکنش‌های ترانس- متیلاسیون و ترانس سولفوراسیون عمل می‌کند (Parvin et al, 2010).

فرم تجاری متیونین به صورت DL- متیونین است. DL- متیونین ترکیبی است که شامل ۵۰ درصد ایزومر D- متیونین و ۵۰ درصد ایزومر L- متیونین می‌باشد. وقتی که از خوراک مکمل‌سازی شده با DL متیونین استفاده می‌شود، هر دو فرم D و L به بافت‌های بدن پرنده می‌رسند، هر دو ایزومر D و L به سرعت در طول دستگاه گوارش و در طول دیواره‌ی روده توسط یک حمل کننده‌ی وابسته به سدیم حمل می‌شوند. هر دو فرم از روده با یک سرعت عبور کرده و هیچ کدام در طی فرایند انتقال از بین نمی‌روند. هنگامی که D متیونین به کبد یا کلیه می‌رسد توسط فرایند آنزیمی دو مرحله‌ای (دی آمیناسیون اکسیداتیو به دنبال ترانس آمیناسیون) تبدیل به فرم L می‌شود که برای سنتز پروتئین در بافت استفاده می‌شود (Huyghebaert, 1993). در بعضی تحقیقات نشان داده شده است که استفاده از فرم L متیونین می‌تواند مفیدتر از فرم DL باشد (Shen et al, 2015). به نظر می‌رسد که تبدیل DL به فرم L متونین در کارخانجات ضروری نیست و اتلاف هزینه و وقت را در پی دارد.

در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که متیونین اثر خود را از طریق بیان ژن‌هایی مانند ژن‌های میوژنیک اعمال می‌کند و بیان آن‌ها را تغییر می‌دهد. یکی از مهم‌ترین این ژن‌ها، ژن میوژنیک فاکتور ۵ (MYF-5) است که نقش کلیدی تنظیم کنندگی در تشکیل و توسعه ماهیچه‌ی اسکلتی ایفا می‌کند و به عنوان یک ژن کاندیدا در صفات مرتبط با رشد و کیفیت گوشت به شمار می‌رود. پروتئین‌های خانواده MYF، فاکتورهای رونویسی لازم برای تمایز ماهیچه‌ها هستند. تحقیقات نشان داده که با افزایش متیونین

جیره، بیان ژن MYF-5 افزایش داشته و این افزایش باعث افزایش در عضله و حجم ماهیچه در سینه‌ی طیور می‌شود (Wen et al, 2014). این پروتئین نقش مهمی در تنظیم تمایز عضلانی یا میوژنز و به خصوص رشد عضله اسکلتی دارد. علاوه بر این MYF5 یک تنظیم کننده‌ی اصلی رشد عضلانی است که توانایی ایجاد فنوتیپ عضلانی را در سلول های فیبروبلاست بر عهده دارد (Sabourin and Rudnicky, 2000). علاوه بر MYF-5 پروتئین آتروژین نیز نقش مهمی در رشد ماهیچه دارد. آتروژین پروتئینی است که به صورت اختصاصی در بافت ماهیچه بیان می‌شود. افزایش بیان این ژن باعث آتروفی عضلانی می‌شود. در محدودیت غذایی در طیور رونویسی از ژن آتروژین افزایش می‌یابد و این باعث کاهش حجم عضلات اسکلتی می‌شود. همان گونه که بیان شد، با افزایش متیونین جیره بیان ژن آتروژین کاهش پیدا می‌کند و این کاهش بیان ژن باعث افزایش حجم عضلات سینه می‌شود (Lee et al, 2012). به این ترتیب ژن آتروژین همانند میوستاتین عمل کرده و افزایش بیان این ژن باعث کاهش در حجم عضلات می‌شود (Vesco et al, 2015). این پژوهش به منظور بررسی تأثیر جیره‌های حاوی سطوح مخلف پروتئین (۲۰ و ۲۴ درصد) و جایگزینی L متیونین با DL متیونین جیره بر بیان ژن‌های آتروژین-۱ و MYF-5 در بلدچین ژاپنی انجام گرفت.

