١٤٤٣

دانشگاه ارومیه

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.S) در رشته علوم دامی

عنوان

تعیین تنوع آ للی ژن کاپا کازئین (CASK) در گوسفندان نژاد ماکویی با استفاده از روش PCR-SSCP

پژوهشگر

معصومه محمودی

اساتید راهنما

دکتر علی هاشمی

دکتر کریم مردانی

حوزه اطلاعات مدارک علمی پزشکی

ثبت مدارک

۳۸۹/۹/ ۸

زمستان ۸۸

۱۴۶۴۶۷

پایان نامه خانم معصومه محمودی به تاریخ ۸۸/۱۲/۲٤ به شماره ۱۳۱-۲ک مورد پذیرش هیات محترم داوران با رتبه بسیار خوب ونمره ۱۷٫۶ هفده و شش دهم قرار گرفت.

۱-استاد راهنمای اول و رئیس هیئت داوران :

۲-استاد راهنمای دوم:

۳-استاد مشاور :

٤-داور خارجی :

٥-داور داخلی :

٦- نماینده تحصیلات تکمیلی :

حق طبع و نشر این رساله متعلق به دانشگاه ارومیه است.

بسم الله الرحمن الرحیم

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس بیکران خدا را که به اینجانب توفیق تحصیل علم وکسب معرفت را عطا فرمود تا با توکل به او این مرحله را هم پشت سر بگذارم و همواره ناظر و شاکر بر الطاف بی انتهایش باشم.

برخود وظیفه می دانم مراتب تشکر و تواضع خود را در قبال کسانی که در طول تحصیل مرا مورد لطف و عنایت قرارداده اند ، با کمال امتنان ابراز دارم .

از پدر ومادرو همسر عزیزم به خاطر تمامی زحمات و حمایت هایشان کمال تشکر و قدردانی را دارم بدهیی است که بدون کمک آنها هرگز این موفقیت حاصل نمی شد.

از استادان بزرگوار جناب آقای دکتر هاشمی ودکتر مردانی که پیشبرد این پایان نامه مرهون علم ، دانش ، راهنمایی و حمایتهای ایشان می باشد ، بالاترین درجات تقدیر و تشکر را به عمل می آورم.

از مدیریت پژوهشکده دانشگاه ارومیه که امکانات انجام این پایان نامه را در اختیارم گذاشتند به خصوص از زحمات جناب آقای عزیزی مسؤل آزمایشگاه کمال تشکر را دارم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

مقدمه ۱

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- ترکیبات عمده شیر ۳

۱-۲- پروتئین ها ۳

۱-۲-۱- انواع پروتئینهای شیر ۴

۱-۲-۲- عوامل موثر بر ترکیبات پروتئین شیر ۴

۱-۳- مشتقات اصلی کازئین ۵

۱-۳-۱- آلفا اس یک کازئین ۵

۱-۳-۲- آلفا اس دو کازئین ۵

۱-۳-۳- کاپاکازئین ۵

۱-۳-۴- بتا کازئین ۶

۱-۳-۵- گاما کازئین ۶

۱-۴- چند شکلی پروتئین های شیر ۷

۱-۵- تحقیقات انجام گرفته در مورد ژن کاپا کازئین ۷

۱-۶- نشانگرها ۹

۱-۷- اهمیت نشانگرهای ژنتیکی ۹

۱-۸- کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح نژاد دام ۱۰

۱-۹- گزینش به کمک نشانگرها ۱۱

۱-۱۰- تعیین سودمندی نشانگرها ۱.۱

۱-۱۱- اهمیت مطالعه گوسفند ۱۱

۱-۱۲- رده بندی گوسفند از لحاظ جانورشناسی ۱۲

۱-۱۳- ژنوم گوسفند ۱۲

۱-۱۴- اهمیت گوسفند از نظر تولید شیر ۱۲

۱-۱۵- گوسفندان ایران ۱۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۱۶- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۳
۱-۱۶-۱- مکانیسم PCR ۱۳
۱-۱۶-۲- مشکلات PCR ۱۶
۱-۱۶-۳- روشهای جلوگیری از آلودگی PCR ۱۶
۱-۱۷- اجزای واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۷
۱- ۱۷-۱- آغازگرها و ویژگی آنها ۱۷
۱- ۱۷-۲- کلرید منیزیم ۱۷
۱-۱۷-۳- آنزیم DNA پلیمراز ۱۸
۱-۱۷-۴- بافر واکنش PCR ۱۸
۱-۱۷-۵- دی اکسی نوکلئوزید تری فسفاتها (dNTPs) ۱۸
۱-۱۸- عوامل موثر بر نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز ۱۸
۱-۱۸-۱- آلودگی بیولوژیکی ۱۸
۱-۱۸-۲- غلظت آغازگر ۱۹
۱-۱۹- تکنیک SSCP ۱۹
۱-۱۹-۱- مزایای روش PCR ۲۰
۱-۲۰- روشهای آماری در مطالعهٔ تنوع درون جمعیتی ۲۱
۱-۲۰-۱- چند شکلی ۲۱
۱-۲۰-۲- شاخصهای اندازه گیری تنوع درون جمعیتی ۲۱
۱-۲۰-۳- هتروزیگوسیتی ۲۱
۱-۲۰-۴- تنوع ژنی ۲۱
۱-۲۰-۵- ضرورت بررسی تعادل هاردی ـ واینبرگ ۲۲

فصل دوم

مواد و روشها

۲-۱- مراحل تحقیق ۲۳

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۲- نحوهٔ خونگیری ۲۳
۲-۳- استخراج DNA ۲۳
۲-۳-۱- تجهیزات لازم برای استخراج DNA ۲۴
۲-۴- مراحل استخراج DNA ۲۴
۲-۵- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۲۵
۲-۵-۱- وسایل و مواد لازم جهت الکتروفورز ۲۵
۲-۶- تکثیر ژن کاپا کازئین با استفاده از روش PCR ۲۶
۲-۷- مشاهده محصول PCR و عکسبرداری ۲۸
۲-۸- تکنیک SSCP ۲۸
۲-۹- راه اندازی الکتروفورز عمودی ۲۹
۲-۹-۱- تهیه بیس آکریلامید ۳۰٪ ۲۹
۲-۹-۲- طرز سوار کردن شیشه ها ۲۹
۲-۱۰- طرز تهیه ژل پایینی با غلظت ۱۵٪ ۳۰
۲-۱۱- طرز تهیه ژل بالایی ۳۰
۲-۱۲- رنگ آمیزی ژل پلی آکریلامید با نیترات نقره ۳۱

