فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۱ ص. ۸۰-۷۱

مقاله پژوهشی

تاثیر استفاده از محصولات تجاری فیتاز بر بیان ژن IGF1 در بافت کبدی جوجه‌های گوشتی

کیان پهلوان افشاری[۱*]، علی اسماعیل پور[۲]، حمیدرضا سید آبادی[۳]

[۱] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران

[۲] گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران

[۳] موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): kianpahlevanafshar@gmail.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۱

DOI:10.30495/JDB.2022.1963785.1320 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.7.1

چکیده

میزان عامل رشد شبه انسولین (IGF) توسط محرک‌های مختلف مانند هورمون‌ها، عوامل رشد و شرایط تغذیه‌ای تنظیم می شود. در مطالعه‌ی حاضر، تاثیرسطوح مختلف آنزیم های فیتاز بر بیان ژن IGF-1 در بافت کبدی جوجه های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش با ۷ تیمار، ۵ تکرار و ۲۵ قطعه جوجه در هر تکرار انجام گردید. جیره‌های آزمایشی شامل جیره شاهد که فسفر مورد نیاز آن توسط دی کلسیم فسفات تامین می‌شد و جیره‌های حاوی آنزیم‌های مختلف فیتاز میکروبی تجاری بر پایه ذرت و سویا مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی بیان ژن IGF-1 ابتدا کل RNA از بافت کبد استخراج و پس از ساخت cDNA، میزان بیان ژن با استفاده از تکنیک Real time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن IGF-I در سطوح مختلف فیتازها اختلاف معنی داری را بین تیمارها نشان داد. بیان ژن IGF-I در تیمار ۱و۲ شامل فیتاز هوستازیم و فیزایم ۵۰ درصد کمترین میزان بیان و تیمار ۶ با فیتازهای هوستازیم و رونوزایم ۱۰۰ درصد بیشترین میزان بیان را نشان داد. افزایش میزان فیتازها باعث افزایش بیان IGF1-mRNA کبدی شده و می تواند متعاقبا عملکرد صفات رشد را نیز تحت تاثیر قرار دهد.

کلیدواژه‌ها: فیتاز، عامل رشد شبه انسولین، جوجه‌های گوشتی

مقدمه

بخش زیادی از فسفر در مواد گیاهی به شکل فیتات فسفریله است [۱]. فیتات حاوی ۱۲ پروتون قابل تجزیه و بسیار واکنش پذیر است که قادر به اتصال به اسیدهای آمینه، مواد معدنی و آنزیم‌های درون زا در محدوده pH اسیدی در سراسر دستگاه گوارش می‌باشد و در نتیجه جذب آمینو اسید و مواد معدنی توسط حیوان را کاهش داده و ترشحات درون زای هم اسیدهای آمینه و هم مواد معدنی را افزایش می‌دهد [۲]. تاثیرات جیره غذایی حاوی فیتات شامل کاهش عملکرد رشد، نقص در تغذیه و به دنبال آن کاهش مصرف مواد مغذی همراه با افزایش میزان

انرژی مورد نیاز است. اثرات ضد تغذیه ای فیتات در رژیم غذایی جوجه‌های گوشتی و محدود بودن قابلیت هضم فیتات در حیوانات تک معده ای مانند خوک، آبزیان و طیور به علت عدم وجود یا مقدار کم آنزیم فیتاز درقسمت‌های بالای دستگاه گوارش این حیوانات به خوبی مطالعه شده است. این امر منجر به عدم جذب سایر مواد معدنی، اسیدهای آمینه و پروتئین در دستگاه گوارش می‌شود [۳]. فسفر فیتاتی هضم نشده به وسیله میکروارگانیسم های روده کور به محیط آزاد شده و باعث آلودگی محیط می شود. فسفات‌ها در آب زیاد محلول نیستند، اما در خاک‌ها انباشته می‌شوند و در نهایت ممکن است به آب‌های جاری وارد شده و همراه با نیتروژن منجر به اوتروفیکاسیون[1] آب‌های سطحی شوند، شرایطی که برای جانوران آبزی مضر است. امروزه استفاده از فیتازهای میکروبی افزودنی به در جیره غذایی به عنوان ابزاری برای افزایش هیدرولیز فیتات، بهبود بخشیدن به مصرف فیتات و کاهش دفع فسفر رایج است [۴و۵]. کاهش تراکم مواد مغذی جیره و بهبود در دسترس بودن و جذب آنها در روده کوچک که با استفاده از فیتاز امکان پذیر شده است، به طور قابل ملاحظه‌ای دفع مواد مغذی را در مدفوع کاهش می‌دهد و در عین حال باعث کاهش هزینه‌های خوراک، بدون کاهش عملکرد رشد حیوانات و نیز کاهش بیشتر اثرات ضد تغذیه ای جیره‌های فیتات حاوی ترکیبات فسفر فیتات با مقادیر بالا، مانند کنجاله کآنولا، سبوس برنج بدون روغن یا کنجاله آفتابگردان می‌گردد [۶و۷]. رشد یک مکانیسم پیچیده است که توسط طیف گسترده ای از مسیرهای عصبی غدد تنظیم می‌شود و عملکرد رشد و صفات لاشه از ویژگی‌های اقتصادی بسیار مهم در تولید جوجه‌های گوشتی بوده و توسط مجموعه‌ای از ژن‌های پیچیده کنترل می‌شوند [۸]. تحقیقات استفاده از یک ژن کاندید را به عنوان تکنیکی قدرتمند برای بهبود ژنتیکی پرورش طیور که کارایی بهتری برای تشخیص صفات لازم بهبود عملکرد تولید داشته باشد، مطرح نموده است. ژن‌های هورمون رشد (GGH) و فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-I) مرغ از جمله این ژن‌های کاندید برای بهبود عملکرد رشد و ویژگی‌های کیفیت لاشه در جوجه‌ها هستند [۹]. IGF-I که به‌عنوان یکی از هورمون‌های غالب ضروری برای حمایت از رشد طبیعی در جوجه‌ها شناخته شده است، یک سیستم پیچیده از هورمون‌های پپتیدی است که به گیرنده فاکتور رشد شبه انسولین (IGFIR) متصل می‌شوند تا فعالیت‌های دامنه تیروزین کیناز ذاتی آنها را فعال کند [۱۰]. نشان داده شد که غلظت IGF-I به طور چشمگیری در جوجه‌های لاین با سرعت رشد بالا نسبت به جوجه‌های لاین با سرعت رشد پایین بالاتر بود. Zhou و همکاران [۱۱] و Amills و همکاران [۱۲] نیز گزارش دادند که پلی مورفیسم ژن IGF-I مستقیماً با سرعت رشد جوجه‌ها مرتبط است. بر اساس مطالعات صورت گرفته تاثیر فیتاز بر فاکتور رشد شبه انسولین، در دوزهای بالا و با آزاد کردن اینوزیتول فیتات همراه است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر فیتازهای تجاری میکروبی بر بیان ژن‌های IGF-I در جوجه‌های گوشتی سویه راس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محل اجرای آزمون

