مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی اثر محدودیت متیونین بر بیان ژن IGF-1 در عضله سینه بلدرچین ژاپنی

الهه رستم زاده[1]، مسعود اسدی فوزی[2*]، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه[3]، ملک حسین اسدی[4]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
[2]دانشیار بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
[3]استاد بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
[4]استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران،

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۳/۲۹

چکیده

در مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر محدودیت متیونین بر بیان ژن IGF-1 در عضله سینه بلدرچین ژاپنی از تعداد ۲۰۰ قطعه بلدرچین ژاپنی در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. این پرندگان بر مبنای نوع جیره مورد استفاده به طور تصادفی به دوگروه شامل جیره محتوی مکمل متیونین و جیره بدون مکمل متیونین تقسیم شدند. میزان بیان ژن IGF-1 در عضله سینه بلدرچین ژاپنی در ٢٤ روزگی با استفاده از تکنیک Real time PCR اندازه گیری شد. همچنین در این سن وزن بدن و صفات مختلف استخوان های ران، درشت نی و بازو برای پرندگان فوق اندازه گیری و ثبت شدند. نتایج نشان داد که بیان ژن IGF-1 با حذف مکمل متیونین از جیره غذایی بلدرچین‌ها به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد (P<۰/۰۵). به طوری‌که میزان بیان این ژن در عضله سینه پرندگانی که از جیره فاقد مکمل متیونین استفاده کرده بودند سه برابر بیشتر از میزان آن در گروهی بود که مکمل متیونین را دریافت کرده بودند. لازم به ذکر است که حذف مکمل متیونین موجب کاهش وزن بدن گردید، اما اثر معنی داری بر رشد استخوان ها در سن مورد بررسی نداشت. نتایج حاصل از تحقیق نشان می‌دهد با اینکه حذف مکمل متیونین از جیره غذایی موجب افزایش میزان بیان ژن IGF-1 می‌گردد اما کاهش وزن را به دنبال دارد. بنابراین رشد بدن تنها متاثر از میزان بیان ژن IGF-1 نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: *بیان ژن IGF-1، متیونین، بلدرچین ژاپنی.*

*نویسنده مسئول: مسعود اسدی فوزی تلفن: ۰۳٤۳۱۳۲۲٦۹۱ Email: masadi@uk.ac.ir

مقدمه

در دو دهه اخیر پرورش طیور یکی از شاخه های 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*) که از خانواده ماکیان می باشد دارای ویژگی هایی از جمله رشد سریع، فاصله نسلی کوتاه، مقاومت به بیماری ها و شرایط نامساعد محیطی، امکان پرورش تعداد زیادی پرنده در فضایی محدود، سن پایین بلوغ جسمی و جنسی، دوره جوجه کشی کوتاه، تخم گذاری بالا، ضریب تبدیل غذایی مناسب و هزینه کم موادغذایی و درمان می‌باشد که باعث شده پرورش آن از راندمان خوب و بالایی برخوردار باشد (Emami Meybodi, 1994; BaniAsadi, 1996; Sharifi *et al.*, 2011; Oguzet *et al.*, 1996; Parvin *et al.*, 2010). همانند سایر طیور، تغذیه از مهمترین عوامل محیطی موثر بر رشد بلدرچین می باشد و قسمت عمده هزینه های پرورش را به خود اختصاص می دهد. در رابطه با رشد حیوان، آگاهی از مکانیسم پروتئین دار جیره مواد غذایی موجب افزایش بازدهی آن و بهبود ضریب تبدیل مواد غذایی می شود. متیونین که از اجزاء گران قیمت جیره غذایی محسوب می شود، یکی از اسیدهای آمینه مهم و ضروری است که در ساختار پروتئین ها یافت می‌شود و در جایی که سویا ترکیب اصلی پروتئین دار جیره باشد، متیونین اولین اسید آمینه محدود کننده محسوب می‌شود که اغلب به میزان اندکی در منابع گیاهی یافت می‌شوند (Parvin *et al.*, 2010)، به همین دلیل به صورت مکمل به جیره افزوده می‌شود. این اسیدآمینه درساخت کارنیتین و کراتین نقش مهمی را بر عهده دارد. متیونین پیش ساز اسیدهای آمینه سولفوری سیستئین، تورین و گلوتاتیون می‌باشد و در واکنش های ترانس متیلاسیون به عنوان دهنده گروه میتل از اهمیت زیادی برخوردار است (Sekiz *et al.*, 1975). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که استفاده از مکمل متیونین ترکیب اسیدهای آمینه جیره را بهبود می‌بخشد و موجب ساخت پروتئین‌های بیشتری در ماهیجه ها و کاهش ذخیره چربی می شود (Bomgaardt & Baker, 1973).