مواد و روش کار

این آزمایش در ایستگاه تحقیقات طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. ۲۴۰ قطعه بلدرچین ژاپنی یک روزه از مخلوط دو جنس به طور تصادفی به ۴ گروه آزمایشی با ۶۰ جوجه در هر گروه تقسیم شدند. هر گروه آزمایشی دارای ۴ تکرار و هر تکرار نیز دارای ۱۵ قطعه جوجه بلدرچین بودند که بر روی بستر پوشال پرورش داده شدند. تیمارها شامل جیره حاوی DL- متیونین وپروتئین ۲۰ درصد (DL20)، همچنین جیره حاوی ۲۴ درصد سطح پروتئین و DL-متیونین (DL24)، جیره حاوی L متیونین و پروتئین ۲۰ درصد و جیره‌ای شامل L متیونین (L20) و پروتئین ۲۴ درصد (L24) بودند. جیره‌ها و ترکیبات آن‌ها در Table 1 ارائه گریده است. جیره‌نویسی بر اساس سطح توصیه شده انجمن ملی تحقیقات (NRC, 1994) و با استفاده از نرم افزار UFFDA انجام شد. جوجه‌ها تا سن ۳۵ روزگی پرورش یافته و پس از اندازه‌گیری صفات مختلف با طرح کاملاً تصادفی در قالب طرح فاکتوریل ۲×۲ تجزیه واریانس شدند. در پایان دوره‌ی آزمایش (۳۵ روزگی)، به دنبال ۸ ساعت گرسنگی، دو قطعه جوجه بلدرچین از هر قفس به طور تصادفی انتخاب و کشتار شده، قطعه‌ای از گوشت سینه‌ی آن‌ها به وسیله‌ی تیغ استریل سریعاً جدا گردید و به همراه ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره شد. همچنین صفات لاشه‌ی پرنده‌ها نیز به دقت اندازه‌گیری شده و مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، استخراج RNA از ۳۰ میلی‌گرم بافت سینه با استفاده از کیت استخراج SV Total RNA Isolation System 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 چنان چه نسبت جذب ۲۶۰/ ۲۸۰ بالای ۱/۸ بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند نمونه‌های RNA استخراج شده تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. برای ساخت، cDNA، از کیت سنتز Revert Aid Tm M-MuLV Reverse Transcriptase استفاده گردید. اولین رشته‌ی cDNA با کمک آغازگر Oligo dT ساخته شد. مقدار ۵ میکرولیتر با غلظت ۰/۵ نانوگرم به میکروگرم از RNA همراه با ۰/۵ میکروگرم آغازگر Oligo dT اضافه شد و حجم محلول با استفاده از آب عاری از نوکلئاز به ۱۱ میکرولیتر رسانده شد مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و پس از آن به سرعت روی یخ سرد قرار داده شد. سپس ۴

میکرولیتر بافر واکنش و ۲ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ میکرومول و ۲۰ واحد (u) RNase inhibitor به هر تیوب افزوده شد و حجم محلول با آب عاری از نوکلئاز به ۱۹ میکرولیتر رسانده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق محیط نگهداری شدند. سپس ۲۰۰ واحد (u/μl) آنزیم M- MuLV Reverse Trenscriptase به محلول فوق اضافه و مخلوط شد. آن گاه به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن به منظور غیرفعال نمودن واکنش، تیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. جهت طراحی آغازگر برای ژن‌های آتروژین-۱ ، MYF-5 و ژن خانه دار بتا اکتین از نرم‌افزار vector NTI advance 11 استفاده گردید. توالی و خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای ژن میوستاتین و بتا اکتین در Table 2 ارائه شده است.

Table 1. Ingredient composition of the experimental diets

Ingredients (%)	Diets			
	1	2	3	4
Corn	61.70	52.25	61.70	52.25
Soybean meal	33.40	38.10	33.40	38.10
Corn gluten	-	4.5	-	4.5
Plant oil	0.80	1.20	0.80	1.20
L- methionine	-	0.50	0.50	
DL- methionine	0.50	-	-	0.50
L-Lysine	0.16	0.13	0.16	0.13
Vitamin premix	0.25	0.25	0.25	0.25
Mineral premix	0.25	0.25	0.25	0.25
Dicalcium phosphate	1.20	1.15	1.20	1.15
Calcium carbonate	1.20	1.20	1.20	1.20
Salts	0.27	0.33	0.27	0.33
Calculated nutrient composition (%)				
ME kcal/kg diet	2900	2900	2900	2900
Crude protein%	20	24	20	24
Lysine	1.17	1.30	1.17	1.30
Methionine	0.79	0.86	0.79	0.86
Methionine + Cysteine	1.11	1.25	1.11	1.25