این تحقیق در موسسه تحقیقات علوم دامی کشور انجام شد.

– جوجه‌ها، تعداد قفس‌ها و گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه

در این آزمایش جوجه‌های گوشتی سویه راس با ۷ تیمار، ۵ تکرار و ۲۵ قطعه جوجه در هر تکرار مورد مطالعه قرار گرفتند. جوجه‌ها پس از تفریخ، وارد سالن شده و به مدت ۴۲ روز نگهداری شدند. جیره غذایی بر پایه ذرت و سویا بود. همه جوجه‌ها به طور آزاد به آب و جیره غذایی آزمایشی و نور به مدت ۲۴ ساعت دسترسی داشتند.

– جیره غذایی مورد مطالعه

جیره غذایی شامل دو قسمت فیتاز و شاهد بود که در جیره شاهد قسمت اعظم کلسیم و فسفر بواسطه دی کلسیم فسفات و در جیره فیتازی بواسطه فیتاز وارداتی و ساخت داخل تامین می‌شد. جیره آزمایشی در سه دوره ۱ تا ۱۴ روزگی تهیه شد (جداول ۱، ۲و ۳). برای هر FTU۵۰۰ فیتاز ۵۳ کیلوکالری انرژی و ۰/۱۲ درصد کلسیم و فسفر لحاظ گردید. جیره‌ها در سه مرحله آغازین، رشد و پایانی به صورت پلت تهیه شدند.

[1] Eutrophication

– مشخصات تیمارهای آزمایشی

فیتازهای میکروبی تجاری به نام‌های هوستازیم، فیزایم و رونوزایم از یک شرکت تجاری تهیه شد.

- جیره شاهد که فسفر مورد نیاز آن توسط دی کلسیم فسفات تامین می‌شد.
- جیره حاوی ۵۰۰ FTU فیتاز هوستازایم که ۵۰ درصد ارزش معادل تغذیه ای آن اعمال گردیده است (تیمار ۱).
- جیره حاوی ۵۰۰ FTU فیتاز فیزایم که ۵۰ درصد ارزش معادل تغذیه ای آن اعمال گردیده است (تیمار ۲).
- جیره حاوی ۵۰۰ FTU فیتاز رونوزایم که ۵۰ درصد ارزش معادل تغذیه ای آن اعمال گردیده است (تیمار ۳).
- جیره حاوی ۵۰۰ FTU فیتاز هوستازایم که ۱۰۰ درصد ارزش معادل تغذیه ای آن اعمال گردیده است (تیمار ۴).
- جیره حاوی ۵۰۰ FTU فیتاز فیزایم که ۱۰۰ درصد ارزش معادل تغذیه ای آن اعمال گردیده است (تیمار ۵).
- جیره حاوی ۵۰۰ FTU فیتاز رونوزایم که ۱۰۰ درصد ارزش معادل تغذیه ای آن اعمال گردیده است (تیمار ۶).

جدول ۱- اجزا (درصد) و ترکیب جیره آزمایش در دوره ۱۴-۰ روزگی.

