

## مطالعه چندشکلی اگزون ۲ ژن GOLA-DRB3 در بز ندوشن با استفاده از روش PCR-RFLP

اسماعیل عباس زاده مهرآبادی<sup>۱</sup> - محمدرضا محمدآبادی<sup>۲\*</sup> - علی اسمعیلی زاده کشکوئی<sup>۳</sup> - روح ... علی نقی زاده<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲

تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۲۵

### چکیده

این پژوهش به منظور بررسی چند شکلی ژن GOLA-DRB3 با استفاده از PCR-RFLP در بز ندوشن صورت گرفت. در این طرح، از ۱۰۰ بز به صورت تصادفی خونگیری شد. سپس DNA نمونه های خون دام ها با استفاده از کیت DIAtom DNA pr استخراج گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت آن از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر استفاده شد. ناحیه اگزون ۲ جایگاه GOLA-DRB3 به طول ۲۸۵bp با روش Heminested-PCR در دو مرحله تکثیر و محصولات PCR توسط آنزیم Taq برش داده شدند. محصولات هضم شده توسط الکتروفورز با ژل اکریل آمید ۱۰٪ یا ۲٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید آشکار گردید. نتایج هضم محصولات PCR با آنزیم TaqI شامل دو قطعه ۱۶۳ bp و ۱۲۲ bp (الگوی هضمی T) یا قطعه هضم نشده ۲۸۵ bp (الگوی هضمی t) بود. جمعیت از لحاظ ژن GOLA-DRB3 انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان نداد ( $p > 0.05$ ). شاخص شانون، شاخص نیی، هتروزایگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار به ترتیب ۰/۶۸، ۰/۴۹، ۰/۵۵ و ۰/۴۹ محاسبه گردید. با توجه به نتایج حاصله کارایی نشانگر GOLA-DRB3 جهت تعیین تنوع ژنتیکی خوب است. با استفاده از نتایج این پژوهش و پژوهش های قبلی و با در دست داشتن رکوردها و اطلاعات کمی جایگاه در این جمعیت، می توان شناسایی و تعیین محل جایگاه های موثر بر صفات کمی را انجام داد.

واژه های کلیدی: ژن GOLA-DRB3، PCR-RFLP، بز ندوشن

### مقدمه

در گله بستگی دارد (۱۱). تخمین دقیق تنوع ژنتیکی در داخل گونه های حیوانی یک گام بنیادی جهت ذخیره منابع ژنتیکی است (۱). امروزه جهت بررسی های ژنتیکی جمعیتها و حیوانات حفاظت شده، از نشانگرهای مولکولی DNA استفاده می شود و میزان چند شکلی بدست آمده از این نشانگرهای ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیتها محسوب می شود (۱). کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) کلاستر بزرگی از ژنهای به هم پیوسته است که نقش تنظیمی را در سیستم ایمنی بازی می کند. از نظر ایمنی شناسی MHC را می توان مجموعه ای از ژنها دانست که آماده سازی و ارائه پادگن را کنترل می کنند. تمامی مهره داران از ماهی تا پستانداران دارای ژنهای MHC هستند که در کروموزوم سلول به صورت مجموعه ای پیوسته قرار گرفته اند. در اغلب دامهای اهلی هر MHC حاوی چند گروه ژن می باشد (هر گروه را معمولاً یک کلاس می نامند). ژنهای کلاس I پروتئینهایی موسوم به MHC کلاس I را کد می کنند که در سطح بیشتر یاخته های هسته دار (و در سطح گلبولهای قرمز برخی از گونه های حیوانات) وجود دارند. ژنهای