از طرف دیگر تحقیقات گذشته نشان داده است که ژن هورمون رشد شبه انسولین (IGF-1) با صفت رشد در گونه های مختلف حیوانی در رابطه می باشد، لذا بررسی نحوه تعامل این ژن و متیونین جیره موجب درک بهتر پروسه رشد و عوامل موثر بر آن خواهد شد (Guernec *et al.*, 2003). مواد مغذی ممکن است رشد عضلات را به طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق اثر بر فاکتور های تنظیمی کنترل کنند. سیستم عصبی و غدد درون ریز به عنوان هماهنگ کننده متابولیسم بدن عمل می‌کنند، بنابراین نقش مهمی در تنظیم رشد حیوان دارند. هورمون هایی مثل هورمون رشد، هورمون رشد شبه انسولین (IGF-1)، هورمون های تیروئیدی و انسولین نقش های مهم و مختلفی در رشد حیوانات دارند. هورمون-

های IGF تنظیم کننده های مهمی در تحریک رشد، تحریک طویل سازی آمینو اسید، متابولیسم گلوکز، سنتز DNA، سنتز پروتئین و تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول محسوب می‌شوند (McMurtry *et al*., 1997; Scanes *et al*., 1999; McMurtry, 1998; Zhou *et al*., 2005).

کبد منبع اصلی تولید و ترشح IGF-1 سرم خون است (Mathews *et al*., 1986). فعالیت IGF-1 در بدن به صورت اندوکرین، پاراکرین و اتوکرین می‌باشد (Velloso, 2008). تحقیقات نشان داده است که IGF-1 پاراکرین برای رشد ماهیچه مهمتر از IGF-1 اندوکرین می‌باشد (Yakar *et al*., 1999; Sjogren *et al*., 1999; Butler, 2001). مطالعات گذشته همچنین نشان می دهد که میزان ضریب تبدیل مواد غذایی در حیوانات ممکن است تحت تاثیر میزان تغییر در فعالیت پمپ سدیم –پتاسیم، بیان ژن های زنجیره انتقال الکترون و غلظت هورمون‌های مهمی مانند IGF-1 و هورمون رشد، تیروکسین، تریدوتیرونین و کورتیکواسترون باشد. این تغییرات ممکن است مصرف غذا و متابولیسم پایه را تحت تاثیر قرار دهند و مصرف انرژی بدن را تغییر دهند (Rosebrough & McMurtry, 1993; Yunianto *et al*., 1997; Johnson *et al*., 2003; Bottje & Carstens, 2009).

لازم به ذکر است که ارتباط مستقیمی بین سطح هورمون رشد و سرعت رشد در جوجه ها وجود ندارد (Beccavin *et al*., 2001). بنابراین مطالعه فاکتور های رشد شبه انسولین به عنوان واسطه فعالیت هورمون رشد مهم می‌باشد (Lei *et al*., 2005). در پژوهشی Gasparino *et al*. (2012) سطوح مختلف گلیسرول ٤ و ۸ درصد جایگزین ذرت جیره را در بلدرچین ژاپنی در ۳۵ روزگی بررسی کردند و میزان بیان mRNA هورمون رشد (GH) و هورمون رشد شبه انسولین (IGF-1) را در بافت سینه با استفاده از تکنیک Real Time PCR اندازه گیری کرده و نشان دادند که میزان بیان این دو ژن در زمانی که پرنده ۸ درصد گلیسرول در مقایسه با ٤ درصد گلیسرول دریافت کرده کاهش پیدا کرده است. همچنین Carew *et al*., (2003) اثرات کمبود متیونین (۰/۲، ۰/۳ و ۰/٤٪) بر سطوح پلاسمایی هورمون های تیروئید، فاکتور رشد شبه انسولین و وزن کبد و بدن مرغ بررسی کرده و نشان دادند که سطح IGF-1 پلاسما در جوجه‌هایی که متیونین کمتری دریافت کردند پایین‌تر بوده است، اما ارتباط بین میزان متیونین جیره و میزان بیان ژن IGF-1 در بلدرچین ژاپنی تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا هدف از تحقیق حاضر مطالعه این موضوع می‌باشد.

مواد و روش ها

در این تحقیق و به منظور بررسی اثر محدودیت متیونین بر میزان بیان ژن IGF-1 تعداد ۲۰۰ قطعه بلدرچین ژاپنی یکروزه استفاده شد. جوجه بلدرچین ها تا سن یک هفتگی تحت شرایط کاملا یکسان نگهداری شدند. در این مدت از جیره غذایی مطابق با جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- ترکیبات جیره‌های آزمایشی (بر حسب درصد).

Table 1- Compositions of experimental diets (%).

