

## اثرات سطوح مختلف اسید آمینه والین بر عملکرد، خصوصیات لاشه، کیفیت گوشت و بیان ژن های IGF-1 و انسولین در جوجه های گوشتی

• سیدسعید صادق زاده<sup>۱</sup>، محسن دانشیار<sup>۲</sup>، پرویز فرهومند<sup>۳</sup>، محمدرضا یزدیان<sup>۴</sup>، سیدمحمد هاشمی<sup>۵</sup>

۱ دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲ دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه

۳ استاد گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه

۴ استادیار گروه علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

۵ استادیار گروه علوم دامی مرکز تحقیقات و کشاورزی استان قم

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۱۴۰۲۷۵۹

Email: daneshyar\_mohsen@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2019.123483.1778

### چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات سطوح متفاوت والین بر عملکرد، خصوصیات و کیفیت لاشه و بیان ژن های فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) و انسولین در جوجه های گوشتی انجام گرفت. آزمایش با ۲۵۰ قطعه جوجه گوشتی نر یکروزه سویه راس ۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی، در ۵ تیمار و ۵ تکرار (در هر تکرار ۱۰ پرنده) با ۵ سطح ال-والین (۱۰۰، ۱۰۵، ۱۱۰، ۱۱۵ و ۱۲۰ درصد نیازهای سویه راس) انجام شد. در ۴۲ روزگی از هر تکرار یک قطعه جوجه جهت بررسی خصوصیات لاشه، کیفیت لاشه، IGF-1 سرم و بیان ژن های IGF-1 و انسولین انتخاب شدند. بهبود افزایش وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل با مصرف سطح ۱۱۰ درصد والین در تمام دوره های آغازین، رشد و پایانی مشاهده گردید. مصرف ۱۱۰ درصد والین موجب افزایش درصد لاشه، سینه، ران و کاهش چربی محوطه بطنی در سن ۴۲ روزگی گردید. در سن ۴۲ روزگی بیان ژن های IGF-1 و انسولین در عضله سینه و بافت کبدی با مصرف ۱۱۵ درصد والین افزایش نشان داد. سطح ۱۱۰ درصد والین موجب بهبود پروتئین، ماده خشک، چربی و خاکستر گوشت گردید. مصرف سطح ۱۱۵ درصد والین در ۴۲ روزگی موجب افزایش غلظت IGF-1 سرم شد. به طور کلی، مصرف ۱۰ درصد ال-والین بالاتر از نیازهای سویه راس از راه فعال کردن mTOR در نتیجه فسفوریله شدن S6k1 منجر به آغاز ترجمه mRNA و سنتز پروتئین و در نتیجه موجب افزایش بیان ژن های IGF-1 و انسولین، عملکرد و کیفیت لاشه و کاهش درصد چربی محوطه بطنی در جوجه های گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ می شود.

واژه های کلیدی: انسولین، بیان ژن، جوجه های گوشتی، والین، IGF-1

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 125 pp: 89-108

### Effects of different levels of valine amino acid on performance, carcass traits, meat quality and insulin like growth factor-1 and insulin genes expression in male Ross 308 broiler chickens

By: SS. Sadeghzadeh<sup>1</sup>, M. Daneshyar<sup>2</sup>, P. Farhomand<sup>3</sup>, MR. Yazdian<sup>4</sup>, SM. Hhashemi<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia. Iran

<sup>2</sup>Associated professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia. Iran

<sup>3</sup>Full professor, Department of Animal Science, of Agriculture, University of Urmia. Iran

<sup>4</sup>Assistant professor, Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Islamic Azad University Qom Branch, Iran

<sup>5</sup>Assistant professor, Department of Animal Science, Agriculture Research and Education Center, Qom Iran

Received: October 2018

Accepted: January 2019

The aim of this experiment was to investigate the effects of different levels of valine on performance, carcass traits and quality and insulin like growth factor-1 (IGF-1) and insulin genes expression in male Ross 308 broiler chickens. Present study performed using 250 one day male broiler chicks in a completely randomized design including 25 pen, 5 treatments and 5 replicates each (10 chicks in each replicate) with 5 levels of valine (100, 105, 110, 115, 120 percent of Ross starin requirements). At day 42 of age, one chick from each replicate slaughtered to determine the carcass traits, meat quality, serum IGF-1 and insulin and IGF-1 genes expressions. The improved body weight gain and decreased feed conversion ratio during starter, grower and finisher periods were observed by consumption of 110% valine level. Consumption of 110% valine caused the increased carcass, breast and thigh and lowered abdominal fat at 42 days of age. The IGF-1 and insulin genes expression of breast muscle and liver increased by 115% valine. At day 42 of age, consumption of 110% valine improved the protein, dry matter, crude fat and ash content of meat. In conclusion, consumption of 10% higher than Ross valine requirement increases the IGF-I and Insuline genes expressions through up-regulation of mTOR and promotion of S6k1 phosphorylation signaling mRNA translation and protein synthesis and hence improves the performance and carcass quality and decreases the abdominal fat in Ross 308 broiler chickens.

**Key words:** Broiler Chicks, Gene Expression, IGF-1, Insulin, Valine.

#### مقدمه

لاشه می تواند تا حدودی در کاهش هزینه های جیره های غذایی و اقتصادی نمودن تولیدات جوجه های گوشتی موثر باشد (Waldroup و همکاران، 2002). بر خلاف سایر اسیدهای آمینه که در کبد تجزیه می شوند، اسیدهای آمینه شاخه دار (لوسین و ایزولوسین و والین) همانند آلانین، گلوتامات و آسپاراتات در عضله اکسیده می شوند (Rossi and Tirapegui, 2005). مواد مغذی می تواند رشد عضلات را به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق اثر بر عوامل تنظیمی کنترل کنند. سیستم های عصبی و

با توجه به نقش های گسترده متابولیسمی اسیدهای آمینه شاخه دار لوسین و والین و همچنین با توجه به کاهش سن کشتار جوجه های گوشتی و لزوم تولید لاشه هایی با چربی کمتر و کیفیت مطلوب، اهمیت تاثیر اسیدهای آمینه شاخه دار والین و لوسین بعنوان عوامل موثر در تولید لاشه های با کیفیت بالا و تعیین سطوح موثر از این اسیدهای آمینه اهمیت زیادی پیدا کرده است (Zhang و همکاران، 2013). استفاده از اسیدهای آمینه شاخه دار از طریق کاهش چربی لاشه و بهبود نسبت کل توده عضلانی و کیفیت

شاخه‌دار شرکت در ساختمان پروتئین‌های بدن است. روند سنتز پروتئین در سلول‌های ماهیچه‌ای توسط کمپلکس mTOR تنظیم می‌گردد. گیرنده‌های mTOR پیام‌هایی از ترکیبات خارج سلولی (که فعال کننده و یا مهار کننده سنتز پروتئین هستند) را دریافت می‌کنند (Block and Harper, 1984). انسولین و فاکتور رشد شبه انسولین نوع یک (IGF-1) از محرک‌های سنتز پروتئین هستند (D'Mello and Lewis, 1970). IGF-1 یک تنظیم کننده کلیدی بالقوه رشد جوجه‌ها و ترکیب بدنی است (Velloso, 2008). مسیرهای ویژه‌ای با واسطه پروتئین mTOR وجود دارند که سنتز پروتئین و رشد تکثیر سلولی را ترجیح می‌دهند. این مسیرها توسط میتوزن‌ها از قبیل انسولین و اسیدهای آمینه شاخه دار تحریک می‌شود (Cota و همکاران، 2006). در بافت چربی نشانه پردازش mTOR نقش‌های اختصاصی بافتی را در تمایز سلول‌های چربی اولیه، مورفوژن (شکل زایی) بافت چربی، رشد هیپرتروفیک و ترشح لپتین بازی می‌کند (Lynch و همکاران، 2002). با توجه به نقش والین به عنوان اسید آمینه محدودکننده رشد و امکان تاثیر والین بر فاکتورهای رشد از جمله IGF-1 و انسولین هدف از انجام این تحقیق بررسی اثرات اسید آمینه والین بر عملکرد، خصوصیات و کیفیت لاشه و بیان ژن‌های IGF-1 و انسولین در جوجه‌های گوشتی نر سویه راس ۳۰۸ بود.