فصل سوم

نتایج و بحث

۳-۱- تعین کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده ۳۴
۳-۲- تکثیر ژن کاپا کازئین ۳۴
۳-۳- الگوی SSCP مشاهده شده ۳۵
۳-۴- پیشنهادات ۳۹
فهرست منابع ۴۱

مقدمه

علوم دامی حیطه ای از دانش کشاورزی بوده که مطالعات آن معطوف به بررسی و تحقیق پیرامون حیواناتی است که با انسان مانوس بوده و به اصطلاح اهلی شده و بین آنها و بشر روابط متعددی برقرار شده است. متخصصان علوم دامی با جمع آوری تجربیات آگاهانه گذشتگان و طرد یا تکمیل آنها در تلاش برای فراهم آوردن عرصه مطلوب جهت زیست حیوانات در راستای بهره برداری بیشتر و اقتصادی تر لحظه ای درنگ نداشته اند. در این تلاش با بهبود روش های تغذیه ، تولیدمثل ، بهداشت و غیره موفقیت های چشمگیری را کسب نموده اند. تلاش برای دستیابی به نسل های پر تولید و دارای قدرت بقا و توان زاد و ولد بیشتر در حیوانات اهلی بخشی دیگر از وظایف علوم دامی و مربوط به شاخه ای از این علم موسوم به اصلاح دام است (۲).

اصلاح دام به کارگیری دانش عملی برای بهبود ژنتیکی حیوانات است. علم ژنتیک فراهم کننده یک سری اصول پایه ای برای راهنمایی فعالیت های به نژادی است .اصولا پرورش حیوانات اهلی فعالیتی اقتصادی بوده و توصیه های به نژادی بایستی از نظر اقتصادی مورد بررسی قرار گیرند. هدف اساسی اصلاح دام بر مبنای افزایش راندمان تولید و کیفیت فراورده های تولیدی برای مصرف کننده نهایی از طریق تغییرات ژنتیکی است(۲).

تعیین ژنوتیپ بر اساس دی- ان- ا (DNA)، هزینه های برنامه های اصلاح نژادی را کاهش داده و باعث کاهش فاصله بین نسلی می گردد. بنابراین استفاده از فن آوری دی- ان- ا ، برای بهبود کیفیت و کمیت تولیدات دامی بسیار کارآمد به نظر می رسد (۱۹). این فن آوری شامل تعداد زیادی از روش هایی است که در مطالعات زیست شناسی سلولی - مولکولی مورد استفاده قرار می گیرد (۵۴) .

پیشرفت های دو دهه اخیر در زمینه زیست شناسی مولکولی موجب ارتقای کارآیی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش های وابسته به دی- ان- ا، در علوم بالینی گردیده است. استفاده از نشانگرهای غیر رادیو اکتیو و اولیگونوکلئوتیدهای مکمل با ژن ها ویا مترادف های ویژه بازهای آلی در دی- ان- ا، از جمله پیشرفت های موثردر بهبود و به کارگیری روزافزون تست های وابسته به دی- ان- ا، در طیف تشخیص بالینی محسوب می شود. یکی از مهم ترین پیشرفت ها در زمینه زیست شناسی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد واکنش زنجیره ای پلیمراز(polymerase chain reaction) می باشد. پی- سی - آر روشی آزمایشگاهی برای تکثیر اختصاصی توالی های اسیدنوکلئیک می باشد (۶).

مصرف روز افزون مواد پروتئینی در دنیا ، ضرورت تلاش برای افزایش تولید ، شناسایی منابع مهم و ارزشیابی کیفیت غذایی پروتئین های مختلف را توجیه می نماید.در بین مواد غذایی طبیعی ، پروتئین های شیر غنی ترین منبع اسیدهای آمینه ضروری هستند و در حقیقت شیر را به دلیل مرغوبیت

پروتئین های آن ، کامل ترین غذای طبیعی نامیده اند (۱۷). شیر حاصل از دام های اهلی ۳۰-۲۰٪ از کل پروتئین مصرفی انسان را در جهان امروز به خود اختصاص داده است (۱۷). با وجود اختلافات کمی و کیفی پروتئین های شیر در گونه های مختلف، در تمام پستانداران پروتئین های شیر به دو گروه عمده تقسیم می شوند که بستگی به رفتار آنها در pH =۶/۴ دارد. بخش محلول، پروتئین های آب پنیر نامیده می شود و بخش نامحلول، کازئین ها هستند که با تعداد متفاوت گروه های فسفات از هم تفکیک داده می شوند (۲۲). حدود ۸۰٪ از پروتئین شیر را کازئین (۲/۸ درصد از کل پروتئین) و ۲۰٪ از آنرا پروتئین های محلول در آب تشکیل می دهند. کاپا کازئین فاکتور اصلی پایداری حالت کلوئیدی کازئین بوده و اگر چه از لحاظ مقدار یکی از اجزا کوچک تشکیل دهنده میسل هاست اما عامل اصلی پایداری ساختمان آنها محسوب می شود. همچنین این پروتئین در کیفیت پنیر تولید شده، سرعت لخته شدن شیرو همینطور راندمان تبدیل شیر به پنیر اهمیت به سزایی دارد (۱۴).

