دانشکده علوم دامی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته فیزیولوژی دام

اثر مکمل آشامیدنی بیوتین بر بیان اویداکتی ژن کربنیک آنهیدراز در مرغ‌های جوان و مسن لاین آرین

پژوهش و نگارش:

پوریا رفیعی

اساتید راهنما:

دکتر یوسف جعفری آهنگری

دکتر امیر اخلاقی

اساتید مشاور:

دکتر زربخت انصاریی پیرسرایی

مهندس حسین دریاباری

پاییز ۹۳

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود؛ بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

1- قبل از چاپ پایان نامه خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
2- قبل از چاپ پایان نامه در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
3- انتشار نتایج پایان نامه باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب پوریا رفیعی دانشجوی رشته علوم دامی مقطع کارشناسی‌ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

پوریا رفیعی

تقدیم به

نه میتوانم موهایشان راکه در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم. امیدوارم که بتوانم هر لحظه شکر گزارشان باشم و ثانیه های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

تقدیم به پدر عزیزم که راهنما و تکیه گاهی را ولاتر از او نیافتم.

تقدیم به مادر مهربانم که الفبای زندگی را به من آموخت.

تقدیم به برادران و خواهران دلسوزم که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بوده و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودشان مایه دلگرمی من می باشد.

تقدیر و تشکر

نهایت سپاسگذاری را از جناب آقای دکتر یوسف جعفری آهنگری به خاطر راهنمایی های پربارشان در این پایان نامه را دارم که نه تنها استاد راهنمایم بودند بلکه پدری مهربان و دوستی بزرگوار برایم بودند.

همچنین از جناب آقای دکتر امیر اخلاقی، جناب آقای دکتر زربخت انصاری پیرسرایی و جناب آقای مهندس حسین دریاری به خاطر کمک هایشان در امور آزمایشگاهی این پایان نامه بسیار ممنونم.

از اساتید عزیزم جناب آقای دکتر سید رضا هاشمی و جناب آقای دکتر مجتبی آهنی آذری که زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را متحمل شدند بی نهایت سپاسگذارم.

از برادر عزیزم مهندس پیمان رفیعی که با صبر و حوصله فراوان پاسخگوی سوالات متعدد بنده در زمینه ژنتیک مولکولی بودند و همچنین تمامی مشکلات مالی بنده را رفع فرمودند بسیار متشکرم.

از آقایان مهندس بخشی، رستمی، تیمورزاده، خدادوست، زاهدی، باقری که در تمام مراحل این پایان نامه بنده را همراهی کرده اند بسیار سپاسگذارم.

با سپاس فراوان از سرکار خانم مهندس فروزان مطاعی که پاسخگوی سوالات متعدد بنده در زمینه نرم افزاری این پایان نامه بودند.

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثر مکمل آشامیدنی بیوتین بر بیان اویداکتی ژن کربنیک‌آنهیدراز در مرغ‌های لاین آرین جوان و مسن در مزرعه G۳ مجتمع پرورش و اصلاح نژاد مرغ آرین بابل‌کنار، وابسته به معاونت امور دام کشور، در شهر بابل‌کنار در ۲۵ کیلومتری جنوب شهرستان بابل در استان مازندران انجام شد. به همین منظور از ۱۴۴ قطعه مرغ لاین سویه آرین استفاده شد. مرغ‌ها به دو گروه جوان ومسن تعلق داشتند. مرغ‌های جوان در سن ۳۰ هفتگی و مرغ‌های مسن در سن ۵۴ هفتگی قرار داشتند. مرغ‌ها در هر گروه به شیوه تصادفی به یکی از سه تیمار کنترل(جیره پایه بر اساس سفارش راهنمای پرورش سویه)، جیره پایه بعلاوه مکمل بیوتین به میزان ۰/۳ میلی‌گرم در هر لیتر آب و جیره پایه بعلاوه مکمل بیوتین به میزان ۰/۴۵ میلی‌گرم در هر لیتر آب تقسیم شدند، که پس از استفاده از مکمل بیوتین در آب آشامیدنی برای نمونه‌گیری از اویداکت، از مرغ‌های جوان و مسن به‌ترتیب در پایان هفته سی و سوم و پنجاه و هفتم،۱۲ قطعه مرغ از هر تیمار و گروه آزمایشی (چهار قطعه از هر تیمار در هر گروه و روی هم رفته ۲۴ مرغ) کشتار شدند و از SST به صورت خراش نمونه بافتی گرفته شد و پس از استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA میزان بیان ژن کربنیک‌آنهیدراز با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که به طور کلی مکمل آشامیدنی بیوتین سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن کربنیک‌آنهیدراز در مرغ‌های جوان و مسن لاین آرین شد ($P<۰/۰۵$). سن مرغ‌ها سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار در بیان ژن کربنیک‌آنهیدراز نشد ($P>۰/۰۵$). اثر متقابل مکمل آشامیدنی بیوتین با سن مرغ‌ها سبب ایجاد اختلاف معنی دار بین مرغ‌های مسن دریافت کننده ۰/۳ بیوتین نسبت به گروه شاهد شد ($P<۰/۰۵$). با توجه به نتایج این پایان نامه می-توان این گونه بیان کرد که مکمل آشامیدنی بیوتین سبب افزایش بیان ژن آنزیم کربنیک‌آنهیدراز و در نتیجه افزایش باروری می‌شود ($P<۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: کربنیک‌آنهیدراز، سن، بیوتین، Real-time PCR