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۲۵۰ قطعه جوجه خروس گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ از ۱ تا ۴۲ روزگی در ۵ تیمار و ۵ تکرار (با ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار) انجام گردید. کلیه جیره‌های غذایی برای آزمایش بر اساس داده‌های حاصل از آنالیز مواد خوراکی مورد استفاده برای مراحل آغازین (یک تا ۱۰ روزگی)، رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی) طبق نیازهای تغذیه ای ارائه شده در کتابچه راهنمای مدیریت راس ۳۰۸ (۲۰۱۴) تنظیم شدند (جدول ۱). پنج سطح ال-والین (۱۰۰، ۱۰۵، ۱۱۰، ۱۱۵ و ۱۲۰ درصد نیازهای سویه راس ۳۰۸)، به عنوان

غدد درون ریز به عنوان هماهنگ کننده متابولیسم بدن، نقش مهمی در تنظیم رشد حیوان دارند. هورمون‌های رشد (GH)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1)، هورمون‌های تیروئیدی (T3 و T4) و انسولین نقش‌های مهم و مختلفی در رشد حیوانات دارند. هورمون‌های IGF تنظیم کننده‌های مهمی در تحریک رشد، تحریک تولید سازی اسیدهای آمینه، متابولیسم گلوکز، سنتز DNA، سنتز پروتئین، تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول محسوب می‌شوند (Zhou و همکاران، 2005). کبد منبع اصلی تولید و ترشح IGF-1 سرم خون است (Lei و همکاران، 2005). فعالیت IGF-1 در بدن به صورت اندوکرین، پاراکرین و اتوکرین می‌باشد (Velloso, 2008). تحقیقات نشان داده است که IGF-1 پاراکرین برای رشد ماهیچه مهم‌تر از IGF-1 اندوکرین می‌باشد (Butler and LeRoith, 2001). مطالعه IGF-1 به عنوان واسطه فعالیت هورمون رشد مهم است (Lei و همکاران، 2005). کمبود والین در جیره برای جوجه‌های گوشتی نه تنها باعث افت افزایش وزن و بالا رفتن ضریب تبدیل خوراک می‌گردد، بلکه سبب رشد غیر معمول پرها نیز می‌شود (Anderson and Warnick, 1967). والین از طریق بهینه سازی پروفایل اسید آمینه ایده آل جیره‌های کارآمدتر را فراهم نموده و توسط آنها محتوی پروتئین خام جیره را کاهش داده و در نتیجه دفع نیتروژن را از بدن جوجه‌های گوشتی به محیط کاهش می‌دهد (Selvarasu و همکاران، 2016). مکمل والین برای بهینه‌سازی راندامان متابولیک و رشد مهم است (Selvarasu و همکاران، 2016). والین چهارمین اسید آمینه محدود کننده در جیره‌های تجارتي جوجه‌های گوشتی است (Corzo و همکاران، 2010). اثرات کمبود یا عدم تعادل والین بر رشد و خصوصیات لاشه در طیور مشخص شده است (Corzo و همکاران، 2007). اسیدهای آمینه شاخه‌دار نقش مهمی بر نگهداری و رشد ماهیچه‌های اسکلتی دارند. اسیدهای آمینه شاخه‌دار لوسین و والین به عنوان منبع نیتروژن برای سنتز آلانین، گلوتامین و پیش‌سازی برای تامین اسکلت کربنی جهت گلوکونئوزن در کبد نقش ایفا می‌کند (Wu و همکاران، 2010). اولین نقش اسیدهای آمینه

تیمارهای آزمایشی استفاده شدند. جیره‌های آزمایشی فاقد هر گونه داروی ضد کوکسیدیوز و آنتی بیوتیک بودند. به منظور تجزیه شیمیایی، ۱ kg از هر نمونه تهیه و در آسیاب آزمایشگاهی با الک ۱ mm آسیاب گردید. مقادیر ماده خشک، پروتئین خام، خاکستر و چربی نمونه‌ها طبق روش‌های توصیه شده AOAC (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین پروفایل اسیدهای آمینه ذرت و کنجاله سویا، مقدار ۵۰۰ g از هر نمونه تهیه شد و پروفایل کلیه اسیدهای آمینه مورد استفاده در جیره‌های آزمایشی بخصوص اسید آمینه والین و ترکیب شیمیایی در آزمایشگاه مرکزی دگوسا در تهران با استفاده از روش<sup>۱</sup> NIR اندازه‌گیری شد. اسید آمینه ال-والین مورد استفاده در پژوهش حاضر از شرکت ژاپنی آجینوموتو (با خلوص ۹۹٪) تهیه شد.

جوجه‌ها به محض ورود به صورت انفرادی وزن کشی شدند به طوری که تفاوتی بین وزن اولیه واحدهای آزمایشی وجود نداشت. جوجه‌ها در طول دوره آزمایشی تحت برنامه نوری سویه راس بودند و در طول شبانه روز بصورت آزاد به آب و دان دسترسی داشتند. آنالیز شیمیایی مواد خوراکی مورد استفاده در جیره و مقادیر اسیدهای آمینه قابل هضم برای جیره نویسی در نرم افزار UFFDA استفاده شد و جیره بر اساس ارزش‌های حقیقی و بر اساس اسیدهای آمینه قابل هضم تنظیم و ترکیب مواد مغذی جیره پایه گزارش شد (جدول ۱). افزایش وزن، مقدار خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک در دوره‌های آغازین (۱-۱۰ روزه)، رشد (۱۱-۲۴ روزه)، پایانی (۲۵-۴۲ روزه) و کل دوره (۱-۴۲ روزه) اندازه‌گیری و محاسبه شدند.

<sup>1</sup> - Near Infrared Spectroscopy

جدول ۱- اجزای خوراکی و مواد مغذی جیره‌های آزمایشی

ماده خوراکی	آغازین (% جیره)	رشد (% جیره)	پایانی (% جیره)
ذرت	۵۳/۴۳	۵۸/۷۰	۶۳/۳۹
کنجاله سویا	۴۰/۲۴	۳۵/۰۲	۳۰/۰۱
روغن گیاهی	۱/۴۱	۲/۰۴	۲/۷۲
دی-ال-متیونین	۰/۳۴	۰/۳۲	۰/۲۸
ال-لایزین کلراید	۰/۱۹	۰/۱۸	۰/۱۷
ال-ترئونین	۰/۰۷	۰/۰۶	۰/۰۴
پودر صدف	۱/۵۲	۰/۹۵	۰/۸۹
دی کلسیم فسفات	۲	۱/۸۷	۱/۶۳
مکمل ویتامینی*	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی**	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
نمک طعام	۰/۲۵	۰/۲۶	۰/۲۷
کربنات کلسیم	۰/۱	۰/۱	۰/۱
جمع کل	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
مواد مغذی اندازه‌گیری شده			
انرژی متابولیسمی (kcal/kg)	۲۹۱۰	۳۰۰۷	۳۱۰۳
پروتئین خام (%)	۲۲/۳	۲۰/۸	۱۸/۹
کلسیم (%)	۱	۰/۹	۰/۹
فسفر قابل استفاده (%)	۰/۴۶	۰/۴۲	۰/۳۷
سدیم (%)	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵
کلر (%)	۰/۲۲	۰/۲۲	۰/۲۲
پتاسیم (%)	۰/۹۵	۰/۸۸	۰/۷۸
لایزین (%)	۱/۳۹	۱/۲۵	۱/۱۱
متیونین (%)	۰/۶۸	۰/۶۲	۰/۵۶
متیونین+سیستین (%)	۱/۰۴	۰/۹۶	۰/۸۷
آرژنین (%)	۱/۵۳	۱/۳۷	۱/۲۲
لوسین (%)	۱/۸۷	۱/۷۶	۱/۶۱
ترئونین (%)	۰/۹۴	۰/۸۵	۰/۷۵
تریپتوفان (%)	۰/۲۸	۰/۸۷	۰/۷۸
والین (%)	۱/۰۶	۰/۹۷	۰/۸۸

\* مکمل ویتامینی شامل ویتامین‌های A، ۰/۷۲ گرم، B1، ۳/۳ گرم، B2، ۴ گرم، B3، ۱/۲ گرم، B6، ۰/۶ گرم، B12، ۱/۶ گرم، D3، ۱۴/۴ گرم، E، ۱/۶ گرم، K3، ۰/۵ گرم، B3، ۱۲ گرم، B5، ۲ گرم، H2، ۴۰۰ گرم کولین کلراید و ۵۵۰/۸۸ گرم در کیلوگرم مکمل بود. \*\* مکمل معدنی شامل ۶۴ گرم اکسید منگنز، ۱۰۰ گرم اکسید روی، ۴۴ گرم سولفات آهن، ۱۶ گرم سولفات مس، ۰/۶۴ گرم یدات کلسیم، ۸ گرم پرمیکس سلنیوم و ۷۶۷/۳۶ گرم در کیلوگرم مکمل بود.

محتویات سلولها و آزاد شدن RNA سلولی و همچنین مهار آنزیم RNAase می شود (Kenneth و همکاران، 2001).

