مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی اگزون چهارم ژن کاپاکازئین گوسفند کرمانی با تکنیک PCR-RFLP

مریم محمودی*[1]، احمد آیت اللهی مهرجردی[2]، محمدرضا محمدآبادی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[2]استادیار، بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[3]استاد بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۲۰

چکیده

کاپاکازئین در پایداری میسل‌های کازئین و اندازه و عملکرد اختصاصی آن‌ها اصلی‌ترین نقش را در بین پروتئین‌های شیر دارد. لذا، هدف مطالعه حاضر بررسی چندشکلی در ناحیه اگزون چهار ژن CSN3 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بود. بدین منظور از ۳۰ راس گوسفند نژاد کرمانی خونگیری و DNA ژنومی استخراج گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی انجام گرفت، محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. قطعه تکثیر شده با آنزیم *Hae*III هضم شد و تعیین ژنوتیپ انجام گرفت. نتاج بررسی‌ها منجر به شناسایی دو ژنوتیپ شد که فراوانی‌های آللی به وسیله نرم افزار Popgene برآورد شدند. فراوانی‌های آللی A و B برای ژن CSN3 به ترتیب برابر ۰/۷ و ۰/۳ برای جمعیت مورد بررسی به دست آمد. آزمون مربع کای بیانگر عدم تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت گوسفند کرمانی بود (P≤۰/۰۵). تعداد آلل مشاهده شده (na)، تعداد آلل موثر (ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، شاخص نئی، متوسط هتروزیگوسیتی و شاخص شانون برای این جمعیت به ترتیب ۲، ۱/۷۲، ۰/۶۰، ۰/۴۳، ۰/۴۲، ۰/۴۲ و ۰/۶۱ به دست آمد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های گوسفند مورد بررسی در این پژوهش با توجه به جایگاه‌های مورد مطالعه، از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردار هستند. بنابراین، مطالعات بعدی روی این دا مها، به ویژه دام های بومی باید به سمت و سویی سوق داده شوند تا همبستگی قطعی بین ژنوتیپ‌های کاپاکازئین و خصوصیات مادری تعیین شود تا بتوان با وارد کردن اطلاعات نشانگرهای ملکولی درطرح‌های اصلاح نژادی، پاسخ به انتخاب را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: پلی مورفیسم، ژن CSN3، PCR RFLP، گوسفند کرمانی.

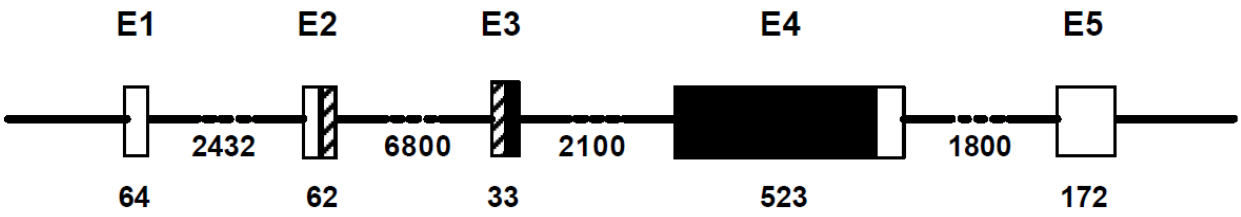
* نویسنده مسئول: مریم محمودی تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۶۸۹ Email: mary.mahmoodi89@gmail.com

