عنوان **فهرست** **صفحه**

چکیده ۱

فصل اول مقدمه و هدف ۳

فصل دوم مروری بر منابع ۷

الف- رده بندی بز ۷

الف-۱- پراکندگی بز ۷

الف-۱-۱- جمعیت و پراکندگی بز در جهان ۷

الف-۱-۲- جمعیت و پراکندگی بز در ایران ۸

الف-۱-۳- جمعیت و پراکندگی بز در استان ۸

الف-۲- نژادهای بز در ایران ۸

ب- مارکر یا نشانگر مولکولی ۹

ب-۱- انواع نشانگرهای ژنتیکی ۹

ب-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی (ریخت شناسی) ۹

ب-۱-۲- نشانگرهای پروتئینی ۹

ب-۱-۳- نشانگرهای سیتولوژیکی ۱۰

ب-۱-٤- نشانگرهای فیزیولوژیکی ۱۰

ب-۲- نشانگرهای DNA ۱۰

ب-۲-۱- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (RFLP) ۱۱

ب-۲-۲- پویش ژنومی نشانه‌های هضم ۱۲

عنوان **فهرست** **صفحه**

ب-۲-۳- ماهواره‌ک‌ها..... ۱۲

ب-۲-٤- توالی‌های تکراری پشت سر هم با تعداد متنوع (VNTR)..... ۱۲

ب-۲-٥- تفاوت طول قطعات هضم شده محصولات PCR (PBR)..... ۱۳

ب-۲-٦- پلی مورفیسم فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP)..... ۱۳