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ آناتومی و ریخت‌شناسی لوله‌های ذخیره اسپرم ۳

۱-۳ انباشت اسپرم در دستگاه تولید مثل ماده ۴

۱-۴ بیوتین ۴

۱-۵ بیان ژن و مبانی واکنش نسخه‌برداری معکوس ۴

فصل دوم: سابقه تحقیق ۷

۲-۱ زنده مانی اسپرم ۸

۲-۲ نقش جنبایی اسپرم در گزینش آن ۸

۲-۳ اثر pH و یون‌ها بر انباشت اسپرم ۹

۲-۴ تاریخچه پیدایش و عمل آنزیم کربنیک‌آنهیدراز ۱۰

۲-۵ انواع آنزیم کربنیک‌آنهیدراز بر اساس محل قرارگیری ۱۲

۲-۵-۱ ایزوآنزیم‌های سیتوپلاسمی ۱۲

۲-۵-۲ ایزوآنزیم متصل به غشاء ۱۳

۲-۵-۳ ایزوآنزیم میتوکندری ۱۳

۲-۵-۴ ایزوآنزیم ترشحی ۱۳

۲-۵-۵ کربنیک‌آنهیدراز هسته‌ای ۱۴

۲-۵-۶ CA در اندام‌های تناسلی نر ۱۴

۲-۵-۷ CA در دستگاه تناسلی ماده ۱۴

۲-۵-۸ جایگاه کربنیک‌آنهیدراز در پرندگان ۱۵

۲-۶ بیوتین ۱۷

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۶-۱ ویژگی‌های شیمیایی ۱۷
۲-۶-۲ منابع و زیست فراهمی ۱۸
۲-۶-۳ سوخت و ساز ۱۸
۲-۶-۴ اثر بیوتین بر فراسنجه‌های تولیدمثلی ۱۹
۲-۶-۵ اسپرم سازی ۱۹
۲-۶-۶ سنتز پروتیئن‌های ویژه ۱۹
۲-۶-۷ بیان ژن ۲۰
۲-۶-۸ ژن‌های تحت تاثیر بیوتین در سطح رونویسی ۲۱
۲-۶-۹ کربوکسیلازهای وابسته به بیوتین و هولوکربوکسیلاز سنتتاز ۲۱
۲-۶-۱۰ ژن‌های تحت تاثیر بیوتین در سطح پس از رونویسی ۲۱
۲-۶-۱۱ میانجی‌های اثر بیوتین بر بیان ژن ۲۲
۲-۷ اصول اساسی PCR و Real-time PCR ۲۲
۲-۸ آماده‌سازی الگو ۲۵
۲-۹ طراحی آغازگر برای Real-time PCR ۲۶
۲-۱۰ آشکارسازهای شیمیایی Real-time PCR ۲۶
۲-۱۰-۱ آشکارسازهای غیر اختصاصی توالی ۲۷
۲-۱۰-۲ آشکارسازهای اختصاصی توالی ۲۹
۲-۱۱ کمیت سنجی در زمان واقعی ۳۰
۲-۱۱-۱ کمیت سنجی مطلق ۳۰
۲-۱۱-۲ کمیت سنجی نسبی ۳۱
۲-۱۲ کارایی تکثیر ۳۲
۲-۱۳ روش‌ها و ابزارهای آنالیز داده‌ها ۳۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۱۴ انتخاب ژن خانه‌دار..... ۳۵

