AF 181

تعیین فراوانی آللهای A و B ژن کاپا-کازئین در نژاد سرابی به روش ARMS/PCR

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۵، تابستان ۱۳۷۶

مقدمه

حدود ۴۰۰۰ گونه پستاندار در جهان وجود دارد، که شیر هر کدام از آنها دارای یکسری ویژگیها می‌باشد ۵ الی ۶ نوع شیر این پستانداران مورد استفاده انسان است و در کل فقط شیر گاو به عنوان منبع اصلی تغذیه انسان مطرح است (۷). پروتئینهای شیر از اهمیت و ارزش غذایی خاصی برخوردار هستند و تلاش زیادی برای بالا بردن تولید آنها بکار رفته و می‌رود، پروتئیهای شیر به دو نوع مشخص کازئین‌ها و پروتئینهای آب پنیر [1] تقسیم می‌شود. کازئین‌های بیش از ۸۰٪ پروتئین شیر را تشکیل می‌دهند. کازئین‌ها شیر به پنج گروه اصلی کازئین‌های آلفا S1، آلفا S2، بتا، کاپا و گاما تقسیم می‌شوند که برخی از مشخصات و خصوصیات کازئین‌ها در جدول شماره ۱ ذکر شده است (۳).

کازئین - گاما در بین کازئین‌های اشاره شد، در اثر ژنهای سلولهای ترشحی پستان به طور مستقیم ایجاد نمی‌شود و از هیدرولیز کازئین - بتا ناشی می‌شود. پروتئینهای آب پنیر محلول در آب شامل دو ژن بتا - لاکتوگلوبولین و آلفا-لاکتوآلبومین و مقدار کمی از پروتئین خون، سرم آلبومین وایمینو گلوبولین را شامل می‌شود (۸ و ۳). میسل‌های کازئین ذرات کروی هستند، که از الحاق کازئین‌های آلفا S1، آلفا S2، بتا و کاپا متصل به فسفات تری کلسیک کلوئیدی تشکیل یافته‌اند (۲). پروتئین کاپا-کازئین شیر گاو دارای ۱۶۹ اسید آمینه با وزن مولکولی حدود ۱۹ کیلو دالتون می‌باشد (۸ و ۳). توالی اولیه ساختمانی این پروتئین با روش‌های مختلفی از قبیل توالی‌یابی از پروتئین، بررسی مولکولی به روش cDNA و DNA ژنومیک تعیین گردیده است (۴ و ۱۱) وظایف اصلی پروتئین ساختمان کاپا - کازئین داشتن اثر متضاد با کازئین حساس به کلسیم، داشتن یک توالی مشخص اختصاصی جهت تشخیص آنزیم رنین برای عمل پروتئولیز خود می‌باشد و همچنین دارای یک قسمت حساس به کلسیم می‌باشد (۸).

ثبات و استحکام دلمه شدن و ساختمان پنیر به طور مستقیم بوسیله غلظت کازئین تحت تاثیر واقع می‌شود (۹) محققین زیادی انواع آلل‌های کاپا - کازئین را در طی تولید پنیر مورد توجه قرار داده‌اند، نوع BB و AB کاپا-کازئین باعث کوتاهتر شدن زمان، بالا رفتن ثبات و استحکام دلمه شدن نسبت به نوع AA کاپا-کازئین می‌گردد. Schaar (۱۹۸۴) پی برد که کاپا-کازئین نوع B زمان بریده شدن مایع پنیر را به میزان ۳۰٪ نسبت به نوع A کاهش می‌دهد (۱۳). مطالعات متعدد اثبات کرده، که اثر پلی‌مورفیسم ژنتیکی در پروتئین شیر روی خواص انعقادی شیر موثر است. همچنین روی بازده پنیر و ترکیبات آن اثر نموده و روی کمیت تولید مؤثر است. در تولید پنیر Parmesan در شیر حاوی کاپا-کازئین نوع B نسبت به کاپا-کازئین نوع A باعث بالا رفتن راندمان به میزان ۸٪ می‌شود (۹).