در استان یزد دو توده نژاد بز شامل بز بومی (بز یزدی یا ندوشن) و نژاد بز گاریزی وجود دارد. بز ندوشن در رنگ های قرمزحنايي و سیاه وجود دارد و بیشتر در مناطق ندوشن گاریزات، عقدا، بافق دیده می شود. بز ندوشن توده بز غالب استان است و بیشتر به رنگ قرمز عنابی دیده می شود. این نژاد به منظور تولید شیر و کرک نگهداری می شود. در صورت غنی بودن مراتع و تغذیه ی مناسب تا ۸۰ درصد دوقلو زایی در این توده بز دیده شده ولی به علت عدم تکافوی شیر مادر فقط یکی از دو بزغاله که دارای جثه بزرگتر است نگهداری و دیگری را در بدو تولد ذبح و یا به فروش می رسانند. این حیوان در برابر شرایط بد آب و هوایی و تغذیه نامناسب مقاوم است. برنامه های اصلاح نژادی بیشتر در جهت بهبود وضعیت تولیدی حیوانات اهلی عمل می کنند که توفیق این برنامه ها به میزان تنوع ژنتیکی موجود

۱ و ۲ - به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

\* - نویسنده مسئول (Email: mmohammadabadi@yahoo.ca)

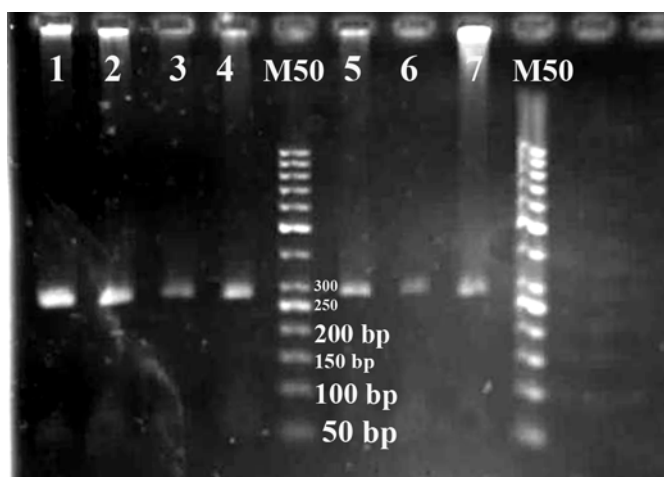
۴ - دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر

در بین نژادها نشان دادند. بزکایا و همکاران (۵)، تکامل همگرای جایگاه MHC را بین گوسفند، بز و گاو با کمک نشانگر ریزماهوره Orthologous آنالیز کردند و نشان دادند تکامل همگرای جایگاه MHC بین گوسفند، بز و گاو وجود دارد. چندین روش برای تحقیق کردن پلی مورفیسم ژن DRB3 بکار رفته است (۷). آنالیز RFLP قطعه ژن بسط یافته بوسیله PCR برای DRB3.2 در بز مفید گزارش شده است (۸). بهاءالدینی (۱)، در بزهای کرکی راینی به بررسی چندشکلی ژن GOLA\_DRB3 پرداخت و فراوانی های آلی و ژنوتیپی را محاسبه کرد. متأسفانه تاکنون تحقیقات بسیار کمی روی بز ندوشن انجام شده است و هیچ گونه تحقیقات ملکولی نیز انجام نشده است. لذا، این تحقیق با هدف بررسی چندشکلی ژن GOLA-DRB3 با استفاده از PCR-RFLP در این دام ها صورت گرفت.