جیره غذایی	شاهد	فیتاز	فیتاز
سطح فیتاز در کیلو گرم جیره(FTU)	۰	۵۰۰	۵۰۰
ماتریس اعمال شده		۵۰ درصد	۱۰۰ درصد
ذرت	۵۳۹/۹	۵۶۵/۲۵	۵۶۹/۵۵
کنجاله گلوتن ذرت	۲۰	۲۰	۲۰
سویا	۳۶۳/۳	۳۵۷	۳۵۵
جوش شیرین	۲/۵	۲/۵	۲/۵
دي کلسیم فسفات	۲۱	۱۳/۷	۱۲/۵
نمک	۱/۲	۱/۲	۲/۱
مکمل معدني *	۲/۵	۲/۵	۲/۵
مکمل ویتامینی*	۲/۵	۲/۵	۲/۵
متیونین	۲/۹	۲/۸	۲/۸
لیزین	۲/۶	۲/۶	۲/۷
روغن	۱۸	۷	۴
بنتونیت	۱۰	۱۰	۱۰
صدف	۱۲/۷	۱۲	۱۳/۸
فیتاز	۰	۰/۰۵	۰/۰۵
جمع	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
انرژي قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۲۸۶۲	۲۸۶۲	۲۸۷۰
پروتئین خام(%)	۲۲	۲۲/۱	۲۲/۱
لیزین قابل هضم(%)	۱/۲۶	۱/۲۶	۱/۲۶
متیونین+سیستین(%)	۰/۹۴	۰/۹۴	۰/۹۴
ترئونین قابل هضم(%)	۰/۸۴	۰/۸۴	۰/۸۴
آرژنین قابل هضم(%)	۱/۳۷	۱/۳۷	۱/۳۷
والین قابل هضم(%)	۱	۱	۱
کلسیم(%)	۱/۰۵	۱/۰۵	۱/۰۵
فسفر قابل دسترس(%)	۰/۵	۰/۵	۰/۵
فسفر کل(%)	۰/۷۶	۰/۶۴	۰/۶۲
تعادل آنیون و کاتیون	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰

* مقدار مواد معدنی و ویتامین‌ها در هر کیلوگرم جیره: ۲ /۹۹ میلی‌گرم منگنز، ۸۵ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۳ میلی‌گرم ید، ۴۴۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۷۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۴۴۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۴۰ میلی‌گرم ویتامین K، ۷۰ میلی‌گرم کوبالامین، ۶۵ میلی‌گرم تیامین، ۳۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۲۹۰ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۲۰ میلی‌گرم نیاسین ، ۶۵ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۲۲ میلی‌گرم بیوتین و ۲۷۰ میلی‌گرم کولین کلراید

جدول ۲- جیره آزمایش در دوره ۲۸-۱۵ روزگی.

جیره غذایی	شاهد	فیتاز	فیتاز
سطح فیتاز در کیلو گرم جیره(*FTU*)	۰	۵۰۰	۵۰۰
ماتریس اعمال شده		۵۰ درصد	۱۰۰ درصد
ذرت	۵۵۰	۵۵۷/۷۹	۵۷۸/۷۵
سویا	۳۶۷	۳۶۵	۳۶۰
جوش شیرین	۲/۵	۲/۵	۲/۵
دي کلسیم فسفات	۱۸/۲	۱۳/۸	۹/۵
نمک	½	۲/۱	½
مکمل معدني	۲/۵	۲/۵	۲/۵
مکمل ویتامینی	۲/۵	۲/۵	۲/۵
متیونین	۲/۲	۲/۲	½
لیزین	۰/۶	۰/۵۶	۰/۵
روغن	۲۷/۲	۲۵	۱۳
بنتونیت	۱۵	۱۵	۱۵
صدف	۱۰/۲	۱۱	۱۱/۵
فیتاز	۰	۰/۰۵	۰/۰۵
جمع	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
انرژي قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۲۹۰۰	۲۹۰۰	۲۹۰۰
پروتئین خام(%)	۲۰/۸	۲۰/۸	۲۰/۸
لیزین قابل هضم(%)	۱/۱۱	۱/۱۱	۱/۱۱
متیونین+سیستین(%)	۰/۸۴	۰/۸۴	۰/۸۴
ترئونین قابل هضم(%)	۰/۸۱	۰/۸۱	۰/۸۱
آرژنین قابل هضم(%)	۱/۳۵	۱/۳۵	۱/۳۵
والین قابل هضم(%)	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۹۵
کلسیم(%)	۰/۹	۰/۹	۰/۹
فسفر قابل دسترس(%)	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵
فسفر کل(%)	۰/۷۲	۰/۶۳	۰/۵۵
تعادل آنیون و کاتیون	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰

* مقدار مواد معدنی و ویتامین‌ها در هر کیلوگرم جیره: ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۸۵ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۳ میلی‌گرم ید، ۴۴۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۷۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۴۴۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۴۰ میلی‌گرم ویتامین K، ۷۰ میلی‌گرم کوبالامین، ۶۵ میلی‌گرم تیامین، ۳۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۲۹۰ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۲۰ میلی‌گرم نیاسین ، ۶۵ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۲۲ میلی‌گرم بیوتین و ۲۷۰ میلی‌گرم کولین کلراید

جدول ۳- جیره آزمایش در دوره ۴۲-۲۹ روزگی.