ب-۲-۷- تفاوت طول قطعات قابل تکثیر (ALP)..... ۱٤

ب-۲-۸- ریز ماهواره‌ها..... ۱٤

ب-۲-۹- تکثیر تصادفی DNA پلی مورف (RAPD)..... ۱٤

ب-۲-۱۰- انگشت نگاری با DNA تکثیر شده (DAF)..... ۱٥

ب-۲-۱۱- تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP)..... ۱٥

ب-۲-۱۲- پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP)..... ۱٦

ب-۲-۱۳- موقعیت توالی نشاندار (STS)..... ۱٦

ب-۲-۱٤- ردیف‌های بیان شده نشاندار..... ۱٦

ج- ژن‌های کاندید..... ۱۷

ج-۱-۱- مزایای آنالیز با ژن کاندید..... ۱۷

ج-۱-۲- محدودیت‌ها..... ۱۷

ج-۲- پلی مورفیسم و کاربردهای آن..... ۱۸

د- استخراج DNA..... ۱۹

عنوان **فهرست** **صفحه**

د-۱- استخراج DNA به روش فنل-کلرفرم..... ۲۰

د-۲- استخراج DNA به روش نمکی..... ۲۰

د-۳- تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده..... ۲۰

و- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۲۰

و-۱- تعریف..... ۲۰

و-۲- اساس PCR..... ۲۱

و-۳- حداقل عوامل مورد نیاز برای انجام یک واکنش PCR..... ۲۱

و- ٤- اجزاء PCR..... ۲۳

و-٥- بررسی محصولات PCR..... ۲۹

هـ- فیزیولوژی تولید مثل حیوان ماده..... ۳۰

هـ-۱- وظایف تخمدان..... ۳۰

هـ-۲- انتخاب شدن فولیکول های تخمدانی..... ۳۰

هـ-۳- ژن‌های عمده موثر بر چند قلوزایی..... ۳۱

هـ-۳-۱- ژن BMP15..... ۳۲

هـ-۳-۲- ژن GDF9..... ۳۲

هـ-۳-۳- ژن ALK6..... ۳۳

فصل سوم مواد و روش کار..... ۳٦

الف- مراحل تحقیق..... ۳٦

عنوان **فهرست** **صفحه**

الف-۱- دستگاه‌های مورد استفاده..... ۳۷

الف-۲- مواد مورد نیاز..... ۳۸

الف-۳- محلول‌های مورد نیاز..... ۳۹

ب- روش کار..... ٤۰

ب-۱- خون گیری..... ٤۰

ب-۲- استخراج DNA..... ٤۱

ب-۳- جدا سازی بافی‌کت..... ٤۱

ب-٤- هضم بافی‌کت..... ٤۱

ب-۵- تعیین کمیت و کیفیت DNA..... ٤۳

ج- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR..... ٤۳

ج-۱- مراحل انجام واکنش PCR برای ژن FecB..... ٤۳

ج-۲- بررسی محصول PCR..... ٤٦

ج-۲-۱- روش تهیه ژل آگارز ۲ درصد..... ٤٦

ج-۲-۲- مرحله انجام الکتروفورز..... ٤٦

ج-۳- بررسی کیفیت DNA..... ٤۷

ج-٤- برش آنزیمی محصولات PCR ژن FecB..... ٤۷

د- بررسی اگزون دو ژن GDF9..... ٤۸

د-۱- مراحل انجام واکنش PCR برای اگزون دو ژن GDF9..... ٤۸

عنوان **فهرست** **صفحه**

د-۲- بررسی محصول PCR ۵۰

د-۲-۱- روش تهیه ژل آگارز ۲ درصد ۵۰

د-۲-۲- مرحله انجام الکتروفورز ۵۰

د-۳- آزمایش بررسی وجود جهش FecGH ژن GDF9 ..... ۵۱

فصل چهارم نتایج **۵٤**

الف- استخراج DNA ۵٤

الف-۱- آزمایش بررسی ژن FecB ۵۵

الف-۲- آزمایش بررسی ژن GDF9 ..... ۵۵

الف-۱-۱- آزمایش بررسی وجود جهش FecB ۵٦

الف-۱-۱-۱- تعیین ژنوتیپ ژن FecB ۵۷

الف-۲-۱- آزمایش بررسی جهش FecGH ۵۸

الف-۲-۱-۱- تعیین ژنوتیپ اگزون دو ژن GDF9 ..... ۵۸

فصل پنجم بحث **٦۱**

الف- بحث ٦۱

ب- پیشنهادات ٦٤

فهرست منابع **٦۷**

جدول | فهرست جداول | صفحه

۳-۱: دستگاه‌های مورد نیاز برای انجام تحقیق..... ۳۸

۳-۲: مواد مورد نیاز برای انجام تحقیق..... ۳۹

۳-۳: مواد لازم برای واکنش PCR جهت بررسی ژن FecB..... ٤٤

۳-٤: توالی آغازگرهای استفاده شده برای ژن FecB..... ٤٤

۳-۵: برنامه حرارتی واکنش PCR..... ٤٥

۳-٦: مواد مورد نیاز برای هضم آنزیمی..... ٤٧

۳-۷: مواد لازم برای واکنش PCR برای بررسی اگزون دو ژن GDF9..... ٤٨

۳-۸: توالی آغازگرهای مورد استفاده برای اگزون دو ژن GDF9..... ٤٨

۳-۹: برنامه حرارتی واکنش PCR ٤٨

۳-۱۰: مواد مورد نیاز برای هضم آنزیمی..... ۵۱

٤-۱: فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن FecB در بزهای نژاد لری..... ۵٦

٤-۲: فراوانی ژنوتیپی و آللی اگزون دو ژن GDF9 در بزهای نژاد لری..... ۵۷

تصویر **فهرست تصاویر** **صفحه**

٤-١: چاهک‌های ۱ تا ۸، DNA استخراج شده و چاهک ۹ مارکر ۵۰ جفت بازی.....۵۳

٤-٢: چاهک ۱، مارکر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک ۲ تا ۱۱ محصولات ۱۹۰ جفت بازی نمونه‌های بز لری.....۵٤

٤-٣: چاهک ۱، مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک‌های ۲ تا ۱۱ محصولات ۱۳۹ جفت بازی نمونه های بز لری.....۵۵