### مواد و روش ها

در این طرح، از ۱۰۰ بز نژاد ندوشن از گله های مردمی به صورت تصادفی در لوله های ونوژکت حاوی EDTA خونگیری شد. سپس نمونه های خون کامل روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز شد. DNA نمونه های خون دام ها با استفاده از کیت DIAtom DNA prep استخراج گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتر استفاده شد. ناحیه اگزون ۲ جایگاه GoLA\_DRB3 به طول ۲۸۵bp با روش Heminested\_PCR در دو مرحله تکثیر شد. پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از: 5'-TATCCCGTCTCTGCAGCACATTTC-3' (DRB 1.1) و 5'-TCGCCGCTGCACACTGAACTCTC-3' (DRB 1.2) و 5'-CGTACCCAGAGTGAGTGAAGGTATC-3' (۴).  
 DRB1.1 در اولین اینترون و دومین اگزون قرار گرفته است، درحالی که DRB1.2 مکمل انتهای 3' اگزون ۲ می باشد. پرایمر GIO یک ناحیه اینترونی است که ۲۰۰bp پایین دست انتهای 3' اگزون ۲ می باشد. پرایمرهای GIO و DRB1.1 در مرحله اول PCR استفاده شد، در حالی که ترکیب پرایمرهای DRB1.1 و DRB1.2 در مرحله دوم PCR استفاده گردید. در مرحله اول، دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه و طی ۱۰ سیکل؛ ۲۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله تکثیر انتهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در مرحله دوم طی ۲۵ سیکل؛ ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و مرحله تکثیر انتهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد.

کلاس II مولکولهای پروتئینی را کد می کنند (پروتئین MHC) که در درجه اول در سطح سلول های ارائه کننده پادگن (ماکروفاژ، یاخته های مضرس و سلول های B) قرار دارند. ژنهای کلاس IIa شامل DRB، DQA، DQB هستند. سه ژن DRB به نامهای DRBP1، DRB2، DRB3 گزارش شده است. DRBP1 یک ژن کاذب است و DRB2 در سطح خیلی پائینی بیان می شود، در حالی که DRB3 بیان بالایی دارد و فوق العاده پلی مورف است (۱۵،۴،۱ و ۱۸). زیرگروه DR مولکولهای MHC بعنوان یکی از پروتئینهای اصلی کلاس II در سطح سلولهای بز شناخته شده است (۴). تا امروز حداقل دو لوکوس DRB مشخص شده است (۱ و ۴). برخی آزمایشات ارتباط بین کمپلکس اصلی سازگاری بافتی حیوان و مقاومت نسبت به بیماریها را نشان می دهند، مثلاً در گاو مقاومت در برابر لیکوز گاوی، کارسینومای چشمی گاو، تریپانوزومیا و حساسیت نسبت به کنه بوافیلوس میکروپلوس، در طیور مقاومت در برابر بیماری مارک، در گوسفند مقاومت نسبت به بیماری اسکرپی و تورم عقده های لنفاوی پنبیری، در بز حساسیت در برابر بیماری تورم مفصل همراه با آنسفالیت گزارش شده است (۱،۴،۶ و ۱۴). ارتباط بین آلهای DRB3.2 و مقاومت به برخی بیماریها و صفات تولیدی بز نشان داده شده است (۸). تحقیقات دیگر نشان داده که ژن DRB3 بر بسیاری از صفات مرتبط با ایمنی در دامها، میزان سلولهای سوماتیک شیر (SCC)، ورم پستان و صفات تولیدی (نظیر شیر، چربی و پروتئین) اثر دارد (۶ و ۹). تعداد ۱۳-۱۰ ژن کلاس I در دو لوکوس و ۳ ژن کلاس II در یک لوکوس (DYA) در بز شناخته شده است. به نظر می رسد که بین برخی از ژنهای کلاس I و ژنهای مربوط به حساسیت بز در برابر بیماری تورم مفصل همراه با آنسفالیت ارتباطی وجود دارد. کلاس II کمپلکس اصلی سازگاری بافتی بز، مشابه گاو است و دارای DQ و DR می باشد (۴). سان (۱۷)، به بررسی تنوع ژنتیکی ژن GOLA-DRB3 در دو جمعیت بز چینی پرداخت، در بین این دو جمعیت تفاوت معنی داری در برخی فراوانی های ژنی و ژنوتیپی مشاهده شد ( $P < 0.01$ ). در دو جمعیت فوق انحراف از تعادل هاردی واینبرگ با استفاده از آزمون کای اسکور ( $P < 0.01$ ) مشاهده شد. شیخ و همکاران (۱۶)، به بررسی پلی مورفیسم ژن GOLA-DRB3.2 در بز چانگتانی<sup>۱</sup> با استفاده از دو آنزیم محدود کننده PstI و TaqI به روش RFLP و ارتباط آن با تولید کرک پرداختند و ارتباط معنی داری را ( $P < 0.05$ ) بین پلی مورفیسم PstI GOLA-DRB3.2 و اولین و دومین سال تولید کرک تشخیص دادند. لی و ژاو (۸)، به بررسی واریانتهای آلی در اگزون ۲ MHC کلاس II بز در ژن GOLA-DRB3 بزهای بومی چین پرداختند، نتایج اختلاف معنی داری ( $P < 0.01$ ) را هم در فراوانی های ژنوتیپی و هم در فراوانی های آلی



شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد. M50 نشانگر اندازه و ۱ تا ۷ حیوانات مورد مطالعه هستند.

نتایج جذب نوری نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر نیز، غلظت مطلوب DNAهای استخراجی را تأیید کرد، زیرا نسبت A260/A280 بین ۱/۸-۲ بود. جهت کنترل تکثیر قطعه مورد نظر از ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید، همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود فقط یک باند ۲۸۵ bp بدست آمد که نشان دهنده این است که آغازگرها اختصاصی عمل کرده و فقط قطعه مورد نظر را سنتز نموده‌اند. البته این نتایج با نتایج شیخ و همکاران (۱۶)، سان (۱۷)، باقی زاده و همکاران (۴)، لی و ژاو (۸)، بهاء‌الدینی (۱)، و احمد و اوتهم (۲)، مطابقت دارد.

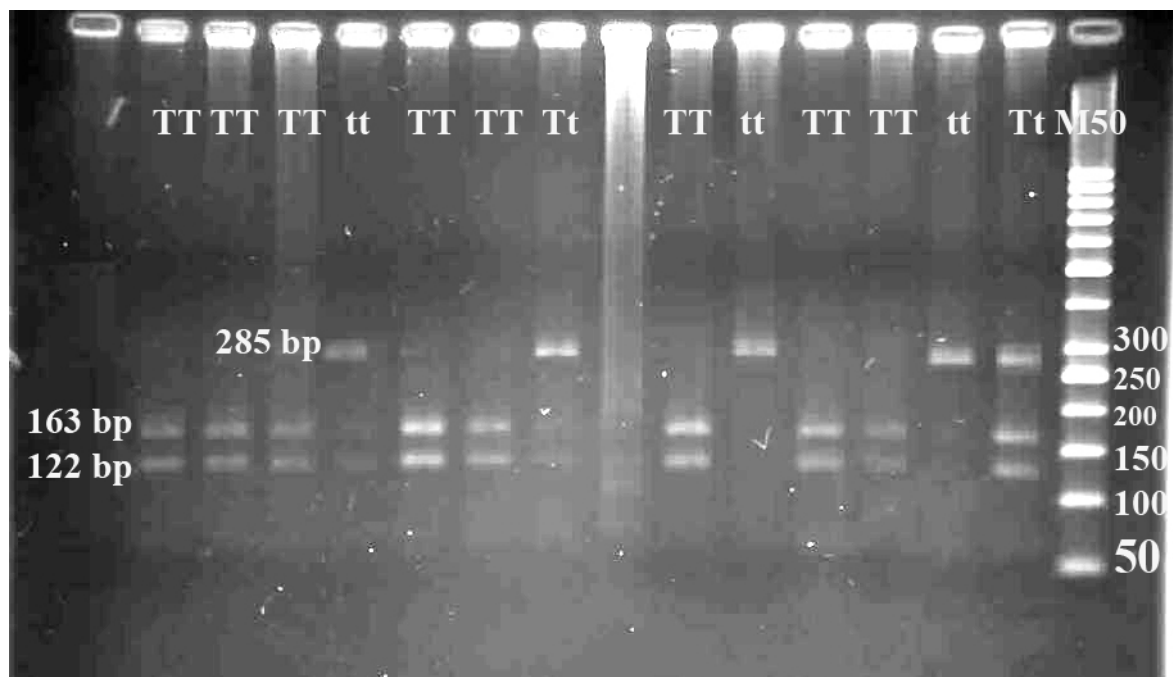
آمیلز و همکاران (۳)، نشان دادند، ارتباط نزدیکی بین پلی مورفیسم تفاوت طول قطعات هضم شده (RFLP) و جایگزینی اسیدهای آمینه در موقعیت‌های مورد انتظار وجود دارد، که در شکل گیری ناحیه تشخیصی آنتی ژنی (ARS)، در مولکول DR مؤثر است. این نتایج پیشنهاد می‌کند که PCR-RFLP ممکن است در مطالعه ژن DRB3 بز و جایگزینی اسیدآمینه مرتبط در ARS در مولکول DR با مقاومت به بیماری مفید باشد. همچنین در این تحقیق همانند DR Nested-PCR و همکاران (۱۶)، و بهاء‌الدینی (۱)، از استفاده شد، زیرا آمیلز و همکاران (۳)، بیان نمودند که ارتباط نزدیکی بین حضور جایگاه‌های هضمی TaqI و Pst I و جایگزینی اسید آمینه به ترتیب در موقعیت‌های ۴۰ و ۷۸ وجود دارد که پیشنهاد کردند Nested PCR امکان بررسی بهتر PstI RFLP و TaqI RFLP در دومین آگزون ژن DRB3 کلاس دو MHC بز را فراهم می‌سازد. لازم به ذکر است که PstI RFLP در گوسفند، گاو، بز و خوک وجود دارد در حالیکه TaqI RFLP تنها در بز وجود دارد (۴).

