Iranian Journal of Animal Science
Vol 47, No 4, Winter 2017 (621-632)
DOI: 10.22059/ijas.2017.213018.653459

علوم دامی ایران
دورهٔ ۴۷، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۵ (ص ۶۳۲-۶۲۱)

تأثیر تزریق درون آمنیوتیکی متیونین- روی و نانو متیونین- روی بر بیان ژن متالوتیونین در جوجه‌های گوشتی

کلثوم رازانی[۱]، مجید متقی‌طلب[۲*] و سید حسین حسینی مقدم[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، دانشیار و استادیار، گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶)

چکیده

تزریق درون آمنیوتیکی متیونین- روی و نانو متیونین- روی، بر میزان بیان mRNA متالوتیونین در کبد و رودهٔ جوجه‌های گوشتی بررسی شد. به این منظور شمار ٤٠٠ عدد تخم‌مرغ بارور(سویهٔ *راس ۳۰۸*) در قالب طرح کامل تصادفی به چهار تیمار، چهار تکرار و ۲۵ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱- بدون تزریق (کنترل منفی)، ۲- تزریق ۱ میلی‌لیتر محلول نمک ۰/۹ درصد (کنترل مثبت)، ۳- تزریق ۱ میلی‌لیتر محلول متیونین- روی و ٤- تزریق ۱ میلی‌لیتر محلول نانو متیونین- روی بودند. تزریق در روز ۱۷ جوجه‌کشی و در مایع آمنیوتیک تخم‌مرغ‌ها انجام شد. نتایج نشان داد، تیمارها تأثیر معنی‌داری بر درصد جوجه‌درآوری نداشتند (P>۰/۰۵). تزریق متیونین- روی و نانو متیونین- روی باعث افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۱) وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ و تا سن سه هفتگی شده، وزن کبد و روده در زمان تفریخ و در سن یک هفتگی به‌صورت معنی‌دار (P<۰/۰۱) افزایش یافت. در مقایسه با تیمارهای کنترل، بیان mRNAی متالوتیونین کبد و روده در نتیجه تزریق متیونین– روی و نانو متیونین– روی، افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۱) داشته و این اختلاف در سن یک هفتگی ادامه یافت. نتیجه‌گیری نهایی این است، تزریق نانو متیونین – روی و متیونین– روی به‌عنوان مکمل تغذیه‌ای جنینی سبب افزایش وزن جوجه‌های گوشتی در سه هفتهٔ اول پرورش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: **تغذیهٔ درون تخم‌مرغی، جوجهٔ گوشتی، متالوتیونین، نانو متیونین- روی.**

The effect of intra amniotic injection of zinc-methionine and nano zinc-methionine on metallothionein gene expression in the broiler chickens

Kolsoom Razani[1], Majid Mottaghitalab[2*] and Seyed Hosein Heseini Moghaddam[3]
1, 2, 3. Ph.D. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran
(Received: Aug. 3, 2016 - Accepted: Feb. 4, 2017)

ABSTRACT

The effects of *intra* amniotic injection of zinc-methionine and nano zinc-methionine on metallothionein mRNA expression of chicken's liver and intestine were studied. Four hundred fertiled eggs (Ross 308 strain) were allocated to 4 treatments, 4 replicates/ treatment and 25 eggs per replicate using a CRD (Complete Random Design) design. Experimental treatments were: 1- no injection (negative control), 2- injection of 1 ml 0.9% saline solution (positive control), 3- injection of 1 ml 25% zinc- methionine solution and 4- injection of 1 ml 25% nano-zinc- methionine solution. On day 17 of incubation, eggs were injected using insulin syringes. Results showed that *in Ovo* injection lead to no significant effect on hatchability. The injection of zinc-methionine and nano zinc-methionine caused significant (P<0.01) increase in chicks weight at hatch, and a week after that. A similar result was obtained for liver and intestine samples. Groups treated with zinc-methionine and nano zinc-methionine showed significant (P<0.01) increase in metallothionein mRNA expression in liver and intestine and remained significant (P<0.01) at day 7 after hatch. Experimental treatments significantly (P<0.01) increased the liver and intestine metallothionein content at day 1 and 7 after hatch. Conclusion is that in ovo injection of zinc-methionine and nano zinc-methionine lead to increase body weight at first 3weeks of broiler rearing.

Keywords: Broiler, *In Ovo* feeding, metallothionein, nano zinc methionine.

* Corresponding author E-mail: m_mottaghi@gstp.ir Tel: +98 911 1318697; +98 13 33461550

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

عنصر روی (Zinc) یک ریزمغذی ضروری برای همهٔ موجودها به‌شمار می‌آید (Chimienti *et al.*,2004; Eide, 2006). این عنصر به‌عنوان عامل کمکی (کوفاکتور) واکنش یاری (کاتالیتیکی) و نیز جزئی از ساختار بسیاری از پروتئین‌ها از جمله عامل‌های رونویسی و پروتئین‌های موسوم به زینک فینگر که به DNA متصل شده و در همانندسازی DNA شرکت می‌کنند، مشارکت دارد (Carpene *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2010; Isani & Carpenè, 2014). همچنین روی در میتوز و فرایند تقسیم یاخته شرکت می‌کند (Kaler & Prasad, 2007). نقش حیاتی عنصر روی در رشد و نمو جنین در بررسی‌های زیادی گزارش شده است (Richards, 1997; Miles, 2000). در اثر کمبود روی افزایش انواع زیادی از یاخته‌ها متوقف و رشد آن‌ها کند می‌شود. افزون بر این بدشکلی مادرزادی (ناقص‌الخلقگی) تا حدودی در همهٔ اندام‌های نتاج محروم از روی مشاهده می‌شود (Miles, 2000; Richards, 1989). در پرندگان ذخیرهٔ روی در اواخر دورهٔ جنینی کاهش می‌یابد (Richards, 2010). از سوی دیگر میزان بالای کلسیم در جیرهٔ مرغ مادر باعث کمبود روی در مرغ مادر و کاهش قابلیت جوجه‌درآوری تخم‌مرغ می‌شود (Hudson *et al.*, 2004). با وجود این‌که روی یک عنصر بسیار ضروری است، مقادیر اضافی آن در یاخته سمی است چراکه با دیگر کاتیون‌ها برای محل اتصال آنزیم‌ها رقابت می‌کند (Gielda *et al.*, 2012).