گوسفند ماکویی اگر چه جزء گوسفندان پشمی محسوب می شود ولی بعد از گوسفندان لری و مهربان جزء شیروارترین گوسفندان ایران به شمار می آید که از شیر آن پنیر معروف لیقوان تهیه می شود (۸). هدف از این تحقیق آنالیز چند شکلی بودن ژن کاپا کازئین در گوسفندان نژاد ماکویی و تعیین فراوانی آللی این ژن و به کار بردن یک روش شناسایی برای تعیین تنوع آللی ژن کاپا کازئین در گوسفند ماکویی می باشد هم چنین بهینه کردن روش پی – سی – آر.اس – اس – سی - پی (PCR-SSCP) به عنوان یک روش توانمند آسان و کم هزینه برای اهداف صنعتی و کاربرد آن در طرح های اصلاح نژاد گوسفند ماکویی می باشد.

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- ترکیبات عمده شیر

شیر مخلوط پیچیده و غیر یکنواختی از لیپیدها، کربوهیدرات ها، پروتئین ها و بسیاری دیگر از ترکیبات آلی و نمک های معدنی محلول یا معلق در آب است. کمیت و کیفیت بسیاری از ترکیبات شیر در بین گونه های مختلف و حتی در میان افراد یک گونه با یکدیگر فرق دارد. اکثر مطالعات انجام شده بر روی شیر به ترکیباتی چون پروتئین (غالبا کازئین و پروتئین های محلول در سرم شیر یا پروتئین های آب پنیر)، چربی، لاکتوز و مواد معدنی اختصاص داشته است (۱۱).

شیر گوسفند در مقایسه با شیر گاومیش آبی ،گاو کوهاندار و نیز از شیر گاو، چربی و پروتئین بیشتری دارد. در سال ۱۹۷۹ گفته شد که اکثر پستانداران نشخوارکننده وحشی، شیر غنی تری به ویژه در انتهای دوره شیر دهی تولید می کنند. وی همچنین بنابر نتایج حاصل از مطالعات بر روی گاو اهلی (حداقل تحت شرایط آب و هوایی معتدل) بر این عقیده است که ظرفیت تولید بالای شیر با کاهش غلظت آن همراه است مدارکی نیز دال بر تایید این موضوع در مورد گوسفند و بز وحشی وجود دارد(۲۳) .

۱-۲- پروتئین ها

به طور متوسط شیر گوسفند حاوی ۴- ۳/۵ ٪ پروتئین است. کازئین، گلبولین و آلبومین مهم ترین مشتقات پروتئین شیر محسوب می شوند و بیش از ۹۰٪ پروتئین های موجود در شیر را تشکیل می دهند. پیش ماده این پروتئین ها اسیدهای آمینه آزاد موجود در خون می باشد، در صورتی که به نظر می رسد گروه دیگری از پروتئین های شیر شامل ایمونوگلوبولین ها و آلبومین سرم خون از پروتئین های خون هستند نیز وجود دارند که از خون وارد سلول های پستانی شده و بدون تغییر در شیر ظاهر می شوند ، به عبارت دیگر این پروتئین ها در سلول های ترشحی پستان از اسیدهای آمینه سنتز نمی شوند، بلکه با همان ماهیت پروتئینی از خون گرفته می شوند. دانش مربوط به عناصر تنظیم کننده سنتز و ترشح شیر و ژن های درگیر در سنتز پروتئین شیر از اهمیت زیادی برای بهبود ژنتیکی در برنامه های اصلاح نژادی برخوردار هستند (۳۵).

در سال ۱۸۷۷ میلادی Hammarsten سه نوع پروتئین شامل کازئین، لاکتالبومین و لاکتوگلبولین در شیر را تشخیص داد. در سال ۱۹۳۹ میلادی Pedersen مشتقات کازئین را توسط اولترا سانتریفوژمشخص کرد. در همان سال Mellander با استفاده از الکتروفورز توانست چهار جزء

تشکیل دهنده کازئین را شامل آلفا کازئین، بتا کازئین، گاما کازئین و کاپا کازئین جدا نماید (به نقل از۶).

۱-۲-۱- انواع پروتئین های شیر

با وجود اختلافات کمی و کیفی پروتئین های شیر در گونه های مختلف، در تمام پستانداران پروتئین های شیر به دو گروه عمده تقسیم می شوند که بستگی به رفتار آنها در pH =۶/۴ دارد. بخش محلول، پروتئین های آب پنیر نامیده می شود و بخش نامحلول، کازئین ها هستند که با تعداد متفاوت گروه های فسفات از هم تفکیک داده می شوند (۲۱). حدود ۸۰٪ از پروتئین شیر را کازئین (۸/۲ درصد از کل پروتئین) و ۲۰٪ از آن را پروتئین های محلول در آب تشکیل می دهند. مقدار ناچیزی از پروتئین شیر را پپتوزها، پروتئوزها، اسیدهای آمینه آزاد و مواد ازته غیر پروتئینی تشکیل می دهند. پروتئین های محلول در آب شامل β لاکتوگلوبولین، α لاکتالبومین، لاکتوفرین ایمنوگلوبولین ها و برخی از آنزیم ها هستند (۱۴).

کازئین ها دارای انواع αs1، αs2، β، γ، κ می باشند، این پروتئین ها گروهی از فسفولیپیدهای اسیدی بوده و در شیر چربی گرفته و در pH = ۶/۴ و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ته نشین می شوند. کازئین ها به شکل ترکیب با کلسیم فسفات و تحت عنوان میسل در شیر وجود دارند و از نظر حساسیت به کلسیم به گروه های حساس به کلسیم شامل αs1، αs2، β کازئین که در محلول با غلظت کم کلسیم رسوب می کنند و κ-Casein که قادر است دامنه گسترده ای از غلظت های کلسیم را تحمل کند، تقسیم می شوند(۱۴).

۱-۲-۲- عوامل موثر بر ترکیبات پروتئین شیر

وجود یک سری عوامل طبیعی نظیر نژاد، مرحله شیردهی، عفونت پستان، فصل، تغذیه، سن و روند شیر دوشی بر روی ترکیبات شیر تاثیر دارند. اگر دام مبتلا به ورم پستان شود آلبومین و گلبولین در شیر آن افزایش خواهد یافت. چنانچه دام از جیره غذایی پر انرژی و سرشار از اوره ایزوله شده تغذیه کند در این صورت میزان پروتئین موجود در شیر افزایش می یابد و جیره غذایی کم انرژی، کاهش پروتئین شیر را در پی خواهد داشت (۱۱).