از مهمترین خصوصیات یک نشانگر مولکولی تعداد آلل، فراوانی آللی، تعداد آللهای مؤثر، هتروزیگوسیتی و محتوای اطلاعاتی چند شکل (PIC) آن نشانگر می‌باشد.

پس از تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از آنزیم TaqI هضم بر طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاز صورت گرفت. در تیوپهای 0.2 میلی لیتری، ده میکرولیتر محصول PCR ریخته، سپس روی یک تیوپ ۱/۵ میلی لیتری علامت TaqI را زده و کلیه مواد لازم شامل ۱ میکرولیتر آنزیم، دو میکرولیتر بافر و ۱۸ میکرولیتر آب استریل به ازای هر نمونه داخل آن ریخته و بعد ۲۱ میکرولیتر از آن، داخل هر یک از میکروتیوپها ریخته شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۶-۱۰ ساعت داخل بن ماری در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نمونه‌های هضمی (۵ میکرولیتر)، بعلاوه بافر 6X Loading dye بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد، سپس ژل تحت نور لامپ ماوراء بنفش بررسی گردید. برای خواندن آلل‌ها، ژل رنگ آمیزی شده اسکن گردید و برای محاسبه اندازه باندها از نرم افزار OnedScan (۱۳)، استفاده شد. بعد از بدست آوردن ژنوتیپ افراد، فراوانی‌های ژنی و ژنوتیپی با نرم افزار POPGENE (۱۸)، محاسبه گردید و تعادل هاردی-وینبرگ نیز با استفاده از آزمونهای کای و جی اسکور (۱۹)، بررسی شد.

## نتایج و بحث

کیفیت DNA استخراج شده توسط الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید و با مشاهده شکل باندها مورد بررسی قرار گرفت. وجود باندهای کاملاً شارپ و بدون کمترین کشیدگی حاکی از بهترین کیفیت بود. عدم وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند حاکی از عدم آلودگی پروتئینی در نمونه‌ها و عدم وجود باند اضافی در پایین ژل و در فاصله ای زیاد از باند اصلی نشان دهنده عدم وجود ناخالصی مربوط به RNA در نمونه‌ها بود. همچنین



شکل ۲- الکتروفورز محصولات هضم شده با آنزیم *TaqI* روی آکریل آمید ۱۰ درصد. M50 نشانگر اندازه و بقیه حیوانات مورد مطالعه هستند