به منظور تعیین دمای اتصال آغازگر به رشته‌های DNA ی هدف، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز همراه با شیب دمایی انجام شد. جهت تکثیر ژن آتروژین -۱ ، MYF-5 و بتااکتین؛ دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و دمای تکثیر ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. برای بررسی میزان بیان ژن‌های میوژنیک از واکنش Real time PCR به روش سایبرگرین استفاده شد. که برای انجام آن از دستگاه Step one plus ساخت شرکت Applied Biosystem آمریکا استفاده شد.

Table 2. The sequence and characteristics of the primer used in this study

Gene name	Primer sequence		Gene Bank-ID	Amplicon size
MYF-5	Sense	F: 5'-CTTCGAGGCGGGCTACTG-3'	NM_001030363	107
	Antisense	R: 5'-AGAGAGGCGGGCTACTG-3'		
Atrogin-1	Sense	F: 5'-CCAACAACCCAGAGACCTGT-3'	XM_015856276.1	254
	Antisense	R: 5'-GGAGCTTCACACGAACATGA-3'		
β-actin	Sense	F:5 TGCTGTGTTCCCATCTATCG-3	NM_205518	150
	Antisense	R: 5 TTGGGACAATACCGTGTTCAT-3		

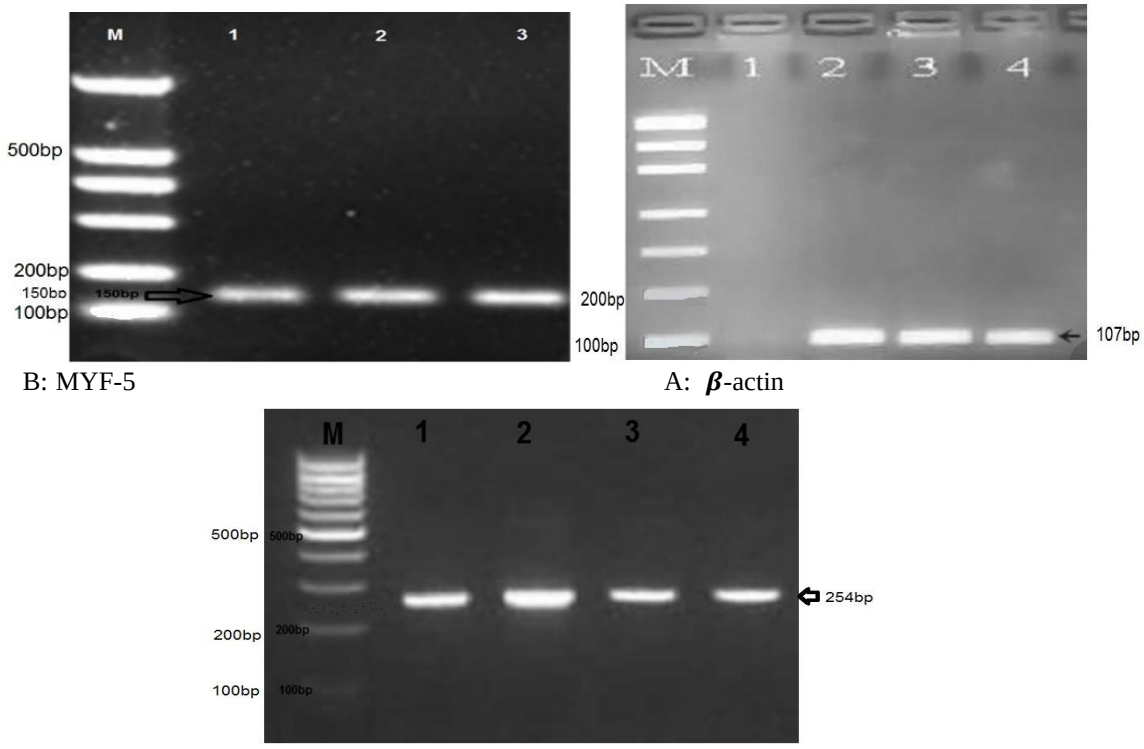
واکنش‌ها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر از مستر میکس سایبرگرین ساخت شرکت ABI آمریکا صورت گرفت. به همین منظور ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس، ۴ میکرولیتر آغازگر رفت، (غلظت ۴ پیکومول به میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر آغازگر برگشت (غلظت ۴ پیکومول به میکرولیتر)، ۳/۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۱ میکرولیتر cDNA با هم مخلوط شدند. 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 کار، رقت‌های مختلف از cDNA را تهیه کرده و روی آن‌ها تست Real-Time PCR انجام شد. بدین منظور cDNA سنتز شده به عنوان 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 ΔΔCT (آستانه‌ی مقایسه‌ای) و نسبت به بیان ژن بتا اکتین بود. در روش مقایسه‌ی نسبی از فرمول $^{-}$ $۲^{\Delta\Delta CT}$ به روش Pffafle (2002) استفاده گردید. بررسی آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS (۱۹۹۹) و آزمون LSD در سطح معنی‌داری ۱ درصد ($P<0.01$) انجام شد.