ترکیب جیره diet composition	جیره الف Diet A	جیره ب Diet B
ذرت Corn	45.6	45.60
سبوس گندم Wheat bran	2.00	2.00
کنجاله سویا Soybean meal	45.8	45.66
روغن گیاهی Plant oil	13.70	3.70
صدف Oyster Shell	1.30	1.30
دی کلسیم فسفات DCP	0.75	0.75
نمک Salt	0.35	0.35
مکمل متیونین Methionine supplement	0.00	0.135
مکمل ویتامین Vitamin supplement	0.25	0.25
مکمل مواد معدنی Mineral supplement	0.25	0.25
ترکیب مواد مغذی بر حسب درصد Nutritional composition (%)		
انرژی (کیلو کالری در کیلوگرم) Energy (Kcal/kg)	2897	2901
پروتئین(٪) Protein (%)	24	24
لیزین(٪) Lysine (%)	1.36	1.36
متیونین(٪) Methionine (%)	0.37	0.5
متیونین + سیستئین(٪) Methionine +Cysteine (%)	0.76	0.89
کلسیم(٪) Calcium (%)	0.81	0.81
فسفر(٪) Phosphorous (%)	0.31	0.31
سدیم(٪) Sodium (%)	0.15	0.15

هر کیلوگرم مکمل ویتامین شامل: ویتامین **A** (۳۵۰۰۰۰۰ واحد بین المللی)، ویتامین **D3** (۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی)، ویتامین **E** (۹۰۰۰ واحد بین‌المللی)، ویتامین **K3** (۱۰۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین **B1** (۹۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین **B2** (۳۳۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین **B3** (۵۰۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین **B5** (۱۵۰۰۰میلی‌گرم) ویتامین **B6** (۱۵۰ میلی‌گرم)، ویتامین **B9** (۵۰۰ میلی‌گرم)، ویتامین **B12** (۷/۵ میلی‌گرم)، کولین (۲۵۰۰۰۰ میلی‌گرم). هر کیلوگرم مکمل مواد معدنی شامل: مس (۵۰۰۰ میلی‌گرم)، روی (۵۰۰۰۰ میلی‌گرم)، منگنز (۵۰۰۰۰ میلی‌گرم)، آهن (۲۵۰۰۰ میلی‌گرم)، ید (۵۰۰ میلی‌گرم)، سلنیوم (۱۰۰ میلی‌گرم).

در این جیره متیونین به اندازه مورد نیاز و مطابق با توصیه های جداول احتیاجات مواد غذایی استفاده شد (NRC,۱۹۹٤). در پایان یک هفتگی این پرندگان به صورت تصادفی به دو گروه مختلف تقسیم شدند. برای بلدرچین های گروه اول از جیره غذایی الف با محدودیت متیونین استفاده شد به طوری که مکمل متیونین از این جیره حذف شده بود و گروه ب مشابه هفته اول (با مکمل متیونین) تغذیه شدند. این پژوهش در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد. لازم به ذکر است که این تحقیق در ایستگاه پرورش طیور بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان اجرا شد.

به منظور بررسی بیان ژن IGF-1 در عضله سینه بلدرچین ژاپنی در سن ۲٤ روزگی تعداد ۲۰ قطعه بلدرچین نر (۱۰ تکرار در هر گروه) بعد از وزن کشی کشتار شدند. پس از کشتار در آزمایشگاه تحت شرایط استریل، قطعات کوچکی از بافت سینه هر پرنده توسط تیغ استریل جدا گردیده و در داخل میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری عاری از RNase قرار داده شد و سریعا به داخل تانک ازت فرستاده شدند. پس از جمع آوری بافت سینه هر پرنده، نمونه ها به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل و تا زمان انجام آزمایشات مربوطه در آنجا نگهداری شدند و سپس پوست و گوشت از بدن پرنده ها جدا گردید و صفات استخوان های ران، درشت نی و بازو شامل طول استخوان بازو، طول استخوان ران، طول استخوان درشت نی، ضخامت استخوان بازو، ضخامت استخوان ران، ضخامت میانی استخوان درشت نی با استفاده از کولیس و وزن استخوان بازو، وزن استخوان ران و وزن استخوان درشت نی با استفاده از ترازوی دقیق اندازه گیری شدند.

استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیوبیسیک کانادا) صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز[۱] و UV اسپکتروفتومتری[۲] مورد ارزیابی قرار گرفت RNA . استخراج شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. ساخت cDNA از روی رشته RNA الگو با آنزیم نسخه بردار معکوس[۳] انجام شد. لازم به ذکر است که در طی مراحل سنتز cDNA همه مواد روی یخ نگهداری و جا به جا شدند. cDNA ی حاصل در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای طراحی آغازگرهای مورد نظر (جدول ۲) از سایت www.ncbi.com و نرم افزار gene runner استفاده شد. آغازگرها با واسطه شرکت تکاپوزیست توسط شرکت bioneer ساخته و ارسال شدند.