فصل سوم: مواد و روش..... ۳۷

۳-۱ پرندگان و تیمارهای آزمایشی..... ۳۸

۳-۲ عادت‌دهی خروس‌ها به مالش شکمی، تلقیح مصنوعی..... ۴۰

۳-۳ نمونه گیری بافتی..... ۴۰

۳-۴ جداسازی RNA..... ۴۳

۳-۴-۱ مشخصات پرایمر کربونیک‌آنهیدراز ۲..... ۴۳

۳-۴-۲ رقیق سازی مواد موجود در کیت..... ۴۳

۳-۴-۳ استخراج mRNA..... ۴۴

۳-۴-۴ حذف RNaseهای محیطی..... ۴۴

۳-۴-۵ هموژنیزه و یکنواخت کردن بافت..... ۴۵

۳-۴-۵-۱ هاون و دسته هاون..... ۴۵

۳-۴-۵-۲ مرحله خشک کردن..... ۴۸

۳-۴-۶ نگهداری RNA استخراج شده..... ۴۸

۳-۴-۷ اطمینان از عدم وجود DNA ژنومی..... ۴۸

۳-۴-۸ سنجش کیفی RNA..... ۴۸

۳-۴-۸ -۱ تهیه بافر TBE(۱۰X) (تریس- بورات-EDTA)..... ۴۹

۳-۴-۹ تولید cDNA (Complmentary DNA) از RNA استخراج شده..... ۵۰

۳-۴-۱۰ تکثیر بوسیله Real-Time PCR..... ۵۰

۳-۴-۱۱ اجزای تشکیل دهنده کیت QuantiFastTM SYBR® Green PCR..... ۵۱

۳-۴-۱۲ اجزای بافر SYBR® Green PCR..... ۵۲

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۵ آغاز واکنش تکثیر در دستگاه Real-Time PCR ۵۲

۳-۵-۱ چرخه‌های دمایی بکار رفته در واکنش‌های Real-time PCR..... ۵۳

۳-۵-۲ ترکیب نمودن اجزای واکنش Real-time PCR..... ۵۳

۳-۵-۳ تکثیر DNA..... ۵۴

۳-۶ واکاوی داده‌ها..... ۵۵

فصل چهارم: نتایج و بحث..... ۵۶

۴-۱ نتایج..... ۵۷

۴-۲ بحث..... ۵۹

۵-۱ نتیجه‌گیری کلی..... ۶۱

۵-۲ پیشنهادات ۶۱

منابع..... ۶۳

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱ ترکیب جیره مرغ‌ها.....۳۹
جدول ۳-۲ توالی و ویژگی آغازگرهای به‌کار رفته در واکنش‌ها Real-Time PCR.....۵۱
جدول ۳-۳ چرخه‌های دمایی بکار رفته در واکنش‌های Real-Time PCR.....۵۳
جدول ۳-۴ اجزای واکنش Real-Time PCR.....۵۳
جدول ٤-۱ تأثیر اثر مکمل آشامیدنی بیوتین بر بیان اویداکتی ژن کربنیک آنهیدراز در مرغ های جوان و مسن لاین آرین.....۵۹
جدول ٤-۲ تأثیر اثر سن بر بیان اویداکتی ژن کربنیک‌آنهیدراز در مرغ های جوان و مسن لاین D آرین.....۵۹
جدول ٤-۳ تأثیر اثر متقابل بیوتین و سن بر بیان اویداکتی ژن کربنیک آنهیدراز در مرغ های لاین D آرین.....۶۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