نتایج

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 A260 به A280 بررسی شد. این نسبت در تمام RNAهای استخراج شده در این پژوهش بین ۱/۹ تا ۲/۲ بود لازم به ذکر است که تکنیک Real–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 (آروژین و MYF-5) 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 آگارز (۲ درصد) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده تک باند در محدوده‌ی ۲۵۴ جفت نوکلئوتید برای ژن آتروژین، ۱۰۷ جفت نوکلئوتید برای ژن MYF-5 و در محدوده‌ی ۱۵۰ جفت نوکلئوتید برای ژن بتااکتین در مورد همه‌ی نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه‌ی مورد نظر می‌باشد (Fig. 1).

از آن جایی که سایبرگرین I به هر DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود، به منظور اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر از منحنی ذوب استفاده می‌شود. در این منحنی، پیک موجود بیانگر نقطه‌ی ذوب محصول تکثیر شده است بنابراین با مقایسه‌ی نقطه‌ی ذوب محصول مورد انتظار و نقطه‌ی ذوب به دست آمده در این منحنی می‌توان صحت کار، عدم آلودگی به DNA و فقدان پرایمر دایمر را تایید کرد.

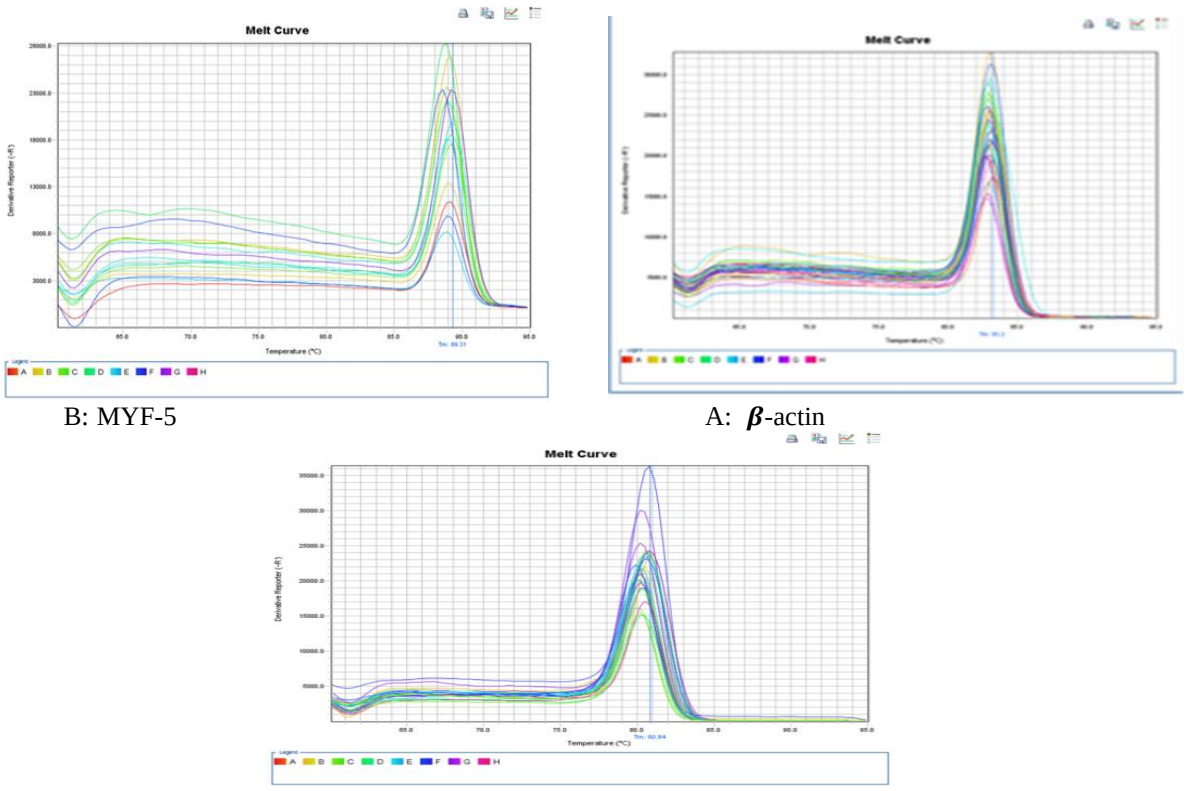
وجود تنها یک قله (پیک) در منحنی ذوب ژن آتروژین، MYF-5 و بتااکتین، اختصاصی بودن پرایمر برای این دو ژن را تایید می‌کند (Fig. 2).