---

۱. Agarose gel electrophoresis
۲. UV spectrophotometry
۳. Transcriptase Reverse

جدول ۲- توالی الیگونوکلئوتیدی جفت آغازگر های استفاده شده برای بیان ژن.

Table 2- Oligonucleotide primer pairs used for gene expression

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer sequence		*طول قطعه تکثیری* Amplicon size (bp)
ژنIGF-1 IGF-1 Gen	آغاز گر رفت Sense Primer	5'-CACCTAAATCTGCACGCT-3'	139
	آغازگر برگشت Antisense Primer	5'-CTTGTGGATGGCATGATC 3′	
ژن β-actin β-actin Gene	آغاز گر رفت Sense Primer	5'-ACCCCAAAGCC AACAGA-3'	136
	آغازگر برگشت Antisense Primer	5'-CCAGAGTCCATCACAATACC-3'	

برای تکثیر ژن مورد نظر و تعیین دمای اتصال آغازگر به رشته های DNA هدف واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام شد. در این تحقیق از ژن β-actin به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برای تکثیر ژن IGF-1 و β-actin، دناتوراسیون اولیه ۹٤ درجه سانتی گراد برای ٤ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه ۹٤ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، سنتز اولیه ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، ۳۵ سیکل تکرار مراحل ۲-٤ و سنتز نهایی۷۲ درجه سانتی گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد. برای بررسی میزان نسبی بیان ژن IGF-1 از واکنش Real time PCR به روش Syber green (تاکارا) استفاده شد. کیت سایبرگرین شامل مسترمیکس حاوی Taq، Mgcl2 ، dNTPs ، RNase H، سایبرگرین و ROX بود.

جهت انجام واکنش ٤/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۷/۵ میکرولیتر SayberPermixTaq II و ۰/۳ میکرولیتر ROX به همراه ۰/۵ میکرولیتر آغازگر رفت، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت و مقدار ۱/۵ میکرولیتر cDNA الگو در میکروتیوپ ۰/۲ با هم مخلوط شدند. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن ۳۰۰۰ قرار داده شد. برای ژن IGF-1 و β-actin، واسرشت اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ٤۵ ثانیه، واسرشت ثانویه ۹۵ درجه سانتیگراد ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۷ درجه سانتیگراد ٦۰ ثانیه، ٤۵ سیکل تکرار مراحل ۲-٤ وگسترش در دمای۷۲ درجه سانتی گراد ٤۰ ثانیه و در مرحله ذوب افزایش دما از ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتیگراد انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده های حاصل از Real time PCR از روش Pffafl استفاده شد. در این روش

برای بررسی درصد بازده واکنش PCR ابتدا نمودار استاندارد برای ژن های IGF-1 و β-actinترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد غلظت های مختلف cDNA (۱، ۱۰/۱، ۱۰۰/۱، ۱۰۰۰/۱) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن های IGF-1 و β-actin نزدیک به ۱۰۰ درصد برآورد شد. در ادامه بر روی نمونه-های تیمار شده و نرمال واکنش های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول زیر محاسبه گردید (pfaffl *et al.*, 2002).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target(control-sample)}}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref(control-sampl)}}}$$

در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. ΔCt حاصل تفریق Ct[1] (حد آستانه) ژن IGF-1 از Ct ژن β-actin می-باشد.

داده های حاصل از این تحقیق با استفاده از مدل زیر و توسط نرم افزار ASReml آنالیز شدند: $y_{ij}=\mu+\alpha_{i+}e_i$

در این مدل y_{ij} هر کدام از مشاهدات، μ میانگین جامعه، α_i اثر i امین سطح متیونین و e_{ij} اثرات خطای آزمایش می باشند.

