



بررسی اثرات اسید آمینه ترئونین جیره بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در جوجه های گوشتی

شکوفه غضنفری^۱، حشمت سپهری مقدم^۲ و کریم نوبری^۳

۱- استادیار دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، گروه علوم دام و طیور،^۲ استادیار دانشگاه پیام نور، گروه کشاورزی و^۳ فارغ التحصیل دکتری دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

چکیده

در این تحقیق، اثر ترئونین بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم روده کوچک در جوجه های گوشتی نر سویه راس بررسی شد. سطوح مختلف ترئونین عبارت بودند از: ۱) ۰،۸ درصد (معادل احتیاجات NRC)، ۲) ۰،۸۷ درصد (میانگین احتیاجات NRC و ROSS)، ۳) ۰،۹۴ درصد (احتیاجات ROSS) و ۴) ۱،۰۱ درصد (بیشتر از احتیاجات ROSS). در سن ۱۴ روزگی، یک پرنده از هر تکرار کشته شد و از بافت ژژنوم نمونه گیری به عمل آمد. جهت استخراج RNA از کیت تریزول استفاده شد. سپس بقایای ژنومی حذف و cDNA سنتز شد. واکنش Real Time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و کیت سایبر گرین انجام شد. جهت انجام مقایسات آماری، طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیان mRNA اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم در طول ۱۴ روز اول زندگی جوجه با افزایش سطوح اسید آمینه ترئونین تا سطح ۰،۹۴ درصد جیره افزایش می یابد ($P < 0.001$). بنابراین، یکی از فاکتورهای تغذیه ای که می تواند باعث تقویت سیستم ایمنی از طریق افزایش بیان mRNA اینترلوکین ۸ در بافت روده شود، اسید آمینه ترئونین است.

واژگان کلیدی: اینترلوکین ۸، ترئونین، جوجه گوشتی، بیان ژن

مقدمه

استفاده از مکمل های اسیدهای آمینه باعث بهبود تعادل کل اسیدهای آمینه شده و سطح پروتئین خام مورد نیاز را کاهش می دهند. اسیدآمینه ترئونین را به عنوان سومین اسیدآمینه ضروری در جیره های جوجه های گوشتی بر پایه ذرت-کنجاله سویا می دانند (والدروپ و همکاران، ۲۰۰۵). از آنجائیکه اسیدآمینه ضروری ترئونین به عنوان یکی از اجزاء مهم و موثر در رشد و توسعه روده میباشند، باید میزان آن دقیقاً در فرمولاسیون جیره گوشتی مشخص شود، زیرا مقادیر اضافی این اسید آمینه باعث افزایش هزینه خوراک می شود و کمبود آن راندمان استفاده از اسیدهای آمینه سولفور دار و لیزین را کاهش می دهد (کید، ۲۰۰۰). اسپارتر و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که بین ۸۰ تا ۹۰ درصد از ترئونین جیره بوسیله روده سنتز می شود. از آنجائیکه ترئونین در سنتز پروتئینهای مخاطی به کار می رود، احتیاجات معده، روده کوچک، روده بزرگ، پانکراس و کبد به ترئونین بالا است. اینترلوکین ۸ کیموکلین است که توسط ماکروفاژها و انواع سلولهای دیگر مانند سلولهای اپیتلیال تولید و بوسیله ژن اینترلوکین ۸ کد گذاری می شود. اینترلوکین ۸ میانجی مهم واکنش ایمنی در پاسخ سیستم ایمنی ذاتی است. همچنین اولین سیتوکین التهابی است که توسط تعدادی از سلولها در پاسخ به تحریکات ایجاد کننده التهاب از قبیل ویروسها ایجاد می شود. در این تحقیقات اثر سطوح مختلف اسید آمینه ترئونین جیره بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در جوجه های گوشتی بررسی شد.