فرایند تنظیم میزان روی درون‌یاخته (هموستازی روی) پیچیده بوده، یاخته‌ها به سازوکارهای انتقال کارآمد برای حفظ سطح مناسب این یون فلزی و توزیع آن درون‌یاخته نیاز دارند (Eide,2006). به‌طور عمده دو گروه از پروتئین‌ها در هموستازی روی نقش دارند، شامل انتقال‌دهنده‌های غشایی روی که ورود و خروج روی به یاخته را کنترل می‌کنند و متالوتیونین‌ها که توزیع روی در ریزکیسه (وزیکول)های درون‌یاخته را به عهده دارند (Andrews, 2000; Chimienti *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007). متالوتیونین‌ها گروهی از پروتئین‌های غیر آنزیمی با وزن مولکولی کم (۱۰-۶ کیلو دالتون) هستند که با ویژگی‌هایی مانند محتوای بالای سیستئین (حدود ۳۰درصد) نبود اسیدآمینه معطر (آروماتیک) و توزیع گسترده در انواع بافت‌ها و در موجودهای گوناگون شناخته شده و در جذب، انتقال و تنظیم روی در سامانه‌های زیستی (بیولوژیکی) شرکت می‌کنند (Carpene *et al.*, 2007; Davis & Cousins, 2000).

تجمع متالوتیونین در یاخته به بیان ژن و تجزیهٔ پروتئین بستگی داشته و این فرایندها به میزان زیادی بستگی به قابلیت در دسترس بودن (زیست‌فراهمی) عنصر روی درون‌یاخته که از منبع جیره‌ای دریافت شده، دارد (Huang *et al.*, 2007). بررسی‌های چندی نشان داده‌اند، متالوتیونین یک پروتئین سیتوسولی متصل‌شونده به عنصر روی است که در بافت‌های بدن، در پاسخ به میزان روی جیره ساخته می‌شود (Sandoval *et al.*, 1998; Andrews, 2000; Davis, & Cousins, 2000; Ramesh *et al.*, 2003). متالوتیونین به‌طور اساسی در سوخت‌وساز (متابولیسم) روی نقش دارد. متالوتیونین نه تنها به روی متصل می‌شود بلکه رونویسی بیان متالوتیونین با میزان روی جیره تنظیم می‌شود (Coyle *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007; Cousins & Lee-Ambrose, 1992).

هنگامی‌که روی توسط یاخته جذب می‌شود باید به‌سرعت به پروتئین‌ها اتصال یابد، چون روی آزاد سمی است. بنابراین یاخته با تولید mRNA متالوتیونین به‌عنوان واسطه[1] و پس‌از آن با تولید پروتئین متالوتیونین به جذب روی پاسخ می‌دهد. سپس متالوتیونین می‌تواند تا هنگامی‌که دیگر پروتئین‌ها و آنزیم‌های یاخته به روی نیاز پیدا کنند، به آن اتصال یابند (McCormick,1984; Davis, & Cousins,2000 ; Dufner *etal.*,2003). سطوح بیان mRNA و میزان پروتئین متالوتیونین به‌عنوان بهترین شاخص وضعیت روی در بدن و نیز معیاری قابل‌اعتماد به‌منظور ارزیابی زیست‌فراهمی منابع مختلف روی در جیره به‌شمار می‌آید (McCormick, 1984; Sandoval *et al.*, 1998; Sullivan *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2004, Richards *et al.*,

1. Intermedeate

Archive of SID

www.SID.ir

2007; Huang *et al.*, 2009). قابلیت دسترسی زیستی ترکیب‌های مختلف آلی و کانی روی در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی از راه سنجش میزان روی در بافت‌های مختلف و یا از راه سنجش میزان بیان متالوتیونین قابل‌اندازه‌گیری است. زیست‌فراهمی برخی از ترکیب‌های آلی و کانی روی در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی از راه سنجش میزان بیان متالوتیونین بررسی شده است (Richards *et al.*, 2007).

اثرگذاری تغذیهٔ درون تخم‌مرغی (IOF)[1] ترکیب‌های روی (به‌ویژه ترکیب‌های نانو روی) به‌عنوان مکمل‌های تغذیه‌ای در دورهٔ جنینی کمتر بررسی شده است.

هدف از انجام این بررسی، ارزیابی امکان افزایش جذب عنصر روی در جوجه در اثر تزریق درون آمنیوتیکی ترکیب روی- متیونین به صورت‌های معمولی و نانو، تأثیر آن بر بیان کمی متالوتیونین در دو سطح mRNA و پروتئین در کبد و رودهٔ جوجه‌های گوشتی بود.

مواد و روش‌ها

جوجه‌کشی و عملیات تزریق

۴۰۰ عدد تخم‌مرغ از یک گلهٔ مادر گوشتی (سویهٔ تجاری *راس ۳۰۸*) در سن ۴۵ هفتگی پس از توزین با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و تعیین دامنهٔ وزنی ۱±۵۵ گرم به چهار تیمار (هر تیمار دارای چهار تکرار و ۲۵ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار) تقسیم، و در دستگاه جوجه‌کشی با شرایط استاندارد (دمای ۳۷/۸ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۸درصد) قرار داده شدند. در روز ۱۷ جوجه‌کشی، با استفاده از نوربینی و اطمینان از زنده بودن جنین، ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های آماده‌شده درون تخم‌مرغ‌ها تزریق شد. تیمارها عبارت بودند از: تیمار اول، محلول ۲۵درصد متیونین- روی (Germany, Merck)، تیمار دوم، محلول ۲۵درصد نانو متیونین- روی (تولیدی شرکت نانو شیمی سبز، مستقر در پارک علم و فناوری گیلان)، تیمار سوم، محلول نمک ۰/۹ درصد، تیمار چهارم، بدون تزریق. محلول‌های آزمایشی با سرنگ ۱ میلی‌لیتری استریل با سر سوزن درجهٔ ۲۱ و در عمق ۱۸ میلی‌متری و در کیسهٔ آمنیون تزریق شد. پیش از تزریق انتهای پهن تخم‌مرغ با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از ایجاد سوراخ روی پوسته، محلول‌های مورد نظر به‌دقت به درون کیسهٔ آمنیون تزریق شد، منفذ پوسته با پارافین مذاب سترون (استریل) بسته و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شدند (Tako *et al.*, 2005).

پرورش جوجه‌ها و نمونه‌گیری از بافت

پس از تفریخ جوجه‌ها، در آغاز درصد تفریخ هر یک از تیمارها محاسبه و ثبت، جوجه‌ها به‌طور انفرادی توزین و به سالن پرورش منتقل و به مدت شش هفته در شرایط استاندارد پرورش یافتند. دسترسی به آب و خوراک در دورهٔ پرورش، آزاد و جیره‌ها بر پایهٔ توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات آمریکا (NRC, 1994) تنظیم، تهیه و در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. در سن یک و هفت‌روزگی از هر تکرار دو عدد جوجه با توجه به میانگین تکرار انتخاب و پس از کشتار به روش جابه‌جایی گردن، کبد و رودهٔ آن‌ها جدا و توزین شدند. نمونه‌های کبد و روده تهیه و در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس ذخیره شد.