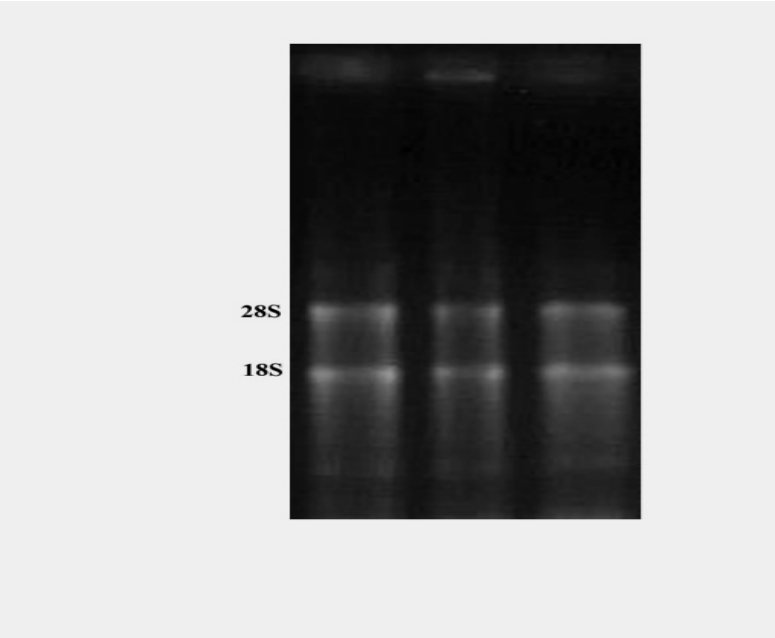
نتایج و بحث

اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین ۱/۷۷–۱/۹ بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده می‌باشد و وجود دو باند 18S و 28S در rRNA نشان دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن می‌باشد (شکل ۱). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (IGF-1) و کنترل (β-actin)، واکنش PCR شیب دمایی[2] انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۵۷°C) انتخاب گردید. بعد از انجام واکنش، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز (۲ درصد) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده تک باند در محدوده ی ۱۳۹bp برای برای ژن IGF-1 و در محدوده ی ۱۳٦bp برای ژن بتا اکتین در مورد همه‌ی نمونه ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر می‌باشد. در طی انجام واکنش دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد. برای منحنی تکثیر همه نمونه ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است.

منحنی ذوب ژن IGF-1 و β-actin، اختصاصی بودن و دمای Tm محصول (دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته ای خارج شده است) واکنش Real Time PCR این دو ژن را نشان می دهد (شکل ۲).

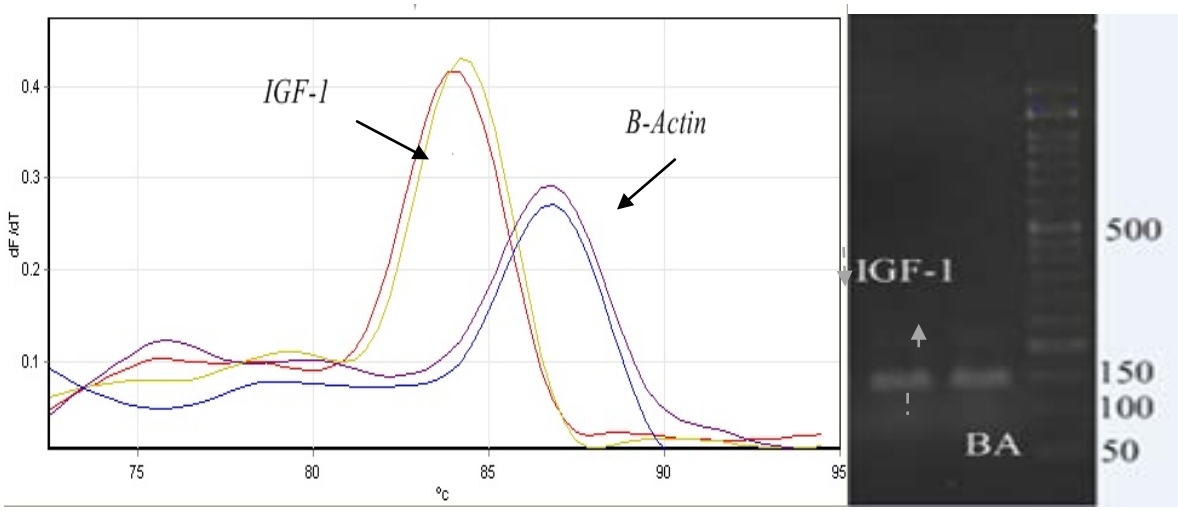
۵.cycle threshold

٦.Gradiant



شکل ۱- نمونه هایی از کیفیت RNA استخراج شده.

Figure 1- Samples of RNA extracted quality.



شکل ۲- منحنی ذوب محصول ژن IGF-1 و β-actin حاصل از واکنش Real Time PCR، سایز DNA مارکر ۵۰ جفت بازی است.

Figure 2- Melting curve of IGF-1 and β-actin gene production using Real Time PCR, DNA marker was 50 bp.

بعد از تکثیر نهایی با گرمادهی در دمای ۷۲-۹۵ درجه سانتی گراد به تدریج DNA دو رشته ای که در واقع محصول واکنش PCR ژن IGF-1 و β-actin می‌باشد، باز و تک رشته ای شدند و همزمان با این اتفاق مولکول های رنگ سایبرگرین نیز از این محصول جدا گردیدند. منحنی ذوب نشان داد که دمای ذوب (Tm)[۱] محصول ژن IGF-1 و β-actin حدود ۸٤ و ۸٦/۵ درجه سانتی گراد می‌باشد. همچنین وجود تنها یک قله در منحنی ذوب ژن IGF-1 و β-actin نشان دهنده این مطلب است که محصول PCR این دو به صورت اختصاصی تکثیر شده است. برای اطمینان بیشتر از اختصاصی بودن ژنIGF-1 و β-actin، محصول PCR به دست آمده روی ژل آگارز ۲ درصد برده شد و تک باند اختصاصی حدود ۱۳٦bp برای β-actin و ۱۳۹bpبرای ژن IGF-1 به دست آمد (شکل ۲).