ژن کاپا-کازئین حدود ۱۳ کیلو جفت باز طول و دارای ۵ اگزون [2] و بزرگترین آن مربوط به اگزون چهار می‌باشد (۴) و تفاوت انواع آلل‌های شناخته شده در ساختار مولکولی این اگزون نهفته است این ژن به همراه دیگر کازئین‌ها حدود ۲۰۰ کیلو جفت باز را روی کرموزوم شماره ۶ اشغال می‌نماید (۶) و در نهایت این ژن پروتئینی را با ۱۶۹ اسید آمینه رمزدهی می‌کند، که ۱۶۰ اسید آمینه آن مربوط به اگزون چهار می‌باشد.

اختلاف کاپا-کازئین نوع A از نوع B ناشی از جابجایی اسید آمینه ترئونین با ایزولوسین در محل توالی ۱۳۶ اسیدآمینه و آسپارتیک اسید با آلانین در محل توالی ۱۴۸ گزارش شده است (۱۰). جهش‌های نقطه‌ای نوکلئوتیدی آنها به ترتیب در موقعیت ۱۰۹۰۸ (C → T) و (A → C) ۱۰۹۴۴ است (۳).

یکی از روشهای که می‌تواند کمک شایانی در شناسائی انواع آلل‌ها در سطح مولکولی نماید ابداع روش بسیار مهم با نام اختصاری PCR به مفهوم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که توسط کری مولیس ابداع و در سال ۱۹۹۳ به خاطر انجام فعالیت‌های در این زمینه برنده جایز نوبل گردید (۱) از این رو حساسیت فوق‌العاده PCR برای نخستین بار فرصتی را فراهم کرده تا بتوان از مقادیر بسیار اندک DNA که به هیچ یک از روش‌های موجود دیگر قابل بررسی و مطالعه نیست مقادیر لازم و کافی از DNA را به دست آورد و در نتیجه مورد مطالعه دقیق مولکولی قرار داد.

مواد و روشها

نحوه خون‌گیری

نمونه‌های خون از ایستگاههای حکیمیه، سراب، شبستر و نمونه اسپرم از مرکز اصلاح نژاد و بهبود شیر جمع‌آوری گردید.

معمولاً خونگیری از ورید دمی و ورید وداجی گردن بوسیله لوله‌های خلا و سرنگ معمولی گرفته شد. از هر نمونه حدود ۵ میلی‌لیتر خون، در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA [3] ریخته شده و نمونه‌های خون تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌سانتیگراد نگهداری گردیده‌اند.

تخلیص DNA

در این آزمایش تخلیص DNA بر روی سلولهای اسپرم و گلبولهای سفید خون از روشهای فنل کلروفرم و جوشاندن استفاده گردید.

روش جوشاندن

ابتدا ۰/۵ سی سی خون در تیوبهای ۱/۵ میلی‌لیتر که فاقد هر گونه آلودگی می‌باشد ریخته و به میزان یک میلی لیتر بافر R (۱۰ mM تریس ۷/۵ = pH، mM ۰/۳۲ ساکاروز، ۱۰ mM کلرید منیزیم و ۱٪ تریتون X ۱۰۰ [4]) اضافه و خوب آن را مخلوط و به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ g سانتریفوژ می‌کنیم سپس محلول روئی دور ریخته و مراحل را آنقدر ادامه می‌دهیم تا رسوب سفید رنگ شود سپس صد میکرولیتر محلول (۵۰ mM هیدروکسید سدیم) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش قرار داده می‌شود، تا گلبولهای سفید لیز شوند بعد از آن ۲۰ میکرولیتر محلول (۱ mM بازتریس pH = ۷/۵) اضافه و بعد از سانتریفوژ کردن به مدت ۳۰ ثانیه در ۱۰۰۰ g، محلول روئی را در تیوب جدید منتقل و تا زمان انجام آزمایشها در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