B: MYF-5 A: β-actin

C: Atrogin-1

Fig. 1: A sample of electrophoresis of PCR products for (A) B-actin (B) MYF-5 (C) Atrogin-1 on the 2% Agarose gel. M: size marker 100bp



B: MYF-5 A: β-actin

C: Atrogin-1

Fig. 2: The melting curves for (A) B-actin (B) MYF-5 (C) Atrogin-1 genes

اثر سطوح پروتئین و جایگزینی DL–متیونین با L– متیونین بر ژن آتروژین–۱

نتیجه‌ی تأثیر سطوح مختلف پروتئین (۲۴ و ۲۰ درصد) بر بیان ژن در بلدرچین ژاپنی در Table 3 ، نشان داده شده است. در این تحقیق، تیمار DL20 (شامل ۲۰ درصد پروئین و حاوی DL– متیونین) به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و به صورت اختیاری میزان بیان ژن در آن عدد ۱ در نظر گرفته شد و بقیه تیمارها نسبت به این تیمار سنجیده شدند. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهد که میانگین تغییرات بیان ژن آتروژین–۱ در تیمار DL24 (حاوی ۲۴ درصد پروتئین و DL–متیونین) ۰/۳۶ بود که نسبت به گروه شاهد (DL20) ۰/۶۴ کاهش نشان داد.

میانگین تغییرات بیان ژن آتروژین–۱ در تیمار L24 (حاوی ۲۴ درصد پروتئین و L–متیونین) ۰/۴۸ بود که نسبت به گروه شاهد (DL20) ۰/۵۲ کاهش نشان داد.

Table 3. Effect of DL- methionine replacement with L- methionine and dietary protein levels (20 and 24 %) on Atrogin-1 and MYF-5 genes expression

Protein Levels	24%		20%	
L and DL- methionine	L24	DL24	L24	DL24
Atrogin-1	0.48 [b]	0.36 [b]	0.93 [a]	1 [a]
MYF-5	2.51 [a]	2.04 [a]	1.23 [b]	1 [b]

Different letters superscripts (a, b) in each row indicates a significant difference between the treatments (P< 0.01)

بنابراین تغذیه با جیره پروتئین ۲۴ درصد، بیان ژن آتروژین کاهش پیدا کرده است و این کاهش در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. همان طور که در جدول Table 3 مشاهده می‌شود، میانگین تغییرات در DL20 و L20 و همچنین در DL24 و L24 تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

اثر سطوح پروتئین و جایگزینی DL متیونین با L متیونین بر بیان ژن MYF-5

اثر سطوح مختلف پروتئین (۲۰ و ۲۴ درصد) و جایگزینی DL متیونین با L متیونین بر بیان ژن MYF-5 **در جدول**Table 3، نشان داده شده است. میانگین تغییرات بیان ژن MYF-5، تیمار DL24 (پروتئین ۲۴ درصد در DL متیونین) نسبت به تیمار DL20 (حاوی پروتئین ۲۰ درصد و DL متیونین) که همان گروه کنترل است، دارای میانگین تغییرات ۲/۰۴ است و در تیمار L24 (حاوی L متیونین و سطح پروتئین ۲۴ درصد) میانگین تغییرات برابر با ۲/۵۱ است. بیان ژن MYF-5 در تیمار DL24 و L24، به ترتیب ۱/۰۴ و ۱/۵۱ واحد افزایش پیدا کرده است و این افزایش در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد. بیان ژن MYF-5 در تیمارهای DL20 و L20 و همچنین در تیمارهای DL24 و L24 تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