مقدمه

نژادهای بومی در هر کشور به‌عنوان سرمایه ملی و محصولی استراتژیک در اقتصاد و رونق آن کشور محسوب می‌شوند. از طرف دیگر، به دلیل شدت انتخاب پایین، تعداد زیاد پرورش‌دهندگان و محدودیت استفاده از تلقیح مصنوعی در گوسفند و بز، معمولا از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردارند (Vajed Ebrahimi *et al*., 2016). از طرفی با گذشت زمان و کسب آگاهی بیشتر نسبت به اهمیت صفات مختلف، نیازهای جدیدی مطرح می‌شود که متخصصین اصلاح نژاد را بر آن می‌دارد که از ذخیره ژنی دام‌های بومی استفاده نمایند. این مسئله، به خصوص با افزایش تولید محصولات دامی و تولید محصولات پیش‌بینی‌نشده در آینده، لزوم حفظ تنوع ژنتیکی در دام‌های بومی را الزامی ساخته است (Vajed Ebrahimi *et al*., 2016) چرا که یک گونه بدون تنوع ژنتیکی کافی قادر به سازگاری با تغییرات محیطی و مبارزه با انگل‌ها نیست (Mohammadabadi *et al*., 2017). به طور کلی در بیشتر کشورهای جهان هدف از اصلاح نژاد گوسفند سودآوری از طریق بهبود یک یا چند صفت اقتصادی در جامعه است (Soufy *et al*., 2009). در ایران بیش از ۵۰ میلیون رأس گوسفند، شامل ۲۶ نژاد گوسفند در ایران وجود دارد که با مناطق مختلف سازگار شده‌اند (Mohammadabadi and Sattai Mokhtari, 2013; Zamani *et al*., 2015; Khodabakhshzadeh *et al*., 2016). گوسفند کرمانی یکی از مهم‌ترین نژادهای گوسفند بومی ایران است و به خوبی با شرایط محیطی خشن و نامطلوب قسمت جنوب شرقی کشور که عمدتا آب و هوای گرم و خشک غالب است و مراتع کم و کم کیفیت هستند، سازگار شده است (Vajed Ebrahimi *et al*., 2017). این گوسفند دنبه دار با اندازه متوسط و پشم سفید است (Mohammadabadi *et al*., 2017) و در استان کرمان بسیاری از نیازهای مردم عشایر و دامپروران این استان را تأمین می‌کند (Mohammadabadi, 2017). از این رو، توجه به بحث اصلاح نژاد این دام و بهبود شرایط محیطی و ژنتیکی گوسفند کرمانی کمک به سزایی در تأمین بخشی از نیازهای دامی مردم کرده است؛ لذا، باید تنوع ژنتیکی آنها محاسبه شده و سپس در حفظ این نژادهای بومی تلاش شود. حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد؛ در این راستا، تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei *et al*., 2010). استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر جهت تعیین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و حیوانات حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است. میزان چندشکلی به‌دست‌آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

هاست (Vajed Ebrahimi *et al*., 2016). گوسفند از نظر تعداد نژاد از تمام حیوانات اهلی متنوع‌تر و در هر منطقه و موقعیت جغرافیایی دارای ویژگی‌های همان منطقه می‌باشد. به طور اعم و صرف نظر از شرایط گوناگون جغرافیایی، پرورش گوسفند در کلیه نقاط دنیا به منظور بهره-برداری از صفات تولیدی آن صورت می‌گیرد. تولید شیر میش متناسب با تقاضای بازار و احتیاجات غذایی دامداران مورد توجه قرار گرفته و دامداران ترجیح می‌دهند که میش‌های شیروار را در گله خود حفظ نمایند. طی سال های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۷ تولید شیر دارای یک روند رو به رشد بوده است (Kharrati Koopaei, *et al*., 2011). با وجود روند افزایشی تولید شیر در کشور، اما هنوز سرانه مصرف شیر از حد استاندارد جهانی پایین تر است. سرانه مصرف شیر در کشور برای هرنفر برابر با ۹۵ کیلوگرم می باشد، در حالی که سرانه مصرف شیر در جهان برابر با ۱۶۹ کیلوگرم و در اروپا برابر با ۳۵۰ کیلوگرم در سال است (Kharrati Koopaei, *et al*., 2011). با توجه به آمار و اطلاعات موجود می‌توان دریافت که اهداف اصلاح نژادی در ایران بایستی برای افزایش تولید شیر در کشور برنامه ریزی شود. لذا مطالعه و بررسی ژن‌هایی که روی تولید و ترکیب شیر نقش موثری دارند اهمیتی دو چندان می یابد (Kharrati Koopaei, *et al*., 2012). پروتئین اصلی شیر کازئین نام دارد که در فرآیند تولید پنیر نقش اساسی دارد. کازئین حدود ۸۰٪ از پروتئین-های شیر را به خود اختصاص داده و دارای اشکال متفاوتی است (Alinaghizadeh *et al*., 2007). کازئین‌ها توسط چهار ژن دسته‌بندی و کدگذاری می‌شوند و حدود ۲۵۰ کیلوباز از DNA ژنومی را شامل می‌شوند (Yahyaoui, 2003). کازئین‌ها: آلفا S1 کازئین، آلفا S2 کازئین، بتا کازئین و کاپاکازئین در گوسفند به ترتیب توسط ژن‌های اتوزومی CSN1S1، CSN1S2، CSN2 و CSN3 که بر روی کروموزوم شماره شش قرار دارند کد می‌شوند (Rijnkels *et al*., 2002). کاپاکازئین نقش اصلی را در تعیین میسل-های شیر ایفا می‌کند و مسئول انعقاد شیر می‌باشد (Alinaghizadeh *et al*., 2007). کاپاکازئین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های شیر است (شکل ۱) و در گوسفند توسط ژنی با پنج اگزون و چهار اینترون کنترل می‌گردد (Supakorn, 2009). نواحی کد کننده ژن کاپاکازئین شامل بخشی از اگزون ۳ با ۹ اسید آمینه و اگزون ۴ با ۱۶۲ اسید آمینه می‌باشد (Yahyaoui *et al*., 2003). ۹۰ درصد ناحیه کد شونده‌ی پروتئین بالغ آن توسط اگزون شماره‌ی ۴ کد می‌شود (Yahyaoui *et al*., 2000). ژن کاپاکازئین در گاوهای ایرانی مطالعه شده است (Alinaghizadeh *et al*., 2007)، اما در گوسفندان ایرانی و به ویژه گوسفند کرمانی مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به موارد ذکر شده هدف این مطالعه بررسی چندشکلی در ناحیه اگزون چهار ژن CSN3 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بود.