تخلیص DNA به روش فنل - کلروفرم

ابتدا گلبولهای قرمز توسط بافر R لیز شده و گلبولهای سفید رسوب داده می‌شود. سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده (۱۰ mM بازتریس، ۲۰ mM EDTA ۸ = pH و ۲۰ mM کلرید سدیم، ۰/۰۲ SDS [5]) اضافه و در بن ماری ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت یا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به طول یک شب قرارداده تا عمل هضم سلولی بخوبی صورت گیرد. در مرحله بعدی مقدار ۵۰۰ میکرولیتر فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵: ۲۴: ۱ به آن اضافه نموده و با سرعت ۱۳۰۰۰ g به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ و فاز آبی را به تیوب جدید منتقل و سپس کلرو فرم وایزوامیل الکل به نسبت ۲۴:۱ به آن اضافه و دوباره سانتریفوژ نموده و فاز آبی را به تیوب جدید منتقل کرده و دو برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه نموده به آرامی مخلوط کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۱۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. جهت شستشوی رسوب مقدار اتانول ۷۰٪ به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر اضافه گردیده و با دور ۱۳۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ صورت گرفت بعد از خشک شدن رسوب DNA مقدار ۱۰۰ میکرولیتر TE [6] (۱ mM EDTA ۸ =pH، ۱۰ mM بازتریس pH= ۷/۶) جهت حل شدن آن اضافه گردید و سپس نمونه‌ها در ۲۰- درجه سانتیگراد به منظور بررسی مولکولی نگهداری شدند.

● **اسدا...آقائی**، دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی (ژنتیک و اصلاح نژاد دام)
● **سیروس زینلی**، عضو هیأت علمی‌انستیتو پاستورایران. Ph.D درژنتیک انسانی
● **جواد توکلیان**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور وابسته به وزارت جهاد سازندگی .Ph.D اصلاح نژاد و بیوتکنولوژی
● **علی اکبر محمدی**، عضوهیأت علمی مؤسسه‌تحقیقات واکسن وسرم‌سازی رازی‌وابسته‌به وزارت‌جهادسازندگی .Ph.D در میکروبیولوژی با گرایش مهندسی ژنتیک
● **مجیداسماعیل‌زاده**، دانشجوی‌کارشناسی‌ارشدعلوم‌دامی (ژنتیک واصلاح‌نژاد)

چکیده

گاوهای دارای آلل نوع B ژن کاپا -کازئین باعث بالا رفتن راندمان تبدیل شیر به پنیر به میزان ۴ تا ۸٪ می‌گردد. در این تحقیق به روشهای ملکولی اقدام به شناسایی آلل A و B ژن کاپا -کازئین گاو سرابی شد. برای تعیین ژنوتیپ گاوها به روش ARMS/PCR (Amplification Refractory Mutation System) ابتدا آغازگرهای اختصاصی با چند برنامه کامپیوتری برای روش ARMS طراحی و سپس آغازگرهای ساخته شده بر روی DNA خالص شده از خون یا اسپرم نمونه‌های مورد آزمایش مطالعه و محصول PCR بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفتند. در جامعه نمونه‌برداری شده فروانی آلل A و B برای نژاد سرابی به ترتیب ۰/۶ و ۰/۴ به دست آمد.

طراحی آغازگرها[7]

برای موفقیت و دقیق بودن یک PCR طراحی آغازگرها از ویژگی‌های خاصی بر خوردار می‌باشد، به‌عنوان مثال در روش ARMS انتخاب طول آغازگرها از ویژگیهایی مهم می‌باشد. که با دقت و بسته به نیاز طراحی می‌گردد.

از آغازگرهای ARMS با طول ۲۰ نوکلئوتیدی نیز می‌توان نتیجه گرفت، ولی بهتر است درازای آغازگر به حدود ۳۰ نوکلئوتید افزایش یابد، تا از اتصالات غیراختصاصی آغازگر به قسمت مختلف DNA جلوگیری گردد، و باعث افزایش اختصاصی عمل کردن آغازگر شود (۱۳ و ۱۰). ناپایداری سازی[8] آغازگر، آلل اختصاصی به طور عمده یک ناجور جفت‌شدگی در فاصله چهارمین نوکلئوتیدی انتهای ´۳ آغازگر قرار داد، که باعث بهبود اختصاصی عمل کردن آغازگر می‌گردد، این در حالی است که مقدار PCR راکاهش می‌دهد. با استفاده از چندین برنامه کامپیوتری نظیر Oligo، DNAsis و Amplify آغازگر مناسب برای ARMS را طراحی و با بکارگیری برنامه‌های مذکور آغازگر مناسب جهت انجام ARMS برای موقعیت ۱۰۹۴۴ ژن کاپا-کازئین (محل آنزیم محدود کننده Hind III) طراحی گردید.