در هنگام نگهداری شیر و تبدیل آن به سایر فرآورده ها با استفاده از روش های نگهداری و تبدیل، میزان پروتئین کل افزایش می یابد اما در مشتقات پروتئین یعنی کازئین و پروتئین های آب پنیر (محلول) تغییری حاصل نمی شود اما در پنیر سازی میزان غلظت کازئین (بصورت کمپلکس پارا کاپا – کازئین) در دلمه (لخته) افزایش می یابد و پروتئین محلول در آب وارد آب پنیر می شود ولی

چنانچه از شیر استریلیزه در پنیر سازی استفاده شود میزان قابل ملاحظه ای پروتئین محلول در آب در لخته باقی می ماند و فقط مقدار ناچیزی از ترکیبات ازتی وارد آب پنیر خواهد شد (۶).

۱-۳- مشتقات اصلی کازئین شیر

۱-۳-۱- آلفا اس یک کازئین (αs1–casein)

آلفا اس یک کازئین ۳۵٪ از کل کمپلکس کازئین را تشکیل می دهد. اندیس S یعنی در مقابل نمک های کلسیم حساس بوده و سریع منعقد می شود. عدد یک یعنی در اجزا آن مقدار ناچیزی ترکیبات غیرپروتئینی مانند گلوکز یا لاکتوز وجود دارد. آلفا اس یک کازئین از ۱۹۹ اسید آمینه تشکیل شده است، جرم مولکولی آن ۲۳۶۰۰ دالتون بوده و ساختار شیمیایی اش حاوی ۸ عامل فسفری است که ۷ عامل فسفر آن با اسیدهای آمینه شماره ۴۳ تا ۸۰ ترکیب شده است (۱۴).

۱-۳-۲- آلفا اس دو کازئین (αs2 –casein)

جرم مولکولی این کازئین ۲۵۲۰۰ دالتون بوده و حاوی ۲۰۷ اسید آمینه است .آلفا اس دو کازئین سرشار از فسفر بوده و در مقابل یون کلسیم (در هنگام حرارت دادن و سرد کردن شیر) رسوب می نماید (۱۴).

۱-۳-۳- کاپاکازئین (κ-casein)

کاپا کازئین از ۱۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و جرم مولکولی آن ۱۹۰۰۰ دالتون است. عوامل احیا کننده فقط بر روی منومرهای کاپاکازئین موثر می باشند. به طورمعمول کاپاکازئین به صورت تری مر یا الیگومر وجود دارد که به وسیله پل های دی سولفید با هم ترکیب شده اند. این پروتئین حاوی مقدار ناچیزی کربوهیدرات شامل ۱٪ گالاکتوز، ۱/۲٪ گالاکتوزامین، ۴/۲ ٪ ان- استیل نورامین اسید (N-Acetyl neuramin Acid) است. با استفاده ازالکتروفورز، کاپاکازئین را تجزیه کرده و اسیدهای آمینه مختلفی که با کربوهیدراتها ترکیب شده است را مشخص می نمایند. منومرهای کازئین به صورت پلی مر با کلسیم کمپلکس ایجاد کرده، توسط میسل های کازئین احاطه می شود (۱۴).

کاپا کازئین مهمترین کازئین شیر است و در حضور یون کلسیم محلول در شیر بسیار حساس می باشد . مشتقاتی از کازئین که توسط یون کلسیم می تواند رسوب کند (آلفا اس یک کازئین و بتا کازئین) بوده که با کلسیم تشکیل کمکپلکس می دهد و از کواگولاسیون آنها جلوگیری می کند. یکی از خصوصیات اصلی کاپاکازئین تشکیل یک کمپلکس کازئین مقاوم است که مقاومت خاصی به میسل های کازئین می بخشد. کاپاکازئین در سطح میسل تمرکز یافته است .فسفات کلوئیدی که سبب

اتصال ساختارهای فرعی با یکدیگر می شود خود به گروههای استری فسفات αs1، αs2 و β کازئین متصل شده است (با کاپا کازئین اتصالی ندارد) . ساختارهای فرعی واجد میزان پایین کاپاکازئین در داخل میسل و انواع دارای مقادیر بالای آن در سطح میسل مستقر شده اند این امر از رشد نامحدود میسل ها جلوگیری به عمل می آورد. ترکیبات منومرها و میسل های کازئین بستگی به نژاد، تغذیه دام، دوران شیردهی دام و اندازه میسل دارد (۱۴).

منومرهای کاپاکازئین توسط عواملی به یکدیگر متصل می شوند این عوامل عبارتند از:

۱- ترکیبات هیدروفوب (آب گریز)

۲- ترکیبات الکترواستاتیکی به خصوص ترکیب با پل های کلسیم یا فسفات کلسیم ما بین ترکیبات فسفولیزین و گلوتامیک اسید و ترکیب پپتید با پل کلسیم

۳- پل های هیدروژنی

کاپا کازئین فاکتور اصلی پایداری حالت کلوئیدی کازئین بوده و اگر چه از لحاظ مقدار یکی از اجزا کوچک تشکیل دهنده میسل هاست اما عامل اصلی پایداری ساختمان آنها محسوب می شود. همینطور این پروتئین در کیفیت پنیر تولید شده، سرعت لخته شدن شیر و همینطور راندمان تبدیل شیر به پنیر اهمیت به سزایی دارد (۱۴).

۱-۳-۴- بتا کازئین (β - casein)

جرم مولکولی این پروتئین ۲۴۵۰۰ دالتون و از ۲۰۹ اسید آمینه تشکیل شده است تعداد فسفرهای ترکیب شده در ساختار بتا کازئین ۴۵ عدد است که با اسید آمینه ۱ تا ۴۰ ترکیب شده است این کازئین در مقابل یون کلسیم و به حرارت معمولی حساس بوده و سریع رسوب می کند (۱۴).

۱-۳-۵ - گاما کازئین (γ–casein)

گاماکازئین از پروتئولیز (هیدرولیز) بتا کازئین موجود در شیر به وجود می آید. گاما کازئین از تجزیه اسید های آمینه ۲۸-۱ بتا کازئین به وجود می آید. گاما کازئین به عنوان یک کازئین مستقل محسوب نمی شود (۱۴).