شکل ۱- ساختار ژن کاپاکازئین. اگزون‌ها در شکل به عنوان جعبه‌هایی با اعداد و اندازه‌های ذکر شده در بالا به تصویر کشیده شده‌اند. جعبه‌های سفید مناطق غیر کد کننده، قسمت‌های هاشورخورده قسمتی از اگزون کد کننده پپتید سیگنال و جعبه‌های سیاه قسمتی از اگزون‌های کد کننده پروتئین بالغ را نشان می دهند (Yahyaoui *et al*., 2000).

Figure 1- Kappa casein gene structure. Exons are depicted schematically as boxes, white (5' and 3'untranslated regions), dashed (part of exon encoding the signal peptide), and black (part of exons encoding the mature protein). Exon numbers and sizes are indicated above and below the boxes, respectively (Yahyaoui *et al*., 2000).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۳۰ راس گوسفند نژاد کرمانی (۱۰ راس میش و ۲۰ راس قوچ) به‌صورت تصادفی از گله‌های موجود در استان کرمان خون‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌های خون کامل از سیاهرگ وداج گردن و با استفاده از لوله خلاء دار ۲/۵ میلی‌لیتری حاوی ماده ضد انعقاد EDTA تهیه و در داخل یخ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. نمونه‌ها، در فلاسک یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استخراج DNA، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل به روش بهینه شده و تغییریافته استخراج نمکی انجام گردید (Abadi *et al.* 2009). برای تجزیه سلول‌های قرمز از بافر شستشو و نیز برای تجزیه اسیدهای نوکلئیک از بافر لایسیز، استفاده گردید.

کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده با ژل آگارز ۱٪ تعیین شدند. برای تکثیر قطعه‌ی مورد نظر جایگاه ژن کاپاکازئین دام‌ها از آغازگرهای 5´-TCC CAA TGT TGT ACT TTC TTA ACA TC-3´ و 5´-GCG TTG TCC TCT TTG ATG TCT CCT TAG-3´ استفاده شد.

در این تحقیق از دستگاه ترموسایکلر peqSTAR 96X ساخت آلمان، با بلوک ۹۶ تایی برای تیوب‌های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر، استفاده گردید. برنامه دمایی برای آغازگرها مورد مطالعه به صورت واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

۴۵ ثانیه، بسط اولیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و سرانجام بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بهینه شد. واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند.