اندازه‌گیری میزان متالوتیونین و پروتئین کل در کبد و روده

متالوتیونین به روش سانترفیوژ افتراقی[2] استخراج شد. نمونه‌های بافتی پس از همگن (هموژنیزه) شدن در سه حجم بافر یکنواخت‌کننده (حاوی ساکاروز ۰/۵ مولار، بافر تریس HCL ۲۰ میلی‌مولار با pH=۸/۶، بتامرکاپتواتانول ۰/۱درصد) به مدت بیست دقیقه در g ×۳۰۰۰ سانترفیوژ شدند. محلول رویی جدا و برای سنجش پروتئین به دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس منتقل شد. پس از حذف محلول رویی، محلول باقی‌مانده در ته تیوب برای تعیین میزان متالوتیونین (Lined and Garcia-Vazquez method; 2006) استفاده شد. برای سنجش پروتئین در آغاز بافر ۲

1. In Ovo Feeding

2. Differential Centrifugation

Archive of SID

www.SID.ir

(۱/۰۵ میلی‌لیتر الکل اتانول سرد و ۸۰ میلی‌لیتر کلروفرم) به ازای هر ۱ میلی‌لیتر محلول رونشین اضافه شد. نمونه‌ها مخلوط و به مدت ده دقیقه در g ×۶۰۰۰ در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس سانترفیوژ شد. در مرحلهٔ بعد اتانول سرد به اندازهٔ سه برابر حجم محلول رونشین اضافه و به مدت یک ساعت در دمای منهای ۲۰- درجهٔ سلسیوس انکوبه شد. در مرحلهٔ بعد نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در g × ۶۰۰۰ سانترفیوژ شده، پلیت به‌دست‌آمده توسط بافر ۳ یا بافر شستشو (اتانول، کلروفرم، بافر یکنواخت‌کننده به نسبت ۱۲:۱:۸۷) شسته شد. پلیت‌ها به مدت ده دقیقه در g × ۶۰۰۰ سانترفیوژ و سپس خشک شدند. پلیت‌ها، با افزودن بافر ۴ (۳۰۰میکرولیتر تریس HCL ۵ میلی‌مولار، EDTA ۱میلی‌مولار، pH=۷) سوسپانسیون شدند. سپس ۴/۲ میلی‌لیتر اسید نیترو بنزوئیک ۰/۴۳ میلی‌مولار در بافر فسفات ۰/۲ مولار، pH=۸، اضافه و در دمای اتاق به مدت سی دقیقه نگهداری شد. درنهایت برای اندازه‌گیری غلظت سولفیدریل احیا، جذب نوری دروایه (سوسپانسیون) با دستگاه الایزا خوان (Awareness, Statfax 2100, USA) در ۴۱۲ نانومتر خوانده و درنهایت با منحنی استاندارد، گلوتاتین به‌عنوان مرجع مقایسه شد (Desouky, 2012).

اندازه‌گیری پروتئین کل نمونه

پروتئین کل به روش Lowry (1951) اندازه‌گیری شد. جذب نوری محلول رونشین (محصول نخستین سانترفیوژ در سنجش متالوتیونین)، پنج دقیقه پس از افزودن معرف Lowry (Sigma, UK) در طول‌موج ۵۴۵ آنگستروم در دستگاه الایزا خوان (Awareness, Statfax 2100, USA) خوانده و پس از مقایسه با منحنی استاندارد، پروتئین کل نمونه محاسبه شد.

اندازه‌گیری بیان ژن متالوتیونین

cDNA و ساخت RNA استخراج

استخراج RNA نمونه‌ها با استفاده از کیت استخراج (AccuZol REAGENT) و بر پایهٔ دستورکار شرکت سازنده (Inc Korea Bioneer) انجام شد. کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از ژل الکتروفورز و کمیت آن به روش طیف‌سنجی نوری (اسپکتروفتومتری) و با دستگاه طیف‌سنج (NanoDrop 2000, USA) و در طول‌موج ۲۸۰/ ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. RNA استخراجی بی‌درنگ برای مرحلهٔ نسخه‌برداری معکوس و ساخت cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (AccuPowerCycleScript RT PreMix) بر پایهٔ دستورکار شرکت سازنده (Bioneer Laboratories, Hercules, CAcatalog, K-2046) و در دستگاه PCR (LabCycler, Germany) استفاده شد. کمیت‌سنجی cDNA ساخته‌شده با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (NanoDrop 2000, USA) انجام شد. پس از طیف‌سنجی به‌منظور همسان‌سازی غلظت cDNA تولیدشده رقیق‌سازی cDNA با آب مقطر بدون DNase به غلظت تقریبی صورت گرفته و غلظت نهایی توسط نانودراپ تأیید شد.

بررسی بیان ژن MT4

برای بررسی بیان ژن هدف MT4 و ژن کنترل درونی β actin، آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی و توسط شرکت Shanghai Generay Biotech CO. ساخته شد (جدول ۱). یکتا بودن محل اتصال آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار BLAST و پایگاه داده‌ای RT primer Data base تأیید شد. پس از انجام گرادیان دمایی، دمای اتصال (annealing) آغازگرها تعیین شد.

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای اختصاصی طراحی‌شدهٔ ژن‌های MT4 وβ-actin

Table 1. Specific primers properties designed for MT4 and β-actin genes

Annealing point temperature	Base per length	Primers sequences	Gene register number in the World Bank	Genes
56	151	Forward: 5′-ATGGACCCTCAGGACTG-3′ Reverse: 5′CAGTGGCAGCAGCTGCACTT-3′	NM_205275	MT4
55.5	132	Forward: 5′ TGATATTGCTGCGCTCGTTG 3′ Reverse: 5′•CATCACAATACCAGTGGTAC-3′••	NM_205518.1	β-actin

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری بیان ژن از روش افزایش ژن طی واکنش Real time PCR و در دستگاه CFX 96, Bio (Biosystems, Germany Applied) Rad با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین، بر پایهٔ روش استاندارد نسبی صورت گرفت. افزایش بر پایهٔ (Perfect Real (Termo Scientific, Time انجام شد. اجزای واکنش Real time PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (مخلوط آمادهٔ سایبرگرین ۱۲/۵ میکرولیتر، آغازگر رفت ۰/۴ میکرولیتر، آغازگر برگشت ۰/۴ میکرولیتر، c DNA ۱/۵ میکرولیتر و آب دو بار تقطیر بدون نوکلئاز: ۱۰/۲ میکرولیتر) و غلظت نهایی مواد در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. اجزای واکنش استاندارد Real Time PCR

Table 2. Real standard reaction components Time PCR

Reaction substances	volume (ml)
SYBR Green	12.5
Forward primer	0.4
Reverse primer	0.4
cDNA	1.5
Double distilled water free of nucleases	10.2
Total volume	25

برنامهٔ گرمایی برای هر دو ژن با استفاده از روش ریل تایم یکسان و بنابر جدول ۳ بود.

پس از انجام واکنش افزایش به روش Real time PCR داده‌های خام به‌صورت Ct (Threshold cycle) از دستگاه استخراج و پس از نرمال‌سازی نسبت به ژن کنترل (β actin) اندازه‌گیری میزان بیان ژن MT۴ با استفاده از روش کمیت سنجی نسبی (Relative Quantification) و با استفاده از رابطهٔ لایوک ($2^{-\Delta\Delta CT}$) انجام شد (Livak, 2001).