البته به غیر از αs1، αs2،β و κ کازئین، کازئین های دیگری نیز وجود دارد که از نظر ساختمانی با یکدیگر متفاوتند . به علاوه در سال ۱۹۸۱ نیز تعدادی از مشتقات کازئین به این مجموعه اضافه شده است اجزایی چون γ، S، TS و R کازئین که به طور طبیعی از β کازئین مشتق شده ولی کمتر مورد توجه قرار گرفته اند (۳۰).

۱-۴- چند شکلی پروتئین های شیر

پلی مورفیسم یا چندشکلی پروتئین های شیر، به واسطه ارتباط آنها با صفات تولیدی نظیر ترکیبات شیر و کیفیت آن امروزه مورد توجه پژوهشگران اصلاح نژاد دام قرار گرفته است. چند شکلی مشاهده شده در پروتئین های شیر نتیجه جهش هایی است که توالی نوکلئوتیدی ژن های ویژه ای را تغییر می دهد و باعث اختلاف در بیان اسیدآمینه های پروتئین شیر می گردد (۴۵). چند شکلی های پروتئین شیر به وسیله جایگزینی یک اسید آمینه و یا حذف تعدادی از آنها ایجاد می شود. در سطح دی- ان- ا ،چند شکلی ها به علت موتاسیون های نقطه ای و یا پدیده نوترکیبی اتفاق می افتد. در مورد موتاسیون های نقطه ای برای مثال تفاوت های بین دو حیوان با استفاده از آنزیم های محدود کننده که مولکول دی- ان- ا، را تنها در یک توالی خاص برش می دهند تعیین می گردد. آلل های مختلف بر روی ژل الکتروفورز و با وجود باندهای با اندازه های مختلف مشاهده می گردند. در مواردی که جهش نقطه ای به وسیله آنزیم های محدود کننده شناسایی نشوند، آغازگرهای اختصاصی آلل برای واریانت های مختلف طراحی شده و با انجام پی- سی - آر های مستقل برای هر واریانت با استفاده از آغازگر دوم مشترک، ناحیه ای که جهش اتفاق افتاده است تکثیر می گردد (۴۵).

۱-۵- تحقیقات انجام گرفته در مورد ژن کاپا کازئین

تا کنون با استفاده از روش های مولکولی اعم از پی - سی- آر- آر – اف – ال - پی ، پی - سی- آر- اس – اس – سی - پی و تعیین توالی نوکلئوتیدی تحقیقات فراوانی به منظور بررسی، شناسایی و تعیین آلل های کاپا کازئین در حیوانات مختلف انجام شده است. پروتئین های شیر شامل دو گروه کازئین ها و پروتئین های آب پنیر می باشند که در تمام گونه های پستانداران بیشترین هتروزیگوسیتی در کازئین ها نسبت به پروتئین های آب پنیر مشاهده شده است (۱۹ و ۴۳).

مدارک بسیاری وجود فراوانی جهش و در نتیجه داشتن چند شکلی آللی بالا در تمام ژن های موجود در جایگاه ژنی کازئین و از جمله کاپا کازئین قابل احتمال است. در سال ۱۹۹۸ با مطالعه ای که بر روی ژن کاپا کازئین در گاو انجام دادند واریانت های A, B, C, E این ژن را با استفاده از روش پی – سی – آر.اس – اس – سی - پی تعیین نمود (۲۶). در سال ۲۰۰۶ ، فراوانی آللی ژن کاپا کازئین را در گاوهای نژادهای آمیخته هندی با استفاده از روش پی – سی – آر.آر – اف – ال - پی بررسی نمودند. طی این مطالعه مشخص شد آلل B دارای اثر معنی داری بر روی پروتئین شیر می باشد (۵۱). مطابق با گزارش سال ۱۹۸۶ ، آلل B در گاوهای جرزی سبب تولید پروتئین بالا و افزایش ویژگی های پنیر سازی در این نژاد است. همچنین ، تولید پنیر در گاوهایی که ژنوتیپ BB دارند نسبت به گاوهایی که ژنوتیپ AA دارند ۱۰٪ بیشتر است (۴۷).

در نژادهای هلشتاین و جرزی ارتباط آلل B با تولید پروتئین بالا گزارش شده است و همچنین مشخص شد که شیر گاوهای دارای آلل B قابلیت انعقاد بهتری نسبت به گاوهایی که آلل A دارند را دارا می باشد (۱۸). در سال ۲۰۰۵ ، با بررسی ژن کاپا کازئین در گاومیش های کلمبیا با استفاده از روش پی – سی – آر.آر – اف – ال - پی و پی – سی – آر.اس – اس – سی - پی جایگاه این ژن را در این گاومیش ها مونومورفیک نشان دادند (۴۹). در حالی که ژن کاپا کازئین را در نژادهای سیاهوال هندی ، موراه و بوفالوهای نیلی راوز تعیین ژنوتیپ کردند و فراوانیهای ژنی آلل A و B را در این بوفالوها تعیین کردند (۴۴).

در سال ۲۰۰۳ با بررسی و تحقیقی که بر روی بزهای نژاد اسپانیایی انجام شد علاوه بر واریانت های A و B دو واریانت جدید به نام G و F با استفاده از روش پی – سی – آر.اس – اس – سی - پی شناسایی شد (۵۸). در یک تحقیق که در سال ۲۰۰۳ میلادی انجام شد، به روش پی – سی – آر.آر – اف – ال - پی و با استفاده از دو جفت پرایمر، اگزون ۳ و ۴ ژن کاپا کازئین در نژادهای بز ایتالیایی از نظرجهش مورد بررسی قرار گرفت. طی این تحقیق مشخص گردید که قطعه ۲۴۲ از اگزون ۴ دارای یک جهش است که در نتیجه آن باز آلی آدنین به گوانین تبدیل شده و بیان آن باعث جایگزینی آسپارتیک اسید به جای گلایسین می شود (۲۰). در سال ۲۰۰۱ با استفاده از روش پی – سی – آر.آر – اف – ال - پی و مطالعه بر روی بز از نژادهای مختلف ایتالیایی و پرتغالی پلی مورفیسم را در ژن کاپاکازئین گزارش نمودند (۵۷).