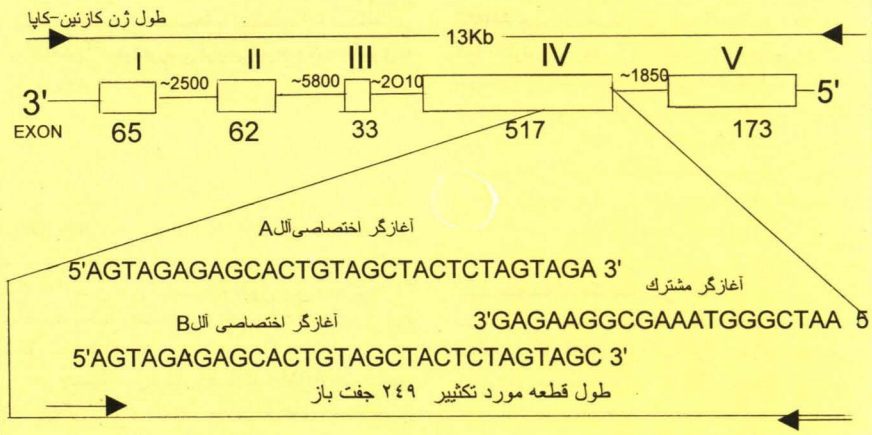
چگونگی انجام ARMS

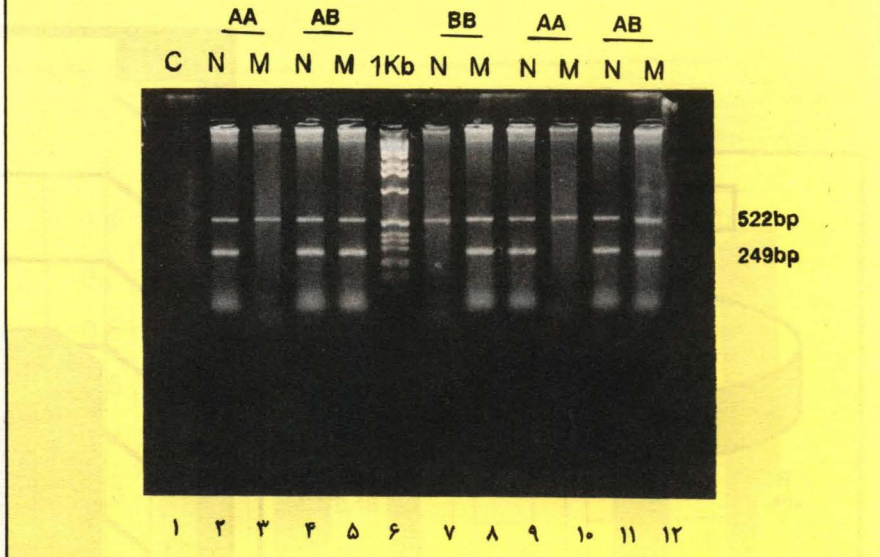
از روش ARMS/PCR برای تعیین سریع جهش‌های نقطه‌ای، حذف و اضافه شدن قطعات کوچک می‌توان استفاده نمود در این روش از دو الیگونوکلئوتید استفاده می‌شود که یک الیگونوکلئوتید مختص آلل نرمال و یک الیگونوکلئوتید مختص آلل موتان می‌باشد. بعد از انجام PCR با الیگونوکلئوتیدهای اختصاصی و الکتروفورز محصول PCR براساس اینکه کدام آغازگر توانسته است، تکثیر انجام دهد به وجود نوع آلل پی می‌بریم. به طور ساده می‌توان ARMS را این طور تشریح کرد که این روش از سه آغازگر جهش یافته، طبیعی و مشترک تشکیل شده و در هر واکنش PCR دو آغازگر طبیعی و مشترک یا جهش یافته و مشترک استفاده می‌گردد، در حالت دقیق‌تر، کنترل داخلی آغازگرها که برای ناحیه خارج از منطقه مورد نظر طراحی شده‌است جهت کنترل اطمینان از صحت واکنش و شرایط PCR و DNA ژنومی بکار گرفته می‌شود که بدین ترتیب در هر واکنش PCR دو آغازگر کنترل داخلی، یک آغازگر طبیعی یا جهش یافته و یک آغازگر مشترک استفاده می‌گردد (۱۰ و ۱۳).