تجزیه‌وتحلیل آماری

این طرح در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تیمار و چهار تکرار اجرا، داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute, 2004) تجزیه‌وتحلیل شده و میانگین‌ها در سطح احتمال ۱درصد با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند).

$$Y_{ij} = \mu + t_j + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

در رابطهٔ بالا Y_{ij} میزان هر مشاهده (داده)، μ میانگین کل، t_j اثر تیمار و ε_{ij} خطای آزمایشی است.

جدول ۳. برنامهٔ گرمایی افزایش ژن‌های MT4 و β-actin

Table 3. Heat program for MT4 and β-actin genes proliferation

	Reaction temperature (°C)	Reaction time	Number of cycles
Primary denaturation	95	3 minutes	1 cycle
Denaturation	95	30 seconds	40 cycles
Primer annealing	MT4: 56 β-actin: 55.5	30 seconds	40 cycles
Elongation	72	30 seconds	40 cycles
Extension Elongation	72	5 minutes	1 cycle

نتایج

نتایج مربوط به اثر تغذیه درون آمنیوتیکی متیونین- روی و نانو متیونین- روی بر جوجه‌درآوری و ویژگی‌های جوجه‌کشی در جدول ۴ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر قابلیت تفریخ و درصد جوجه‌درآوری نداشتند، اما تزریق درون آمنیوتیکی متیونین- روی و نانو متیونین- روی موجب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) وزن جوجه‌های تفریخ شده نسبت به گروه کنترل شد.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر وزن جوجه‌ها در سن یک هفتگی (جدول ۵) معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) بوده و تزریق ترکیب متیونین- روی (معمولی و نانو) موجب افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) وزن کبد و روده در روزهای یک و هفت پس از تفریخ شدند.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر وزن جوجه‌ها در زمان تفریخ و نیز در سن یک هفتگی و سه هفتگی (جدول۶) معنی‌دار ($P<۰/۰۱$) بود اما اختلاف مشاهده‌شده در وزن جوجه‌ها در پایان هفتهٔ ششم از نظر آماری معنی‌دار نبود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. تأثیر تزریق متیونین- روی و نانو متیونین -روی بر جوجه‌درآوری (درصد)، وزن زنده (گرم) و وزن نسبی (درصد) جوجه‌های تفریخ شده*

Table 4. Effect of Injection of Zinc-Methionine and Nano Zinc-Methionine on hatchability (%), live body weight (gr) and relative body weight (%) of hatching chicks*

Treatments	Hatchability	Live body weight (g)	Relative body weight (%)	Egg weight (g)
MetZn	90.97	43.02 [a]	77.13	55.77
NMetZn	90.47	42.77 [a]	77.43	55.24
PCont	90.87	41.86 [b]	76.35	54.84
NCont	89.53	41.13 [b]	75.89	54.69
SEM	0.395	0.064	0.336	0.137
P Value	0.133	0.001	0.265	0.218

* حرف‌های متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار در آن ستون است (P< ۰/۰۱).

* Means within a column with different superscripts are significantly different (P<0.01).

جدول ۵. تأثیر تزریق متیونین- روی و نانو متیونین- روی بر وزن کبد و روده در سن یک و هفت‌روزگی پس از تفریخ*

Table 5. Effect of Injection of Zinc-Methionine and Nano Zinc-Methionine on liver and intestine weight at 1 and 7 d of age after hatch*

Treatments	1 Day of age			7 Day of age		
	Live body weight (g)	Liver weight (g)	intestine weight (g)	Live body weight (g)	Liver weight (g)	intestine weight (g)
MetZn	43.02 [a]	1.19[a]	6.16 [a]	128.87 [a]	6.65 [a]	34.68 [a]
NMetZn	42.77 [a]	1.27[a]	6.29 [a]	131.22 [a]	6.74 [a]	36.62 [a]
PCont	41.86 [b]	1.07[b]	5.33 [b]	119.28 [b]	5.91 [b]	30.33 [b]
NCont	41.13 [b]	0.93[b]	5.27 [b]	120.73 [b]	6.07 [b]	31.11 [b]
SEM	0.064	0.025	0.082	1.66	0.045	0.417
P Value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.005	0.001

* حرف‌های متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار در آن ستون است (P< ۰/۰۱).

* Means within a column with different superscripts are significantly different (P<0.01).

جدول ۶. تأثیر تزریق متیونین- روی و نانو متیونین- روی بر افزایش وزن هفتگی جوجه‌ها*

Table 6. Effect of Injection of Zinc-Methionine and Nano Zinc-Methionine on weekly chicken weight gain*

Treatments	Live body weight (g) hatch	Live body weight (g) week 1	Live body weight (g) week 3	Live body weight (g) week 6
MetZn	43.02 [a]	128.87 [a]	610.6 [a]	2370
NMetZn	42.77 [a]	131.22 [a]	592.9 [a]	2315
PCont	41.86 [b]	119.28 [b]	560.6 [b]	2290
NCont	41.13 [b]	120.73 [b]	540.5 [b]	2275
SEM	0.064	1.66	9.37	38.55
P Value	0.001	0.001	0.001	0.165

* حرف‌های متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف آماری معنی‌دار در آن ستون است (P< ۰/۰۱).

* Means within a column with different superscripts are significantly different (P<0.01).

در این بررسی تأثیر متیونین- روی و نانو متیونین- روی بر بیان ژن متالوتیونین در کبد و رودهٔ جوجه‌ها بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که تزریق هر دو نوع ترکیب موجب افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۱) بیان mRNA متالوتیونین کبد و رودهٔ جوجه‌ها در روزهای یک و هفت پس از تفریخ شد (جدول ۷).

جدول ۷. تأثیر تزریق متیونین-روی و نانو متیونین-روی بر میزان بیان ژن MT4 در کبد و رودهٔ جوجه* در سن یک و هفت‌روزگی پس از تفریخ**

Table 7. Effect of Injection of Zinc-Methionine and Nano Zinc-Methionine on MT4 gene expression in chicks* liver and intestine at 1 and 7 d of age after hatch**

Treatments	Intestine		Liver	
	1 day of age	7 day of age	1 day of age	7 day of age
MetZn	3.30 [b]	4.93 [a]	3.84 [b]	5.34 [b]
NMetZn	2.22 [a]	3.57 [b]	5.23 [a]	8.94 [a]
PCont	1.08 [c]	1.06 [c]	1.06 [c]	1.1 [c]
NCont	1.01 [c]	1.00 [c]	0.96 [c]	1.05 [c]
SEM	0.009	0.055	0.044	0.039
P Value	0.001	0.006	0.001	0.001

* هر عدد میانگین هشت جوجه است.

** میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۱) با هم دارند.

* Each number represents average of eight chicks.