بحث

آزمایشات نشان داده که اسیدآمینه متیونین اولین اسیدآمینه محدودکننده در جیره‌های با پایه‌ی ذرت و سویا در بلدرچین ژاپنی است. به همین دلیل افزودن مقدار کمی اسیدآمینه میونین سبب بهبود کیفیت پروتئین جیره می‌شود. متیونین به عنوان یک دهنده‌ی گروه متیل و گوگرد برای واکنش‌های ترانس– متیلاسیون و ترانس سولفوراسیون عمل می‌کند. افزودن متیونین به عنوان اولین اسیدآمینه‌ی محدودکننده، 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 (Parvin et al, 2010).

در تحقیقی که به مقایسه‌ی اثرات آنالوگ‌های DL متیونین، L متیونین و کتوآنالوگ متیونین (2-Keto-4-Butyric Acid) بر جوجه‌های گوشتی پرداخته شد مشخص

گردید این آنالوگ‌ها اثر معنی‌داری بر عملکرد نداشتند و DL متیونین و و L متیونین اثر یکسانی بر عملکرد داشتند (Dilger et al, 2007).

البته مقایسه‌ی آنالوگ‌های DL و L – متیونین در جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمایی، بیان کننده‌ی بهبود معنی‌دار ضریب تبدیل خوراکی در گروه دریافت‌کننده L متیونین بوده است. در حالی که بازدهی لاشه تحت تأثیر آنالوگ‌های متیونین قرار نگرفت (Ribeiro et al, 2005). در گزارش دیگری مشخص شد که عملکرد تحت تأاثیر منبع متیونین جیره‌ای (اعم از آنالوگ DL یا L) قرار نمی‌گیرد در حالی که مشخص شد که میانگین ارزش تغذیه‌ای L متیونین در مقایسه با DL متیونین برابر با ۱۰۲ درصد است (Evonic, 2015).

البته آزمایشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد جایگزین نمودن L متیونین به جای DL متیونین می‌تواند سبب بهبود عملکرد شود. در آزمایشی که بر روی خوک به مقایسه‌ی کارایی L متیونین در مقایسه با DL متیونین و اثرات آن بر عملکرد و سلامت دستگاه گوارش پرداخته شده بود، مشخص شد که گروه دریافت‌کننده L – متیونین در مقایسه با –DL متیونین، افزایش وزن روزانه معنی‌داری داشته‌اند. همچنین، قابلیت دسترسی زیستی L متیونین و DL متیونین برای صفت افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل خوراکی به ترتیب ۱۴۳/۸ در مقابل ۱۲۲/۷ درصد به دست آمد. در مورد وضعیت سلامت روده مشخص شد که گروه دریافت‌کننده‌ی L متیونین غلظت گلوتاتیون بالاتر در بافت روده داشته و همچنین دارای ارتفاع و عرض بالاتری از ویلی‌های روده در مقایسه با گروه دریافت‌کننده‌ی DL متیونین داشت (Shen et al, 2014).

در تحقیق دیگری محققین به مقایسه‌ی کارایی آنالوگ معمول DL متیونین با L متیونین در تغذیه‌ی جوجه‌های گوشتی پرداختند. نتایج نشان داد که جوجه‌های مصرف کننده‌ی L متیونین عملکرد رشدی و وضعیت مورفولوژی روده‌ای بهتری از خود نشان دادند (Shen et al, 2015).