مواد و روشها

این تحقیق در مرغداری تجاری در تربت حیدریه در بهار سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. تعداد ۳۲۰ قطعه جوجه گوشتی نر در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار، ۸ تکرار و ۱۰ قطعه پرنده در هر تکرار در ۳۲ پن تقسیم شدند به طوریکه میانگین وزنی جوجه ها به یکدیگر نزدیک بود. طول دوره آزمایش ۱۴ روز بود. جیره ها به نحوی فرموله و آماده شدند که ۱۰۰ درصد از احتیاجات توصیه شده (۱۹۹۴) NRC را تامین کنند. تیمارها هم نیتروژن بر پایه ذرت-کنجاله سویا با ۴ سطح مختلف ترئونین بودند. سطوح مختلف ترئونین عبارت بودند از: ۱) ۰.۸ درصد (معادل احتیاجات NRC)، ۲) ۰.۸۷ درصد (میانگین احتیاجات NRC و ROSS)، ۳) ۰.۹۴ درصد (احتیاجات ROSS) و ۴) ۱.۰۱ درصد (بیشتر از احتیاجات ROSS). تیمارها با استفاده از اسید آمینه ال-ترئونین (۹۸.۵ درصد ترئونین از کمپانی اونیک دگوسا، آلمان) در حضور یک رقیق کننده ساخته شدند و مکمل ال-گلوتامیک اسید، جیره ها را هم پروتئین ساخت. در سن ۱۴ روزگی، یک پرنده از هر تکرار کشته شد و از بافت ژژنوم نمونه گیری به عمل آمد. نمونه ها از قسمت میانی ژژنوم گرفته شدند و در نیتروژن مایع منجمد شدند و بلافاصله به یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل شد. به منظور مشخص شدن میزان بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم روده کوچک، بافتهای منجمد شده، به کمک هاون و نیتروژن، کاملاً هموژن شده و برای استخراج RNA آماده گردیدند. جهت استخراج RNA از کیت تریزول مطابق روش توصیه شده کیت استفاده شد. به منظور حذف بقایای احتمالی DNA ژنومی در RNA استخراج شده که می تواند در روند تکثیر خلل وارد آورد، از یک مرحله آنزیمی استفاده می شود. برای این منظور از آنزیم Free DNase RNase I استفاده می شود. برای ارزیابی RNA تخلیص شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (K1622, Fermentas, Germany) ساخته شد. به منظور بررسی تکثیر طول قطعه مورد نظر بعد از انجام PCR از نمونه cDNA تهیه شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد. واکنش Real Time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و کیت سایبر گرین^۱ ABI در دستگاه ABI (Applied Biosystems) 7300 انجام شد. برای پرایمرهای اختصاصی مربوط به mRNA اینترلوکین ۸ از توالی گزارش شده توسط پارک و همکاران (۲۰۰۸) استفاده گردید. توالی پرایمرهای اختصاصی ۱۸S نیز یک توالی مورد استفاده توسط پازوسکا- الیازویچ و همکاران (۲۰۰۶) بود. پس از تایید توالی و صحت طول قطعه تولیدی با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن^۲ NCBI، پرایمرهای مورد نظر سنتز گردیدند. علاوه بر این، به منظور تایید تکثیر طول ژن مورد نظر (اینترلوکین ۸) از توالی یابی تولیدات PCR نیز استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش در جدول ۱ گزارش شده است. سطوح mRNA اینترلوکین ۸ بر اساس بازدهی PCR و انحراف C_T یک نمونه ناشناخته نسبت به کنترل بر طبق روش دلتا دلتا C_T برآورد گردید. میزان آن برای تیمار کنترل تقریباً برابر ۱ بود. این عمل را برای بقیه تیمارها نیز انجام شد. بدین ترتیب بیان ژن کلیه تیمارها نسبت به تیمار کنترل بیان گردید. جهت انجام مقایسات آماری، داده های آزمایش بوسیله نرم افزار SAS مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند و مقایسه میانگین به روش چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. مدل آماری طرح کاملاً تصادفی متعادل در آزمایشات استفاده شد.

^۱ - SYBR GREEN KIT

^۲ - National Center for Biotechnology Information



نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بیان mRNA اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم در طول ۱۴ روز اول زندگی جوجه با افزایش سطوح اسید آمینه ترئونین تا سطح ۰٫۹۴ درصد افزایش می یابد ($P < ۰/۰۰۰۱$). اثر سطوح مختلف ترئونین بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده در جدول ۲ گزارش شده است. بیشترین بیان mRNA اینترلوکین ۸ در بافت ژژنوم روده نسبت به سایر تیمارها و تیمار شاهد متعلق به تیمار حاوی ۰٫۹۴ درصد ترئونین (احتیاجات ROSS) بود. جوجه های تغذیه شده با جیره حاوی ۱٫۰۱ درصد ترئونین، بیان mRNA اینترلوکین ۸ کمتری داشتند که این نتیجه بیان کننده این است که با افزایش غلظت ترئونین بیشتر از حد مورد نیاز به علت رقابت بین اسیدهای آمینه با سیستم انتقالی مشابه با ترئونین، بین اسیدهای آمینه عدم تعادل ایجاد خواهد شد و در نتیجه بیان mRNA اینترلوکین ۸ کاهش می یابد. ترئونین مازاد به گلیسین متابولیزه می شود و گلیسین مازاد بر نیاز، باعث تشکیل کراتین با استفاده از آرژنین و آنزیم آمیدینوترانسفراز خواهد شد. همچنین تولید کراتین، باعث مصرف بیشتر آرژنین و متیونین و کم شدن ذخایر این اسیدهای آمینه ضروری و حیاتی خواهد شد و این وضعیت ممکن است باعث بروز عدم توازن این دو اسید آمینه شده و در نتیجه، کاهش راندمان استفاده از اسیدهای آمینه، افزایش غلظت اسید اوریک پلاسما و دفع بیشتر نیتروژن به صورت اسید اوریک را باعث می شود، در نتیجه استفاده از سطوح بالای ترئونین، باعث کاهش عملکرد خواهد شد (بیرد و همکاران، ۱۹۸۴). این آزمایش برای اولین بار انجام شده و تحقیقی مشابه آن یافت نشد.