از آنزیم برشی BsuRI (HaeIII) با جایگاه برشی 5´GG↓CC3´ برای هضم محصولات PCR استفاده شد. از حجم ۱/۵ میکرولیتر آنزیم برشی برای هضم هر نمونه از محصولات PCR استفاده شد. سپس تمامی نمونه‌های آنزیمی به مدت ۱۶ ساعت، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بن ماری نگهداری شد، و پس از اتمام زمان هضم آنزیمی برای بررسی قطعات برشی از ژل آگارز ۲٪ استفاده شد تا قطعات حاصل از هضم به خوبی از هم تفکیک شوند. آزمون نسبت درست نمایی برای تعادل هاردی- واینبرگ (P<۰/۰۵) در هریک از جایگاه‌ها، همچنین تنوع درون جمعیتی به صورت متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار و معیارهای چندشکلی از جمله تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر، با استفاده از نرم‌افزار PopGene انجام گردید (Yeh *et al.* 1999).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که کیفیت DNA های استخراج شده با استفاده از روش نمکی بهینه‌شده بسیار مناسب و تقریباً تمامی باندهای نمونه‌ها شفاف و بدون کشیدگی بودند (شکل ۲).

شکل ۲- الکتروفورز چند نمونه DNA استخراج‌شده گوسفندان مورد مطالعه روی ژل آگارز ۱ درصد.

Figure 2- Electerophoresis of some studied sheep DNA samples on 1% Agarose gel.

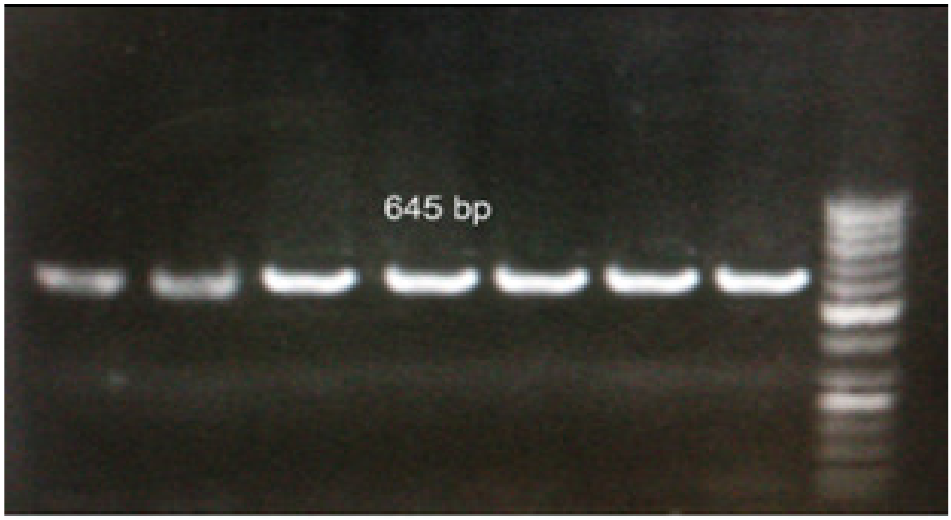
نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز، صحت تکثیر قطعه ۶۴۵ جفت بازی از ژن CSN3 را مورد تایید قرار داد (شکل ۳). نتایج حاصل از هضم آنزیمی و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲٪، برای آگزون چهار ژن CSN3 (جایگاه ۶۴۵ جفت

بازی) در شکل ۴ نشان داده شده است. در این جایگاه آلل A شامل دو قطعه ۴۱۶ و ۲۲۹ جفت بازی (با یک سایت برش) و آلل B شامل یک قطعه ۶۴۵ جفت بازی (بدون سایت برش) است. لذا، باید ژنوتیپ AA شامل دو قطعه ۴۱۶ و ۲۲۹ جفت بازی، ژنوتیپ BB شامل یک قطعه ۶۴۵ جفت بازی و ژنوتیپ AB شامل سه قطعه ۶۴۵، ۴۱۶ و ۲۲۹ جفت بازی باشد. در این پژوهش تعداد ۱۲ ژنوتیپ AA (٪۴۰) و تعداد ۱۸ ژنوتیپ AB (٪۶۰) مشاهده شدند و ژنوتیپ BB مشاهده نشد (جدول ۱ و شکل ۴).