جیره غذایی	شاهد	فیتاز	فیتاز
سطح فیتاز در کیلو گرم جیره(FTU)	۰	۵۰۰	۵۰۰
ماتریس اعمال شده		۵۰ درصد	۱۰۰ درصد
ذرت	۶۰۰	۶۱۰	۶۳۱/۶۵
سویا	۳۱۸/۸	۳۱۴/۸۵	۳۱۰
جوش شیرین	۲/۵	۲/۵	۲/۵
دي کلسیم فسفات	۱۷	۱۲/۶	۸/۵
نمک	½	۲/۱	½
مکمل معدني	۲/۵	۲/۵	۲/۵
مکمل ویتامینی	۲/۵	۲/۵	۲/۵
متیونین	۱/۹	۱/۸	۱/۷
لیزین	۰/۳	۰/۴	۰/۴
روغن	۲۷/۲	۲۵	۱۲
بنتونیت	۱۵	۱۵	۱۵
صدف	۱۰/۲	۱۰/۷	۱۱/۱
فیتاز	۰	۰/۰۵	۰/۰۵
جمع	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
انرژي قابل متابولیسم (Kcal/Kg)	۲۹۶۰	۲۹۶۰	۲۹۶۰
پروتئین خام(%)	۱۹	۱۹	۱۹
لیزین قابل هضم(%)	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۷
متیونین+سیستین(%)	۰/۷۷	۰/۷۷	۰/۷۷
ترئونین قابل هضم(%)	۰/۷۳	۰/۷۳	۰/۷۳
آرژنین قابل هضم(%)	۱/۲۱	۱/۲۱	۱/۲۱
والین قابل هضم(%)	۰/۸۷	۰/۸۷	۰/۸۷
کلسیم(%)	۰/۸۶	۰/۸۶	۰/۸۶
فسفر قابل دسترس(%)	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۲
فسفر کل(%)	۰/۶۷	۰/۵۹	۰/۵۱
تعادل آنیون و کاتیون	۲۳۰	۲۳۰	۲۳۰

***** مقدار مواد معدنی و ویتامین‌ها در هر کیلوگرم جیره: ۹۹/۲ میلی‌گرم منگنز، ۸۵ میلی‌گرم روی، ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم، ۱۳ میلی‌گرم ید، ۴۴۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۷۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۴۴۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۴۰ میلی‌گرم ویتامین K، ۷۰ میلی‌گرم کوبالامین، ۶۵ میلی‌گرم تیامین، ۳۲۰ میلی‌گرم ریبوفلاوین، ۲۹۰ میلی‌گرم اسید پانتوتنیک، ۱۲۲۰ میلی‌گرم نیاسین ، ۶۵ میلی‌گرم پیریدوکسین، ۲۲ میلی‌گرم بیوتین و ۲۷۰ میلی‌گرم کولین کلراید

- بیان ژن

به منظور بررسی بیان ژن IGF-1 با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج GeneJET RNA Purification Kit RNA (شرکت فرمنتاز، کشورآمریکا) از نمونه کبد جوجه‌های تحت تیمار RNA استخراج گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز ژل آگارز و UV اسپکتروفوتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت سنتز cDNA از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis (شرکت فرمنتاز، کشور آمریکا) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۴ ارائه شده است. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده

گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نمونه‌های cDNA حاصل از بافت کبد، با ۷ تیمار و۴ تکرار، برای ژن IGF-I و ژن مرجع GAPDH با استفاده از دستگاه ABI7300 (Applied Biosystems) انجام شد. برای تعیین میزان بیان ژن‌های IGF-1 و GAPDH، Real -time PCR (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) و روش سایبرگرین استفاده شد. کیت سایبرگرین شامل مستر میکس حاوی Taq، Mgcl2، dNTPs، RNase H، سایبرگرین و ROX می‌باشد. نسبت مواد مورد استفاده و شرایط بهینه دمایی و زمانی جهت انجام Real -time PCR در جداول ۵ و ۶ ارائه شده است.

رسم منحنی ذوب به وسیله اندازه‌گیری تغییرات فلورسانس در زمان‌های مختلف صورت گرفت. در ابتدا دستگاه دمای نمونه‌ها را در فواصل زمانی مشخص به مقدار معینی تغییرداد. در این حالت تمام DNAها به صورت تک رشته‌ای هستند و میزان SYBR Green متصل شده حداقل است. در نتیجه میزان فلورسانس ساطع شده کم می‌باشد. به تدریج دستگاه دمای نمونه‌ها را ۰/۵ درجه سانتی‌گراد کاهش داده و ۱۰ ثانیه در آن دما ثابت نگه داشت و در این مدت نور ساطع شده از نمونه‌ها توسط دستگاه اندازه گیری می‌شود. همزمان با این عمل، منحنی تغییرات فلورسانس برحسب دما که همان منحنی ذوب است ترسیم می‌گردد. در نقطه ذوب ۵۰ درصد از پیوندهای هیدروژنی در DNAهای دو رشته‌ای از هم جدا می‌شوند و میزان فلورسانس به طور ناگهانی تغییر می‌یابد.

برای تعیین غلظت و خلوص RNA و cDNA، از دستگاه اسپکتروفتومتر Thermo (شرکت فرمنتاز، کشورآمریکا) استفاده گردید. با محاسبه جذب نوري نمونه اسید نوکلئیك در طول موج‌های ۲۶۰ ، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر و محاسبه نسبت‌های جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ درجه خلوص اسیدهای نوکلئیك مشخص شد.