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که جایگزینی L متیونین به جای DL –متیونین، تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌های میوژنیک ندارد (Table 3). با توجه به نتایج محققین دیگر که در بالا اشاره شد به نظر می‌رسد که L متیونین در شرایط خاصی مثل استرس سبب بهبود شده است و این بهبود به دلیل بهبود شرایط جذب روده‌ای بوده است و این بهبود به دلیل تأثیر بر بیان ژن‌های میوژنیک نبوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که تأثیر L و DL متیونین بر بیان ژن‌های آتروژین و MyF-5 معنی‌دار نبوده است و این بدین معناست که جایگزینی آن‌ها تأثیری بر بیان این ژن‌ها نخواهد گذاشت. پس می‌توان نتیجه گرفت که افزایش عملکرد در هنگام استفاده از L متیونین مربوط به بیان ژن‌های میوژنیک مثل آتروژین یا MyF-5 نبوده است بلکه به دلیل تأثیراتی است که بر شرایط جذب روده‌ای داشته است.

همچنین نتایج نشان این آزمایش نشان داد که کاهش مصرف پروتئین جیره از ۲۴ درصد به ۲۰ درصد سبب کاهش بیان ژن MYF-5 و افزایش بیان ژن آتروژین می‌گردد (Table 3). این عامل می‌تواند سبب کاهش تولید گردد. در تحقیقی که به منظور بررسی اثر متیونین بر بهبود عملکرد و رشد عضله‌ی سینه انجام شد، مشخص گردید که جیره‌های حاوی متیونین بالا و در نتیجه آن جیره‌های با سطح پروتئین بالاتر عملکرد را بهبود می‌بخشند و رشد ماهیچه‌ی سینه را افزایش می‌دهند. افزایش پروتئین و متیونین جیره سطح mRNAی ژن‌های IGF-1 و TOR و MYF-5 را افزایش می‌دهند و باعث کاهش در بیان ژن آتروژین- ۱ و FOX04می‌شود (Wen et al, 2014).

در تحقیقی نشان داده شد که با افزایش متیونین در جیره بیان ژن آتروژین-۱ کاهش یافته است. این مطالعه نشان داد که ژن آتروژین-۱ نیز همانند میوستاتین عمل کرده و با افزایش سطح پروتئین جیره، بیان این ژن کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است، اما یافته‌ای که نشان دهد کاهش بیان این ژن ارتباط مستقیمی با افزایش سطح پروتئین دارد، یافت نشده است (Vesco et al, 2015).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که جایگزین کردن L متیونین به جای DL تأثیری بر بیان ژن‌ها ندارد پس می‌توان این جایگزینی را در جیره انجام داد. پس نیازی نیست که کارخانجات فرم D متیونین را تولید کنند و فرم L میونین می‌تواند کارآمد باشد. همچنین سطح ۲۴ درصد پروتئین در جیره‌ی بلدرچین مناسب‌تر از ۲۰ درصد می‌باشد. پیشنهاد می‌گردد از سطح ۲۴ درصد پروتئین در جیره استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان که هزینه‌ی این تحقیق را تأمین نمودند تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام میدارند که هیچ تعارض منافعی وجود ندارد .

منابع مالی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه با حمایت مالی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شده است.

منابع

Aghaei, A., Khosravinia, H., Mamoei, M., Azarfar, A., Shahriari, A., and Ghorbanpor, M. (2018). Effects supplementation of zinc and Vit E on antioxidant enzyme, sexual hormone and some biochemical parameters in breeder flock of Japanese Quails. *Iranian Veterinary Journal*, *4* (2), 14-24. (In Persian)

Dersjant-Li, Y. and Peisker, M. (2011). A Review on Recent Findings on Amino Acids Requirements in Poultry Studies. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, *1*(2), 73-79.

Dilger, R.N., Kobler, C., Weckbecker, C., Hoehler, D. and Baker, D.H. (2007). 2-keto-4-(Methylthio) butyric acid (Keto analog of methionine) is a safe and efficacious precursor of L-Methionine in chicks. *Journal of Nutrition*, *137*, 1868-1873.

Evonik Industries, AG Health and & Nutrition (2015). Nutritional value of L-Methionine is comparable to DL-Methionine in growing broilers from 14 to 27 days of age. *Facts & Figures,* 15113.

Hyankova, L., Dedkova, L., Knizetva, H. and Klecner, D. (1997). Responses in growth, food intake and food conversion efficiency to different dietary protein concentrations in meat-type lines of Japanese quail. *British Poultry Science*, *38*, 564-570.

Huyghebaert, G. (1993). Comparison of DL-methionine and methionine hydroxy analog-free acid in broilers by using multi exponential regression models. *British Poultry Science*, *34*, 351–359.