١-٤: چاهک ۱، مارکر ۱۰۰ جفت بازی و چاهک‌های ۲ تا ۱۰ محصولات ۱۹۰ جفت بازی..... ۵٦

٤-٢: چاهک ۱، مارکر ۵۰ جفت بازی، چاهک‌های ۲ تا ۹، محصولات.....۵۷

فصل اول

مقدمه و هدف

فصل اول: مقدمه و هدف

اصلاح ژنتیکی دام‌ها به منظور اصلاح نژاد و برای افزایش کمی و کیفی تولیدات بسیار مهم است، اما نیاز به زمان طولانی دارد. بنابراین برنامه‌های اصلاح نژادی به عنوان روش دراز مدت برای افزایش تولیدات دام مورد توجه قرار دارند (خالداری، ۱۳۸٤). گوسفند و بز با توجه به تنوع ژنتیکی در محدوده وسیعی از شرایط آب و هوایی پرورش می‌یابند و باتوجه به تفاوتهای ژنتیکی و آب و هوایی، وضعیت تولیدمثلی آنها نیز متفاوت میباشد. متوسط تعداد زایمان در بزها در یک فصل تولیدمثل حدود ۳-۱ و گاهی بیشتر است. از جمله مهمترین اهداف اصلاح نژاد دامها، افزایش وزن بدن، کیفیت لاشه و بره‌زایی میباشد (Notter، ۲۰۱۲).

هر فرد روزانه به ۲٤٥۰ کیلوکالری انرژی و ۲۱ گرم پروتئین حیوانی نیاز دارد. در حال حاضر حدود ٤۰٪ مردم جهان از سوء تغذیه رنج می‌برند که یکی از مهمترین کمبودها، کمبود مواد پروتئینی با کیفیت مطلوب (نظیر گوشت و شیر) می‌باشد (خالداری، ۱۳۸٤).

کشور ایران نیز دچار مشکلات تغذیه‌ای است، با توجه به جمعیت زیاد، که حدود ۷۵ میلیون نفر برآورد شده است (گزارش مرکز آمار ایران، ۱۳۹۰) و نرخ رشد سالانه ۱/۵ درصد، تامین فرآورده‌های دامی متناسب با جمعیت از مهم‌ترین اولویت‌ها می‌باشد. یکی از معیارهای مهم برای ارزیابی میزان تمدن و پیشرفت جوامع، تامین تغذیه مطلوب است زیرا در پیشرفت همه جانبه یک جامعه، درجه سلامت روحی و جسمی افراد آن، یک عامل تعیین کننده می‌باشد (خالداری، ۱۳۸٤).

در طول دهه‌های اخیر، بکارگیری روش‌های مبتنی بر ژنتیک جمعیت و آمار، منجر به توسعه جمعیت دام‌ها با بازده بالا شده است. ترکیب این روش‌ها با علوم جدیدی همچون ژنتیک ملکولی پیشرفت‌های شگرفی در اصلاح نژاد پدید آورده است. چند شکلی‌های موجود در ژن‌های مرتبط با صفات تولیدی به عنوان نشانگر ژنتیکی برای شناسایی و اصلاح نژاد دام‌ها بکار برده می-شود (الیاسی زرین قبایی و همکاران، ۱۳۸٦).

تنوع ژنتیکی موجودات زنده، سرمایه‌های گرانبهایی هستند که طی قرون و اعصار به وجود آمده‌اندو حاصل اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط در زمانهای بسیار طولانی هستند که به نسل کنونی به ارث رسیده‌اند. امروزه استفاده از مارکرهای مولکولی راهی سریع و دقیق را برای شناسایی نژادهای مختلف در اختیار متخصصین قرار داده است. در طی دهه‌های گذشته چهره اصلاح نژاد دام تا حد زیادی تغییر یافته است. امروزه در اصلاح نژاد دام از دانش و فن‌آوری بیشتری استفاده می‌شود. گسترش استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توسعه تکنیک‌های توالی یابی ژنوم، شناسایی و کشف انواع نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم، ارائه نقشه‌های ژنتیکی از گونه‌های مختلف حیوانات اهلی به همراه پیشرفت‌های حاصله در علوم آمار و کامپیوتر، ابزار

قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی تفصیلی موجودات زنده و نیز گونه‌های دامی فراهم آورده است (Montaldo و Meza-Herrera, ۱۹۹۸).