جدول ۴: توالی پرایمرهای IGF-1 و GAPDH

نام ژن	توالی پرایمر	طول محصول (bp)
IGF-I	5′-AGACGCTTACACCACAAGGGAATAG-3′ Forward 5′ATCTCCAGCCTCCTCAGGTCACAAC-3′ Reverse	۶۱
GAPDH	5′-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3′ Forward 5′-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3′ Reverse	۲۶۴

جدول ۵: نسبت مواد در واکنش Real - time PCR

مقدار	مواد موجود در واکنش
۱۲/۵µl	Maxima® SYBER Green'ROX qPCR Master Mix (2x)
۰/۷۵µl	آغازگر رفت
۰/۷۵µl	آغازگر برگشت
۱µl	الگو(cDNA)
۱۰µl	آب عاری از نوکلئاز
۲۵µl	حجم کل

جدول ۶: چرخه دمایی مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

مرحله	دما °C	مدت زمان	تعداد چرخه
Optional*	۵۰	۲`	۱
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۱۰`	۱
واسرشته سازی	۹۵	۱۵``	۴۰
اتصال آغازگرها	۶۰	۳۰``	
بسط آغاز گرها	۷۲	۳۰``	

– آنالیز داده‌های Real-time PCR

داده‌های به دست آمده از Real-time PCR با استفاده از proc mixed در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند همچنین مقایسه میزان بیان این ژن‌ها در نمونه‌های تیمار شده در مقایسه نمونه‌های کنترل بر اساس $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تیمار شده با کنترل اندازه‌گیری شد. مقادیر مربوط به چرخه آستانه (C_t) حاصل از تکرارهای بیولوژی و تکنیکی هر تیمار برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن IGF-I در بافت کبد مورد مطالعه، وارد نرم افزار Excel گردید. میانگین C_T، برای تکرارهای ژن IGF-I و ژن GAPDH محاسبه شد. سپس با استفاده از رابطه ذیل میزان ΔC_T، تعیین گردید:

$$\Delta C_T = C_{T\,(Target)} - C_{T\,(Refrence)}$$

$$\Delta C_T = C_{T\,(IGF\text{-}I)} - C_{T\,(GAPDH)}$$

دراین رابطه Etarget وEreference به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یاکنترل داخلی می‌باشند. ΔCt حاصل تفریق Ct (حد آستانه) ژن IGF-1 از Ct ژن GAPDH می‌باشد.

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

– آنالیز آماری داده‌ها

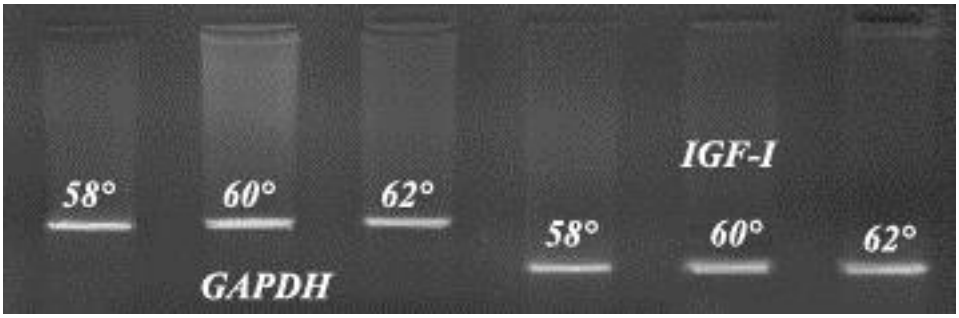
آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۷ تیمار انجام شد. تیمار یک به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS (Statistical Analysis System,) مدل طرح کاملا تصادفی رویه عمومی خطی (GLM) مورد تجزیه و تحلیل آماري قرار گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد، مدل آماری طرح به صورت $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ بود.

نتایج

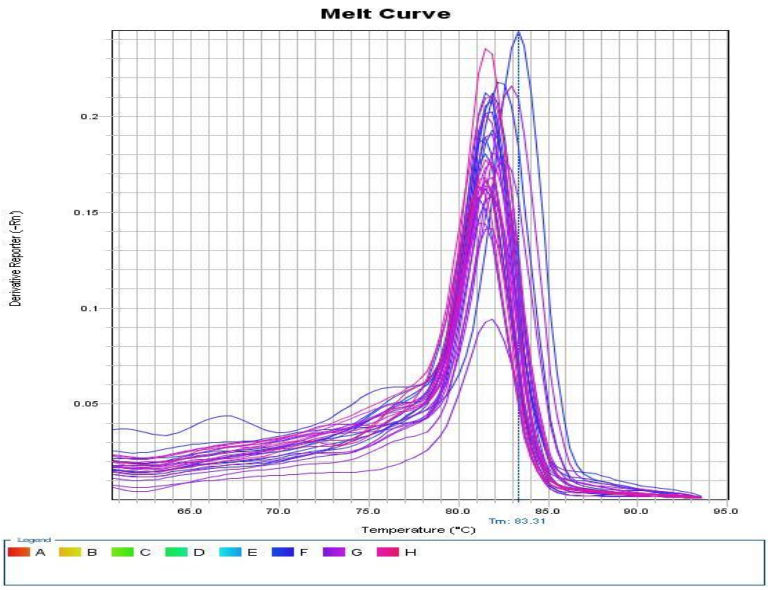
این آزمون برای ژن‌های IGF-I و GAPDH در طیف حرارتی ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری شد. به منظور تعیین دمای بهینه اتصال پرایمرهای اختصاصی ژن، واکنش PCR با شیب دمایی ۵۸°C، ۶۰°C , ۶۲°C انجام شد. با توجه به این که ژن IGF-I و GAPDH به عنوان ژن مرجع، بهترین باند را در دمای ۶۰°C نشان دادند این دما برای اتصال پرایمرها انتخاب شد (شکل ۱).