محتویات این ویال به ستون دارای فیلتر، در ستون استخراج RNA منتقل شد و سپس به مدت ۱ دقیقه، میکروتیوب با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایعات رد شده از فیلتر (که در کف میکروتیوب تجمع یافته بود)، کاملاً دور ریخته شد. مقدار ۴۰۰ μl از محلول GW1 به فیلتر اضافه گردید و سپس سانتریفیوژ با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و مایع تجمع یافته در میکروتیوب جمع آوری، دور ریخته شد. ۷۵۰ μl از بافر RNW به فیلتر اضافه گردید و سپس سانتریفیوژ با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه انجام شد و مایع تجمع یافته در میکروتیوب جمع آوری، دور ریخته شد. مجدداً سانتریفیوژ با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه انجام شد و بار دیگر مایع تجمع یافته در تیوب جمع آوری، دور ریخته شد. ستون استخراج، به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر استریل و عاری از RNAase منتقل گردید. مقدار ۳۰ میکرولیتر، آب عاری از RNase داخل ستون ریخته شد. سانتریفیوژ با ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه انجام شد تا RNA متصل شده به فیلتر به طور کامل شسته شده و از فیلتر جدا و در کف میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر تجمع یافت. مایع تجمع یافته در ته ویال، تنها حاوی RNA بوده و پس از بستن درب ویال (با استفاده از پارافیلیم درب ویال مسدود شد) و ویال به فریزر °C -۷۰ منتقل گردید. استخراج RNA از بافت‌های کبد و سینه توسط کیت شرکت GeneAll صورت گرفت. تعیین کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو دراپ و تعیین کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز انجام شد. بعد از انجام استخراج با استفاده از کیت HyperScript™ RT (with Random hexamer) premix شرکت Gene All، cDNA سنتز شد. به منظور بررسی RNA ژنومیک استخراج شده، نمونه حاصل بر روی ژل آگارز ۱٪، الکتروفورز گردید. سنتز cDNA به روش Real Time PCR انجام شد. cDNAهای سنتز شده در °C -70 نگهداری شدند. برای آنکه مشخص شود cDNA به درستی استخراج شده است با استفاده از

در سن ۴۲ روزگی، ۱ قطعه جوجه از هر واحد آزمایشی انتخاب، وزن کشی و جهت نمونه برداری خون و اندازه‌گیری شاخص‌های کمی لاشه (درصد لاشه، سینه، ران، کبد، روده کوچک و سنگدان نسبت به وزن بدن) و کیفی لاشه (درصد ماده خشک، چربی، پروتئین و خاکستر) کشتار شدند. نمونه خون از ورید بال در ۴۲ روزگی گرفته شد و داخل لوله‌های استریل ریخته شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سرم جدا شد. اندازه‌گیری فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) سرم با روش کمی لومینسنس<sup>۲</sup> (CLIA) و با دستگاه اتوآنالایزر (تحت لیسانس دیاسورین آمریکا) با حساسیت ۰/۱ ng/ml از رادیویمونواسی استفاده شد.

نمونه‌های ماهیچه سینه چرخ شد و درصد ماده خشک با قرار دادن نمونه‌ها در آون °C ۹۰ به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد چربی خام به روش سوکسوله (Soxtec 2050, Sweden) و درصد پروتئین ماهیچه سینه به طور غیر مستقیم به وسیله آنالیز نیتروژن کل و ضرب محتوای نیتروژن نمونه در ضریب ۶/۲۵ و به روش کلدال و با استفاده از دستگاه کلدال اتوماتیک (Kjeltec™2300, Foss, Sweden) اندازه‌گیری شد. درصد خاکستر عضله سینه با قرار دادن نمونه‌های عضله فاقد رطوبت در کوره °C ۶۵۰ به مدت ۲۴ ساعت تعیین شد (AOAC، ۲۰۰۰). نمونه عضله سینه (پکتورالیس) و کبد جمع آوری و در آزمایشگاه دو تکرار از هر نمونه گرفته شد و در RNA هولدر در °C -۲۰ و برای استخراج RNA در دو Run (دو بار آزمایش برای حصول اطمینان) استفاده گردید. ابتدا بافت کبد و سینه به طور جداگانه در داخل هاون ریخته شده و ازت مایع به آن اضافه شد و به صورت مکانیکی با دسته هاون له کرده تا پودر شد. پودر حاصله را در داخل یک میکروتیوب ۱/۵ cc استریل ریخته و سپس مقدار ۴۰۰ μl از محلول لیز کننده سلول و ۱۰ μl بتامرکاپتو اتانول به ویال محتوی بافت پودر شده اضافه کرده و ویال را به آرامی سر و ته کرده و به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود در دمای اتاق قرار داده تا غشای سلول‌ها لیز شد. اضافه کردن این محلول لیزکننده باعث تخریب غشاء سلولی و رها شدن

<sup>2</sup> -Chemiluminescence immunoassy

پرایمرهای طراحی شده (جدول ۲) واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام گرفت.

جدول ۲: توالی الیگونوکلئوتیدی جفت آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن

شماره دسترسی Accession number	طول قطعه تکثیری Length of product (bp)	توالی آغازگر (5'-3') Primer sequence	نام ژن Gene name
NM_001004384.2	217	5'-TGCTCTCAACATCTCACATCTC-3'	آغازگر رفت
		5'-TAAGGTAAGCAAACACAGGC-3'	آغازگر برگشت
XM_015286579.1	217	5'-GTAAGTTCGGACAGGTTTCAGC-3'	آغازگر رفت
		5'-TACTTAATCCTCCACCATCCC-3'	آغازگر برگشت
NM_204305.1	189	5'-GCAGGAACACTATAAAGGCG-3'	آغازگر رفت
		5'-CCCTTGAAGTGCCGTGTG-3'	آغازگر برگشت

تفریق cycle threshold (CT) (حد آستانه) ژن IGF-1 و انسولین از CT ژن GAPDH می‌باشد. در یک نمونه خالص RNA نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر ( $A_{260}/A_{280}$ ) برابر با ۱/۸ می‌باشد. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ نشان دهنده آلودگی نمونه با پروتئین و یا سایر مواد می‌باشند. همچنین نسبت جذب ۲۶۰ نانومتر به ۲۳۰ نانومتر ( $A_{260}/A_{230}$ ) نیز، برای یک نمونه خالص برابر با ۲/۲ می‌باشد. نسبت‌های کمتر از ۲/۲ نشان دهنده آلودگی نمونه با فنل و یا سایر مواد می‌باشند. نتایج به دست آمده بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده و وجود دو باند 18S و 28S در rRNA نشان دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن می‌باشد (شکل ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن IGF-1 و انسولین با دستگاه ترموسایکلر Reacon-TCY انجام شد. برای سنجش بیان ژن‌های IGF-1 و انسولین از تکنیک Real-Time PCR از نوع سنجش کمی به روش SYBER GREEN استفاده گردید. همچنین ژن GAPDH به‌عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب شد. جهت محاسبه بیان ژن هدف نسبت به رفرنس، از روش  $\Delta\Delta Ct$  استفاده شد (Xiayu و همکاران، 2013).

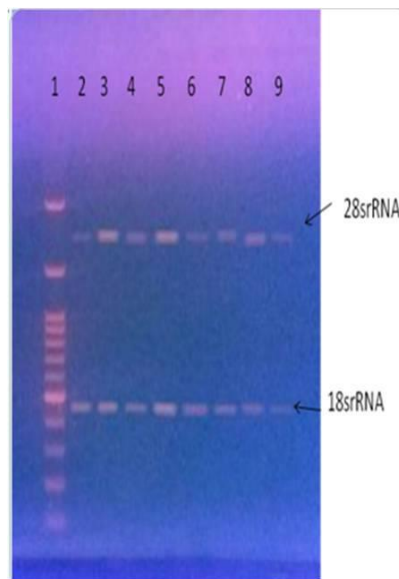
$$\Delta CT = CT_{Target} - CT_{GAPDH}$$

$$\Delta CT = CT_{Target} - CT_{GAPDH}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{sample} - \Delta CT_{Reference} \rightarrow$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

در این رابطه  $CT_{Target}$  و  $CT_{ref}$  به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند.  $\Delta CT$  حاصل



شکل ۱: نمونه‌هایی از کیفیت RNA استخراج شده

می‌باشد، باز و تک رشته‌ای شدند. و همزمان با این اتفاق ملکول-های رنگ سایبرگرین (SYBR Green) نیز از این محصول جدا گردیدند. منحنی ذوب نشان داد که دمای ذوب (Tm) محصول ژن‌های IGF-1 و انسولین و GAPDH حدود ۸۴ و ۸۶/۵ درجه سانتی گراد می‌باشد. همچنین وجود تنها یک قله در منحنی ذوب ژن‌های IGF-1 و انسولین و GAPDH نشان دهنده تکثیر اختصاصی محصول PCR برای این سه ژن می‌باشد. برای اطمینان بیشتر از اختصاصی بودن ژن‌های IGF-1 و انسولین و GAPDH محصول PCR به دست آمده روی ژل آگارز (۱٪) برده شد و تک باند اختصاصی حدود ۲۱۷bp برای ژن IGF-1 و انسولین و در حدود ۱۸۹bp برای ژن GAPDH به دست آمد. کلیه داده‌های آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۵ تکرار با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۲) مورد تجزیه تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین تیمارها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس مدلی زیر انجام گرفت.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (IGF-1)، انسولین و کنترل (GAPDH)، واکنش PCR شیب دمایی (Gradient) انجام شد. و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای ۵۷ درجه سانتی گراد) انتخاب گردید. بعد از انجام واکنش، محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز (۱ درصد) مورد بررسی قرار گرفتند. مشاهده تک باند در محدوده‌ی ۲۱۷bp برای ژن IGF-1 و انسولین و در محدوده‌ی ۱۸۹bp برای ژن GAPDH در مورد همه نمونه‌ها، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر می‌باشد. در طی انجام واکنش دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است. بعد از تکثیر نهایی با گرما دهی در دمای ۷۲-۹۵ درجه سانتی گراد به تدریج DNA دو رشته‌ای که در واقع محصول واکنش PCR ژن‌های IGF-1 و انسولین و GAPDH



درصد افزایش پیدا کرد در حالیکه مصرف سطح ۱۲۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین موجب کاهش مصرف خوراک در دوره رشد در مقایسه با سطح ۱۱۵ درصد و تیمار شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). در دوره پایانی، مصرف سطح ۱۰۵ درصد نیازهای راس والین موجب افزایش مصرف خوراک در مقایسه با سایر تیمارهای شاهد و دریافت کننده ۱۱۰ درصد والین شد ( $P < 0/05$ ). در کل دوره نیز مصرف ۱۰۵ درصد والین باعث افزایش مصرف خوراک در مقایسه با سطح ۱۲۰ درصد والین گردید ( $P > 0/05$ ). ضریب تبدیل خوراک جوجه‌های تغذیه شده با سطح ۱۱۰ درصد در دوره آغازین، ۱۰۵ و ۱۲۰ درصد در دوره رشد، ۱۰۰، ۱۰۵ و ۱۱۰ درصد در دوره پایانی و ۱۱۰ درصد در کل دوره پایین تر از مقادیر مربوط به سایر تیمارهای آزمایشی بود ( $P < 0/05$ ).