نگاره ۲-۱ نقش کاتالیزوری آنزیم کربنیک‌آنهیدراز ۱۰
نگاره ۲-۲ نمایی سه بعدی از آنزیم کربنیک آنهیدراز..... ۱۱
نگاره ۲-۳ نمای ساختاری بیوتین..... ۱۷
نگاره ۲-۴ نمودار تکثیر در real-time PCR..... ۲۴
نگاره ۲-۵ اتصال سایبرگرینI به DNA دو رشته‌ای..... ۲۸
نگاره ۲-۶ نمودار ذوب، جهت اطمینان از صحت تکثیر..... ۲۹
نگاره ۲-۷ نمودار کالیبراسیون با استفاده از سری رقت..... ۳۱
نگاره ۳-۱ پیچ خوردگی‌های واژن تا رسیدن به رحم..... ۴۱
نگاره ۳-۲ رحم و واژن پس از باز شدن پیچ‌خوردگی‌های واژن و جایگاه UVJ در بین آن‌ها..... ۴۱
نگاره ۳-۳ نحوه جداسازی بافت مخاطی UVJ که دارای SST می‌باشد..... ۴۲
نگاره ۳-۴ قسمت درونی واژن و رحم..... ۴۳
نگاره ۳-۵ هاون وکاربرد آن..... ۴۶
نگاره ۳-۶ هاون حاوی بافت کوبیده شده..... ۴۶
نگاره ۳-۷ ترتیب قرار گیری RNA, DNA و پروتئین در میکروتیوب..... ۴۷
نگاره ۳-۸ باندهای ایجاد شده در ژل به منظور سنجش کیفی RNA..... ۴۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

امروزه یکی از بزرگترین دغدغه‌ها و نگرانی‌ها از نظر سیاستگذاران و برنامه‌ریزان، تأمین نیازهای پروتئینی و غذایی جامعه می‌باشد. بدیهی است تأمین نیاز غذایی مردم با توجه به روند روز افزون رشد جمعیت جهان از ضروری‌ترین برنامه‌هایی است که باید به آن پرداخته شود. در این میان گوشت طیور با توجه به قیمت مناسب از جایگاه ویژه‌ای برخودار است. به همین منظور در سال‌های اخیر به صنعت پروش طیور به ویژه امر مهم تولید مثل توجه خاصی شده است. تولید مرغ در همه سطوح، از سطح لاین تا جوجه گوشتی وابسته به تولید جوجه یک روزه می‌باشد. از عوامل مهمی که در تولید جوجه نقش دارند می‌توان به باروری و قابلیت هچ اشاره کرد. باروری اشاره به درصدی از تخم‌مرغ‌های خوابانده شده[۱] دارد که بارور هستند. برای دست‌یابی به باروری، اسپرم باید با تخمک در زمان و مکان مناسب به یکدیگر بپیوندد. از آنجایی که معمولاً زمان تخمک‌ریزی با جفت‌گیری همزمان نیست، مرغ جهت افزایش احتمال برخورد گامت‌ها، اسپرم را در دستگاه تولید مثلی ذخیره می‌کند. صنعت پرورش پرندگان اهلی به شکل یک زنجیره سازمان دهی شده است که برای پخش برترین سویه‌های ژنتیکی درسراسر جهان به بازدهی بالای تولیدمثل وابسته است و توان بالای تولیدمثل یکی از پایه های مهم صنعت پرورش پرندگان اهلی است (اتچز،۱۹۹۳). از این رو یکی از بی‌نظیرترین و جالب‌ترین شکل‌های تولیدمثلی، یعنی توانایی انباشت اسپرم درون مجرای تخم در پرندگان مشاهده می‌شود. انباشت اویداکتی اسپرم که ویژگی رایج همه پرندگان است در لوله‌های انباشت اسپرم (SST)[۲] انجام می‌شود. باروری مرغان در سطوح لاین، اجداد و مادر سهم بسزایی در تامین جوجه‌ها در نسل‌های پی آیند دارد.

[1] Incubated
[۲] Sperm storage tubules

۱-۲ آناتومی و ریخت شناسی لوله‌های دخیره اسپرم

اسپرمها درون غده‌های لوله‌ای واقع در ۲ سانتی‌متری جلوی واژن در پیوندگاه رحمی- واژنی (UVJ)[۲۱] در نوار باریکی به پهنای ۲ – ۵ میلی‌متر انباشته می‌شوند (باکست، ۲۰۱۰) که بین غده پوسته و واژن قرار دارند. بافت مخاطی این بخش، به شکل سه تا خوردگی حلقوی است که سطح آن‌ها با سلول‌های مژک‌دار ناتراوشی و سلول‌های بدون مژک، پوشیده شده است. غده‌های لوله‌ای در تاخوردگی حلقوی، محل انباشت اسپرم در سراسر دوره باروری هستند و از اینرو، آن‌ها را "لوله‌های انباشت اسپرم (SST) می‌نامند. نزدیک به ۲۵۰۰۰ لوله انباشت اسپرم، در مرغ وجود دارد که هر کدام از چندین تا چند صد اسپرم دارند. اسپرم‌ها موازی یکدیگر قرار دارند و سر آنها به سوی انتهای کور غده است. به طور میانگین نزدیک به ۴۰۰ اسپرم در هر لوله انباشته می‌شوند و نزدیک به ۷۵ درصد از لوله‌های مرغی که به تازگی تلقیح شده باشد، دارای اسپرم هستند (اتچز، ۱۳۸۰).