واکنش PCR

برای انجام یک PCR مناسب استفاده از بعضی

شکل شماره ۱- محل تکثیر با آغازگرهای اختصاصی به روش ARMS/PCR





شکل شماره ۲- نحوه شناسائی ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی بر روی ژل آگاروز ۱/۸٪ ردیف ۱کنترل منفی که فاقد DNA ولی مواد لازم دیگر را برای تکثیر داراست. ردیف ۲ و ۳ نوع ژنوتیپ AA را نشان می‌دهد به طوری که در ردیف ۳ آلل اختصای که نوع B را مشخص می‌کند تکثیر نیافته است. ولی در ردیف ۲ آغازگر اختصاصی برای آلل نوع A تکثیر یافته است ردیف ۴ و ۵ ژنوتیپ AB، ردیف ۶ مارکر ژنتیکی 1kb، ردیف ۷ و ۸ ژنوتیپ BB و ردیف، ۹ و ۱۰ AA و ردیف ۱۱ و ۱۲ ژنوتیپ AB را نشان می‌دهد.

کتابخانه انستیتو رازی

مواد و رعایت غلظت آنها بسیار مهم است.

مواد و غلظت مناسب برای ۲۵ میکرولیتر واکنش شامل (۱۰ mM تریس pH=۸/۴، ۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۱ mM اسپر میدین، ۱/۵ mM کلرید منیزیم، ۲۰ pM از هر آغازگر، ۰/۲ mM dNTP-Mix، ۳۰۰ nM DNA)، به میزان ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR در دو میکروتیوب جدا از هم ریخته و در تیوب اول آغازگر مشترک و آغازگر طبیعی و دو آغازگر کنترل داخلی اضافه و در تیوب دوم آغازگر مشترک یا آغازگر موتان همراه با دو آغازگر کنترل داخلی اضافه و خوب مخلوط می‌کنیم، و سپس به آن آنزیم rTth[9] یا Taq[10] پلیمراز برای هر ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR، ۰/۲۵ واحد اضافه و ۳۰ میکرولیتر پارافین روی آن ریخته و در دستگاه چرخان حرارتی[11] با برنامه: (دناتوره شدن اولیه ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، دمای اتصال[12] ۶۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر[13] ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه، دمای دناتوره شدن ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر نهائی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه) با ۲۶ سیکل قرار می‌گرفت.

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز

ابتدا آگارز ۱/۸٪ با بکارگیری بافر[14] ۱ x TBE (۰/۰۹mM تریس، ۰/۰۹ mM اسید بوریک، ۰/۰۲ mM EDTA pH=۸) تهیه و به ازای هر ده میلی لیتر ژل ۰/۲ میکرولیتر اتیدیوم بروماید[15] (۱۰ mg/ml) به‌آن اضافه کرده،و در ظرف مخصوص‌حاوی شانه ریخته

جدول شماره ۱- برخی از خصوصیات کازئین‌های شیرگاو (۳).

نوع کازئین	تعداداسید آمینه	وزن‌ملکولی (دالتون)	تعداد فسفوسرین	درصد کل در میسل
آلفا S1	۱۹۹	۲۳۰۰۰	۹-۷	۳۳
آلفا S2	۲۰۷	۲۵۰۰۰	۱۳-۱۰	۱۱
بتا	۲۰۹	۲۴۰۰۰	۵	۳۳
کاپا	۱۶۹	۱۹۸۰۰	۱	۱۱
گاما	-	۱۱۶۰۰-۲۰۵۰۰	۱یا۰	۴

می‌شود. بعد از بسته شدن ژل به ازای ۷ میکرولیتر محصول PCR با دو میکرولیتر لودینگ بافر[16] (برومو فنل بلو ۰/۲۵٪، ساکاروز ۴۰٪) افزوده و مخلوط نموده سپس در چاهک‌های ژل قرار داده می‌شوند. با ولتاژ بالا حدود ۱۰۰ ولت شروع تا اینکه نمونه‌ها از چاهک خارج شود. سپس ولتاژ را به حدود ۶۰ ولت رسانیده و پس از یکساعت الکتروفورز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نور ماوراءبنفش[17] مورد بررسی قرار می‌گیرند و نتیجه گیری به عمل می‌آید.