که  $Y_{ij}$  مربوط به مشاهده واحد آزمایش  $j$ ام از سطح  $i$ ام تیمار  $T$ ،  $\mu$  اثر میانگین جامعه،  $\tau_i$ ، سطح  $i$ ام تیمار و  $\varepsilon_{ij}$  خطای مربوط به مشاهده واحد آزمایشی  $j$ ام از سطح  $i$ ام تیمار  $T$  است.

## نتایج

### عملکرد

اثرات سطوح متفاوت اسید آمینه ال-والین بر عملکرد جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در جدول ۳ ارائه گردیده است. مصرف سطح ۱۱۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین باعث افزایش وزن بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد در دوره آغازین گردید ( $P < 0/05$ ). در دوره رشد، مصرف سطوح ۱۰۵، ۱۱۰، ۱۱۵ و ۱۲۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین باعث افزایش وزن بالاتری در مقایسه با تیمار شاهد شدند ( $P < 0/05$ ). افزایش وزن بدن در دوره پایانی با مصرف سطح ۱۱۰ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین افزایش پیدا کرد در حالیکه مصرف ۱۱۵ و ۱۲۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین موجب کمتر شدن افزایش وزن بدن در دوره پایانی و کل دوره در مقایسه با شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). افزایش وزن پرندگان تغذیه شده با سطح ۱۱۰ درصد والین در کل دوره بالاتر از مقدار مربوط به جوجه‌های تغذیه شده با ۱۱۵ درصد والین بود ( $P < 0/05$ ) در حالی که تفاوت معنی داری بین سایر تیمارهای آزمایشی در کل دوره برای افزایش وزن مشاهده نشد.

مصرف خوراک در دوره آغازین با مصرف سطح ۱۱۵ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین افزایش پیدا کرد در حالیکه مصرف سطح ۱۰۵ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین موجب کاهش مصرف خوراک در دوره آغازین در مقایسه با شاهد گردید ( $P < 0/05$ ). مصرف خوراک در دوره رشد با مصرف سطح ۱۱۵ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین در مقایسه با سطح ۱۰۵

جدول ۳- اثر سطوح مختلف اسید آمینه والین بر عملکرد جوجه های گوشتی

کل دوره (یک تا ۴۲ روزگی)	پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی)	رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی)	آغازین (یک تا ده روزگی)	سطوح اسید آمینه والین %
افزایش وزن زنده بدن (گرم)				
۲۲۱۳/۶۸ <sup>ab</sup>	۱۴۸۶/۱۶ <sup>a</sup>	۵۷۵/۲۰ <sup>b</sup>	۱۵۲/۳۲ <sup>b</sup>	۱۰۰
۲۱۷۱/۱۶ <sup>ab</sup>	۱۳۵۶/۹۶ <sup>b</sup>	۶۵۸/۰۰ <sup>a</sup>	۱۵۶/۲۰ <sup>b</sup>	۱۰۵
۲۳۳۲/۹۴ <sup>a</sup>	۱۴۸۶/۹۴ <sup>a</sup>	۶۶۷/۸۰ <sup>a</sup>	۱۷۸/۲۰ <sup>a</sup>	۱۱۰
۲۱۰۴/۸۵ <sup>b</sup>	۱۲۹۷/۳۸ <sup>c</sup>	۶۵۳/۱۶ <sup>a</sup>	۱۵۴/۳۱ <sup>b</sup>	۱۱۵
۲۱۱۶/۶۹ <sup>ab</sup>	۱۲۹۴/۱۴ <sup>c</sup>	۶۶۰/۱۲ <sup>a</sup>	۱۶۲/۴۳ <sup>b</sup>	۱۲۰
۰/۰۵۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	۰/۰۰۹	Pvalue
۱/۰۳۲	۱/۱۸۲	۱/۰۳۲	۱/۷۹۱	SEM
خوراک مصرفی (گرم)				
۴۰۸۴/۹۸ <sup>ab</sup>	۲۵۰۶/۰ <sup>b</sup>	۱۲۸۸/۷۱ <sup>a</sup>	۲۹۰/۲۷ <sup>ab</sup>	۱۰۰
۴۲۶۸/۲۸ <sup>a</sup>	۲۸۲۸/۳ <sup>a</sup>	۱۱۶۸/۳۰ <sup>ab</sup>	۲۷۱/۶۸ <sup>b</sup>	۱۰۵
۴۰۰۶/۲۵ <sup>ab</sup>	۲۴۸۱/۳ <sup>b</sup>	۱۲۴۳/۳۵ <sup>ab</sup>	۲۸۱/۶۰ <sup>ab</sup>	۱۱۰
۴۲۰۶/۰۱ <sup>ab</sup>	۲۶۰۷/۲ <sup>ab</sup>	۱۲۹۷/۶۶ <sup>a</sup>	۳۰۱/۱۵ <sup>a</sup>	۱۱۵
۳۹۷۹/۸۳ <sup>b</sup>	۲۵۴۹/۱ <sup>ab</sup>	۱۱۴۲/۶۸ <sup>b</sup>	۲۸۸/۰۵ <sup>ab</sup>	۱۲۰
۰/۰۲۳	۰/۰۰۱	۰/۰۴۹	۰/۰۳۹	Pvalue
۱/۳۳۲	۱/۰۰۵	۱/۱۶۹	۱/۲۲۲	SEM
ضریب تبدیل خوراک				
۱/۸۴ <sup>ab</sup>	۱/۶۸ <sup>bc</sup>	۲/۲۳ <sup>a</sup>	۱/۹۰ <sup>a</sup>	۱۰۰
۱/۹۷ <sup>ab</sup>	۲/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۷۷ <sup>b</sup>	۱/۷۴ <sup>ab</sup>	۱۰۵
۱/۷۱ <sup>b</sup>	۱/۶۷ <sup>c</sup>	۱/۸۶ <sup>ab</sup>	۱/۵۸ <sup>b</sup>	۱۱۰
۲/۰۰ <sup>a</sup>	۲/۰۱ <sup>ab</sup>	۱/۹۸ <sup>ab</sup>	۱/۹۵ <sup>a</sup>	۱۱۵
۱/۸۸ <sup>ab</sup>	۱/۹۶ <sup>ab</sup>	۱/۷۳ <sup>b</sup>	۱/۷۷ <sup>ab</sup>	۱۲۰
۰/۰۳۶	۰/۰۰۲	۰/۰۲۴	۰/۰۱۸	Pvalue
۰/۰۳۷	۰/۰۳۳	۰/۰۶۳	۰/۰۳۹	SEM

a و b: مقادیر دارای حروف متفاوت در هر ستون از نظر آماری اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ دارند.