در سال ۱۹۹۶ با بررسی ژن کاپا کازئین در نژاد Serra da estrela گوسفند جایگاه این ژن را پلی مورفیسم مشاهده کرد (۲۷). در سال ۲۰۰۰ با بررسی بر روی نژادهای گوسفند ایتالیایی Sopra vissana، Serda و Comisana با استفاده از روش پی – سی – آر.اس – اس – سی - پی و مطالعه بر روی ۱۳۸ نمونه خونی مشاهده کرد که ۱۳۷ نمونه دارای جایگاه تک شکلی هستند و تنها یک نمونه آن هم در نژاد Sopra vissana علاوه بر الگوی اصلی ژن کاپا کازئین که به نام C خوانده می شود الگوی دیگری به نام T را نیز مشاهده کرد که مربوط به جابجایی C با T در موقعیت ۴۴۳ می باشد که این ژن در گوسفند بر روی کروموزوم شماره ۴ قرار دارد (۳۱). در سال ۲۰۰۱، این ژن را با استفاده از روش پی – سی – آر.اس – اس – سی - پی بر روی ۴۰ نمونه از گوسفندان نژاد پرتغالی Churra da Terra Quente مورد مطالعه قرار داده و جایگاه این ژن را تک شکل مشاهده کردند(۲۵). چند شکلی بودن ژن کاپاکازئین در گوسفند توسط محققین مختلف اشاره شده است. در گوسفندان نژادهای Apilian Merino، Ile de France، و Altamurana دو شکلی آللی با استفاده از آنزیم های *Hind*III و *Plu*II، و یک سه شکلی آللی با استفاده از آنزیم *Pst*I مشاهده گردید (۳۴ و ۴۳). همچنین در مطالعه ای دیگر بر روی چند شکلی ژن های کازئین در

گوسفندان شیری با استفاده از پی – سی – آر.آر – اف – ال - پی ، چند شکلی در ژن کاپاکازئین گزارش گردیده است (۵۰) .

۱-۶- نشانگرها

استفاده از نشانگرها قدمتی برابر با تاریخ بشر دارد. انسان های نخستین، حتی آنهایی که هنوز کشاورزی را فرا نگرفته بودند و برای ادامهٔ زندگی مجبور به جمع‌آوری بذر و میوهٔ گیاهان بودند، بدون آنکه خود بدانند از نشانگرهای مورفولوژیک برای شناختن و تمایز انواع بذر، میوه و جانوران وحشی استفاده می‌کردند و برخی را به برخی دیگر ترجیح می‌دادند اما به صورت مدون و دانش مدار، شاید مندل نخستین کسی بود که از نشانگرهای مورفولوژیک یا نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ برای مطالعهٔ چگونگی توراث صفات در نخود فرنگی استفاده کرد (۹). به طور کلی هر صفتی که بین افراد، متفاوت باشد، ناشی از تفاوت موجود بین ردیف دی- ان- ا کروموزوم های آنها است که به نتاج نیز منتقل می‌شود. حتی صفاتی که تحت تاثیر شرایط محیط نیز به صورت متفاوت بروز می‌کنند ، بازتاب تفاوت های موجود در ردیف‌های دی- ان- ا، هستند. این تفاوت‌ها می‌توانند به عنوان نشانه یا نشانگر ژنتیکی به کار گرفته شوند. این تفاوت ها ممکن است به طرق مختلفی تظاهر یابند. برخی از این تفاوت ها در صفات قابل رویت مانند صاف یا چروکیده بودن دانهٔ نخود فرنگی در آزمایشات مندل، چسبیده و یا آزاد بودن لالهٔ گوش در انسان تجلی می‌کنند و برخی دیگر از تفاوت های موجود در ردیف دی- ان- ا، ممکن است به صورت پروتئین‌هایی با اندازه‌های مختلف تجلی کند که به روش های مختلف بیوشیمیایی قابل ثبت، رویت و مطالعه است. دسته‌ای دیگر از تفاوت های موجود در سطح دی- ان- ا، هیچ تظاهری ندارد یعنی نه صفت خاصی را کنترل می‌کنند و نه در ردیف اسیدهای آمینهٔ پروتئین‌ها تاثیری برجای می‌گذارند. این نشانگرها که تعدادشان تقریباً نامحدود است، فقط از راه تجزیه و تحلیل مستقیم دی- ان- ا، قابل ثبت هستند (۵).

در حقیقت برای آنکه صفتی به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد، باید دست کم دو ویژگی زیر را داشته باشد:

۱- در بین ۲ فرد متفاوت باشد (چند شکلی نشان دهد).

۲- به توارث برسد.

۱-۷- اهمیت نشانگرهای ژنتیکی

بهره‌مندی از علم ژنتیک و اصلاح نژاد دام بیش ترین نقش را در افزایش محصول و تولیدات فرآورده‌های غذایی به عهده داشته است، به دلیل رشد روز افزون جمعیت، تلاش بیشتری برای غلبه بر شرایط نامساعد محیطی، اعم از عوامل زیستی و غیر زیستی و افزایش کمیت و کیفیت محصول

لازم است. پیشرفت علوم و تکنولوژی موجب بهره‌مندی متخصصین اصلاح نژاد دام از ابزار دقیق آزمایشگاهی، روش های برتر جمع‌آوری اطلاعات و تجزیه و تحلیل کامپیوتری آنها گردیده است. در سال های اخیر پیشرفت های تحسین برانگیزی که در زمینهٔ زیست‌شناسی مولکولی و تکنولوژی زیستی صورت گرفته است ابزار قدرتمندی را برای مطالعات ژنتیکی جانوران فراهم آورده است و اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها نشانگرهای دی- ان- ا، می‌باشند که در حقیقت تفاوت های قابل ثبت اطلاعات ژنتیکی (ردیف های بازی دی- ان- ا) موجود بین دو یا چند نمونه می‌باشد. اطلاعات به دست آمده از نشانگرهای دی- ان- ا، امروزه استفاده‌های گسترده‌ای یافته‌اند که عمده‌ترین آنها در پزشکی، پزشکی قانونی، تشخیص والدین، تشخیص بیماری های گیاهی و جانوری، مطالعات ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح نژاد دام می‌باشد (۵۶).