جدول ۱- فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی مشاهده شده در گوسفندان مورد مطالعه.

Table 1- Genotype and allele frequencies in studied sheep.

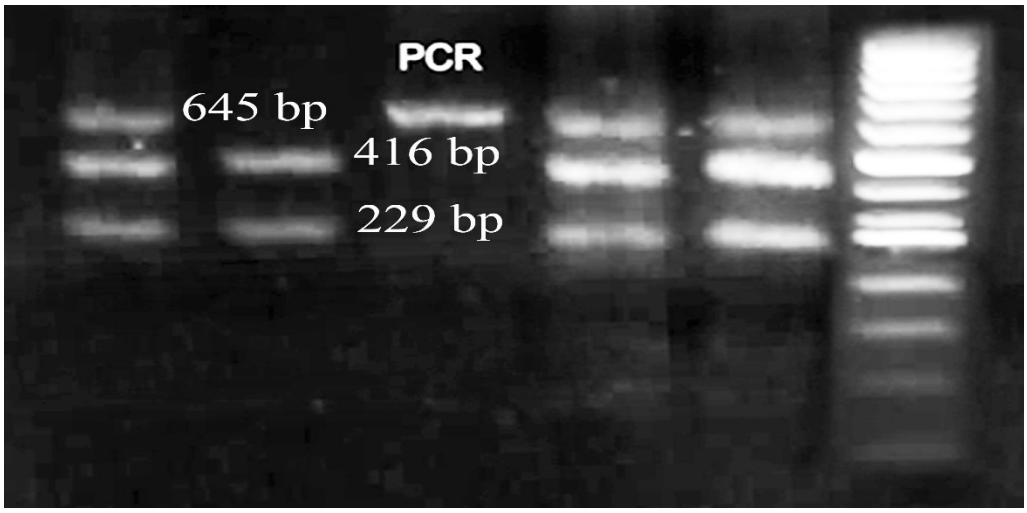
فراوانی Allele frequency	آلل Allele	فراوانی Genotype frequency	تعداد Number	ژنوتیپ Genotype
0.7	A	0.40	12	AA
		0.60	18	AB
0.3	B	0.00	0	BB



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد. نشانگر اندازه: M100.

Figure 3- Electrophoresis of PCR products on a 1% Agarose gel. Size marker: M100.

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل ۴- الکتروفورز محصولات حاصل از هضم برای ژن CSN3. نشانگر اندازه: M100.

Figure 4- Electrophoresis of digested products for the CSN3 gene. Size marker: M100.

در این تحقیق فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب ۷۰ و ۳۰ درصد محاسبه گردید. آزمون مربع کای بیانگر عدم تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت گوسفند کرمانی بود (P≤۰/۰۵). این عدم تعادل می‌تواند به دلیل تعداد کم نمونه، اثر انتخاب انجام شده در این دام‌ها، جهش‌های صورت گرفته و یا به دلیل خویشاوندی و همخونی باشد. تعداد آلل مشاهده شده (na)، تعداد آلل موثر (ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار، شاخص نئی، متوسط هتروزیگوسیتی و شاخص شانون برای این جمعیت به ترتیب ۲، ۱/۷۲، ۰/۶۰، ۰/۴۳، ۰/۴۲، ۰/۴۲ و ۰/۶۱ به دست آمد. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که جمعیت‌های گوسفند مورد بررسی در این پژوهش با توجه به جایگاه-های مورد مطالعه، از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردارند. در پژوهشی Feligini *et al.* (2005) چندشکلی تک نوکلنوتیدی ناحیه کد کننده ژن کاپاکازئین را در ۱۲۰ گوسفند از سه کشور کرواسی، صربستان و ایتالیا مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب برابر ۰/۱۲ و ۰/۸۸ برای گوسفندان نژاد Pag کرواسی، ۰/۲۷ و ۰/۷۳ برای گوسفندان نژاد Sarda ایتالیا و ۰/۴۵ و ۰/۵۵ برای گوسفندان نژاد Pramenka صربستان است. در پژوهشی Mohammadi *et al.* (2009) چندشکلی ژنتیکی ژن کاپاکازئین گاوهای محلی و هلشتاین استان کرمان را با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مطالعه نمودند. این محققین فراوانی آلل‌های A و B را به ترتیب ۷۰ و ۳۰ درصد گزارش کردند. آزمون مربع کای بیانگر تعادل هاردی-وینبرگ در جمعیت مورد مطالعه آنها بود. با توجه به این که اثر ژن کاپاکازئین بر خصوصیات پنیرسازی شیر در گاو گزارش شده است (Aleandri *et al.* 1990; Lodes *et al.*, 1996; Alinaghizadeh *et al.*, 2007)، باید این ارتباط در گوسفند هم مورد