در سالهای اخیر استفاده از نژادهای پرزا که حامل ژنهای موثر بر چند قلوزایی هستند و تلاقی آنها با دیگر نژادها، یکی از روشهای مناسب برای اصلاح ژنتیکی و بهبود تولید می‌باشد. جهش‌های طبیعی در نژادهای گوسفندهای پرزا نشان می‌دهد که اعضای فوق خانواده TGFβ[1] مانند GDF9[2]، BMP15 و FecB بر میزان تخمک‌گذاری و تعداد زایمان موثر هستند (Polley و همکاران، ۲۰۰۹).

ژن FecB اولین بار در گوسفندان نژاد مرینو بورولا استرالیایی شناسایی گردید. حاملین این جهش به دلیل اهمیتی که در صنعت گوسفندداری جهان دارند از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند (McNatty، ۲۰۰۵). حاملین هموزیگوت این ژن در هر سیکل بیش از ۵ تخمک با اندازه ۳ تا ۵ میلی متر و حاملین هتروزیگوت سه یا چهار تخمک با اندازه ٤ تا ۵ میلی-متر رها می‌کنند (Davis، ۱۹۸۲).

ژن GDF9 دارای هشت جهش است، یکی از جهش‌های آن که به $FecG^H$ معروف است اولین بار در گوسفندان نژادهای بلکلیر و کمبریج پیدا گردید. حاملین هموزیگوت این جهش نابارور و در حاملین هتروزیگوت منجر به افزایش تخمک‌گذاری می‌شود (Hanrahan و همکاران، ۲۰۰٤).

هدف از این تحقیق بررسی وجود جهش های FecB و $FecG^H$ در بزهای نژاد لری استان لرستان می‌باشد.

1. Transforming Growth Factor β
2. Growth Differntiation Factor 9

فصل دوم

بررسی منابع

فصل دوم: مروری بر منابع

الف- رده‌بندی بز

گونه بز اهلی به سلسله[1] جانوران، شاخه طناب داران، زیر شاخه مهره‌داران، رده پستانداران، زیر رده سم‌داران، راسته زوج سمان، زیر راسته نشخوارکنندگان و خانواده تهی شاخان تعلق دارد (حاجی سید جوادی، ۱۳۸۸).

الف-۱- پراکندگی بز

الف-۱-۱- جمعیت و پراکندگی بز در جهان

براساس گزارش فائو تعداد بز در دنیا ٥٧٤ میلیون رأس است، که حدود ۹۰٪ جمعیت بز در کشورهای جهان سوم و از این تعداد بیش از ٤٨٪ در هند، چین، پاکستان، نیجریه و اتیوپی پرورش می‌یابد (عزت پور، ۱۳۸۲).

1. Kingdom

الف-۱-۲- جمعیت و پراکندگی بز در ایران

ایران یکی از کشورهای عمده‌ی پرورش دهنده بز در دنیا می باشد. جمعیت بز در ایران در حدود ۲۱ میلیون راس می‌باشد (گزارش مرکز بهبود تولیدات دامی کل کشور، ۱۳۸۹). بزهای بومی ایران اغلب به رنگ سیاه بوده که به سیاه بز معروف هستند البته به رنگهای دیگر مانند سفید نیز دیده میشوند. برخی موارد نیز رنگ سیاه با رنگ سفید مخلوط میباشد (حاجی سید جوادی، ۱۳۸۸).

الف-۱-۳- جمعیت بز در استان لرستان

بز سیاه بومی استان لرستان، بز لری نامیده می‌شود که شیر، گوشت و چرم مرغوبی را تولید می‌کند. جمعیت بز لری در استان بالغ بر ۱/۳ میلیون راس می باشد که در شهرستان‌های این استان به خصوص شهرستان خرم‌آباد پراکنده میباشند (گزارش مرکز بهبود تولیدات دامی کل کشور ، ۱۳۸۹).