۱-۸- کاربرد نشانگرهای مولکولی در اصلاح نژاد دام

در حیوانات اهلی نظیر گاو و گوسفند، هدف اصلی استفاده از نشانگرهای دی- ان- ا، ایجاد نقشه‌های پیوسته (Linkage Map) است که این نقشه‌ها در حقیقت برای تشخیص نواحی از ژنوم دی- ان- ا که صفات مهم اقتصادی را تحت تاثیر قرار می‌دهند به کار می‌رود. اکثر صفاتی که در دام انتخاب می‌شوند صفات کمی هستد (۵۶). شاخه‌ای از علم ژنتیک که نحوهٔ توارث صفات کمی را بررسی می‌کند ژنتیک کمی نام دارد و مکان های ژنی کنترل کنندهٔ این صفات جایگاه های ژنی دخیل در صفات کمی یا QTL (Quantative Trait Loci) نامیده می‌شود. به ناحیه‌ای از ژنوم که قسمتی از واریانس ژنتیکی یک صفت کمی را توجیه می‌کند، یک QTL گفته می‌شود. روش های آماری مورد استفاده برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات کمی و کیفی متفاوت هستند (۱۲).

در مرحله دوم، ژنوتیپ مولکولی (خالص مانند والد A، خالص و ناخالص مانند والد B) هریک از اجزای جمعیت در حال تفرق با استفاده از نشانگرهای مولکولی مشخص شود (تهیهٔ نقشه‌های ژئتیکی) در مرحله سوم، باید ارتباط بین هریک از نشانگرها با صفت کمی مورد نظر (نقشه‌های QTL) تعیین شود (۱۲).

دلایل اصلی استفاده از نشانگرهای مولکولی به شرح زیر می باشند (۲۹) :

۱- سرعت عمل در رسیدن به اهداف بسیار بالاست.

۲- هزینه اجرای طرح های تحقیقاتی با به کار گیری روش های مولکولی کاهش می یابد.

۳- مدت زمان لازم جهت اجرای طرح های تحقیقاتی به طور چشمگیری کاهش می یابد.

۴- استفاده از نشانگرهای مولکولی در هر مرحله ای از حیات جاندار امکان پذیر می باشد.

۵- با روش های مولکولی می توان ژنوتیپ افراد را در حداقل زمان تشخیص داد.

۱-۹- گزینش به کمک نشانگرها

برای اولین بار در اوایل قرن بیستم از ویژگی چند شکلی ژنها به منظور آسان‌سازی برنامه‌های اصلاحی استفاده شد. ژن هایی که بر اساس توارث سادهٔ مندلی به ارث می‌رسند می‌توانند به عنوان نشانگر برای تفکیک ژن های موثر بر صفات کمی به کار گرفته شوند به ویژه اگر وراثت‌پذیری صفت کم باشد تکنیک گزینش به کمک نشانگر یا MAS (Marker Assisted Selection) موثرتر خواهد بود. از طرف دیگر با استفاده از گزینش به کمک نشانگرها می‌توان فراوانی آلل خاصی از یک ژن را از یک لاین به لاین دیگر افزایش داد. هنگامی که از این تکنیک در برنامه‌های اصلاح نژاد دام استفاده می‌کنیم پاسخ به انتخاب بسیار بالاتر از موقعی است که از روی فنوتیپ انتخاب می‌کنیم این تکنیک ابزار مناسبی برای افزایش صحت (Accuracy) گزینش است و علاوه بر آن باعث کاهش فاصله نسلی می‌گردد (۵۶).

۱-۱۰- تعیین سودمندی نشانگرها

اطلاعاتی که از یک نشانگر مولکولی به دست می‌آید از طریق میزان ناخالصی (Heterozygosity) ظرفیت اطلاعات چند شکلی (Polymorphism information content)و خطای ژنوتیپی مشخص می‌شود خطای ژنوتیپی تحت تاثیر میزان تکرارپذیری نشانگر است (۹).

در کل مهمترین خصوصیات یک نشانگر خوب عبارت است از:

- تشخیص آسان همه فنوتیپ های ممکن (هتروزیگوت و هموزیگوت)
- تظاهر در مراحل اولیه یک گیاه یا دام
- آسان بودن اندازه گیری
- پیوستگی بسیار نزدیک با ژنهای مورد نظر
- توارث پذیری کامل
- نداشتن تاثیر بر روی دیگر آلل های موجود در مکان های ژنی (نداشتن اپیستازی) (۱).

۱-۱۱- اهمیت مطالعه گوسفند

گوسفند یکی از مهمترین دام های اهلی است که هنوز تحقیقات زیادی روی آن انجام می گیرد. بیوشیمی و فیزیولوژی در این گونه نسبت به سایر گونه‌ها با جزئیات بیشتر و یا حداقل مشابه موش سوری و موش صحرایی مورد مطالعه قرار گرفته است. به خاطر اهمیت زیاد این دام در کشورهایی نظیر استرالیا، زلاندنو، قسمتهایی از ایالات متحدهٔ آمریکا و بریتانیا مطالعات ژنتیکی در این

کشورها انجام گرفته است. گوسفند دامی است که با شرایط مختلف اقلیمی به راحتی سازش یافته است و از این رو برای بهره برداری از منابع طبیعی آب و هوایی ، زمین و پوشش گیاهی متفاوت بسیار دام مناسبی می باشد. قابلیت تحمل کم غذایی و مصرف علوفهٔ نه چندان مرغوب و از همه مهمتر امکان برگشت سریع سرمایه و تولید فرآورده‌های فرعی از جمله چرم، روده، کود، لانولین، پشم و ... باعث شده است تا این دام از اهمیت اقتصادی بسزایی برخوردار باشد (۱۰). از آنجائیکه در ایران ، گوشت گوسفند برای ذائقه ایرانیان سازگار بوده، گوسفندداری بیشتر به سمت تولید گوشت سوق یافته است و سایر فرآورده‌های آن در درجهٔ دوم اهمیت قرار گرفته است. (۱۲).