### خصوصیات لاشه

سطح ۱۲۰ درصد والین باعث کاهش درصد لاشه، سینه و ران نسبت به سایر تیمارها گردید ( $P < 0.05$ ). پایین ترین وزن سنگدان در سن ۴۲ روزگی با مصرف ۱۱۰ درصد والین بدست آمد در حالی تفاوتی بین سایر تیمارهای آزمایشی برای وزن سنگدان

اثرات سطوح متفاوت ال-والین بر خصوصیات لاشه جوجه های گوشتی مورد آزمایش در جدول ۴ ارائه گردیده است. در سن ۴۲ روزگی، اگر چه مصرف سطح ۱۱۰ درصد اسید آمینه والین باعث بیشترین درصد لاشه، سینه و ران گردید در حالی که، مصرف

مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ). همچنین بالاترین وزن کبد نیز با مصرف سطح ۱۱۰ درصد والین مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). عدم تاثیر سطوح والین بر درصد روده در سن ۴۲ روزگی مشاهده گردید

جدول ۴- اثر سطوح مختلف اسید آمینه والین بر وزن نسبی (درصد وزن نسبت به وزن زنده) اجزای لاشه نسبت به وزن زنده بدن در ۴۲ روزگی

چربی محوطه بطنی	سطوح اسید آمینه والین %						
	روده کوچک	کبد	سنگدان	ران	سینه	لاشه	
۱/۱۵ <sup>a</sup>	۳/۸۲	۲/۳۹ <sup>bc</sup>	۲/۲۴ <sup>a</sup>	۲۷/۴۴ <sup>ab</sup>	۲۶/۴ <sup>a</sup>	۶۷/۸۰ <sup>b</sup>	۱۰۰
۱/۲۳ <sup>ab</sup>	۳/۸۰	۲/۷۹ <sup>a</sup>	۲/۳۶ <sup>a</sup>	۲۷/۹۴ <sup>a</sup>	۲۷/۲۱ <sup>a</sup>	۶۹/۷۷ <sup>ab</sup>	۱۰۵
۰/۸۸ <sup>b</sup>	۳/۹۶	۲/۷۴ <sup>ab</sup>	۱/۷۱ <sup>b</sup>	۲۸/۰۲ <sup>a</sup>	۲۷/۵۲ <sup>a</sup>	۷۰/۷۳ <sup>a</sup>	۱۱۰
۱/۰۵ <sup>ab</sup>	۴/۰۳	۲/۳۰ <sup>c</sup>	۲/۱۹ <sup>a</sup>	۲۶/۸۵ <sup>b</sup>	۲۶/۳۱ <sup>a</sup>	۶۹/۰۴ <sup>ab</sup>	۱۱۵
۱/۶۰ <sup>a</sup>	۳/۷۹	۲/۵۲ <sup>abc</sup>	۲/۱۷ <sup>a</sup>	۲۶/۷۴ <sup>b</sup>	۲۵/۰۳ <sup>b</sup>	۶۷/۲۷ <sup>b</sup>	۱۲۰
۰/۰۳۳	۰/۹۶۱	۰/۰۲۹	۰/۰۴۳	۰/۰۳۱	۰/۰۰۲	۰/۰۳۶	Pvalue
۰/۰۳۸	۰/۱۱۵	۰/۰۶۰	۰/۰۷۴	۰/۱۷۲	۰/۲۴۰	۰/۴۱۴	SEM

a و b: مقادیر دارای حروف متفاوت در هر ستون از نظر آماری اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ دارند.

### میزان مواد مغذی گوشت

اثرات سطوح متفاوت والین بر میزان مواد مغذی عضله سینه جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در جدول ۵ ارائه گردیده است. در سن ۴۲ روزگی، مصرف سطح ۱۱۰ درصد والین باعث افزایش درصد راس اسید آمینه والین باعث افزایش درصد ماده خشک گردید در حالی مصرف سطح ۱۲۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین باعث کاهش درصد ماده خشک در مقایسه با سایر تیمارها گردید ( $P < 0/01$ ). مصرف سطح ۱۱۰ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش درصد خاکستر عضله سینه در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0/01$ ).

میزان مواد مغذی گوشت  
اثرات سطوح متفاوت والین بر میزان مواد مغذی عضله سینه جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در جدول ۵ ارائه گردیده است. در سن ۴۲ روزگی، مصرف سطح ۱۱۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین باعث افزایش درصد پروتئین گردید در حالی مصرف سطح ۱۲۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین باعث کاهش درصد پروتئین در مقایسه با سایر تیمارها گردید ( $P < 0/01$ ). مصرف سطوح ۱۰۵ و ۱۱۰ درصد نیازهای راس اسید آمینه والین باعث کاهش درصد چربی عضله سینه در مقایسه با تیمار شاهد در

جدول ۵- اثر سطوح مختلف اسید آمینه والین بر میزان مواد مغذی گوشت سینه جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

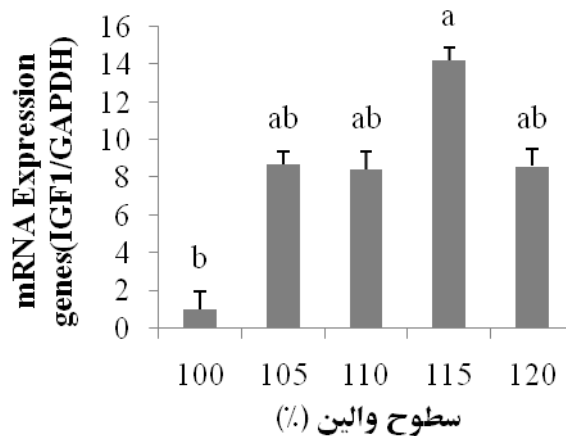
سپوح اسید آمینه والین %	پروتئین (%)	چربی (%)	ماده خشک (%)	خاکستر (%)
۱۰۰	۸۶/۹۳ <sup>bc</sup>	۵/۲۸ <sup>ab</sup>	۲۴/۸۳ <sup>ab</sup>	۶/۳۴ <sup>b</sup>
۱۰۵	۸۸/۵۴ <sup>ab</sup>	۴/۵۴ <sup>b</sup>	۲۴/۵۷ <sup>abc</sup>	۶/۷۰ <sup>b</sup>
۱۱۰	۸۹/۱۴ <sup>a</sup>	۴/۶۸ <sup>b</sup>	۲۵/۲۶ <sup>a</sup>	۷/۷۰ <sup>a</sup>
۱۱۵	۸۵/۹۳ <sup>c</sup>	۵/۱۲ <sup>ab</sup>	۲۴/۱۵ <sup>bc</sup>	۶/۵۲ <sup>b</sup>
۱۲۰	۸۵/۱۵ <sup>c</sup>	۵/۹۰ <sup>a</sup>	۲۳/۶۹ <sup>c</sup>	۶/۳۶ <sup>b</sup>
Pvalue	۰/۰۰۱	۰/۰۱۴	۰/۰۲۰	۰/۰۰۱
SEM	۰/۴۰۷	۰/۱۴۷	۰/۱۶۸	۰/۱۲۰

a و b: مقادیر دارای حروف متفاوت در هر ستون از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ دارند.

### بیان ژن IGF-1 در عضله سینه

اثرات سطوح متفاوت ال-والین بر بیان ژن‌های فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1) در عضله سینه جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در نمودار ۱ ارائه گردیده است. در ۴۲ روزگی، مصرف

سطوح ۱۰۵، ۱۱۵، ۱۱۰ و ۱۲۰ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش بیان ژن IGF-1 در عضله سینه در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0/01$ ).

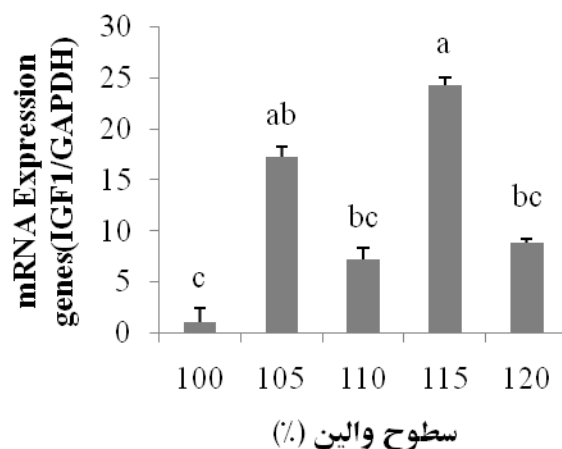


نمودار ۱: بیان ژن IGF-1 در عضله سینه جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ در ۴۲ روزگی

### بیان ژن IGF-1 بافت کبد

اثرات سطوح متفاوت ال-والین بر بیان ژن IGF-1 در بافت کبد جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در سن ۴۲ روزگی در نمودار ۲ ارائه گردیده است. در ۴۲ روزگی، مصرف سطوح ۱۰۵ و ۱۱۵ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش

بیان ژن IGF-1 در بافت کبد در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0/01$ ). همچنین مصرف سطح ۱۱۰ و ۱۲۰ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش بیان ژن IGF-1 در بافت کبدی کمتری در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0/05$ ).

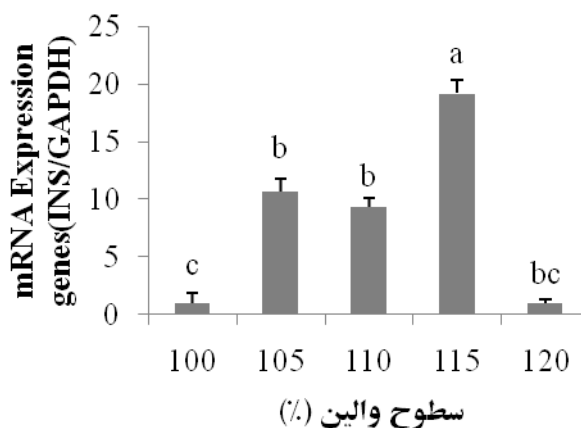


نمودار ۲: بیان ژن IGF-1 در بافت کبد جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ در ۴۲ روزگی

### بیان ژن انسولین در عضله سینه

بیان ژن انسولین در عضله سینه در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0.01$ ). همچنین مصرف سطوح ۱۲۰ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش بیان ژن انسولین در عضله سینه بسیار کمتری در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0.05$ ).