برای منحني تكثير همه نمونه‌ها، يك حد آستانه در فاز نمايي تعريف شد كه نشان دهنده سيكلي مي‌باشد كه در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تكثير واكنش به حد آستانه رسيده است. شکل ۲ منحنی ذوب ژن IGF-1 اختصاصي بودن و دمای Tm محصول یعنی دمایی که که در آن نيمي از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج شده است را در واکنش Real time PCR نشان می‌دهد.

نتایج بررسی بیان ژن IGF-I نشان داد که بین مقدار بیان ژن IGF-I در تیمارهای مختلف اختلاف معنی داری وجود دارد. این اختلاف معناداری در تیمارهای شماره ۴ و ۶ که بالاترین میزان بیان ژن IGF-1 را نشان دادند مشاهده شد (جدول ۷). با توجه به اینکه در این تحقیق سطوح ۵۰۰ واحد فیتاز مورد بررسی قرار گرفت و برای بیان نسبی ژن نیاز به گروه کنترل بود، لذا تیمار شاهد به عنوان معیار سنجش بیان ژن قرار گرفت. بیان ژن IGF-I در تیمار ۱ و ۲ ($P<0/05$) کمترین میزان بیان را داشته و تیمار ۶ بالاترین بیان را دارد.



شکل ۱ : محصولات واکنش PCR ژن‌های IGF-I و GAPDH



شکل ۲ - منحنی ذوب واکنش Real-Time PCR

جدول ۷: میزان بیان IGF-I mRNA کبدی در سطوح مختلف فیتاز.

	گروه‌های آزمایشی								
سطوح فیتاز	شاهد	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴	تیمار۵	تیمار۶	SEM	معنی‌داری
میانگین تیمارها	-۱/۹۷۴^{a}	-۲/۹۷۲^{a}	-۲/۹۲۲^{a}	-۲/۶۹۵^{a}	-۶/۰۰۶^{bc}	-۳/۸۳۰^{ab}	-۷/۳۶۶^{c}	۰/۰۱۵	**

*تیمار شاهد : بدون فیتاز تیمار۱ : هوستازایم ۵۰ درصد تیمار۲: فیزایم ۵۰ درصد تیمار۳ : رونوزایم ۵۰ درصد تیمار۴: هوستازایم ۱۰۰ درصد
تیمار۵ : فیزایم ۱۰۰ درصد تیمار ۶ : رونوزایم ۱۰۰درصد

بحث

هورمون رشد شبه انسولین یا IGF-1 با صفت رشد در گونه هاي مختلف حيواني مرتبط بوده و در بافت‌های مختلف وجود دارد و کبد بیشترین سطح IGF-I را به خود اختصاص می‌دهد [۱۳]. این هورمون اثرات متابولیک انسولین مانندی را در بافت‌های عضلانی و چربی ایجاد کرده [۱۴] و نقش مهمی در تکثیر، تمایز و متابولیسم رده‌های سلولی میوژنیک در جوجه‌ها ایفاء می‌کند [۱۵]. مطالعات متعدد نشان داده که گرسنگی و یا محدودیت پروتئینی باعث تغییر در سطح IGF-I سرم و IGF-I mRNA می‌شود و این تغییر به زمان گرسنگی و یا کیفیت و کمیت پروتئین بستگی دارد [۱۶]. از طرفی علاوه بر مقدار پروتئین، وضعیت تغذیه به ویژه ترکیب پروتئین جیره و برخی هورمون‌ها نیز بر میزان بیان IGF-I تاثیر دارند زیرا که رژیم غذایی غنی از آمینو اسیدهای ضروری نسبت به رژیم غذایی محتوی آمینو اسیدهای غیر ضروری باعث افزایش میزان IGF-I در سرم می‌شود [۱۷]. همانطور که ذکر شد، فاکتور تغذیه، تنظیم کننده ی مهمی در میزان هورمون IGF-I است. در این حوزه استفاده از مکمل جیره غذایی با آنزیم فیتاز یک عمل رایج و مهم در صنعت طیور است. Ravindran و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Walk و همکاران طی سال‌های ۲۰۱۹ و ۲۰۲۰ گزارش دادند که از مهمترین مزایای فیتاز افزودنی، کاهش اثرات منفی فیتات جیره بر استفاده از مواد مغذی و بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی است [۲۰-۱۸].Zyła سال ۲۰۰۱ پیشنهاد کرد که دفسفوریلاسیون کامل رژیم غذایی ذرت و سویا را می‌توان تنها با ترکیبی از فیتاز همراه با آنزیم‌های کربوهیدرات مناسب به دست آورد [۲۱]. در ایران سال ۲۰۰۴ حسن ابادی و همکاران اثر آنزیم فیتاز میکروبي را بر هضم اسیدهاي آمینه، قابلیت هضم پروتئین و عملکرد جوجه هاي گوشتي نر مورد ارزیابي قرار دادند و گزارش دادند که تیمارهاي آزمایشي شامل استفاده از سطوح مختلف آنزیم فیتاز میکروبي در جیره بر پایه ذرت- سویا سبب بهبود معني دار ($P<0.05$) قابلیت هضم ظاهري اسیدهاي آمینه (بجز اسید آمینه آلانین) و قابلیت هضم پروتئین نسبت به گروه