میزان بیان ژن IGF-1 که در دو گروه بلدرچین مورد بررسی شامل گروه تغذیه شده با جیره الف (جیره ای بدون مکمل متیونین) و گروه تغذیه شده با جیره ب (جیره ای با مکمل متیونین) اندازه گیری شد به ترتیب برابر با ۱۹/۱ و ٤/۹۵ AU بود. این نتایج نشان می دهد که محدودیت متیونین جیره بطور معنی داری ($P<۰/۰۵$) موجب افزایش میزان بیان ژن IGF-1 شده است، به طوری که بیان این ژن در این بلدرچین ها سه برابر بیشتر از گروه مقابل می باشد (شکل ۲). در این ارتباط گزارشی از تحقیقات قبلی برای مقایسه یافت نشد. در تحقیق حاضر وزن بدن بلدرچین ها در زمان کشتار (نمونه گیری) نیز اندازه گیری شد. متوسط وزن بدن در بلدرچین های گروه الف و ب به ترتیب ۹٤/۸ و ۱۰۰ گرم بود (جدول ۳). این تفاوت وزن از نظر آماری معنی دار نبود. متیونین اسید آمینه ضروری و پیش ساز پروتئین درجیره طیور محسوب می‌شود. زمانی که این ماده اولیه برای سنتز پروتئین در دسترس نباشد، احتمالا سیستم غدد درون ریز بدن برای جبران این کمبود در بلدرچین هایی که به دلیل تغذیه با جیره بدون مکمل متیونین دچار کاهش رشد شده اند، ترشح هورمون رشد شبه انسولین (IGF-1) را از بافت ماهیچه سینه افزایش می‌دهد تا پروتئین سازی را بیشتر تحریک کند و بدن بتواند با استفاده از متیونینی که از دیگر اجزاء جیره در دسترس است برای ساخت پروتئین ماهیچه ها استفاده کند. یکی از تاثیرات هورمون IGF-1 تحریک رشد استخوان می‌باشد. لذا در تحقیق حاضر صفات مختلف استخوان در بلدرچین های مورد بررسی اندازه گیری شدند. نتایج حاصله نشان داد که با وجود تفاوت در میزان متیونین جیره در دو گروه مورد بررسی، بین صفات مختلف استخوان آنها تفاوت معنی داری وجود ندارد (جدول ۳). امکان دارد بیان بیشتر ژن IGF-1 در بلدرچین های با محدودیت متیونین موجب جبران رشد استخوان ها در این پرندگان شده باشد.

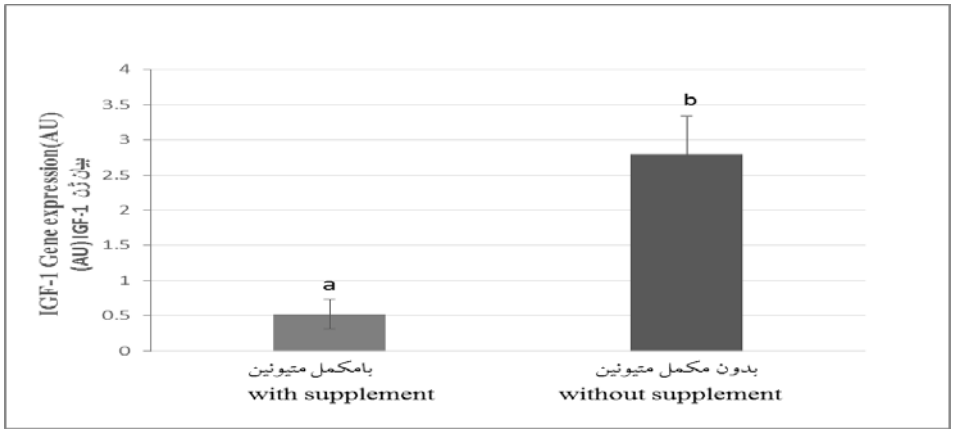
۷.Temperature melting

جدول ۳- میانگین حداقل مربعات وزن بدن و صفات استخوان در بلدرچین ژاپنی در دو جیره غذایی مختلف.

Table 3- least square means and standard errors of body weight and bone characteristics of Japanese quail in the two different diets.