اثرات سطوح متفاوت ال-والین بر بیان ژن انسولین در عضله سینه جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در ۴۲ روزگی در نمودار ۳ ارائه گردیده است. در ۴۲ روزگی، مصرف سطوح ۱۰۵، ۱۱۰ و ۱۱۵ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش

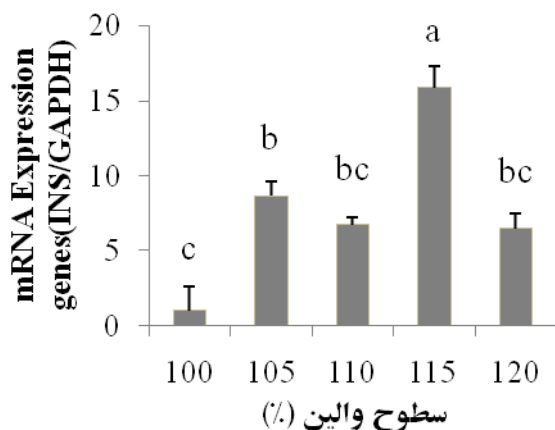


نمودار ۳: بیان ژن انسولین در عضله سینه جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ در ۴۲ روزگی

### بیان ژن انسولین در بافت کبدی

انسولین در بافت کبدی در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0.01$ ). علاوه، مصرف سطوح ۱۰۵، ۱۱۰ و ۱۲۰ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش کمتری در بیان ژن انسولین در بافت کبدی در مقایسه با گروه شاهد شدند ( $P < 0.05$ ).

اثرات سطوح متفاوت ال-والین بر بیان ژن انسولین در بافت کبد جوجه‌های گوشتی مورد آزمایش در سن ۴۲ روزگی در نمودار ۴ ارائه گردیده است. در ۴۲ روزگی، مصرف سطوح ۱۱۵ درصد نیازهای سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش بیان ژن

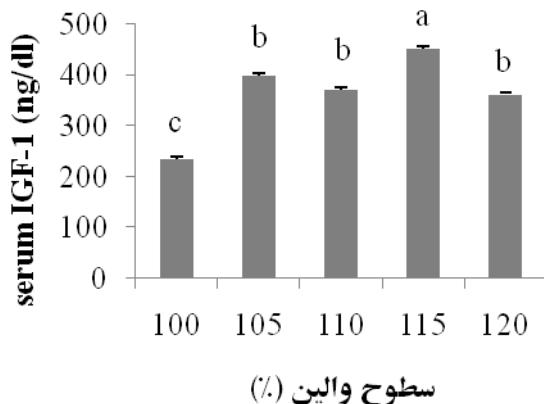


نمودار ۴: بیان ژن انسولین در بافت کبدی جوجه‌های گوشتی سویه راس ۳۰۸ در ۴۲ روزگی

### اثرات سطوح متفاوت والین بر غلظت IGF-1 سرم

سویه راس اسید آمینه والین موجب افزایش غلظت IGF-1 سرم در مقایسه با شاهد شدند ( $P < 0.01$ ).

اثرات سطوح متفاوت ال-والین بر غلظت IGF-1 سرم جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی در نمودار ۵ ارائه گردیده است. در ۴۲ روزگی، مصرف سطوح ۱۰۵، ۱۱۰، ۱۱۵ و ۱۲۰ درصد نیازهای



نمودار ۵- اثر سطوح مختلف اسید آمینه والین بر غلظت IGF-1 سرم در ۴۲ روزگی

### بحث

والین به میزان ۰/۸۴ درصد والین قابل هضم جیره غذایی جوجه-های گوشتی راس ۷۰۸ در دوره رشد موجب افزایش وزن بدن و بهبود عملکرد گردید (Corzo و همکاران، 2007). نسبت ۰/۵۹ درصد والین قابل هضم به عنوان کمبود والین در جیره موجب

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد، افزودن والین به جیره جوجه‌های گوشتی باعث افزایش وزن بدن و کاهش ضریب تبدیل غذایی نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری گردیده است ( $P < 0.01$ ). که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو می‌باشد. افزودن

جیره نیاز به والین و ایزولوسین را در جوجه‌های در حال رشد افزایش می‌دهد (Tuttle and Balloun, 1976). کمبود والین جیره در جوجه‌های گوشتی نه تنها وزن بدن را کاهش می‌دهد بلکه با ناهنجاری‌های پر و پا همراه است (Farran and Thomas, 1992). سطوح زیاد لوسین نیز منجر به بروز مشکلات مشابه کمبود والین در جوجه‌های گوشتی می‌گردد (Penz و همکاران، 1984). عوارض کمبود والین به نوع خوراک مورد استفاده و میزان لوسین جیره مرتبط است (Corzo و همکاران، 2004). نیاز به والین برای جوجه‌های گوشتی بین ۴۲ تا ۵۶ روز ۰/۷۰ درصد می‌باشد (Corzo و همکاران، 2004). انتقال گلوتامین از خون به مغز بسیار ناچیز است و مغز برای ساخت گلوتامین مورد نیاز از اسیدهای آمینه شاخه‌دار استفاده می‌کند، پس اسیدهای آمینه شاخه‌دار در مغز نقش بسیار مهمی را در تامین نیتروژن، سنتز گلوتامات و گلوتامین و منبع انرژی ایفا می‌کنند. علاوه بر اینکه اسیدهای آمینه شاخه‌دار بخش مهمی از ماهیچه‌های اسکلتی را تشکیل می‌دهند، یک همبستگی مستقیمی بین اسیدهای آمینه شاخه‌دار و افزایش سنتز پروتئین وجود دارد (Shimomura و همکاران، 2006). انسولین محتوای پروتئین بدن را از طریق تحریک پروتئین‌سازی در کبد و با واسطه فاکتورهای رشد افزایش داده و باعث افزایش رشد عضلات می‌شود.

نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد که افزودن والین به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی باعث افزایش درصد پروتئین و ماده خشک و کاهش درصد چربی عضله سینه نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری گردیده است ( $P < 0.01$ ) که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو می‌باشد. اسیدهای آمینه شاخه‌دار باعث افزایش آنابولیسم در عضلات، بافت چربی و کبد می‌گردند (Corzo و همکاران، 2007). تجزیه اسیدهای آمینه شاخه‌دار در شرایط بتا اکسیداسون اسیدهای چرب سبب تامین آگزالواستات مورد نیاز در چرخه کربس برای اکسیداسیون استیل کوآ حاصل از بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود و باعث کاهش توده چربی لاشه و نسبت چربی لاشه در کل لاشه می‌شود.

کاهش عملکرد در جوجه‌های گوشتی گردیده است (Corzo و همکاران، 2007). ال-والین به عنوان چهارمین اسید آمینه محدود کننده در جیره‌های بر پایه ذرت و سویا می‌باشد و موجب بهبود رشد و عملکرد جوجه‌های گوشتی می‌شود (Corzo و همکاران، 2009). ماهیچه اسکلتی اولین جایگاه تجزیه اسیدهای آمینه شاخه دار است که به علت فعالیت بالای آمینو ترانسفراز در ماهیچه می‌باشد (Harper و همکاران، 1984). کتواسیدهای حاصله از اسیدهای آمینه شاخه دار در ماهیچه می‌توانند به داخل جریان خون وارد و توسط سایر بافت‌ها جذب و به اسیدهای آمینه شاخه دار به منظور سنتز پروتئین تبدیل شوند. به طور جایگزین، این کتواسیدهای می‌توانند به کتواسید دهیدروژناز و کو آنزیم آ را تبدیل شده و در نهایت به استیل کو آنزیم آ و سوکسینیل کو آنزیم آ برای استفاده در چرخه کربس تبدیل شوند (Harper و همکاران، 1984).

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که افزودن والین به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی تا سطح ۱۱۰ درصد نیازهای سویه راس در دوره رشد باعث افزایش درصد لاشه، ران و سینه و کاهش چربی محوطه بطنی نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری گردیده است در حالی که در دوره رشد سطوح بالای ۱۱۰ درصد موجب کاهش درصد لاشه، ران و سینه و کاهش چربی محوطه بطنی نسبت به گروه شاهد گردید ( $P < 0.01$ ). که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو می‌باشد. افزودن والین به میزان ۱/۳ کیلوگرم در تن در دوره رشد موجب کاهش وزن بدن، وزن لاشه و وزن سینه شد در حالی که افزودن ال-والین به میزان ۰/۵۲ کیلوگرم بر تن موجب افزایش وزن بدن، لاشه و سینه گردید (Corzo و همکاران، 2011). والین یک اسید آمینه محدود کننده قوی در فرمولاسیون‌های جیره‌های بر پایه ذرت و سویا در جوجه‌های در حال رشد می‌باشد (Fernandez و همکاران، 1994). محدودکنندگی والین به ویژه در سنین بالاتر در حالی که پروتئین جیره کاهش و غلات در جیره افزایش پیدا می‌کند از اهمیت بیشتری برخوردار است. نسبت والین به ایزولوسین در پروتئین غلات با سطح بالای لوسین همراه است. نسبت زیاد لوسین