کنترل گردید [۲۲]. همچنین سال ۲۰۱۰ موسوی و همکاران نشان دادند که استفاده از ۵۰۰ واحد آنزیم فیتاز میکروبی در هر کیلوگرم جیزه غذایی بهترین عملکرد را در جوجه‌های گوشتی به همراه داشت [۲۳]. در سال ۲۰۰۵، Juanpere و همکاران برخی از تعاملات برای حفظ فسفر را بین آنزیم‌های فیتاز و کربوهیدرات تنها برای جیره‌های مبتنی بر گندم و جو گزارش کردند، اما برای جیره‌های مبتنی بر پایه ذرت نه [۲۴]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که فیتاز موجود در جیره غذایی مبتنی بر ذرت و سویا در جوجه‌های گوشتی منجر به افزایش بیان میزان ژن IGF-I شده است. نقش موثر و سودمند آنزیم‌های فیتاز و کربوهیدرات در مطالعه Józefiak در سال ۲۰۱۴ به خوبی گزارش شده است [۲۵] که نتایج آن با مطالعات قبلی Francesch و Geraet در سال ۲۰۰۹ در رابطه با جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌های مبتنی بر کنجاله ذرت و سویا مطابقت دارد [۲۶]. در مطالعه حاضر با مقایسه جیره‌های مختلف غذایی با آنزیم‌های فیتاز میکروبی تجاری مختلف نشان داده شد که در تیمارهای ۴ و ۶ که حاوی فیتاز هوستازیم و رونوزایم ۱۰۰ درصد بودند، بالاترین میزان بیان ژن IGF-1 وجود دارد، در حالیکه در تیمارهای ۱ و ۲ با فیتاز میکروبی هوستازیم و فیزایم ۵۰ درصد کمترین میزان بیان ژن IGF-1 مشاهده می‌شود. برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که استفاده از کمپلکس‌های آنزیمی حاوی کربوهیدرات‌های مختلف و فعالیت‌های فیتازی باعث کاهش میزان انرژی قابل متابولیسم یا Apparent Metabolisable energy (AME) و کاهش نیاز به اسیدهای آمینه رژیمی می‌شود و در عین حال منجر به عملکرد رشد بهینه در جوجه‌های گوشتی می‌شود [۲و۲۶]. سطح انسولین و گلوکز با هورمون IGF-1 در جوجه‌های گوشتی که نقش آن مشابه نقش این هورمون در پستانداران است و تکثیر و تمایز سلول‌ها را تنظیم می‌کند و در جذب آمینو اسید و سنتز DNA شرکت می‌کند، مرتبط است [۲۷]. به طور کلی افزایش میزان فیتازها باعث افزایش بیان IGF-mRNA کبدی شده و متعاقبا عملکرد صفات رشد نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد و می‌تواند منجر به افزایش وزن روزانه و وزن طیور در پایان دوره و کاهش ضریب تبدیل غذایی شود. با توجه به اینکه ژن‌های کاندید نقش بسزایی در بروز فنوتیپی صفات در حیوانات مزرعه‌ای دارند، می‌توان نقش IGF-I را در بروز این صفات، مهم و عمده در نظر گرفت.

References

[1] Sandberg A. S. Bioavailability of minerals in legumes. British Journal of Nutrition 2002; 88(Suppl. 3): 281–285.

[2] Cowieson A.J, Acamovic T.C, Bedford. M.R. Phytic acid and phytase Implications for protein utilization by poultry. Poultry science 2006; 85: 878-885.

[3] Selle PH, Cowieson AJ, Ravindran V. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and swine. **Livestock science** 2009; 124:126–141.

[4] Dersjant Li, Awati AY, Schulze H, Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition:a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. Journal of the Science of Food and Agriculture 2015; 95(5): 878–896.

[5] Selle PH ,Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology 2007; 135:1–41.

[6] Walk C.L, Santos T.R, Bedford M.R. Influence of super doses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. The Journal of Poultry Science 2014; 93: 1172-1177.

[7] Sommerfeld V, Rodehutscord M, Influence of phytase or myo-inositol supplements on performance and phytate degradation products in the crop, ileum, and blood of broiler chickens. The Journal of Poultry Science 2018; 97: 920-929.

[8] Zhang C, Zhang W, Luo H, Yue W, Gao M, Jia Z. A new single nucleotide polymorphism in the IGF-I gene and its association with growth traits in the Nanjiang Huang goat. Asian Australas Journal of Animal Sciences 2008; 21: 1073–1079.

[9] Kansaku N,Hiyama G, Sasanami T, Zadworny D. Prolactin and growth hormone in birds: Protein structure, gene structure and genetic variation. The Journal of Poultry Science 2008: 45:1–6.

[10] Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC,Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. Cytokine and Growth Factor Reviews 2005; 16: 421–439.