نتایج

طراحی آغازگرها

با استفاده از برنامه‌های متعدد کامپیوتری مانند Oligo، Amplify ,DNAsis آغازگرهای ARMS برای موتاسیون موقعیت ۱۰۹۴۴ (محل آنزیم محدود کننده Hind III) طراحی گردید که طول این آغازگرها ۳۰ نوکلئوتید و طول قطعه مورد تکثیر ۲۴۹ جفت باز بود (شکل شماره ۱).

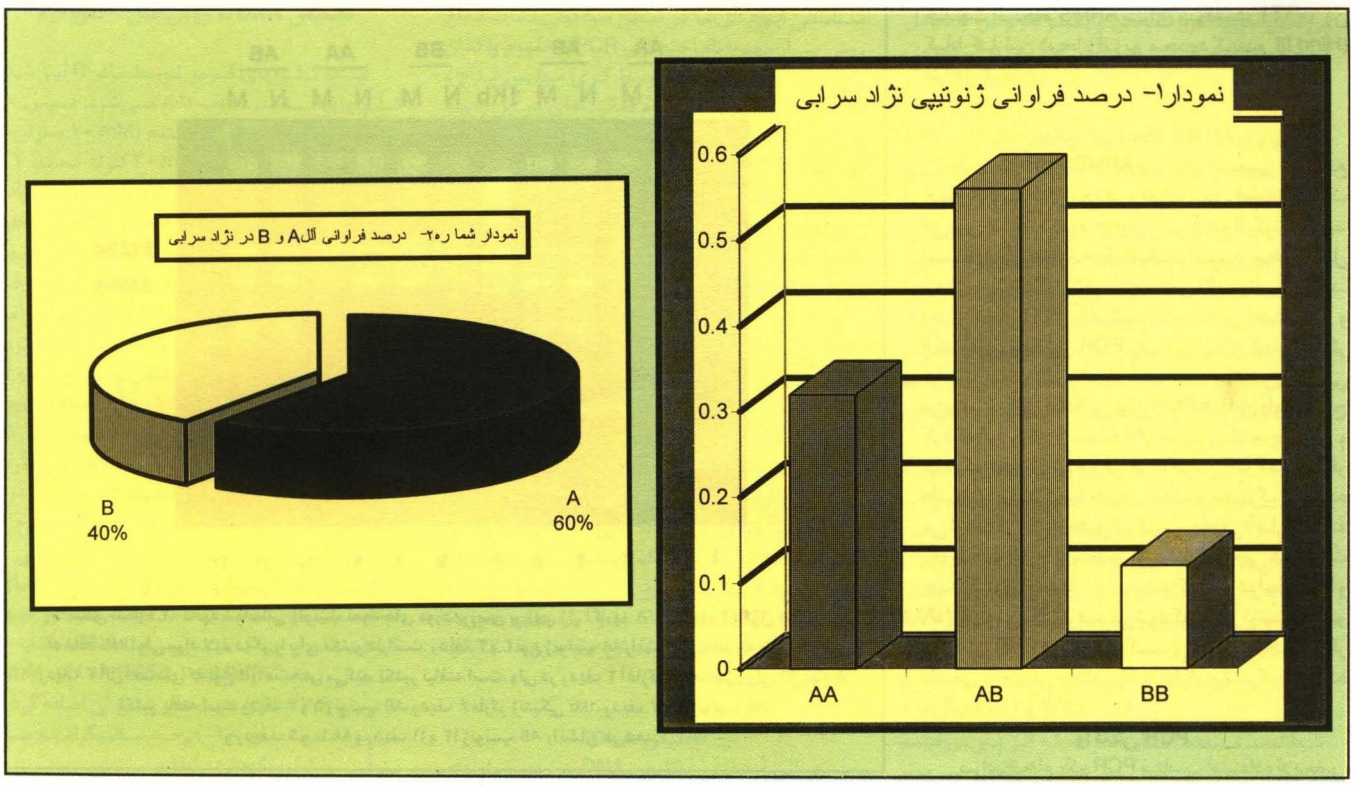
در چهارمین باز آغازگر ARMS یک ناجور جفت‌شدگی[18] برای ناپایدار سازی آلل‌های اختصاصی از انتهای '۳ که آدنین به تیمین قرار داده شد که کمک در بهبود اختصاصی عمل کردن آغازگر گردد. و طول قطعه کنترل داخلی ۵۲۲ جفت باز بود که قابل تفکیک بر روی ژل آگاروز بود که توالی از نوکلئوتیدهای مورد تکثیر بر روی DNA ژنومیک که قسمتی از اگزون IV واینترون IV مورد تکثیر قرار می‌گیرد را نشان می‌دهد (شکل ۱).