الف-۲- نژادهای بز در ایران

با توجه به شرایط اقلیمی و وضعیت درآمد مردم در کشورهای مختلف نژاد بزهای مورد پرورش متفاوت است. در ایران نژادهای مختلفی نظیر نژاد لری، عربی، خلخالی، مرغز، نجدی، نائینی، نژاد کرکی رائینی، بز بومی سیستانی، نژاد تالی، ترکی، نژاد بوشهری، ندوشنی و رباطی وجود دارد که دارای ویژگی‌های متفاوتی از نظر تولید شیر و گوشت هستند (حاجی سید جوادی، ۱۳۸۸).

ب- مارکر یا نشانگر مولکولی

در برنامه‌های اصلاح نژاد، مارکر یا نشانگر مولکولی عبارتست از تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای DNA که این تفاوت دارای توارث مندلی هستند. این قطعه ویژه متعلق به ژن یا ژن‌هایی است که بطور معنی داری در تنوع بین حیوانات سهیم هستند (جوانمرد، ۱۳۸۰).

ب-۱- انواع نشانگرهای ژنتیکی

ب-۱-۱- نشانگرهای مورفولوژیکی (ریخت شناسی)

این نشانگرها (مارکرها) غالباً تحت تأثیر محیط قرار داشته و از سن حیوان متأثر می‌شوند و گاهی برای مشاهده آنها باید منتظر ظهورشان ماند. اگر چه نشانگرهای ریخت‌شناسی در علوم زیستی مورد استفاده قرار میگیرند ولی دارای محدودیت‌هایی اساسی هستند که موجبات توجه محققین این علوم را به انواع دیگری از نشانگرها فراهم آورده است (گله‌داری و همکاران، ۱۳۸۵).

ب-۱-۲- نشانگرهای پروتئینی

نشانگرهای پروتئینی تغییرات را در سطح ردیف و عمل ژن به صورت نشانگرهای همبارز نشان می‌دهند. معمول ترین نوع نشانگرهای پروتئینی ایزوزیم‌ها هستند، که فرم‌های مختلفی از یک آنزیم را نشان می‌دهند.

از معایب این نشانگرها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- تعداد مارکرهای پروتئینی محدود است.

۲- بخش کمی از ژنوم، تولید کننده پروتئین است.

۳- روش رنگ آمیزی آنها چندان زیاد نیست.

٤- چند شکلی موجود در نشانگرهای پروتئینی زیاد نمی‌باشد.

٥- همه تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در سطح DNA ، در سطح الکتروفورز قابل ظهور نیست.

٦- تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه هستند (نقوی و همکاران، ١٣٨٤).

ب-١-٣- نشانگرهای سیتولوژیکی

در بسیاری از موجودات زنده تفاوت‌های گسترده کروموزومی مشاهده می‌شود که می-توانند، به عنوان نشانگر بکار روند. تلوسنتریک، جابجایی و الگوهای نواربندی از جمله این نشانگرها می‌باشند (گله داری و همکاران، ١٣٨٥).

ب-١-٤- نشانگرهای فیزیولوژیکی

مطالعات مربوط به بعضی صفات نشان می‌دهد که افزایش تولید با افزایش سطح برخی از هورمون‌ها در پلاسما همراه است. پس میزان این هورمون‌ها می‌تواند، به عنوان یک نشانگر فیزیولوژیک محسوب شود. اشکال نشانگرهای فیزیولوژیک این است که این نشانگرها (از جمله سطح هورمون‌ها در پلاسمای خون) علاوه بر ژن‌ها به شدت تحت تأثیر محیط داخلی سن و جنس هستند (گله داری و همکاران، ١٣٨٥).