(1997). IGF-1 بسیار قوی تر از انسولین برای این اثرات است که از راه گیرنده IGF-1 به جای گیرنده انسولین این اثرات میانجی-گری می شود زیرا غلظت گیرنده های انسولین در این سلول ها بسیار کم است. اثرات آنابولیک انسولین و IGF ها در عضله جوجه بعد از هج مشخص گردیده است. عضله جوجه بالغ دارای گیرنده های انسولین اختصاصی و گیرنده ای IGF-1 است (Oudin و همکاران، 1998). بنابراین عضله جوجه نسبت به تنظیم مستقیم متابولیسم خود توسط IGF ها و انسولین از راه گیرنده های اختصاصی خود حساس است (Oudin و همکاران، 1998). بیان ژن IGF-1 عضله در جوجه های گوشتی می تواند تا حد زیادی مستقل از هورمون رشد (بر خلاف آنچه که در پستانداران دیده می شود) باشد (Rossetot و همکاران، 1995). پپتید IGF-1 در گردش خون و mRNAIGF-1 کبدی در زمان ناشتا بودن جوجه های گوشتی کاهش می یابد (Kimball and Jefferson, 2006). در جوجه ها، تولید IGF-1 عضلانی می تواند تاثیر گذار باشد. در حقیقت هر دو mRNAIGF-1 در گردش خون و عضلانی بین روز اول تا دوم سن جوجه ها افزایش یافته در حالی که mRNAIGF-1 کبدی پایین بوده است (Naranjo و همکاران، 2002). IGF-1 یک تنظیم کننده کلیدی بالقوه رشد جوجه ها و ترکیب بدنی است. کبد منبع اصلی تولید و ترشح IGF-1 سرم خون است (Velloso, 2008). IGF-1 اندوکراین و IGF-1 پاراکراین می توانند در سنتز پروتئین دخالت داشته باشند. با در نظر گرفتن تنوع ژنتیکی رشد کلی بدن، یک ارتباط مثبت بین IGF-1 اندوکراین و ضریب رشد وجود دارد. همچنین شواهدی مبنی بر یک ارتباط مثبت بین mRNAIGF-1 عضلانی به عنوان فاکتور پاراکراین و رشد عضلانی ژنوتیپ های با رشد بالا در مدل های ژنتیکی و تغذیه ای دیده شده است (Naranjo و همکاران، 2002). هورمون رشد، IGF-1 و انسولین نقش های مهم و مختلفی را در رشد حیوانات بر عهده دارند (Zhou و همکاران، 2005). اغلب فعالیت هورمون رشد در بدن جوجه های گوشتی با عامل رشد شبه انسولین (IGF-1) انجام می شود. این ژن مرتبط با عملکرد رشد در جوجه ها است

(Kainulainen و همکاران، 2013). اسیدهای آمینه شاخه دار حدود یک سوم اسیدهای آمینه ضروری پلازما را شامل شده و به عنوان منبع انرژی برای سلول های بافت ماهیچه ای در هنگام گرسنگی، فعالیت شدید، تولید گوشت سینه در جوجه های گوشتی می شود. با کاهش سطوح ATP در طیور کاتابولیسم اسیدهای آمینه شاخه دار لوسین و والین در بافت ماهیچه ای افزایش می یابد. بر این اساس، اسیدهای آمینه شاخه دار نقش های مهمی را در نگهداری و رشد ماهیچه های اسکلتی بازی می کنند. جوجه های گوشتی با سرعت رشد بالا، اکسیداسیون اسیدهای آمینه شاخه دار به شدت افزایش می یابد، تحت این شرایط، بدن اسیدهای آمینه شاخه دار را به جای، اکسیداسیون و کاتابولیسم پروتئین عضلات جهت تولید انرژی مورد استفاد قرار می دهد. بنابراین، اسیدهای آمینه شاخه دار لوسین و والین نقش مهار کننده ای در مورد تجزیه پروتئین های بدن دارند (Baker, 2005).

نتایج نمودارهای ۲ تا ۵ نشان می دهد که افزودن والین به جیره غذایی جوجه های گوشتی باعث افزایش بیان ژن های IGF-1 و انسولین نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری گردیده است ( $P < 0.01$ ) که با نتایج بدست آمده از تحقیقات پیشین همسو می باشد. هورمون های IGF تنظیم کننده های مهمی در تحریک رشد، تحریک طویل سازی آمینو اسید، متابولیسم گلوکز، سنتز DNA، سنتز پروتئین، تکثیر و تمایز انواع مختلف سلول محسوب می شوند (Zhang و همکاران، 2007). کبد منبع اصلی تولید و ترشح IGF-1 سرم خون است. فعالیت IGF-1 در بدن به صورت اندوکراین، پاراکراین و اتوکراین می باشد (Yin و همکاران، 2010). IGF-1 پاراکراین برای رشد ماهیچه مهم تر از IGF-1 اندوکراین می باشد (Butler و همکاران، 2001). مطالعه IGF-1 به عنوان واسطه فعالیت هورمون رشد مهم می باشد (Butler و همکاران، 2001). IGF-1 جذب گلوکز، آمینو اسید، سنتز پروتئین و DNA را تحریک و افزایش داده و تجزیه پروتئین را توسط تارهای عضلانی مشتق از سلول های اقماری مهار می کند (Duclos و همکاران، 1993). IGF-1 همچنین تکثیر انواع سلول ها را تحریک می کند (McMurtry و همکاران،



برداشت می‌شود (Corzo و همکاران، 2007). عدم تعادل یا بیش از حد شدن اسیدهای آمینه شاخه دار بر روی انتقال هم ردیف‌های آنها تاثیر دارد. بعلاوه بیش از حد شدن یکی از اسیدهای آمینه شاخه دار باعث تحریک اکسیداسیون دیگران می‌گردد چرا که آنزیم دهیدروژناز کتواسید زنجیره شاخه دار تمایل بالایی برای تمامی آنها دارد (Corzo و همکاران، 2011).

### نتیجه‌گیری

به طور کلی اضافه کردن ۱۰ درصد بالاتر از نیازهای سویه راس از اسید آمینه ال-والین از طریق افزایش بیان mRNA ژن IGF-1 و ژن انسولین در بافت عضله سینه و بافت کبد موجب افزایش تولید و ترشح IGF-1 و انسولین، افزایش وزن عضله سینه، وزن لاشه و بهبود عملکرد و همچنین کاهش درصد چربی محوطه بطنی در جوجه‌های گوشتی می‌گردد. این نتایج ارزش اقتصادی مکمل والین را در صنعت پرورش طیور به خوبی نشان می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از همکاری پژوهشگران و پرسنل مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان قم و آزمایشگاه‌های امین و پاسنور به ویژه آقایان کلهر و طاهری کمال تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### منابع

- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis AOAC Int. 17th ed., Arlington, VA.
- Baker, D.H. (2005). Tolerance for branched-chain amino acids in experimental animals and humans. The Journal of nutrition 135, 1585S-1590S.
- Block, K. P. and Harper, A. E. (1984). Valine metabolism in vivo: effects of high dietary levels of leucine and isoleucine. Metabolism. 33:559-566.
- Butler, A.A., LeRoith, D., Minireview. (2001). tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor. physiology. Endocrinology. 142:1685-1688.

(Zhou و همکاران، 2005). IGF-1 یک ژن کاندیدا برای رشد، ترکیب بدن و سوخت و ساز (متابولیسم) چربی در طیور است که منجر به رشد عضله در گونه‌های مختلف طیور می‌شود (Kadlec و همکاران، 2011). ارتباط مستقیم بین سطح هورمون رشد و سرعت رشد در جوجه‌های گوشتی وجود ندارد. بنابراین مطالعه فاکتورهای رشد شبه انسولین به عنوان واسطه فعالیت هورمون رشد مهم می‌باشد (Gasparino و همکاران، 2012). هورمون رشد از طریق مسیر گیرنده‌های خود، سنتز رها سازی IGF-1 را تحریک می‌کند (Van و همکاران، 2008). اولین نقش اسیدهای آمینه شاخه‌دار والین و لوسین، شرکت در ساختمان پروتئین‌های بدن می‌باشد. روند سنتز پروتئین در سلول‌ها توسط کمپلکس mTOR تنظیم می‌گردد. گیرنده‌های mTOR پیام‌هایی را از ترکیبات خارج سلولی (که فعال کننده و یا مهار کننده سنتز پروتئین هستند) دریافت می‌کنند. انسولین و IGF-1 احتمالاً از محرک‌های سنتز پروتئین هستند (Baker, 2005). نشانه پردازای اسید آمینه از mTOR شروع شده و S6k1 و 4EBP1 را فعال می‌کند (Meijer and Dubbelhuis, 2004). مصرف یک جیره با پروتئین بالا به وضوح S6k1 را فعال کرده و فعالیت آن را در عضله سینه افزایش داده است (Everaer و همکاران، 2010). فعال کردن S6k1 به فراهم بودن اسیدهای آمینه جیره طی اولین روزهای تغذیه جوجه‌های گوشتی حساس بوده که می‌تواند ترجمه mRNA را عضله اسکلتی جوجه‌ها افزایش دهد (Everaer و همکاران، 2010). اسیدهای آمینه در هوموستاز گلوکز از راه مهار عمل انسولین بر انتقال گلوکز عضله و تولید گلوکز کبدی می‌باشد، این اثر مهارى با فسفوریله شدن مهارى وابسته به mTOR/S6K1 سوبسترای شماره یک گیرنده انسولین (IRS-1) مرتبط بوده، که بر روی دنباله‌های سرین و یا ترئونین انجام می‌شود و فعالیت PI3K مهار می‌شود که یک فاکتور کلیدی در اعمال متابولیک انسولین است (Tremblay و همکاران، 2007). اسیدهای آمینه شاخه دار بعنوان سیگنال‌های مواد مغذی در اکثر گونه‌های حیوانی، به جز ماهی، توسط کبد به مقادیر کمی