۱-۳ انباشت اسپرم در دستگاه تولید مثل ماده

انباشت اسپرم در مجرای تولید مثلی حیوان ماده به صورت گسترده در همه گروه‌های گونه‌های مهره-داران رخ می‌دهد و در برخی خزندگان تا حداکثر ۷ سال و در ماهی‌ها تا بیشتر از یک سال به درازا می-کشد. دوزیستان، همه پرندگان و برخی خفاش‌ها به علت داشتن توانایی انباشت اسپرم در مجرای تولید مثلی، تکامل پیدا کرده اند (هالت و لیوید، ۲۰۱۰)

بیولوژی تولید مثل در پرندگان و پستانداران بسیار متفاوت است؛ پرندگان بر خلاف پستانداران چرخه فحلی برای همزمان سازی جفتگیری با تخمک‌ریزی را ندارند، به همین علت به انباشت اسپرم در اویداکت وابسته اند (باکست، ۲۰۱۰). ورود یک نمونه منی با ۱۰۰ تا ۲۰۰ میلیون اسپرم زنده به مجرای

---

[۱] utero- vaginal junction

تولیدمثلی پس از جفتگیری یا تلقیح مصنوعی، موجب می‌شود که مرغ تا ۱۴ روز و بوقلمون ماده ۴۵ تا ۱۱۲ روز، تخم‌های بارور تولید کنند (چریستنسن، ۱۹۸۱).

۱-۴ بیوتین

بیوتین(ویتامین H یا B_7) یکی از ویتامین‌های B کمپلکس و ساختمان شیمیایی آن اسید۲-کتو-۳ و ۴- ایمیدازولیدو-۲- تتراهیدروتیوفن- ان - والریک است (مک دونالد و همکاران، ۱۳۸۶). .بیوتین دارای هشت نوع استریوایزمر است؛ تنها D- بیوتین از نظر بیولوژیکی فعال است وسایر ایزومرها در طبیعت یافت نشده‌اند (پلوکس، ۲۰۰۰). پیشنهاد شد که بیوتین می‌تواند در ساخت موضعی فاکتورهای بیضه‌ای نقش داشته باشد که علاوه بر تستوسترون و FSH، برای بروز برهم کنش‌های نرمال بین سلول‌های لایدیگ، سرتولی و پری‌تیوبولار نیز به آن‌ها نیاز است (پایلوس و همکاران، ۱۹۸۹). بیوتین در ساخت و تراوش برخی هورمون ها نیز دخالت دارد. تراوش پروژسترون از سلول‌هایی که دچار کمبود بیوتین شده‌اند کاهش یافت (کریسپ و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به پژوهش‌های پیشین به نظر می‌رسد ویتامین‌های محلول در آب (مانند بیوتین) نیز اثر تنظیمی بر بیان ژن داشته باشند (داکشینامورتی، ۲۰۰۵). پژوهش‌های داکشینامورتی و لیواک در سال ۱۹۷۰ نقش بیوتین در بیان ژن را آشکار کرد. این پژوهش‌ها بر این فرض استوار بود که برخی از آثار بیوتین بر بیولوژی سلول و رشد رویان می‌تواند ناشی از تغییر در بیان ژن در پاسخ به بیوتین موجود باشد.

۱-۵ بیان ژن و مبانی واکنش نسخه‌برداری معکوس (RT) و Real-Time RT-PCR

فنوتیپ‌های گوناگون جانوران تک سلولی و چند سلولی از تفاوت‌های موجود در ژن‌ها و الل‌های تشکیل دهنده ژنوم هر گونه ناشی می‌شود. ولی اغلب، سلول‌های یک موجود چند سلولی، از قبیل سلول-های عصبی، سلول‌های کبدی، سلول‌های استخوانی و سلول‌های خونی تفاوت‌های فنوتیپی زیادی را نشان می‌دهند. این تفاوت‌ها به دلیل تغییر توالی DNA ژنوم نیست بلکه از تفاوت بیان ژن‌های خاص سلول‌ها در حین نمو سلولی ناشی می‌شود. در زیست‌شناسی پیشرفته، بررسی دقیق بیان ژن‌ها اهمیت روزافزونی پیدا کرده است و این بررسی‌ها نه‌تنها در افزایش شناخت ما از اعمال ژن و پروتین کمک کرده است بلکه

در زمینه تشخیص میزان کم نسخه‌برداری ژن‌ها در زمینه کاربردهای بیوتکنولوژیک و تشخیص پزشکی نیز کاربرد داشته است (استین و همکاران، ۱۹۹۷).