** Means within a column with different superscripts are significantly different (P<0.01).

Archive of SID

www.SID.ir

در سنین یک‌روزگی و یک هفتگی میزان متالوتیونین کبد و روده در تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) نسبت به گروه‌های کنترل افزایش یافت (جدول ۸). همان‌گونه که در جدول‌های ۷ و ۸ مشاهده می‌شود تیمار نانو متیونین- روی در هر دو بررسی بیان mRNA و میزان پروتئین متالوتیونین کبد و روده در سنین یک و هفت‌روزگی نسبت به تیمار متیونین-روی تأثیر افزایشی معنی‌دار (P<۰/۰۱) داشته است.

جدول ۸. تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی متیونین- روی و نانو متیونین- روی بر میزان متالوتیونین (میلی‌گرم متالوتیونین در گرم بافت) کبد و رودهٔ جوجه‌ها در سن یک و هفت‌روزگی*

Table 8. Effect of Injection of Zinc-Methionine and Nano Zinc-Methionine on chick's liver and intestine metallothionein content (mg per g tissue) at 1 and 7 d of age after hatch*

Treatments	Intestine		Liver	
	1 day of age	7 day of age	1 day of age	7 day of age
MetZn	25.22 b	31.97 b	39.97 b	50.73 b
NMetZn	31.80 a	39.93 a	48.55 a	59.05 a
PCont	19.24 c	25.50 c	28.24 c	31.24 c
NCont	20.05 c	27.05 c	27.52 c	31.78 c
SEM	0.705	0.419	0.624	0.587
P Value	0.001	0.001	0.005	0.005

* میانگین‌هایی که در هر ستون حرف‌های متفاوت دارند، اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۱) با هم دارند.

* Means within a column with different superscripts are significantly different (P<0.01).

بحث

روی (Zinc) به علت ویژگی‌های شیمیایی خاص، نقش‌های زیستی حیاتی منحصربه‌فردی ایفا می‌کند (Ramesh *et al.*, 2003). به‌رغم اینکه یک عنصر بسیار ضروری به شمار می‌آید، میزان‌های اضافی آن در یاخته سمی است، چون با دیگر کاتیون‌ها برای محل اتصال آنزیم‌ها رقابت کرده و بنابراین میزان آن باید با دقت کنترل شود (Gielda *et al.*, 2012). هموستازی روی در یاخته‌ها از راه تنظیم هماهنگ ورود و خروج روی به یاخته و نیز توزیع آن بین اندامک‌های درون‌یاخته و نیز از راه ناقلان موجود در غشاهای یاخته‌ای (زینک ترانسپورترها) و ناقلان درون‌یاخته‌ای (متالوتیونین و CRIP) انجام می‌شود (Chimienti *et al.*, 2004). هنگامی‌که سطوح بالایی از روی درون‌یاخته وجود دارد، متالوتیونین با اتصال به روی از بروز سمیت در یاخته جلوگیری کرده و یک مخزن ناپایدار از این عنصر برای استفادهٔ دیگر پروتئین‌ها که در شرایط کمبود روی در یاخته، آزاد می‌شود، فراهم می‌کند (Dufner *et al.*, 2003). بسیاری از محققان بیان متالوتیونین را در بافت‌های مختلف از جمله کبد بررسی کرده‌اند (Fleet *et al.*, 1990; Fernando *et al.*, 1998; Trayhurn *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2004)، اما چگونگی سازوکار کبد برای بیان بالاترین سطح متالوتیونین تاکنون مبهم مانده است. بر پایهٔ یافته‌های یک بررسی (Davis & Cousins, 2000) در حالت طبیعی در کبد انسان، روی، عمده‌ترین فلزی است که به متالوتیونین متصل می‌شود.

بررسی فرایندهای سوخت‌سازی (متابولیکی) مرتبط با جذب روی در زیست‌شناسی ضروری است چون این عنصر برای همهٔ موجودها ضروری است (Eide,2006). بین عناصر کمیاب در بدن، عنصر روی از نظر فراوانی پس از آهن قرار داشته و کمبود آن در انسان در رتبهٔ سوم پس از کمبود آهن و ویتامین آ قرار دارد (Ramesh *et al.*, 2003). بنابراین در این بررسی میزان متالوتیونین و سطح بیان mRNA متالوتیونین در کبد و رودهٔ جوجه‌های گوشتی پس از تزریق درون آمنیوتیکی روی- متیونین و نانو روی- متیونین بررسی شد. نتایج این آزمایش گویای افزایش معنی‌دار میزان متالوتیونین و همچنین سطح mRNA متالوتیونین کبد و روده پس از تفریخ جوجه‌ها بود.

نتایج بررسی‌های چندی نشان داد که متالوتیونین یک پروتئین سیتوسولی متصل شونده به عنصر روی است که در بافت‌های مختلف، در پاسخ به میزان روی در جیره ساخته می‌شود (Richards, 1989; Davis, & Cousins, 2000; Coyle *et al.*, 2002; Dufner *et al.*, 2003).

افزودن مکمل روی (سولفات روی) به میزان ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیرهٔ جوجه‌ها موجب افزایش خطی میزان متالوتیونین کبد، کلیه و پانکراس شد (Cao *et al.*, 2000). میزان متالوتیونین کبد و پانکراس جوجه‌ها پس از مصرف جیره‌های

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی استات و یا اکسید روی افزایش یافت (Sandoval *et al.*, 1998). افزایش سطوح بیان متالوتیونین در بافت‌های مختلف (کبد، کلیه، پانکراس و مخاط روده) جوجه‌های گوشتی پس از افزودن مقادیر بالای روی (ppm ۱۶۰۰۰-۱۰۰۰) به جیره گزارش شد (Oh *et al.*, 1979). این محققان نتیجه گرفتند که پس از تغذیهٔ جیره‌هایی با کمبود روی، روی به‌سرعت از متالوتیونین ناپدید شده که بیانگر پیوند بسیار ناپایدار و سست متالوتیونین و روی است (MacCormic *et al.*, 1984, Fleet *et al.*, 1990; Sandoval *et al.*, 1997) نیز نتایج همسانی در رابطه با تأثیر ترکیب‌های مختلف روی بر افزایش میزان متالوتیونین و سطح mRNA متالوتیونین در کبد، پانکراس و کلیهٔ جوجه‌ها گزارش کردند.

در این بررسی ترکیب آلی متیونین-روی و ترکیب نانو متیونین-روی منجر به افزایش میزان متالوتیونین و سطح mRNA متالوتیونین در کبد شد که با یافته‌های پیشین همخوانی دارد. افزون بر این در این بررسی تزریق ترکیب‌های روی در اواخر دورهٔ جنینی به کیسهٔ آمنیون موجب افزایش میزان پروتئین متالوتیونین و سطوح mRNA متالوتیونین کبد و روده پس از تفریخ شد. این نتایج با یافته‌های Fernando *et al.* (1989) همخوانی دارد. آنان گزارش کردند که سطوح پایین mRNA متالوتیونین کبد جنین جوجه پس از تزریق عنصرهای روی و مس در دورهٔ جنینی افزایش‌یافته و همچنین افزایش سریع سطوح mRNA متالوتیونین کبد پس از تفریخ را گزارش کردند. عامل‌هایی که بیان متالوتیونین را در تکامل کبد تحت تأثیر قرار می‌دهند، ناشناخته مانده‌اند. اما سطوح روی و مس جیره mRNA متالوتیونین کبد را در هفتهٔ اول پس از تفریخ تحت تأثیر قرار می‌دهند (Fernando *et al.*, 1989).