نتایج عمل ARMS

در حالتی آغازگر به صورت اختصاصی تکثیر می‌یافت دو قطعه ۲۴۹ جفت بازی و کنترل داخلی ۵۲۲ جفت بازی حاصل می‌گردید ولی اگر آغازگر به صورت اختصاصی عمل نمی‌کرد، فقط یک قطعه ۵۲۲ جفت بازی که به عنوان کنترل داخلی (در محلی خارج از این محل تکثیر می‌یابد) است حاصل می‌شود (شکل ۲).

مطابق آنچه در بالا در ارتباط با بکارگیری روش ARMS جهت تشخیص آلل A و B توضیح داده شد. ژن کاپا - کازئین بر روی ۱۱۳ نمونه نژاد سرابی در جامعه نمونه برداری شده مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که درصد فراوانی ژنوتیپی AA، AB و BB به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۵۶ و ۰/۱۲ بود. (نمودار ۱). در نهایت‌فراوانی آللی در سطح جامعه نمونه‌برداری از چند ایستگاه نگهداری این نژاد برای آلل A و B به ترتیب ۰/۶ و ۰/۴ به دست آمد (نمودار شماره ۲).

مقایسه فروانی آللی نژاد سرابی با نژادهای شیری ایالت متحده آمریکا نشان می‌دهد (۵). فراوانی آلل نژاد سرابی در حد متوسط قرار دارد (نمودار شماره ۳). فراوانی آلل B ژن کاپا کازئین در نژاد هلشتاین در کشورهای مختلف بین ۱۰ تا ۲۰٪ می‌باشد در صورتی که در نژاد سرابی در حد ۴۰٪ به دست آمد.



بحث

برای تعیین ژنوتیپ نوع کاپا - کازئین در گاو نر بوسیله نمونه‌های شیر از مادر - دختر (روشهای کلاسیک اصلاح نژاد) نیازمند ۵ تا ۶ سال می‌باشد. اما در روشهای مولکولی ژنوتیپ کاپا - کازئین بدون در نظر گرفتن سن و جنس آن به سرعت در عرض چند ساعت امکان پذیر می‌باشد. و نیازمند محاسبات آماری بر اساس تست نتایج نیست. از این روش می‌توان برای تعیین سریع ژنوتیپ این ژن در جهت بالا بردن فراوانی آلل B در گاو سرابی با انتخاب گاو نر دارای ژنوتیپ BB به عنوان یکی از شاخص‌های اصلاح نژاد بکار برد. با توجه به اینکه حدود یک میلیون گاو بومی در نواحی شمال غربی ایران وجود دارد و شیر حاصل از این گاوها در تولید پنیر استفاده می‌گردد این ضرورت احساس می‌شود که جهت بالابردن راندمان تولید شیر به پنیر در این منطقه با روش‌های ملکولی نسبت به انتخاب گاوهای نر که دارای ژنوتیپ BB می‌باشند همراه با دیگر شاخص‌های مهم تولیدی که به روشهای دیگر به دست می‌آید، به انتخاب گاوهای مساعد اقدام نمود و با روشهای اصلاح نژادی مناسب فراوانی این آلل را در منطقه بالا برد.