طی سال‌ها، روش‌های رایج برای بررسی بیان ژن‌ها، لکه‌گذاری نورترن[۱]، هیبریداسیون درجا[۲] و سنجش محافظت دربرابر RNase[3] بوده است. اگرچه این روش‌ها به طور گسترده استفاده می‌شوند، ولی بیشتر آنها وقت‌گیر هستند و حساسیت نسبتا پایینی دارند که در نتیجه، تشخیص نسخه‌های RNA نادر را مشکل یا غیرممکن می‌سازد. گسترش PCR به عنوان روشی برای بررسی الگوی بیان ژن و تشخیص نسخه‌های RNA نادر، حساسیت روش‌های بررسی بیان ژن را متحول کرده است. هم اکنون، می‌توان با استفاده از رنگ‌های فلورسانس، بررسی‌های هم‌زمان و آنی (Real Time) را برای سنجش تولید چندین فراورده انجام داد و یافته‌های پیچیده‌تری در زمینه میزان نسبی رونویسی ژن‌های مختلف به دست آورد.

فرضیه ها

اسپرمها درون SST برای زمان به نسبت طولانی انباشت می‌شوند. بر پایه شواهد موجود، نرخ باروری ونیز تداوم باروری در مرغ‌ها، با شمار اسپرم‌های زنده درون لوله‌های انباشت اسپرم رابطه‌ای مستقیم دارد. با توجه به اینکه کربنیک انهیدراز با تثبیت pH سبب افزایش ماندگاری اسپرم می‌شود و همچنین بیوتین سبب افزایش بیان ژن می‌گردد، می‌توان این نتیجه را گرفت که بیوتین با افزایش بیان آنزیم کربنیک‌آنهیدراز نقش مهمی را در باروری مرغان ایفا کند.

H_0 : مکمل آشامیدنی بیوتین موجب افزایش بیان اویداکتی ژن آنزیم کربنیک‌آنهیدراز در مرغ‌های جوان و مسن لاین آرین نمی‌شود.

---

[۱] Northern blot

[۲] *In situ*hybridization

[۳] RNase protection assay

$\mathbf{H_1}$: مکمل آشامیدنی بیوتین موجب افزایش بیان اویداکتی ژن آنزیم کربنیک‌آنهیدراز در مرغ‌های جوان و مسن لاین آرین می‌شود.

اهداف

هدف از این تحقیق مقایسه بیان ژن آنزیم کربنیک‌آنهیدراز در مرغ‌های جوان نسبت به مرغ‌های مسن لاین آرین می‌باشد که تحت تیمار با مکمل آشامیدنی بیوتین قرار گرفته‌اند.

۲-۱ زنده مانی اسپرم

انباشت اسپرم درون لوله‌های SST با باروری مرغ‌های تخم‌گذار همبستگی مستقیم دارد (داس و همکاران، ۲۰۰۸). تداوم باروری نیز با شمار اسپرم درون لوله‌های انباشت اسپرم همبستگی مستقیم دارد (پیرسون و همکاران، ۱۹۸۸). توان زنده‌مانی اسپرم درون لوله‌های انباشت اسپرم همبستگی بسیار نزدیکی با باروری مرغ‌های تخمگذار دارد. مطالعاتی روی ماندگاری اسپرم در لوله‌های ذخیره اسپرم صورت گرفته است که بی‌حرکتی اسپرم را در دوران نگهداری (هولم و همکاران، ۲۰۰۰)، عکس العمل‌های متقابل ترشحات SST و تحرک اسپرم (زانیبونی و باکست، ۲۰۰۴)، و حفاظت اسپرم از فعالیت‌های سیستم ایمنی (داس و همکاران، ۲۰۰۵) را به عنوان فرایندهایی برای ماندگاری اسپرم پیشنهاد کرده‌اند. گزارش شده است که اسپرم‌های ساکن در SST در مرغ از سر به یکدیگر چسبیده‌اند (فرومان و انجل، ۱۹۸۹). تمایل چسبیدن اسپرم‌ها به یکدیگر ممکن است اساس نگهداری طولانی مدت در شرایط *in vivo* باشد، زیرا این نوع سکونت اسپرم بین پرندگان اهلی متداول می‌باشد. علاوه بر این چندین پروتئین نقش بالقوه‌ای در نگهداری اسپرم در SST دارند که از جمله آنها کربونیک آنهیدراز، آویدین، اکواپورین و آلکالین فسفاتاز می‌باشد (ساسانامی و همکاران، ۲۰۱۲). استروژن، همراه با افزایش شمار سلولهای ایمنی پیرامون لوله‌های انباشت اسپرم، میتوانند با نبوداسپرم در لولههای انباشت اسپرم مرغ های با باروری پایین ارتباط مستقیم داشته باشند.