افزایش زیادی در سطوح mRNA متالوتیونین کبد و پانکراس جوجه‌های لگهورن پس از تزریق زیرجلدی ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول‌های گلوکوکورتیکوئید، لیپوپلی‌ساکارید، کلرید روی و کلرید مس گزارش شد (Wei & Andrews, 1988). بر پایهٔ مشاهدات این محققان القای mRNA متالوتیونین در طیور به‌وسیلهٔ عنصرهای مس و روی وابسته به دُز (dosage dependent) بوده و همچنین در شرایط آزمایشی روی و مس نسبت به گلوکوکورتیکوئیدها و لیپوپلی ساکاریدها، محرک‌های قوی‌تری برای القای تولید متالوتیونین هستند.

تأثیر تزریق عروقی محلول سولفات روی ($ZnSo_4$) در جوجه‌های نر (۲۲ روزه) بررسی شد (Shen *et al.*, 2013). یافته‌های این تحقیق نشان داد که سطوح mRNA متالوتیونین و میزان متالوتیونین پانکراس ۶ و ۱۲ روز پس از تزریق افزایش‌یافته که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. در شرایط این تحقیق اندازه‌گیری میزان متالوتیونین و سطح mRNA متالوتیونین کبد و روده در سنین یک و هفت‌روزگی جوجه‌ها (۵ و ۱۲ روز پس از تزریق مکمل روی) انجام شد و در هر دو زمان اندازه‌گیری افزایش میزان و سطح mRNA متالوتیونین مشاهده شد، هماهنگ با نتایج شن و همکاران او، ناظر بر اثر فزاینده و القاکنندهٔ ترکیب‌های روی بر سطح mRNA متالوتیونین در بافت‌های جوجه و باقی ماندن آن تا چند روز پس از تزریق است.

Richards *et al.* (2007) زیست‌فراهمی ترکیب‌های مختلف روی را در جیرهٔ جوجه‌های گوشتی از راه اندازه‌گیری بیان متالوتیونین در روده بررسی کردند. بر پایهٔ یافته‌های آنان اندازه‌گیری بیان mRNA متالوتیونین در برخی بافت‌ها مانند روده و کبد نسبت به اندازه‌گیری میزان روی در همان بافت‌ها، وضعیت روی بدن و قابلیت دسترسی آن را به‌طور دقیق‌تری برآورد می‌کند (Richards *et al.*, 2007).

در بررسی‌های با نمونه‌های انسانی نیز بیان mRNA متالوتیونین در برخی بافت‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی وضعیت روی بدن بررسی شده است. پس از یک دوره افزودن مکمل روی به برنامهٔ غذایی افراد جوان سطوح mRNA متالوتیونین درمونوسیت‌ها و اریتروسایت‌های آن‌ها افزایش می‌یابد (Sullivan *et al.*, 1998). بیان mRNA متالوتیونین در لمفوسیت‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی وضعیت روی در انسان نیز بررسی شد (Allan *et al.*, 2000). بر پایهٔ یافته‌های

Archive of SID

www.SID.ir

آن‌ها کمبود ملایم روی در برنامهٔ خوراکی آزمایشی به‌طور شایان‌توجهی منجر به کاهش سطح mRNA متالوتیونین لمفوسیت‌ها می‌شود. با برطرف کردن کمبود و افزودن مکمل روی به برنامهٔ غذایی، سطح mRNA متالوتیونین به سرعت افزایش می‌یابد.

در بررسی دیگر (Trayhurn *et al.*, 2000) القای سریع تولید متالوتیونین در کبد و کلیهٔ موش‌ها، ۶ و ۲۴ ساعت پس از تزریق زیرپوستی یک دوز منفرد ($ZnCl_2$) 1 mg/kg body weight مشاهده شد، اما تغییری در سطح mRNA متالوتیونین در بافت چربی سفید اپیدیدیومی ثبت نشد. در مقابل، افزایش بسیار زیادی (شانزده برابر) در mRNA متالوتیونین در کبد در هر دو زمان اندازه‌گیری مشاهده شد. سطوح mRNA متالوتیونین در بافت‌های موش صحرایی یک پاسخ اغراق‌آمیز نسبت به افزایش مصرف روی جیره نشان داده، اما در پاسخ به مس جیره تغییر آن کمتر است، که ناظر بر برتری انتخاب روی در مقایسه با مس برای القای اتصال MTF-1[1] به توالی[2] MRE است. پاسخ دو مرحله‌ای سطوح mRNA متالوتیونین به‌عنوان یک عملکرد از مصرف روی جیره، با بیشترین بیان در مصرف جیره حاوی ۱۰۰ mg Zn/kg در موش صحرایی می‌تواند به تنظیم خودبه‌خودی تولید متالوتیونین به سطوح بالاتر مصرف روی مرتبط باشد (Cousins & Lee-Ambrose, 1992). عامل‌های چندگانه اتصال ممکن است این فرایندهای تنظیم‌شده توسط فلز را تغییر دهند. جهش null ژن MTF-1 منجر به مرگ‌ومیر جنینی می‌شود درحالی‌که موش‌های MT-1 and -2 knockout (KO) زنده ماندند (Coyle *et al.*, 1995).

سازوکارهای مولکولی بیان متالوتیونین به‌خوبی شناخته نشده، اما این دیدگاه پذیرفته شده است که بیان متالوتیونین به‌ویژه وابسته به عنصرهاست (Sakulsak, 2012). وجود اجزاء پاسخ‌دهنده به فلز (MRE) در توالی بالادست ژن متالوتیونین مدارک لازم دال بر رونویسی متالوتیونین در اثر القای فلزات را اثبات می‌کند. پروتئین متصل به MRE عامل فلزی رونویسی (MTF-1) نامیده شده و به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ مثبت برای آغاز بیان ژن متالوتیونین عمل می‌کند. این عامل فلزی رونویسی (MTF-1) برای اتصال بهینه به DNA به افزایش غلظت روی نیاز دارد (Otsuka, 2001).

اتصال MTF-1 به MRE در آزمایشگاه تنها از راه یون‌های روی القا می‌شود، که به مفهوم عمل MTF-1 به‌مثابهٔ یک پروتئین حساس به روی است. اگرچه سازوکاری که به چنین عامل وابسته به روی (ZRF)[3] اجازه پاسخ به انواع مختلف فلز را می‌دهد، در محیط زنده هنوز شناسایی نشده است (Carpene *et al.*, 2007; Coyle *et al.*, 2002; Otsuka, 2001).