ب-٢- نشانگرهای DNA

مارکرهای DNA، مهمترین و کاربردی‌ترین سیستم‌های مارکری‌اند، که گستردگی زیادی داشته و هر روز در حال تکامل و توسعه هستند. از آنجا که در اولین سطح از بیان ژن مطرح می-شوند، خیلی دقیق بوده، تنوع و پلی مورفیسم زیادی دارند. مارکرهای DNA را به ساختمان‌ها و اماکن مهم در یک شهر تشبیه می‌کنند که می‌توان سایر نقاط شهر را نسبت به آنها آدرس داده و مکان یابی کرد (سادات نوری و نجف آبادی، ١٣٨٥).

ب-۲-۱- تفاوت طول قطعات حاصل از هضم[1]

RFLP اولین بار در سال ۱۹۷٤ به عنوان یک مارکر ژنتیکی برای تعیین جهش در ویروس به کار گرفته شد. تکنیک RFLP نیاز به ایجاد یک کتابخانه قطعات DNA دارد که داخل ناقل‌ها کلون شده باشد. این تکنیک نیاز به دانستن توالی‌ها از قبل ندارد (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵). کاربردهای مهم همچون نقشه‌یابی و دستکاری مکان‌های ژن‌های کنترل کننده صفات کمی با استفاده از RFLP در سال ۱۹۸۳ بیان گردید. RFLP وجود الگوهای غیر یکسان است که بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA بوسیله آنزیم‌های محدود کننده مشخص می‌شود. این الگوهای غیر یکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیم‌های محدود کننده بوجود می‌آید (سامعی، ۱۳۸۵).

تکنیک RFLP دارای محاسن زیر می‌باشد:

۱- تکرار پذیری: دقت و قابلیت اعتماد به این نشانگرها فوق العاده زیاد است.

۲- هم بارز هستند و امکان تشخیص افراد هموزیگوت از هر یک از انواع افراد هتروزیگوت امکان پذیر است.

۳- تحت تأثیر عوامل محیطی داخلی و خارجی نبوده و صد در صد ژنتیکی هستند.

از معایب این روش می‌توان به دشواری، پیچیدگی، وقت گیر بودن و هزینه اولیه بالا اشاره کرد (گله‌داری و همکاران، ۱۳۸۵).

1.Restriction Fragment Lengh Polymorphism

ب-۲-۲- پویش ژنومی نشانه‌های هضم[1]

تکنیک پویش ژنومی نشانه‌های محدود شده، برای تجزیه و تحلیل DNA ژنومی به کار می‌رود. این روش بر اساس نقاط برش اختصاصی آنزیم‌های محدود کننده بوده و به عنوان نشانه و وجه تمایز افراد بکار گرفته می‌شود (صدر، ۱۳۸٦).

ب-۲-۳- ماهوارک‌ها

ماهوارک‌ها واحدهای ۱۰ تا ٦۰ جفت بازی هستند که ممکن است، صدها بار تکرار شده باشند. آنها معمولاً یک هسته مشترک ۱۰ تا ۱۵ جفت بازی دارند که احتمالاً در تنوع پذیری موثرند. تنوع پذیری ماهوارک‌ها در حدی است که گاهی در انگشت نگاری DNA انسان مورد استفاده قرار می‌گیرند (صدر، ۱۳۸٦).

ب-۲-٤- توالی‌های تکراری پشت سر هم با تعداد متنوع[2]

این روش به علت تعداد زیاد باندها و پیچیده بودن تفسیر نتایج و امتیازبندی، با استقبال زیادی مواجه نشده است. در VNTR علاوه بر اینکه تعداد واحدها متفاوت است، خود VNTRها هم متفاوتند. یعنی در یک موجود ممکن است، VNTRI، VNTRII، VNTRIII وجود داشته باشد (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

1. Restriction Landmarc Genomic Scaning(RLGS)
2. Variable Number of Tandonm Repeat(VNTR)

ب-۲-۵- تفاوت طول قطعات هضم شده محصولات PCR[1]

در این روش فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط آنزیم‌های برشی هضم می-شوند و سپس قطعات حاصله روی ژل پلی آکریل آمید یا آگارز از هم جدا می‌گردند. در صورت بروز جهش در هر یک از نقاط برش تفاوت طول در اندازه قطعات هضم شده، مشاهده می‌شود. جهش از نوع حذف و اضافه کوچک نیز تفاوت در طول قطعات را در پی خواهد داشت (گله داری و همکاران، ۱۳۸۵).