بررسی قرار گیرد، چرا که در شیر گوسفند که بیشتر برای ساخت پنیر استفاده می‌شود این موضوع دارای اهمیت بیشتری است. بنابراین، مطالعات بعدی روی این دا مها، به ویژه دام های بومی باید به سمت و سویی سوق داده شوند تا ارتباط قطعی بین ژنوتیپ‌های کاپاکازئین و خصوصیات مادری تعیین شود تا بتوان با وارد کردن اطلاعات نشانگرهای ملکولی در طرحهای به نژادی پاسخ به انتخاب را افزایش داد. با توجه به این که نشانگرهای ملکولی در سطح ژنوم احتیاج به بیان ژن ندارند و می توانند حتی در دام-های نر، بزغاله‌ها و دام‌های ماده غیرشیرده جهت تشخیص ژنوتیپ صفات مربوط به شیر و رشد مورد استفاده قرار گیرند و با توجه به این که تعیین ژنوتیپ براساس DNA توسط نشانگرهای ملکولی بسیار دقیق و سریع است و در هر مرحله از حیات حیوان می تواند در اصلاح نژاد مورد استفاده قرار گیرد، استفاده از نشانگرهای DNA در دام های کشور و استان پیشنهاد می گردد. به علت این که انتخاب به کمک نشانگرهای ملکولی هزینه‌های اجرایی را به شدت کاهش می‌دهد و باعث کاهش فاصله نسل در اصلاح نژاد دام می-گردد، استفاده از نشانگرهای DNA موجبات پیشرفت ژنتیکی بیشتری را فراهم خواهد آورد.

منابع

Abadi MRM, Askari N, Baghizadeh A, Esmailizadeh AK (2009). A directed search around caprine candidate loci provided evidence for microsatellites linkage to growth and cashmere yield in Rayini goats. Small Ruminant Research 81: 146-151.

Aleandri R, Buttazzoni LG, Schneider JC, Caroli A, Davoli R (1990). The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability. Journal of Dairy Science 73: 241–255

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007). Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bos indicus) using PCR-RFLP. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 4291-4294.

Feligini M, Vlaco S, Curik VC, Parma P, Greppi GF, Enne G (2005). A single nucleotide polymorphism in the sheep kappa-casein coding region. Journal of Dairy Research 72: 1–5

Feligini M, Cubric V, Parma P, Curik I, Greppi GF, Enne G (2002). Designed DNA test for discrimination of A and B alleles. Food Technology and Biotechnology 40: 293-298.

Kharrati Koopaei H, Mohammad Abadi MR, Ansari Mahyari S, Tarang AR, Potki P, Esmailizadeh AK (2012). Effect of DGAT1 variants on milk composition traits in Iranian Holstein cattle population. Animal Science Papers and Reports 30: 231-240.

Kharrati Koopaei H, Mohammadabadi MR, Ansari Mehyari S, Esmailizadeh AK, Tarang A, Nikbakhti M (2011). Genetic Variation of DGAT1 Gene and its Association with Milk Production in Iranian Holstein Cattle Breed Population. Iranian Journal of Animal Science Research 3: 185-192 (In Farsi).

Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh Koshkoieh A, Moradi-Shahrebabak H, Bordbar F, Ansari Namin S (2016). Identification of point mutations in

Journal of Agricultural Biotechnology; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. Polish Journal of Veterinary Sciences 19: 281–289.