مستندهای مختلفی ناظر به این است که شش دومین (domain) انگشت روی متصل‌شونده به DNA به‌شدت محافظت‌شده MTF-1 به‌عنوان دومین (domain) حسگر روی (zinc-sensing) عمل کرده و اتصال‌دهنده‌های بین شش انگشت مختلف می‌تواند فعالانه در تعدیل رونویسی MTF-1 به هسته و اتصال به پروموتور ژن MT1 شرکت کنند. فعالیت MTF-1 توسط بازدارندهٔ حساس به روی (MTI)[4] جلوگیری می‌شود (Sakulsak, 2012; Suhy *et al.*, 1999; Eide, 2006). بنابراین به علت اثر متقابل روی با MTF-1 تصور می‌شود که روی در تنظیم بیان برخی ژن‌ها از جمله متالوتیونین و ناقلان غشایی خود (خانوادهٔ ZnT) نقش اساسی داشته باشد (Chimienti *et al.*, 2004).

این پژوهش در تکمیل بررسی پیشین این گروه در بررسی تأثیر روی- متیونین و نانو روی- متیونین بر بیان ناقل روی (ZnT1) در یاخته‌های جذبی رودهٔ جوجه انجام شد. به علت قابلیت دسترسی پایین روی به شکل مینرالی، روی- متیونین (Zinc Metioneine) که یک ترکیب آلی روی با قابلیت دسترسی بالاست، استفاده شد. افزون بر این تأثیر ترکیب نانو روی- متیونین (Nano Zinc Metioneine) در این بررسی ارزیابی شد.

بنیان‌های سیستئین مهم‌ترین اسیدهای آمینه در

1. Metal-responsive transcription factor 1
2. Metal-responsive element
3. Zinc-responsive factor
4. Metal-responsive transcription inhibitour

Archive of SID

www.SID.ir

ساختار و ترکیب متالوتیونین هستند، چراکه آن‌ها نقاط کلیت‌کنندهٔ فلزها در هنگام تشکیل خوشه‌های متال تیولات هستند (Isani & Carpenè, 2014). در بدن اسید آمینهٔ سیستئین از اسید آمینهٔ متیونین ساخته می‌شود. بنابراین منطقی است که فرض کنیم روی و متیونین موجود در روی- متیونین و نانو روی- متیونین هر دو در افزایش بیان متالوتیونین نقش دارند. در این بررسی تأثیر روی و متیونین نه به‌طور جداگانه بلکه به‌صورت ترکیب روی و متیونین بر بیان متالوتیونین بررسی شد. ترکیب جدید نانو روی- متیونین که در این آزمایش بررسی شد هیچ‌گونه تأثیر سوئی بر سلامت جنین و جوجه‌ها در دورهٔ جنینی و در کل دورهٔ حیات (شش هفته پرورش) نداشت. بنابراین یک ترکیب محرک و بی‌خطر به‌عنوان مکمل روی در تغذیهٔ جنینی طیور گوشتی معرفی، و البته پیشنهاد می‌شود که اثر احتمالی بیماری‌شناختی (پاتولوژیکی) ترکیب نانو متیونین-روی در کبد، روده و دیگر اندام‌های جوجه‌های گوشتی به‌منظور افزایش اطمینان از بی‌خطر بودن این ترکیب برای پرنده انجام شود.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی:

۱. بیان ژن و پروتئین متالوتیونین در روده و کبد جوجه‌ها در اثر تزریق درون آمنیوتیکی روی- متیونین و نانو روی- متیونین ارتقاءیافته و در پی آن بر عملکرد زیستی و تغذیه‌ای پرنده تأثیرگذار است.

۲. وزن کبد و رودهٔ جوجه‌ها پس از تزریق درون آمنیوتیکی روی- متیونین و نانو روی- متیونین افزایش یافت همچنین تزریق درون آمنیوتیکی روی- متیونین و نانو روی- متیونین موجب افزایش وزن جوجه‌ها از زمان تفریخ تا هفتهٔ سوم پرورش شد.

۳. در تحقیقات نوین، تغذیهٔ درون تخم‌مرغی (IOF) روی- متیونین و نانو روی- متیونین در درک و شناخت سازوکارهای مولکولی و یاخته‌ای درگیر در جذب ریزمغذی ضروری روی سودمند است.

سپاسگزاری

از همکاری مسئولان پارک علم و فناوری گیلان، مؤسسهٔ جوجه‌کشی نوید جوجه و سرکار خانم مهندس هرمزدی به خاطر مساعدت‌هایی که در تأمین مواد و لوازم آزمایشگاهی مورد نیاز این پروژه داشته‌اند، و آقای دکتر گل شکن، مدیرعامل شرکت نانو شیمی سبز به دلیل آماده‌سازی و در اختیار گذاشتن نانوزینک- متیونین، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Allan, A. K., Hawksworth, G. M., Woodhouse, L. & Beattie, J. (2000). Lymphocyte Metallothionein mRNA responds to marginal zinc intake in human volunteers. *British Journal of Nutrition*, 84(5), 747-756.
2. Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical. Pharmacology Journal*, 59, 95-104.
3. Cao, J., Henry, P. R., Guo, R., Holwerda, R. A., Toth, J. P., Littell. R.C., Miles, R.D. & Ammerman, C. B. (2000). Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminant. *Journal of Animal Science*, 78(8), 2039-2054.
4. Carpene, E., Andreani G. & Isani, G. (2007). Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(1), 35-39.
5. Cousins, R. J. & Lee-Ambrose, L. M. (1992). Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. *Journal of Nutrition*, 122, 56-64.
6. Coyle, P., Philcox, J. C. & Rofe, A. M. (1995). Hepatic zinc in metallothionein-null mice following zinc challenge: in vivo and in vitro studies. *Biochemical. Pharmacology Journal*, 309, 25-31.
7. Coyle, P., Philcox, J. C., Careya, L. C. & Rofe, A. M. (2002). Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular. Life Science*, 59, 627-647.
8. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A. & Seve, M. (2004). Identification and Cloning of a -Cell–Specific Zinc Transporter, ZnT-8, Localized Into Insulin Secretory Granules. *Diabetes*, 53, 2330-2337.
9. Davis, S. R. & Cousins R. J. (2000). Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *Journal of Nutrition*, 130, 1085-1088.
10. Desouky Mahmoud, M. A. (2012). Metallothionein is up-regulated in molluscan responses to cadmium, but not aluminum, exposure. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 65, 139-143.