۲-۲ نقش جنبایی اسپرم در گزینش آن

اسپرم با بهره برداری از توانایی ذاتی در جنبایی[۱] (فرومان و همکاران، ۲۰۰۶) و به کمک حرکات ماهیچه‌های صاف و فعالیت سلول‌های مژکدار سطح مخاطی حفره واژن، به سمت تخمدان انتقال داده می-شود. انتقال زرده به سوی اینفاندیبولوم، مگنوم و ایستموس با حرکات دودی، که به علت کش آمدن لایه ماهیچه صاف دیواره اویداکت آغاز می‌شود، صورت می‌پذیرد (آرجاما و تالو، ۱۹۸۳). تلقیح اسپرم‌های دارای جنبایی بالا ضرورتا به افزایش باروری نمی‌انجامد. برای نمونه جداسازی گلایکوپروتینهای غشای

[۱] mobility

پلاسمایی اسپرم به کمک آنزیم‌ها بر جنبایی اسپرم اثر نمی‌گذارد اما اسپرم‌ها پس از تلقیح نمی‌توانند وارد SST شوند (ویشارت و استیل، ۱۹۹۰). رابرتستون و همکاران (رابرتستون و همکاران ، ۲۰۰۰) نشان دادندکه اسپرمهای خروس و بوقلمون نر باید گلایکوپروتین‌ها و پروتین‌های غشایی منظمی همراه با گروه-های ساکاریدی داشته باشند تا بتوانند به SST وارد شوند و نیز بتوانند با اووسیت واکنش نشان دهند. تلقیح منی‌های نامشابه به واژن باعث شد که شمار اندکی اسپرم وارد SST شود که شاید به دلیل نبود گلایکوپروتین‌های غشایی اسپرم خاص گونه تلقیح شده برای سازگاری با سازوکارهای گزینش اویداکتی اسپرم باشد؛ ولی هنگامی که منی‌های نامشابه به چین خوردگی‌های UVJ افزوده شدند، اسپرم ها وارد SST شدند که نشان می‌دهد فرایند گزینش اسپرم در واژن و نه درSST تنظیم می‌شود (رابرتسون و همکاران، ۲۰۰۰).

۲-۳ اثر pH و یون‌ها بر انباشت اسپرم

تنظیم جنبایی اسپرم در پرندگان ماده احتمالا به بر هم کنش سازه‌هایی مانند pH ، دما و ترکیب یونی بستگی دارد (آشیزاوا و ویشارت، ۱۹۹۴). باکست (باکست، ۱۹۸۰) تفاوت معنی داری را در pH مایع مخاطی بخش میانی واژن مرغ‌های گوشتی ۷/۱۵ (۲۰ دقیقه پس از تخمگذاری) تا ۷/۵۱ (حدود ۸ تا ۱۲ ساعت پس از تخمگذاری) گزارش کرد که می‌تواند جنبایی اسپرم را تحت تاثیر قرار دهد . هولم و ریدراسترال (هولم و ریدراسترال، ۱۹۹۸) فعالیت بالای آنزیم کربنیک‌آنهیدراز را در لوله‌های انباشت اسپرم و بخش اینفاندیبولوم بوقلمون گزارش کردند. با توجه به این که این آنزیم واکنش زیر را کاتالیز می‌کند (نگاره ۲-۱)، حضور آن در این نواحی می‌تواند سبب تغییرات زودهنگام pH شود. از اینرو، غلظت بالای کربنیک‌آنهیدراز در لوله‌های انباشت اسپرم بوقلمون می‌تواند در انباشت درازمدت اسپرم نقش داشته باشد.