Diet جیره		
Diet B [۲] جیره ب	Diet A [۱] جیره الف	متغیرها
[a] 100±6.85	[a] 94.8±6.85	Body weight وزن بدن
		Bone Trait صفات استخوان
[a] 32.80±1.09	[a] 34.8±1.04	Humerus length طول استخوان بازو
[a] 2.87±0.08	[a] 2.84±0.08	Humerus diameter ضخامت استخوان بازو
[a] 0.23±0.02	[a] 0.24±0.02	Humerus weight وزن استخوان بازو
[a] 34.50±0.99	[a] 35.30±0.94	Tibia length طول استخوان درشت نی
[a] 2.80±0.12	[a] 2.68±0.11	Tibia diameter ضخامت استخوان درشت نی
[a] 0.17±0.02	[a] 0.20±0.02	Tibia weight وزن استخوان درشت نی
[a] 42.16±1.2	[a] 43.30±1.14	Femur length طول استخوان ران
[a] 2.44±0.11	[a] 2.47±0.11	Femur diameter ضخامت استخوان ران
[a] 0.24±0.02	[a] 0.24±0.02	Femur weight وزن استخوان ران

aa. میانگین های با حروف مشابه دارای اختلاف معنی داری نمی باشند، **ab**: میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری می باشند، ۱: جیره بدون مکمل متیونین، ۲: جیره محتوی مکمل متیونین.



شکل ۳- اثر محدودیت متیونین بر میزان بیان ژن IGF-1 در ماهیچه سینه بلدرچین ژاپنی (ab: میانگین های با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری می باشند).

Figure 3- Effect of methionine restriction on IGF-1 gene expression in breast muscle of Japanese quail.

بررسی مطالعات گذشته نشان می دهد مکانیسم عمل متیونین و IGF-1 در رابطه با رشد بدن و استخوان ها در بلدرچین تا کنون مورد بررسی قرار نگرفته است. در تحقیق حاضر در هر دو جیره مورد استفاده متیونین وجود دارد. مقدار متیونین در جیره الف و ب به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۵۰ درصد می باشد. بعبارت دیگر در جیره الف نیز که در آن مکمل متیونین حذف شده متیونین وجود دارد. منبع این متیونین سایر اجزاء جیره می‌باشد.همانگونه که قبلا ذکر شد محدودیت متیونین در جیره الف موجب کاهش رشد بدن در بلدرچین ها می‌شود. IGF-1 تنظیم کننده‌ی مهمی در تحریک رشد، تحریک طویل سازی آمینو اسید (Zhou *et al.*, 2005) سنتز پروتئین و تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول محسوب می‌شود (McMurtry *et al.*, 1997; Scanes *et al.*, 1999). لذا با توجه به نقش IGF-1 در رشد بدن، پایین بودن مقدار متیونین جیره و به طبع آن کاهش میزان رشد، به تنهایی و یا بصورت توام می توانند از عوامل افزایش بیان ژن محسوب شوند. به عبارت دیگر بدن برای استفاده حداکثری از متیونین موجود، بیان این ژن را افزایش می دهد. این افزایش، رشد استخوان ها را با توجه به متیونین موجود متعادل می سازد اما کمبود متیونین در سطحی است که علی رغم افزایش بیان ژن، رشد بدن کاهش می یابد لذا افزایش وزن بدن تنها توسط ژن IGF-1 کنترل نمی‌شود و نمی توان میزان متیونین مورد نیاز را بر حسب بیان این ژن تعیین نمود. متیونین از اجزاء گران قیمت جیره بلدرچین می باشد. لذا بایستی سطح متیونین جیره را به گونه ای حداقل نمود که بتوان بازدهی حداکثری آن را با افزایش بیان ژن IGF-1 فراهم نمود به گونه ای که همانند رشد استخو ان ها، رشد مناسب بدن نیز تامین گردد. این موضوع لازم است در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

منابع

Bani Asadi M (1996). Quail and it nutrition. Journal of animal feed 14: 36-39.

Beccavin C, Chevalier B, Cogburn LA, Simon J, Duclos MJ (2001). Insulin-like growth factors and body growth in chickens divergently selected for high or low growth rate. Journal of Endocrinology 168: 297–306.

Bomgaardt J, Baker DH (1973). Effect of age on the lysine and sulfur amino acid requirement of growing chickens, Poultry Science 52: 592–597.

Bottje WG, Carstens GE (2009). Association of mitochondrial function and feed efficiency in poultry and livestock species. Journal of Animal Science 87: E48-E63.

Butler AA, LeRoith D (2001). Minire view: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1rgenes and their roles in insulin-like growth factor physiology. Journal of Endocrinology 142: 1685–8.

Carew LB, McMurtry JP, Alster FA (2003). Effects of Methionine Deficiencies on Plasma Levels of Thyroid Hormones, Insulin-like Growth Factors-I and -II, Liver and Body Weights, and Feed Intake in Growing Chickens. Poultry Science 82: 1932–1938.