[11] Zhou H, Mitchell AD, McMurtry JP, Ashwell CM, Lamont SJ. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. The Journal of Poultry Science 2005; 84: 212–219.

[12] Amills M, Jimenez N, Villalba D,Tor M, Molina E, Cubilo D, Marcos C, Francesch A, Sanchez A, Estany J. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. The Journal of Poultry Science 2003; 82: 1485–1493.

[13] Guernec A, Berri C,Chevalier B, Wacrenier-Cere N, Bihan-Duval ELe, Duclos MJ. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. Growth Hormone & IGF Research 2003; 13: 8–1.

[14] Monzavi R, Cohen P. IGFs and IGFBPs: role in health and disease. Best Practice and Research in Clinical Endocrinology and Metabolism 2002; 16: 433–447.

[15] Duclos M. Insulin-like growth factor-I (IGF-1) mRNA levels and chicken muscle growth. Journal of Physiology and Pharmacology 2005; 56: 25–35.

[16] Radcliff R. P, Valdemar M. J, Kobayashi Y, Sharma B. K, Tucker H. A, Lucy M. C. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotropic axis in Holstein heifers. Journal of Dairy Science 2004; 87: 1229-1235.

[17] Skottner A. Biosynthesis of growth hormone and insulin-like growth factor-I and the regulation of their secretion. Endocrinology Journal 2012; 6:3–12.

[18] Ravindran V, Morel P. C. H, Partridge G. G, Hruby M, Sands J. S. Influence of an Escherichia coli-derived phytase on nutrient utilization in broilers tarters fed diets containing varying concentrations of phytic acid. The Journal of Poultry Science 2006; 85: 82–89.

[19] Walk, C. L, and Olukosi O. A. Influence of graded concentrations of phytase in high-phytate diets on growth performance, ileal amino acid digestibility, and phy-tate concentration in broilers from hatch to day 28 post-hatch. The Journal of Poultry Science 2019; 98: 3884–3893.

[20] Walk C. L, Bedford M. R. Application of exogenous enzymes: is digestibility an appropriate responsevariable? Animal production science 2020; 60: 993–998.

[21] Zyła K, Mika M, Stodolak B, Wikiera A, Koreleski J, Swiatkiewicz S. Towards complete dephosphorylation and total conversion of phytates in poultry feeds. The Journal of Poultry Science 2004; 83: 1175–1186.

[22] Hassan Abadi A, Nasiri Moghadam H, Pour reza J. The effect of microbial phytase on the apparent digestibility of amino acids and some performance indicators in broilers. Agricultural sciences and industries 2013: 18(1): 1-5.

[23] Mousavi A, Rezaei M, Nik Nafs F, Shohreh B. Effect of microbial phytase on performance, carcass quality and phosphorus and calcium content of tibia of broiler chickens. Livestock production research 2010;1 .

[24] Juanpere J, Perez-Vendrell A, Angulo E, Brufau 2010 J. Assessment of potential interactions between phytase and glycosidase enzyme supplementation on nutrient digestibility in broilers. The Journal of Poultry Science 2005; 84:571–580.

[25] Jozefiak D, Ptak A, Kczmarek S, Mackowiak P, Sassek M, Solminski B.A. Multi-carbohydrase and phytase supplementation improves growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed. The Journal of Poultry Science 2010, 89(9): 1939-46.

[26] Francesch M, Geraert P. A. Enzyme complex containing carbohydrases and phytase improves growth performance and bone mineralization of broilers fed reduced nutrient cornsoybean-based diets. The Journal of Poultry Science 2009; 88: 1915–1924.

[27] McMurtry J. P, Francis G. L, Upton Z, Insulin-like growth factors in poultry. Domestic animal endocrinology 1997; 14:199–229.

The effect of using commercial phytase products on expression of IGF1 functional gene in broilers

Pahlevan AfshariK.[1] *, Esmailpoor A.[2], Seyed Abadi H. R.[3]

[1] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Varamin pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[2] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Abhar Branch, Islamic Azad University, Abhar, Iran
[3] Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

* (Corresponding author): kianpahlevanafshar@gmail.com

DOI:10.30495/JDB.2022.1963785.1320 https://dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1401.15.1.7.1

Received: June 2022 Accepted: September 2022

Abstract

The amount of insulin-like growth factor (IGF) is regulated by various stimuli such as hormones, growth factors and nutritional conditions. In the present study, the effect of different levels of phytase enzymes on the expression of IGF-1 gene in the liver tissue of broiler chickens was investigated. The experiment was conducted with 7 treatments, 5 repetitions and 25 chicken pieces in each repetition. Experimental diets including the control diet, whose required phosphorus was provided by dicalcium phosphate, and the diets containing different commercial microbial phytase enzymes based on corn and soy were investigated. In order to investigate the expression of IGF-1 gene, first, total RNA was extracted from liver tissue and after making cDNA, the gene expression level was measured using real time PCR technique. The results of examining IGF-I gene expression in different levels of phytases showed a significant difference between the treatments. The expression of IGF-I gene in treatments 1 and 2 including phytase hostazim and phyzyme showed the lowest expression level and treatment 6 with phytases hostazim and ranozyme 100% showed the highest expression level. Increasing the amount of phytases increases the expression of IGF1-mRNA in the liver and can subsequently affect the performance of growth traits.

Keywords: Phytases, IGF-1, Broilers.