نتایج ارزشمند دیگری که از این مطالعات به دست آمد آن است که نژاد سرابی نیز واجد محل پلی‌مورفیسم (چند حالتی) مورد مطالعه در نژاد هلشتاین و نژادهای تجاری می‌باشد. ارزش کار حاضر هم در جهت اصلاح نژاد دام است و هم جهت تعیین اپیدمیولوژی مولکولی آللهای A و B در گاوهای سرابی برای کاپا - کازئین در موقعیت ۱۰۹۴۴ می‌باشد و امیدواریم با استفاده از این یافته‌ها کشور ما بتواند با روشهای نوین سریعتر به اهداف اصلاح نژاد دام شیری کشور برسد.

سپاسگزاری

این پروژه با همکاری مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور و بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران به انجام رسیده است. بدینوسیله از زحمات و مساعدهای آقایان دکتر علامه، ریاست محترم و مهندس فضائلی معاونت محترم پژوهشی وقت مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور و دکتر آذرنوش ریاست محترم، دکتر آسمار معاونت پژوهشی و بخصوص همکاران بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران که از هر کمکی در انجام پروژه دریغ نکردند و نیز از معاونت امور دام و تحقیقات جهاد سازندگی استان آذربایجان شرقی و ایستگاه حکیمیه کرج در انجام نمونه گیری همکاری نموده‌اند تشکر و سپاسگزاری می‌گردد. بخشی از هزینه‌های مربوط به انجام این پروژه توسط مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور تأمین گردیده است که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

پاورقی‌ها

1- Whey protein 2- Exon 3- Ethylene diamine Tetra Acetate 4- Triton x 100 5- Sodium dodecyl sulfate 6- Tris electophoresis 7- Primers 8- Destabilization 9- Recombinant thermus thremophilus 10- Thermus aquaticus 11- Thermal cycler 12- Annealing 13- Extension 14- Tris-borate electorphoresis buffer 15- Ethidum bromide 16- Loading buffer 17- UV Transilluminator 18- Mismatch

منابع مورد استفاده

۱- آقائی، اسدا...، ۱۳۷۳. PCR و کاربرد آن در اصلاح نژاد دام سمینار کارشناسی ارشد علوم دامی.

۲- احسانی، محمدرضا، ۱۳۶۹. مکانیزمها و عوامل موثر در انعقاد شیر وزارت کشاورزی، ۱۳ صفحه.

3- Alan H.V. and Jane P.S. 1994. Milk and milk production,. Chapman and Hall., England pp9.

4- Alexander L., J. Steward, A.F. Mackinlay, A.G. Kapelinnskayak, T.V. Tkach and Gorodetsky S.I., 1988., Isolation and characterization of the bovine k-casein gene., Eur. J. Biochem., 178, 395-401.

5- Eenennaam A. V. and Medran J.F. 1991. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. J. Dairy Sci. 74: 1730-1742.

6- Eggen, A. and fries R. 1995., An integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome., Animal Genetics 26, 215-236.

7-Fox P.F. 1989. Developments in dairy chemistry-4., Chapman and Hall, england, 1pp.

8- Fox P.F. 1992. Advanced dairy chemistry volume1 proteins., Capman and Hall, England., 64pp.

9- Marziali, A. S. and Ng-Kwai-Hang, K.F. 1986. Relationships between milk protein polymorphisms and cheese yield capacity. J. Dairy. Sci. 69, 1793-8.

10- Mcphererson, M.J., B.D., Hames and G. R. Taylor. 1995. PCR2, Oxford, LIR press. 219-255pp.

11- Mercier, J.C., Brignon G., and Ribadeau-Dumas, B. 1973. Structure primaire de k-casein B bovine sequence complete. Eur. J. biochem, 35: 222-35.

12- Prinzenberg E-M, S. Hiendleder, T. ikonen and Erhardt G. 1996, Molecular genetic charcterization of new bovine kappa-casein alleles CSN3F and CSN3G and genotyping by PCR-RFLP.

13- Newton C.R., A. G. Graham 1994, PCR, United kingdom, Bios. Sci. Pub 99-104pp.

14- Schaar, J. 1984 Effects of K-casein genetic variants and lactation number on the renneting properties of individual milk. J. Dairy Res. 51:397-406.