به طور خلاصه، یکی از فاکتورهای تغذیه ای که می تواند بیان mRNA اینترلوکین ۸ در بافت روده را افزایش دهد، اسید آمینه ترئونین است که استفاده از آن به میزان مورد نیاز می تواند باعث عملکرد بهتر ژن اینترلوکین ۸ شود و باعث تقویت سیستم ایمنی شود.

جدول ۱: توالی پرایمر الیگونوکلوئیدی برای واکنش Real Time PCR

ژن	توالی پرایمر (۵'-۳')	طول محصول (جفت باز)
اینترلوکین ۸	GGC TTG CTA GGG GAA ATG A	رفت
	AGC TGA CTC TGA CTA GGA AAC TGT	برگشت
۱۸S	CGC GTG CAT TTA TCA GAC CA	رفت
	ACC CGT GGT CAC CAT GGT A	برگشت

جدول ۲: تاثیر سطوح مختلف ترئونین بر بیان ژن اینترلوکین ۸ در بافت روده

ترئونین %	بیان ژن اینترلوکین ۸ (n=۸)
۰٫۸ درصد (معادل احتیاجات NRC)	۱ ^d
۰٫۸۷ درصد (میانگین احتیاجات NRC و ROSS)	۲٫۳ ^b
۰٫۹۴ درصد (احتیاجات ROSS)	۳٫۴ ^a
۱٫۰۱ درصد (بیشتر از احتیاجات ROSS)	۱٫۶ ^c
±SEM	۰٫۰۱۸
P value	<۰٫۰۰۰۱

SEM: میانگین خطای استاندارد، ^{a,b,c,d} میانگین ها در سطوح احتمال ۵ درصد معنی دار است.



1. Bird M, Nunn PB, Lord L (1984) Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria 802: 229-236.
2. Kidd MT (2000) Nutritional consideration concerning threonine in broilers. World's Poultry Science Journal 56: 139-151.
3. NRC. (1994) Nutrient Requirements of Poultry. 9 th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.
4. Ross Broiler Nutrition Specification. (2007) Home page address: <http://www.aviagen.com/>
5. Park SS, Lillehoj HS, Allen PC, Park DW, FitzCoy S, Bautista DA, Lillehoj EP (2008) Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with eimeria maxima and clostridium perfringens with the use of an animal model of necrotic enteritis. Avian Diseases. 52: 14-22.
6. Paczoska-Eliasiewicz HE, Gertler A, Proszkowiec M, Proudman J, Hrabia A, Sechman A, Mika M, Jacek T, Cassy S, Raver N, Rzasa J (2006) Attenuation by leptin of the effects of fasting on ovarian function in hens (*Gallus domesticus*). Reproduction. 126: 739-751.
7. Schaart MW, Schierbeek H, Van Der Schoor SR, Stoll B, Burrin DG, Reeds P, Van Goudoever GB (2005) Threonine utilization is high in the intestine of piglets. Journal of Nutrition. 135: 765-770.
8. Waldroup PW, Jiang Q, Fritts CA (2005) Effects of glycine and threonine supplementation on performance of broiler chicks fed diets low in crude protein. International Journal of Poultry Science. 4: 250-257.

Investigation effect of dietary threonine amino acid on interleukin-8 gene expression in broiler chicken

Abstract

In this experiment, effect of threonine on interleukin-8 gene expression in the jejunum of the small intestine in male broilers Ross was evaluated. Different levels of threonine were: 1) 0.8% (equivalent requirements of NRC), 2) 0.87 % (average of NRC requirements and ROSS), 3) 0.94 % (requirements ROSS) and 4) 1.01% (most of the requirements ROSS). At 14 days of age, one bird from each replicate was killed and the jejunum tissue samples were obtained. Trizol kit was used for RNA extraction. Then remove genomic remnants and cDNA was synthesized. Real Time PCR reactions using primers and SYBR Green kit was performed. For statistical comparisons, completely randomized design was used. Experiment result showed that interleukin-8 mRNA expression levels in jejunum tissue increased during the first 14 days of live chickens with increase threonine amino acid level until 0.94 percentage diet ($P < 0.0001$). Thus, one of the nutritional factors that can improve the immune system by increasing interleukin-8 gene expression in the intestine tissue, is threonine amino acid.

Keyword: interleukin-8, threonine, broiler chicken, gene expression