Archive of SID

www.SID.ir

11. Dufner, J. B., Langmad, S. J., Wang, F., Eide, D. & Andrews, G. K. (2003). Structure, Function, and Regulation of a Subfamily of Mouse ZincTransporter. *Genesis journal*, 278(50), 50142-50150.
12. Eide D. J. (2006). Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochimical et BiophysicaActa*, 1763, 711-722.
13. Fernando, L. P., Wei, D. & Andrews, G. K. (1989) Structure and expression of chicken metallothionein. *Journal of Nutrition*, 119, 309-318.
14. Fleet, J. C., Golemboski, K. A., Dietert, R. R., Andrews, G. K. & McCormick, C. C. (1990) Induction of hepatic metallothionein by intraperitoneal metal injection: an associated inflammatory response. *American journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 258, 926-933.
15. Gielda, L. M. & DiRita, V. J. (2012). Zinc Competition among the Intestinal Microbiota. *American society for microbiology*, 3(4), 217-223.
16. Huang, Y. L., Lu, L., Li, S. F., Luo, X. G. & Liu, B. (2007). An Optimal Dietary Zinc Level of Broiler Chicks Fed a Corn-Soybean Meal Diet1. *Poultry Science*, 86, 2582-2589.
17. Huang, Y. L., Lu, L., Li, S. F., Luo, X. G. & Liu, B. (2009). Relative bioavailabilites of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Journal of Animal* Science, 87, 2038-2046.
18. Hudson, B. P., Fairchild, B. D. Wilson, J. L. Dozier, W. A. & Buhr, R. J. (2004). Breeder Age and Zinc Source in Broiler Breeder Hen Diets on Progeny Characteristics at Hatching. *Journal of Applied Poultry Research*, 13, 55-64.
19. Isani, G. & Carpenè, E. (2014). Metallothioneins, Unconventional Proteins from Unconventional Animals: A Long Journey from Nematodes to Mammals. *Biomolecules*, 4, 435-457.
20. Kaler, P. & Prasad, R. (2007). Molecular cloning and functional characterization of novel zinc transporter rZip10 (Slc39a10) involved in zinc uptake across rat renal brush-border membrane. *American journal of Physiology Renal Physiology*, 292, 217-229.
21. Linde, A. R. & Garcia-Vazquez, E. (2006). A simple assay to quantify metallothionein helps to learn about bioindicators and environmental health. *Biochemical Molcular Biology Education*, 34(5), 360-363.
22. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) method. *Methods*, 25: 402-208.
23. Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
24. Martinez, N. M., Hill, G. M., Link, J. E., Raney, N. E., Tempelmam, R. J. & Ernst, C. W. (2004). Pharmacological zinc and phytase supplementation enhance metallothionein abundance and protein concentration in newly weaned pigs. *Journal of Nutrition*, 134(3), 538-544.
25. McCormick, C. C. (1984). Induction and Accumulation of Metallothionein in Liver and Pancreas of Chicks Given Oral Zinc: A Tissue Comparison. *Journal of Nutrition*, 114, 191-203.
26. Miles, R. D. (2000). Trace Minerals and Avian Embryo Development. *Ciência Animal Brasileira*, 2(1), 1-10.
27. NRC. (1994). National Research Council. *Nutrient requirements of poultry*. National Academy of Science Washington (DC), USA.
28. Oh, S.H., Nakaue, H., Deagen, J. T., Whanger, P. D. & Arscott, G. H. (1979). Accumulation and Depletion of Zinc in Chick Tissue Metallothioneins. *Journal of Nutrition*, 109, 1720-1729.
29. Otsuka, F. (2001). Molecular Mechanism of the Metallothionein Gene Expression Mediated by Metal-Responsive Transcription Factor 1. *Journal of Health Science*, 47(6), 513-519.
30. Ramesh, S. A., Shin, R., Eide, D. J. & Schachtman, D. P. (2003). Differential Metal Selectivity and Gene Expression of Two Zinc Transporters from Rice. *Plant Physiology*, 133(1), 126-134.
31. Richards, J. D., Zhao, J., Harrell, R. J., Atwell, C. A. & Dibner, J. J. (2010). Trace Mineral Nutrition in Poultry and Swine. *Asian-Australasian journal of Animal Science*, 23(11), 1527-1534.
32. Richards, J., Shirley, R., Winkelbauer, P., Atwell, C., Wuelling, C., Wehmeyer, M. & Buttin, P., (2007). Bioavailibity of zinc source in chicken determined via real time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for metallothnionein. 16th European symposium on poultry nutrition. In: Proceeding of *16th European symposium on poultry nutrition*, 26-30 Aug. France, pp. 71-74.
33. Richards, M. P. (1989). Recent Developments in Trace Element Metabolism and Function: l: Role of Metallothionein in Copper and Zinc Metabolism. *Journal.of Nutrition*, 119, 1062 -1070.
34. Richards, M. P. (1997). Trace mineral metabolism in the avian embryo. *Poultry Science*, 76,152-164.
35. Sakulsak, N. (2012). Metallothionein: an overview on its metal homeostatic regulation in mammals. *International Journal of Morphoogyl*, 30(3), 1007-1012.
36. Sandoval, M., Henry, P. R., Ammerman, C. B., Miles, R. D. & Littell, R. C. (1997). Relative bioavailability of supplemental inorganic zinc sources for chicks. *Journal of Animal Science*, 75, 3195-3205.

Archive of SID

www.SID.ir

37. Sandoval, M., Henry, P. R. Luo, X. G. Littell, R. C. Miles, R. D. & Ammerman, C. B. (1998). Performance and Tissue Zinc and Metallothionein Accumulation in Chicks Fed a High Dietary Level of Zinc. *Poultry Science*, 77, 1354-1363.
38. SAS. (2003). Version 9.1 SAS. *STAT user's guide*. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, U.S.A.
39. Shen, S. F., Wang, R. L. Lu, L., Li, S. F., Liu, S. B., Xie, J. J., Zhang, L. Y., Wang, M. L. & Luo, X.G. (2013). Effect of intravenously injected zinc on tissue zinc and metallothionein gene expression of broilers. *British Poultry Science*, 54(3), 381-390
40. Suhy, D. A., Simon, K. D. Linzer, D. I. H. & O'Halloran, T. V. (1999). Metallothionein Is Part of a Zinc-scavenging Mechanism for Cell Survival under Conditions of Extreme Zinc Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9183-9192.
41. Sullivan V. K., Burnett, F. R. & Cousins, R. J. (1998). Metallothionein Expression Is Increased in Monocytes and Erythrocytes of Young Men during Zinc Supplementation. *Journal of Nutrition*, 128, 707-713.
42. Tako, E., Ferket, P. R. & Uni, Z. (2005). Changes in chicken intestinal zinc exporter mRNA expression and small intestinal functionality following intra-amniotic zinc-methionine administration. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16, 339-346.
43. Trayhurn, P., Duncan, J. S., Wood, A. M. & Beattie, J. H. (2000). Metallothionein gene expression and secretion in white adipose tissue. *American journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, 279, 2329-2335.
44. Wei, D. Y. & Andrews, G. K. (1988). Molecular cloning of chicken metallothionein. Deduction of the complete amino acid sequence and analysis of expression using cloned cDNA. *Nucleic Acids Research*, 16(2), 537-555.

Archive of SID

www.SID.ir