این پژوهش، فراوانی آلل *t* نسبتاً بالا است، هر چند که فراوانی ژنوتیپ *tt* از بقیه ژنوتیپ‌ها کمتر است (جدول ۱). غالبیت جزئی هتروزیگوت‌ها سبب افزایش سهم آلل *t* شده است. تغییر در طبیعت اسیدهای آمینه در کدون ۴۰ از اسید آمینه خنثی (آلل *T*) به اسیدآمینه قطبی (آلل *t*) می‌تواند سبب تغییر در ساختار سوم پروتئین شود. این پروتئین مسئول تولید آنتی ژن در سطح سلول است. تغییر در ساختار پروتئین، احتمالاً بر توانایی اتصال آنتی ژن تاثیر می‌گذارد و نهایتاً تولید و آزاد شدن آنتی بادی بر علیه ارگانسیم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

به منظور بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه در این جمعیت از دو آزمون کای اسکور ( $\chi^2$ ) و جی اسکور ( $G^2$ ) استفاده گردید، البته باید توجه داشت که آزمون  $G^2$  نسبت به  $\chi^2$  حساستر است. براساس آزمون  $\chi^2$  و  $G^2$  جمعیت از لحاظ ژن-*GOLA-DRB3* انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ را نشان نداد ( $P > 0.05$ ). که این امر می‌تواند به این دلیل باشد که نیروهای برهم زننده تعادل (مانند، مهاجرت، جهش، انتخاب و غیره) عمل نکرده‌اند و یا این که عمل کرده‌اند ولی اثر همدیگر را خنثی نموده‌اند. از آنجایی که جایگاه‌های RFLP دارای چند شکلی بالائی می‌باشند و شاخص شانون بیانگر میزان تنوع ژنتیکی در هر جمعیت است، بنابراین در این مطالعه اقدام به محاسبه شاخص شانون<sup>۱</sup> (I) گردید (جدول ۲). تنوع

در این تحقیق سه ژنوتیپ (*TT*، *Tt*، *tt*) و دو آلل (*T* و *t*) در *TaqI* RFLP ژن *GOLA-DRB3* بز ندوشن مشاهده شد. عبارت دیگر دو الگوی هضمی وجود دارد (شکل ۲): الگوی هضمی *T* با اندازه قطعات ۱۶۳ bp و ۱۲۲bp و الگوی هضمی *t* با قطعه هضم نشده ۲۸۵ bp. در ژنوتیپ *TT* در هر دو رشته همولوگ سایت برش وجود دارد، در ژنوتیپ *Tt* در یک رشته سایت برش وجود دارد و در ژنوتیپ *tt* در هیچ یک از دو رشته سایت برش وجود ندارد. چند شکلی موجود در نتیجه حضور سایت چند شکل، در موقعیت ۱۲۲ قطعه مورد نظر است. نتایج این تحقیق در خصوص تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد ژنوتیپ‌ها با نتایج شیخ و همکاران (۱۶)، احمد و اوتهمام (۲)، باقی زاده و همکاران (۴)، و بهاء‌الدینی (۱)، مطابقت کامل دارد، که در این پژوهش برای *TaqI* RFLP تعداد ۲ آلل و ۳ ژنوتیپ، به نحوی که در بالا ذکر شد بدست آمد.