Emami Meybodi, MA (1994). Quail farming in Bangladesh. Journal of research and development 30: 132 – 134.

Gasparino EOA, Liveira Neto R, Del Vesco AP, Pires AV, Batista E, Voltolini DM, Souza KRS (2012). Expression of growth genes in response to glycerol use in Japanese quail diets. Genetics and Molecular Research 11 (3): 3063-3068

Genchev G, Mihaylova S, Ribarski A, Pavlov M, Kabakchie V (2008). Meat quality and composition in Japanese quails. Trakia Journal of Sciences 6: 25-29.

Guernec A, Berri C, Chevalier B, Wacrenier-Cere N, Bihan-Duval ELe, Duclos MJ (2003). Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. Growth Hormone & IGF Research 13: 8–18.

Johnson DE, Ferrell CL, Jenkins TG (2003). The history of energetic efficiency research: Where have we been and where are we going? Journal of Animal Science 81: 27-38.

Lei MM, Nie QH, Peng X, Zhang DX, Zhang, Q (2005). Single nucleotide polymorphisms of thechicken insulin-like factor binding protein2 gene associated with chicken growth and carcass traits. Poultry Science 84: 1191–1198.

Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD (1986). Regulation of insulin likegrowth factor I gene expression by growth hormone. Proceedings of the National Academy of science of the USA 83: 9343–9347.

McMurtry JP, Francis GL, Upton Z (1997). Insulin-Like Growth Factors in Poultry. Domestic Animal Endocrinology 14(4): 199-229.

McMurtry JP (1998). Nutritional and developmental roles of insulin-like growth factors in poultry. Journal of Nutrition 128: 302-307.

National Research Council (1994). Nutrient Requirements of Poultry, 9th edition National Academy Press. Washington. D.C.

Oguzet I, Altan O, Kirkpinar F, Settar P (1996). Body weights, carcass characteristics, organ weights, abdominal fat, and lipid content of liver and carcass in two lines of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica), unselected and selected for four-week body weight. British Poultry Science 37: 579-588.

Parvin R, Mandal AB, Singh SM, 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 MW, Horgan GW, 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**:** e36.

Rath NC, Huff GR, Huff WE, Balog JM (2000). Factors Regulating Bone Maturity and Strength in Poultry. Poultry Science 79: 1024–1032.Rosebrough RW, McMurtry JP (1993). Protein and energy relationships in the broiler chicken. Effects of protein quantity and quality on metabolism. British Journal Nutrition 70: 667-678.

Scanes CG, Proudman JA, Radecki SV (1999). Influence of continuous growth hormone insulin-like growth factor I administration in adult female chickens. General and Comparative Endocrinology 114: 315–323.

Sekiz SS, Scott ML, Nesheim MC (1975). The effect of methionine deficiency on body weight, food and energy utilization in the chick. Poultry Science 54: 1184–1188.

Sharifi M, Shams M, Dastar B, Hassani S (2011). Evaluation of dietary protein levels on the performance of some economic factors of production in Japanese quail. 4th Congress of Animal Sciences. Volume 4, Karaj, Iran 88-90.

Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V (1999). Liver derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. Proceedings of the National Academy of science. USA 96:70–92.

Velloso, CP (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. British Journal of Pharmacology 154: 557–56.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. Proceedings of the National Academy of science. USA 96: 7324–9.

Yunianto VD, Hayashi K, Kaneda S, Ohtsuka A (1997). Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. British Journal Nutrition 77: 897-909.

Zhou H, Mitchell AD, McMurtry JP, Ashwell CM, Lamont SJ (2005). Insulin-like growth factor-I Gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. Poultry Science 84: 212−219

Effect of Methionine Restriction on IGF-1 Gene Expression in Breast Muscle of Japanese Quail

Rostamzade E.[1], Asadi Fozi M.[*2], Esmailizadeh A. K.[3] , Asadi M.H.[4]

[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

[2]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

[3]Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

[4]Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Environmental Sciences. Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

Abstract

In the present study to investigate the effect of dietary methionine restriction on IGF-1 gene expression in breast muscle of Japanese quail, 200 pieces of the birds were randomly divided into two different dietary groups containing recommended methionine supplement and without the methionine supplement. IGF-1 gene expression levels were measured using the Real time PCR techniques in breast muscle of the Japanese quail at 24 days of age. Also in this age, the body weight and bone characteristics such as Femur, Humorous and tibia were recorded. The results indicate that IGF-1 gene expression significantly increased when the methionine supplement was removed from the diet ($P<0.05$) while the body weight was decreased No significant difference was found between the two groups for the bone characteristics.

Keywords: *IGF-1Gene expression, Methionine, Japanese quail.*

[*] Corresponding Author: Asadi Fozi M. Tel: 03431322692 Email: masadi@uk.ac.ir