- Corzo, A., Dozier III, W., Loar, R., Kidd, M. and Tillman, P. (2010). Dietary limitation of isoleucine and valine in diets based on maize, soybean meal, and meat and bone meal for broiler chickens. *British poultry science* 51, 558-563.
- Corzo, A., Dozier, W. A., Kidd, M. T., Mejia, L., Zumwalt, C.D., and Tillman, P. B. (2011). Nutritional feasibility of l-valine inclusion in commercial broiler diets. *Poult. Sci.* 20 :284-290.
- Corzo, A., Kidd, M., Dozier III, W. and Vieira, S. (2007). Marginality and needs of dietary valine for broilers fed certain all-vegetable diets. *Journal of Applied Poultry Research* 16, 546-554.
- Corzo, A., Loar, R.E., and Kidd, M.T. (2009). Limitations of isoleucine and valine in broiler chick diets. *Poult. Sci.* 88:1934-1938.
- Corzo, A., Moran Jr, E. and Hoehler, D. (2004). Valine needs of male broilers from 42 to 56 days of age. *Poultry science*, 83(6): 946-951.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., Seeley, R.J.(2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 312:927-930.
- D'Mello, J.P.F., and Lewis, D. (1970). Amino acid interactions in chick nutrition. 2. Interrelationships between leucine, isoleucine and valine. *Br. Poult. Sci.* 11: 313-323.
- Duclos, M.J., Chevalier. B., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F., Goddard, C. and Simon, J. (1993). Insulin-like growth factor-I-stimulated glucose transport in myotubes derived from chicken muscle satellite cells. *J. Endocrinol.* 137:465-72.
- Everaert, N., Swennen, Q., Coustard, S.M., Willemsen, H., Careghi, C., Buyse, J., Bruggeman, V., Decuypere, E. and Tesseraud, S. (2010). The effect of the protein level in a pre-starter diet on the post-hatch performance and activation of ribosomal protein S6 kinase in muscle of neonatal broilers. *British Journal of Nutrition* 103, 206-211.
- Farran, M. and Thomas, O. (1992). Valine deficiency. 1. The effect of feeding a valine-deficient diet during the starter period on performance and feather structure of male broiler chicks. *Poultry science*, 71(11): 1879-1884.
- Fernandez, S.R., Aoyagi, S., Han, Y., Parsons, C.M. and Baker, D.H. (1994). Limiting order of amino acids in corn and soybean meal for growth of the chick. *Poultry Science*, 73(12): 1887-1896.
- Gasparino, E.O.A., Liveira Neto, R., Del Vesco, A.P., TPires, A.V., Batista, E., Voltolini, DM. and Souza krs, T. (2012). IT Expression of growth genes in response to glycerol use in Japanese quail diets. *OTGenetics and Molecular Research* 11 (3): 3063-3068.
- Harper, A., Miller, R. and Block, K. (1984). Branched-chain amino acid metabolism. *Annual review of nutrition* 4, 409-454.
- Kadlec, J., Hosnedlova, B., Rehout, V., Citek, J. and Vecerek, L.(2011). Insulin-like growth factor-I gene polymorphism and its association with growth and slaughter characteristics in broiler chickens. *Journal of Agrobiology*, 28(2),157-163.
- Kainulainen, H., Hulmi, J.J. and Kujala, U.M. (2013). Potential role of branched-chain amino acid catabolism in regulating fat oxidation. *Exercise and sport sciences reviews*, 41(4): 194-200.
- Kenneth, J., Livak, D and Thomas, D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2DDCT Method. *METHODS* 25, 402-408.
- Kimball, S.R., and Jefferson, L.S. (2006). signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *J. Nutr.* 136:227-231.

- Lei, M., Nie, Q., Peng, X., Zhang, D. and Zhang, X. (2005). Single nucleotide polymorphisms of the chicken insulin-like factor binding protein 2 gene associated with chicken growth and carcass traits. *Poultry science* 84, 1191-1198.
- Lynch CJ, Hutson SM J, Patson B, Vaval A, Vary TC (2002a) Tissue specific effects of chronic dietary leucine and norleucine supplementation on protein synthesis in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E824–E835.
- McMurtry, JP., Francis, GL. and Upton, Z. (1997). Insulin-Like Growth Factors in Poultry. *Domestic Animal Endocrinology* 14(4): 199-229.
- Meijer, A.J. and Dubbelhuis, P.F. (2004). Amino acid signalling and the integration of metabolism. *Biochemical and biophysical research communications* 313, 397-403.
- Naranjo, WM., Yakar, S., Sanchez-Gomez, M., Perez, AU. and Setser, J. (2002). Protein calorie restriction affects nonhepatic IGF-I production and the lymphoid system: studies using the liver-specific IGF-I gene-deleted mouse model. *Endocrinology*;143:2233-2241.
- Oudin, A., Chevalier, B., Simon, J. and Duclos, M.J. (1998). Muscle insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in chickens with high or low body weight: effects of age and muscle fibre type. *Growth Horm IGF .Res.*8:243-50.
- Penz, J.r., Clifford, A., Rogers, A. and Kratzer, F. (1984). Failure of dietary leucine to influence the tryptophan-niacin pathway in the chicken. *The Journal of nutrition*, 114(1): 33-41.
- Rogero, M. M., and Tirapegui, J. (2008). Aspectos atuais sobre aminoácidos de cadeia ramificada e exercício físico. *Rev. Bras. Cien. Farm.*, v.44, p.536-575.
- Rosselot, G., McMurtry, J.P., Vasilatos-Younken, R. and Czerwinski, S. (1995). Effect of exogenous chicken growth hormone (cGH) administration on insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression in domestic fowl. *Mol Cell Endocrinol*;114:157-66.
- Rossi, L. and Tirapegui, J. (2005). Aminoácidos de cadeia ramificada e atividade física. Tirapegui, J. *Nutrição, metabolismo e suplementação na atividade física*. São Paulo: Editora Atheneu, 153-161.
- Selvarasu, K., Amutha, R., Edwin, S., Natarajan, A. and Mani, K. (2016). Dietary Valine Supplementation on Meat Quality Characteristics of Broilers.
- Shimomura, Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T. and Shimomura, N. (2006). Nutraceutical Effects of Branched-Chain Amino Acids on Skeletal Muscle. *Journal of Nutrition*. 529s-532s.
- Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H. and Marette, A. (2007). Role of dietary proteins and amino acids in the pathogenesis of insulin resistance. *Annu. Rev. Nutr.* 27, 293-310.
- Tuttle, W.L. and Balloun, S.L. (1976). Leucine, isoleucine and valine interactions in turkey poults. *Poultry science* 55: 1737-1743.
- Van Vught, A.J., Nieuwenhuizen, A.G., Brummer, R.J., and Westerterp-Plantenga, M.S. (2008). Effects of oral ingestion of amino acids and proteins on the somatotrophic axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93: 584-590.
- Velloso, C.P. (2008). Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *British Journal of Pharmacology*. 154: 557–56.
- Wu, G., Bazer, F., Burghardt, R., Johnson, G., Kim, S., Li, X., Satterfield, M. and Spencer, T. (2010). Impacts of amino acid nutrition on pregnancy outcome in pigs: mechanisms and implications for swine production. *Journal of animal science* 88, E195-E204.
- Xiayu, R., Xuelin, H., Zhicheng, Z. and Xin, L. (2013). An improvement of the 2<sup>−ΔΔCT</sup> method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis.

*Biostat Bioinforma Biomath.* 3(3): 71–85.

Yin, Y., Yao, K., Liu, Z., Gong, M., Ruan, Z., Deng, D., Tan, B., Liu, Z. and Wu, G. (2010a). Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs *Amino Acids* .39 1477–1486.

Zhang, S., Qiao, S., Ren, M., Zeng, X., Ma, X., Wu, Z., Thacker, P. and Wu, G. (2013). "Supplementation with branched-chain amino acids to a low-protein diet regulates intestinal expression of amino acid and peptide transporters in weanling pigs." *Amino acids* 45(5): 1191-1205.

Zhang, Y., Guo, K., LeBlanc, R.E., Loh, D., Schwartz, G.J. and Yu, Y.H. (2007). Increasing dietary leucine intake reduces diet-induced obesity and improves glucose and cholesterol metabolism in mice via multimechanisms. *Diabetes* 56:1647–1654.

Zhou, H., Mitchell, A., McMurtry, J., Ashwell, C. and Lamont, S.J. (2005). Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. *Poultry science* 84, 212-219.

Zhou, H., Mitchell, A.D., McMurtry, J.P., Ashwell, C.M. and Lamont, S.J. (2005). Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. *Poultry Science*.84,212-219.