یکی دیگر از معیارهای چند شکلی تعداد آلل مؤثر است که با استفاده از نرم افزار POPGENE محاسبه شد. در نژاد بز ندوشن تعداد آلل واقعی (*na*) برابر ۲ و تعداد آلل مؤثر (*ne*) مساوی ۱/۹۵ به دست آمد. فراوانی ژنوتیپ‌های *TT*، *Tt* و *tt* به ترتیب ۰/۳۰، ۰/۵۵ و ۰/۱۵ (جدول ۱) و فراوانی آلل‌های *T* و *t* به ترتیب ۰/۵۷۵ و ۰/۴۲۵ محاسبه گردید. نتایج پژوهش حاضر با نتایج آمیلز و همکاران (۱۹۹۵)، احمد و اوتهمام (۲)، و بهاء‌الدینی (۱)، هماهنگی کامل دارد، همچنین با نتایج شیخ و همکاران (۱۶)، مشابهت زیادی دارد. ولی آنچه مشهود است اینکه، در همه پژوهش‌های ذکر شده و همچنین

1 - Shannon information Index

۰/۵۵ بود، و چون حیوانات هتروزایگوت سیستم ایمنی بهتری نسبت به هموزایگوت‌ها دارند و در این تحقیق هم فراوانی هتروزایگوت‌ها بالا است پس اکثر حیوانات از سیستم ایمنی نسبتاً قدرتمندی برخوردارند. شاخص هتروزایگوسیته نئی برای بزهای ندوشن برابر ۰/۴۹ بدست آمد که این مقدار برای این جایگاه دو آلی بالا است و بیانگر تنوع ژنتیکی خوبی است، چرا که شاخص هتروزایگوسیته یکی از شاخص‌های مهم در تعیین تنوع ژنتیکی است و همیشه مورد توجه اصلاحگران دام می‌باشد. با توجه به نتایج حاصله کارایی نشانگر GOLA-DRB3 جهت تعیین تنوع ژنتیکی انکار ناپذیر است. با تلفیق نتایج این پژوهش و پژوهش‌های قبلی می‌توان با در دست داشتن رکوردها و اطلاعات کمی جایگاه در این جمعیت، در جهت شناسایی و تعیین محل جایگاه‌های موثر بر صفات کمی استفاده نمود.

درون جمعیتی با تعیین معیارهائی همچون هتروزایگوسیته مشاهده شده ( $H_o$ )، هتروزایگوسیته مورد انتظار ( $H_e$ ) و هتروزایگوسیته مورد انتظار نا اریب یا شاخص نئی ( $Nei$ ) مورد بررسی قرار گرفت (۱۲). تعیین این مقادیر برای جایگاه GOLA-DEB3 در این جمعیت با استفاده از نرم افزار POPGENE انجام گرفت که نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

## نتیجه گیری

با توجه به تعداد آل‌های مشاهده شده و موثر در جایگاه مورد بررسی برای جمعیت و همچنین نتایج بدست آمده از تحلیل محتوای اطلاعاتی چند شکل استنباط می‌گردد که چندشکلی و کارایی آغازگرهای مورد بررسی خوب بوده و می‌توان از این آغازگرها در مطالعات بعدی استفاده نمود. میانگین هتروزایگوسیته مشاهده شده

جدول ۱- مقایسه نتایج پژوهش‌های مختلف برای TaqI RFLP

Tt فراوانی ژنوتیپ	t فراوانی آل	T فراوانی آل	
Genotype frequency of Tt	Allele frequency of t	Allele frequency of T	
۰/۵۵	۰/۴۲	۰/۵۸	تحقیق حاضر
۰/۶۱	۰/۴۰	۰/۶۰	احمد و اوتهم (۲۰۰۶)
۰/۴۴	۰/۳۲	۰/۶۶	باقی زاده و همکاران (۲۰۰۹)
۰/۶۱	۰/۵۹	۰/۴۱	شیخ و همکاران (۲۰۰۶)
۰/۵۷	۰/۴۷	۰/۵۳	بهاء‌الدینی (۱۳۸۷)

جدول ۲- تنوع درون جمعیتی برای ژن GoLA-DRB3

TaqI RFLP	
۰/۴۵	هموزایگوسیته مشاهده شده
۰/۵۵	هتروزایگوسیته مشاهده شده
۰/۵۰	هموزایگوسیته موردانتظار
۰/۴۹	هتروزایگوسیته موردانتظار
۰/۴۹	شاخص نئی ( $Nei$ )
۰/۴۸	متوسط هتروزایگوسیته
۰/۶۸	شاخص شانون