Kaur, S., Mandal, A., Singh, K. and 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 Science*, *117*, 255-262.

Lee, J., Giordano, S. and Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Journal of Biochemistry*, *441*, 523–540.

Nasiri Moghadam, H., Hesabi Nameghi, A. and Madayeni, M.M. (2007). Effect of supplementation of methionine and lysine amino acids on yield and carcass characteristics of broiler chicks. *Journal Iranian Agriculture*, *20*, 183-192. (In Persian)

National Research Council. (1994). *Nutrition of Poultry*. National Academy Press. Washington D. C., U.S.A.

Parvin, R., Mandal, A.B., Singh, S.M. and Thakur, R. (2010). Effect of dietary level of methionine on growth performance and immune response in Japanese quails (Coturnix coturnix japonica). *Journal Science Food Agriculture*, *90*, 471-481.

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 Research*, 30, pp.1-10.

Ribeiro, A., Dahlke, F. and Kessler, A.M. (2005). Methionine sources do not affect performance and carcass yield of broilers fed vegetable diets and submitted to cyclic heat stress. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(3), 159-164.

Sabourin, L.A. and Rudnicki, M.A. (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics*, 57(1), 16-25.

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

Shen, Y.B., Ferket, P., Park, I., Malheiros, R.D. and Kim, S.W. (2015). Effects of feed grade l-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional dl-methionine. *Journal of Animal Science*, *93*, 2977-2986.

Shen, Y.B., Weaver, A.C. and Kim, S.W. (2014). Effect of feed grade L-Methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared to conventional DL-Methionine. *Journal of Animal Science*, *92*, 5530-5539.

Vesco, A.P., Gasparino, E., Oliveira Neto, A.R., Guimarães, S.E. and Marcato, S.M. (2015). Effects of Methionine Supplementation on the Expression of Protein Deposition-Related Genes in Acute Heat Stress-Exposed Broilers. *PLoS One*, *10*(2), e0115821.

Wen, C., Chen, X., Chen, G.Y., Wu, P., Chen, Y.P., Zhou, Y.M. and Wong, T. (2014). Methionine improves breast muscle growth and alters myogenic gene expression in broilers. *Journal of Animal Science 92*(3), 1068-1073.

Vol. 16, No. 4, Winter, 2021 **Original Article**

DOI: 10.22055/ivj.2019.152644.2078

The effect of substitution to DL-methionine with L-methionine and dietary protein levels on Expression Myogenic Genes in Japanese quail

Keyaram Koohgivi [1], Hedaiat allah Rooshanfekr [2], Mahmood Nazari[3*] and Ahmad Tatar[3]

[1] MSc Graduated of Animal genetic and Breeding, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

[2] Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

[3] Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received: 17.10.2018 Accepted: 24.06.20.19

Abstract

This research was conducted to investigate the effect of different levels of protein (20 and 24%) and the replacement of methionine DL with L methionine on the expression of myogenic genes (atrogin-1 and MYF-5) using the RT-qPCR technique in Japanese quail. This experiment was done in the form of a 2×2 factorial with 4 treatments and 4 repetitions and 15 quail in each replicate. The first treatment included DL-methionine and 20% protein (control group). The second treatment consisted of L methionine and 24% proteins, and the third treatment included L methionine and protein 20% and the fourth treatment included DL-methionine and protein 24%. After 35 days of feeding and keeping the quails, with 8 hours interval of hunger, 2 quails were slaughtered in each replicate, and a piece of their chest has been removed immediately and was transferred to the laboratory with Liquid nitrogen, and froze in -80°c. After extraction of the whole RNA, its quality was measured and was used to generate and synthesis the cDNA. Eventually, the expression of myogenic genes was measured by the real-time PCR method. In this method, $\boldsymbol{\beta}$-actin gene, as the source gene, was used to normalize the data. The results showed that by decreasing the protein level from 24% to 20%, atrogin-1 gene expression increased and the MYF-5 gene expression decreased. Also, the replacement of methionine DL with L-methionine did not have a significant effect on the expression of myogenic genes. The results indicated that DL-methionine could be replaced with L methionine, and a 24% protein level is more suitable than 20% in the Japanese quail diet.

Keywords: Japanese quail, Atrogin-1, Gene expression, Myogenic genes

[*] **Corresponding Author**: 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, E-mail: m.nazari@asnrukh.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).