Lodes A, Krause I, Buchberger J, Aumann J, Klostermeyer H (1996). The influence of genetic variants of milk proteins on the compositional and technological properties of milk. 1. Casein micelle size and the content of non-glycosylated k-casein. Milchwissenschaft 51: 368–373.

Mohammadabadi MR (2017). Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. Journal of Advances in Agriculture 7: 1117-1121.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017). Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. Journal of Research and Development 5: 154-157.

Mohammadabadi MR, Sattayimokhtari R (2013). Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in Kermani sheep. Journal of Animal Science 46: 45-51.

Mohammadi A, Mohammadabadi MR, Mirzaei H, Baghizadeh A, Dayani O, Asadi Fozi M, Bahrampoor V (2009). Study of Kappa Casein gene of local and Holstein dairy cattle in Kerman province using PCR-RFLP method. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 16: 125-132 (In Farsi).

Rijnkels M (2002). Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. Journal of Mammary gland Biology and Neoplasia 7: 327-345.

Shojaei M, Mohammad Abadi MR, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010). Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research 2: 67-73.

Soufy B, Mohammadabadi MR, Shojaeyan K, Baghizadeh A, Ferasaty S, Askari N, Dayani O (2009). Evaluation of Myostatin gene polymorphism in Sanjabi sheep by PCR-RFLP method. Animal Science Reserches 19: 81-89 (In Farsi).

Supakorn CH (2009). The important candidate genes in goats. Walailak Journal of Science and Technology 6: 17-36.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016). Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. Journal of Agricultural Biotechnology 7: 143-158.

Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2017). Using microsatellite markers to analyze genetic diversity in 14 sheep types in Iran. Archiv fuer Tierzucht (Arch. Anim. Breed) 60: 183-189

Yahyaoui MH, Angiolillo A, Pilla F, Sanchez A, Folch JM (2003). Characterization and genotyping of the caprine κ-casein variants. Journal of Dairy Science 86: 2715-2720.

Yahyaoui MH, Coll A, Sanchez A, Folch JM (2000). Genetic polymorphism of the caprine kappa casein gene. Journal of Dairy Research 68: 209-216.

Yeh FC, Yang R, Boyle T (1999). POPGENE. Microsoft Window based freeware for population genetic analysis. Version 1.32. Centre for International Forestry Research, University of Alberta.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Ruminant Research 132: 123-127.

Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP

Mahmoodi M.*[1], Ayatollahi Mehrjerdi A.[2], Mohammadabadi M.R.[3]

[1]MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[3]Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

Kappa casein plays an essential role in the case of micelle stabilization and their size and the specific biological function. Hence, the purpose of this study was to investigate polymorphism in the exon 4 gene of CSN3 using the PCR-RFLP technique. For this purpose, blood samples were taken from 150 Kermani sheep, and genomic DNA was extracted. The polymerase chain reaction (PCR) was performed a pair of specific primer. PCR productions were separated using agarose gel. The amplified fragment was digested with *Hae*III enzyme and determining the genotype was performed. The results of this study led to the identification of two genotypes that allele frequencies were estimated by Popgene software. Allele frequency of A and B alleles for CSN3 gene was respectively 70% and 30% for the Kermani sheep population. Chi-square test showed that studied population is not in Hardy-Weinberg equilibrium ($P \leq 0.05$). Number of observed allele, number of effective allele, observed heterozygosity, expected heterozygosity, Nei's index, mean of heterozygosity and Shanon's index were obtained 2, 1.72, 0.60, 0.43, 0.42, 0.42 and 0.61 respectively. In conclusion, it can be concluded that studied Kermani sheep population has a high degree of genetic variability. Therefore, next studies on these animals, especially on native animals should aim to determine crucial relationship between kappa casein genotypes and maternal characteristics, as selection could be enhanced by the inclusion of genetic markers in breeding decisions.

Keywords: polymorphism, CSN3 gene, PCR-RFLP, Kermani sheep.

* Corresponding Author: Mahmoodi M. Tel: 03431322689 Email: mary.mahmoodi89@gmail.com