## منابع

- ۱- بهاء‌الدینی، م. ۱۳۸۷. بررسی پلی مورفیسم ژن GoLA-DRB3 در یز کرکی راینی با استفاده از PCR-RFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه زابل.
- 2- Ahmed, S., and E. Othman. 2006. A PCR-RFLP method for the analysis of Egyptian goat MHC class II DRB gene. *Biotech.* 5:58-61.
- 3- Amills, M., O. Francino, and A. Sanchez. 1995. Nested PCR allows the characterization of TaqI and PstI RFLPs in the second exon of the caprine MHC class II DRB gene. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 48: 313-21.
- 4- Baghizadeh, A., M. Bahaaddini, M. R. Mohamadabadi, and N. Askari. 2009. Allelic Variations in Exon 2 of Caprine MHC Class II DRB3 Gene in Raeini Cashmere Goat. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 6 (4): 454-459.

- 5- Bozkaya, F., A. Kuss, and H. Geldermann. 2006. DNA variants of the MHC show location-specific convergence between sheep, goat and cattle. *Small Rum. Res.* 70:174–182.
- 6- Dietz, A. B., N. D. Cohen, L. Timms, and M. E. Kehrli. 1997. Bovine Lymphocyte Antigen Class II Alleles as Risk Factors for High Somatic Cell Counts in Milk of Lactation. *Dairy Cows. J. Dairy Sci.* 80:406–412.
- 7- Ledwidge, S. A., and Z. Jiang. 2001. Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB alleles. *Anim. Genet.* 32: 219–221.
- 8- Li, M., and S. Zhao. 2005. Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 gene in Chinese indigenous goats. *Small Rum. Res.* 66: 236–243.
- 9- Mohammadi, A., Nassiry, M. R., Mosafer, J., Mohammadabadi, M. R., and G. E. Sulimova. 2009. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (*Bos indicus*). *Russian Journal of Genetics.* 45(2): 198–202.
- 10- Montaldo H. H., and C. A. Meza- Herrera. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Electronic J. biotech.* 1:83-89.
- 11- Msoffe, P. L., M. M. A. Mtaambo, U. M. Minga, H. R. Juul-Madsen, and P. S. Gwakisa. 2005. Genetic structure among the local chicken ecotypes of Tanzania based on microsatellite DNA typing. *African J. biotech.* 4:768-771.
- 12- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- 13- Rockville, M. D. 2000. OneDscan system, USA BioRad, version 1.3.
- 14- Ruff, G., U. Sattler, D. Martinez, J. Maillard, C. Chartier, N. Saitbekova, M. Glowatzki, and C. Gaillard. 2003. Association studies using random and candidate microsatellite loci in two infectious goat diseases. *Genet. Sel.* 35:113–119.
- 15- Ruzina, M. N., T. A. Shtyfurko, M. R. Mohammadabadi, O. B. Gendzhieva, T. Tsendsuren, and G. E. Sulimova. 2010. Polymorphism of the BoLA\_DRB3 Gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut Cattle Breeds. *Russian Journal of Genetics.* 46(4): 456–463.
- 16- Sheikh, F. D., T. K. Bhattacharya, P. Kumar, and A. Sharma. 2006. DRB3.2 gene polymorphism and its association with pashmina production in Changthangi goat. *J. compilation.* 271-276.
- 17- Sun, D. 2004. Polymorphism analysis of the GOLADR3 gene digested with HaeIII in Mongolian goat and Kazakh goat. College of Animal Science and Technology. China Agricultural University.
- 18- Wang, K., D. X. Sun, and Y. Zhang. 2007. Identification of genetic variations of exon 2 of BoLA-DQB gene in five Chinese yellow cattle breeds. *Int. J. Immunogenet.* 34:115–118.
- 19- Yeh, F. C., R. Yang, and T. Boyle. 1999. POPGENE: Version 1.31. Microsoft Window–Bsed Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.