۱-۱۲- رده‌بندی گوسفنداز لحاظ جانورشناسی

گونهٔ گوسفند اهلی اویس ائریس(Ovis Eris) به جنس گوسفند اویس(Ovis) و زیر خانوادهٔ کاپرینه (Caprinae) و به خانوادهٔ شاخداران (Bovidae) و زیر راستهٔ نشخوارکنندگان (Ruminanta) و راستهٔ زوج سمان (Artiodactyl) و زیر ردهٔ جفت‌داران (placentalia) و به ردهٔ پستانداران (Mammalia) و به شاخهٔ مهره‌داران (Vertebrata) در سلسلهٔ جانوری تعلق دارد (۱۳).

۱-۱۳- ژنوم گوسفند

تعداد کروموزومهای دیپلوئید در گوسفند اهلی ۵۴ عدد می‌باشد. و از این تعداد ۲۶ جفت (۵۲ عدد) اتوزومی بوده و ۲ تای دیگر کروموزومهای جنسی می‌باشند. کروموزومهای اتوزرمی گوسفند تلوسانتریک هستند (به استثنای کروموزومهای ۱، ۲ و ۳ که متاسانتریک می‌باشند). کرموزوم X بزرگترین کروموزوم متاسانتریک می‌باشد. در حالی که کروموزوم Y یک کروموزوم متاسانتریک خیلی کوچک بوده و شبیه مربعی کوچک می‌باشد. کروموزم X به علت داشتن بازوهای کوچک کوتاه قابل تشخیص می‌باشد ولی اتوزومهای تلوسانتریک بدون به کارگیری روشهای مختلف رنگ‌آمیزی قابل تشخیص نیستند. در سال ۱۹۹۵ یک کاریوتیپ G- banding استاندارد در نهمین انجمن سیتوژنتیک و نقشه‌یابی ژنتیکی آمریکای شمالی به تصویب رسیده است(۳۳).

۱-۱۴- اهمیت گوسفنداز نظر تولید شیر

تولید شیر یکی از مسائل اساسی در فعالیت های گوسفند داری است و امروزه نه تنها در بسیاری از نقاط دنیا میش مانند ماده گاو نقش مهمی را از نظر تولیدات شیر ایفا می نماید که در این میان گوسفند ماکویی به همراه گوسفندان لری و مهربان جزء گوسفندان شیروار ایران محسوب می شوند از شیر گوسفند ماکویی پنیر معروف لیقوان تهیه می شود(۸).

۱-۱۵- گوسفندان ایران

گوسفندان ایران علاوه بر آنکه از نظر کیفیت پشم در ردیف گوسفندان با پشم ضخیم قرار دارند، همگی به استثنای نژاد زل (که بدون دنبه و یا دارای نیم دنبه است) و نژاد قره‌گل (که دارای نیم دنبه است) از جمله گوسفندان دنبه‌دار می‌باشند و به رنگ‌های مختلف سفید، سیاه، خرمایی قهوه‌ای نخودی، خاکستری و غیره دیده می‌شوند (۱۲).

۱-۱۶- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction)

واکنش زنجیره های پلیمراز روشی برای تکثیر اختصاصی قطعات دی- ان- ا، است که نخستین بار در سال ۱۹۸۵ (۴۶) به کار گرفته شد. در این روش قطعه ای از دی- ان- ا، را به طور انتخابی با به کارگیری دو آغازگر اولیگونوکلئوتیدی و آنزیم پلیمراز تک می توان تا دهها هزار برابر تکثیر کرد. هر یک از این دو پرایمر به رشته های مخالف شان در روی دی- ان- ا، هدف متصل شده و مکان آنها به گونه ای است که سنتز زنجیره دی- ان- ا، توسط آنزیم پلی مراز تنها در میان دو آغازگر انجام می گیرد (۱۶). از آنجا که زنجیره های تازه ساخته شده خود مکمل آغازگرها است، این چرخه می تواند پس از یک مرحله واسرشته شدن زنجیره های دی- ان- ا، از هم تکرار شود. قابلیت پی - سی- آر در ازدیاد اسیدهای نوکلئیک موجود در نمونه مورد آزمایش موجب شناسایی سریع و اختصاصی نوع سلول یا میکروارگانیسم مورد نظر در نمونه مذکور می گردد که این ویژگی علاوه بر بکارگیری پی - سی- آر در تشخیص آزمایشگاهی بیماری ها و شناسایی انواع سلول ها، آنرا به عنوان ابزاری مطمئن و حساس در زمینه پژوهش های علمی مطرح می سازد. امروزه روش پی - سی- آر جایگاه بسیار مهمی را در جنبه های مختلف مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، میکروب شناسی تشخیصی، تشخیص سرطان و بیماریهای ژنتیک، تشخیص هویت، جرم شناسی (پزشکی قانونی جهت تشخیص منشا نمونه اسپرم،خون و غیره) تعیین ترادف، باستان شناسی، مطالعات تکاملی موجودات و غیره پیدا کرده است (۱۶) .

۱-۱۶-۱- مکانیسم پی - سی- آر

همانطور که می دانیم دی- ان- ا، یک مولکول مارپیچی دو رشته ای پلی نوکلئوتیدی است که این دو رشته در جهت مقابل هم قرار گرفته اند و به وسیله پیوندهای هیدروژنی میان بازهای آلی مکمل به یکدیگر متصل هستند (سیتوزین بوسیله سه پیوند هیدروژنی به گوانین و آدنین بوسیله دو پیوند هیدروژنی به تیمین اتصال پیدا می کنند). دی- ان- ا، دو رشته ای می تواند به وسیله حرارت (حدود ۹۴ درجه سانتیگراد) از هم جدا شده و دو مولکول دی- ان- ا، تک رشته ای ایجاد کند که