ب-۲-٦- پلی مورفیسم فرم فضایی رشته‌های منفرد[2]

این روش در سال۱۹۸۹ ابداع شد. در الکتروفورز SSCP، ابتدا از یک ماده واسرشت ساز مانند اوره استفاده می‌شود تا DNA دو رشته‌ای به DNA تک رشته‌ای تبدیل گردد. به هنگام راندن DNA تک رشته‌ای بر روی ژل، اثرات متقابل درون مولکولی روی می‌دهد. به عبارت دیگر بین بخش‌هایی از این DNA پیوند ایجاد می‌شود و ساختمان ثانویه تشکیل می‌شود. بنابراین حرکت مولکول‌های DNA در این حالت به جای اینکه تابع اندازه مولکول باشد به ساختمان ثانویه DNA تک رشته‌ای بستگی خواهد داشت. در حین الکتروفورز، این ساختمان‌ها که به توالی رشته مورد نظر بستگی دارند از طریق ایجاد برودت حفظ می‌شوند. اگر در این توالی جهشی روی داده باشد، نوع پیوندهایی که تشکیل می‌شود متفاوت بوده و باند مربوطه بر روی ژل نیز متفاوت خواهد بود. عواملی نظیر دمای ژل (نباید زیاد بالا باشد)، درصد ژل پلی آکریل آمید (۵ تا ٦ درصد مناسب است) و اندازه قطعه DNA مورد بررسی (معمولا بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ جفت باز و ایده‌ال ۱۵۵ جفت باز) در موفقیت SSCP نقش دارند (نقوی، ۱۳۸٤).

1 . PCR Based RFLP
2. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

ب-۲-۷- تفاوت طول قطعات قابل تکثیر[1]

وجود اختلاف در اندازه قطعات حاصل از PCR که در آن دو پرایمر هدفمند از توالی ژن بکار رفته است، را ALP گویند. این اختلاف بیانگر وقوع پدیده حذف یا اضافه شدن این نشانگر است. برای مشاهده پلی مورفیسم از نوع حذف و اضافه در ALP لازم است که حداقل ۱۰ جفت باز در این نوع جهش شرکت داشته باشند (سامعی، ۱۳۸۵).

ب-۲-۸- ریز ماهواره‌ها[2]

ریز ماهوارها توزیع وسیعی را در اکثر گونه‌های مهره‌داران به خود اختصاص داده‌اند. در سال ۱۹۹۲ نشان داده شد که تکرارهای GT یا CA بیشترین تکرارهای دی نوکلئوتیدی رایج هستند. تعداد باز موجود در هر ردیف تکرار شونده ممکن است دو، سه، چهار یا حتی بیشتر باشد. برای طراحی پرایمر از خود این نوکلئوتیدهای تکراری استفاده می‌شود. عملیات شناسائی ریز ماهواره‌ها، تعیین توالی بازی آنها، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیکی بسیار پیچیده بوده و مستلزم صرف وقت و هزینه فوق‌العاده است (گله‌داری و همکاران، ۱۳۸۵).

ب-۲-۹- تکثیر تصادفی DNA پلی مورف[3]

در سال ۱۹۹۰ دو گروه تحقیقاتی همزمان روشی را برای سنجش میزان چند شکلی ابداع کردند. یک گروه در شرکت دو پونت که روش خود را RAPD نامیدندو گروه دیگر در موسسه تحقیقات زیست‌شناسی کالیفرنیا که روش خود را واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر تصادفی نامیدند. در این روش یک آغازگر چند نوکلئوتیدی کوتاه که بطور تصادفی از توالی‌های بازی A انتخاب شده است، در مجاور سایر مواد لازم برای تکثیر در PCR قرار می‌گیرد. در این تکنیک

1. Amplicon Length Polymorphism (ALP)
2. Microsatellete
3. Random Amplification Polymorphic DNA