نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ۱۶، پاییز ۱۳۹۴
ص‌ص: ۳۹~۴۶

بررسی چندشکلی اگزون چهارم ژن کاپاکازئین در گوسفند نژاد ماکویی با استفاده از روش *PCR-SSCP*

- **معصومه محمودی**
کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه
- **محمد قادرزاده** (نویسنده مسئول)
دانشجوی دکترا، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
- **علی هاشمی**
دانشیار، دانشگاه ارومیه
- **کریم مردانی**
دانشیار، دانشگاه ارومیه

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۹۴۳۲۲۰۹۱
Email:mg.mahabad1365@gmail.com

چکیده

این پژوهش به منظور شناسایی چندشکلی موجود در ناحیه اگزون چهارم ژن کاپاکازئین گوسفند نژاد ماکویی با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز انجام گرفت. برای این منظور، از صد رأس گوسفند مرکز اصلاح نژاد گوسفند ماکویی، بطور تصادفی خونگیری انجام شد. DNA **ژنومی از نمونه‌های خون استخراج شد و قطعه‌ای با اندازه ۴۵۹ جفت باز شامل قسمتی از ناحیه اگزون چهارم ژن کاپاکازئین تکثیر شد. کیفیت** DNA **ژنومی و نمونه‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به ترتیب با استفاده از ژل‌های آگارز یک درصد و آگارز دو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج** SSCP **محصولات** PCR **با ژل پلی‌آکریل آمید ژنوتیپ‌های یکسان را آشکار ساخت. با توجه به نتایج این پژوهش هیچ جهشی در این ژن مورد تأیید قرار نگرفت. عدم وجود چندشکلی احتمالاً می‌تواند به دلیل عدم آمیزش با سایر نژادها، بسته بودن محیط پرورش و کوچک بودن تعداد نمونه‌های بررسی شده باشد.**

واژه‌های کلیدی: گوسفند ماکویی، ژن کاپاکازئین، *PCR-SSCP*.

Applied Animal Science Research Journal No 16 pp: 39-46

Study polymorphism of kappa-casein gene exon 4 in Makoei sheep using PCR-SSCP

By: M. Mahmoodi[1], M. Ghaderzadeh[2], A. Hashemi[3], K. Mardani[4]

1: MSc Graduated of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
2: PhD Student of Genetics & Animal Breeding, College of Animal Science and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Tel: +989394322091 , Email: mg.mahabad1365@gmail.com)
3: Associate Professor Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Urmia University
4: Associate Professor Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University

This study was undertaken to identify the polymorphism of kappa-casein gene exon 4 in Makoei sheep, using polymerase chain reaction (PCR) and single strand conformation polymorphism (SSCP) technique. A total number of 100 Makoei sheep were randomly selected from Makoei Sheep Breeding Station where located in Mako and blood samples were collected. Genomic DNA was extracted from blood samples in order to amplify 459 bp fragment comprising part of the fourth exon of the ovine kappa-casein gene. Genomic DNA and PCR products samples quality was investigated, using 1 and 2 % agarose gel respectively. Based on SSCP analysis of PCR product with Polyacryl Amide the same genotypes were identified. Results revealed that the there is not, any mutation in this gene. Lack of the polymorphism, can be because of no mating with others sheep breeds, the closed breeding place and small samples size probably.

Key words: Makoei sheep, kappa-casein gene, PCR-SSCP.

مقدمه

گوسفند از نظر تعداد نژاد از تمام حیوانات اهلی متنوع‌تر و در هر منطقه و موقعیت جغرافیائی دارای ویژگی‌های همان منطقه می‌باشد. به‌طور اعم و صرف نظر از شرایط گوناگون جغرافیائی، 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 غذائی دامداران مورد توجه قرار گرفته و دامداران ترجیح می‌دهند که میش‌های شیروار را در گله خود حفظ نمایند(سیاه‌منصور و سعادت نوری، ۱۳۸۴). گوسفند نژاد ماکویی یکی از نژادهای رایج در استان آذربایجان غربی است که عمدتاً به منظور تولید شیر و تولید پشم و گوشت نگهداری می‌شود. با افزایش جمعیت کشور و نیاز این جمعیت جوان به مواد غذائی مانند شیر نیاز به شناسایی نژادهای پستانداران (گوسفند، گاو، بز) دارای میزان تولید شیر بیشتر و با کیفیت‌تر احساس می‌شود. شناسایی ژن‌های مؤثر در تولید و کیفیت شیر در جهت هموار نمودن نیاز جامعه و اصلاح نژاد دام‌های بومی به کمک نشانگرهای مولکولی اقدامی صحیح و هدفمند می‌باشد.

اولین مطالعات بر روی پروتئین شیر توسط لوسیا و همکارانش انجام گرفت (لوسیا و همکاران، ۱۹۹۰). تحقیقات بر روی شیر و پروتئین‌های آن به دلیل ارتباط بین این پروتئین‌ها و کیفیت شیر همچنان ادامه دارد (پریزنبرگ و همکاران، ۲۰۰۵: استانکوآ و همکاران، ۲۰۰۵). در هنگام نگهداری شیر و تبدیل آن به فرآورده‌های لبنی با استفاده از روش‌های نگهداری و تبدیل، میزان پروتئین کل افزایش می‌یابد اما در مشتقات پروتئین یعنی کازئین و پروتئین‌های آب پنیر (محلول)، تغییری حاصل نمی‌شود. اما در پنیرسازی، میزان غلظت کازئین (به‌صورت کمپلکس پارا کاپا کازئین) در دلمه (لخته) افزایش می‌یابد و پروتئین محلول در آب وارد آب پنیر می‌شود ولی چنان‌چه از شیر استریلیزه در پنیرسازی استفاده شود میزان قابل ملاحظه‌ای پروتئین محلول در آب در لخته

باقی می‌ماند و فقط مقدار ناچیزی از ترکیبات ازتی وارد آب پنیر خواهد شد (رسول‌زاده، ۱۳۸۰). کاپاکازئین از ۱۶۹ اسید آمینه تشکیل شده و دارای جرم مولکولی ۱۹۰۰۰ دالتون است. عوامل احیاء کننده فقط بر روی مونومرهای کاپاکازئین مؤثر می‌باشند. به طور معمول کاپاکازئین به صورت تری‌مر یا الیگومر وجود دارد که به‌وسیله پل‌های دی سولفید با هم ترکیب شده‌اند. این پروتئین حاوی مقدار ناچیزی کربوهیدرات شامل ۱٪ گالاکتوز، ۱/۲٪ گالاکتوزامین، ۲/۴ ٪ ان استیل نورآمین اسید[1] است. با استفاده ازالکتروفورز، کاپاکازئین را تجزیه کرده و اسیدهای آمینه مختلفی که با کربوهیدرات‌ها ترکیب شده است را مشخص می‌نمایند. مونومرهای کازئین به صورت پلی مر با کلسیم کمپلکس ایجاد کرده، توسط میسل‌های کازئین احاطه می‌شود (میرنظامی، ۱۳۷۵). کاپا کازئین مهمترین کازئین شیر است و در حضور یون کلسیم محلول در شیر بسیار حساس می‌باشد. مشتقاتی از کازئین که توسط یون کلسیم می‌توانند رسوب کنند (آلفا اس یک کازئین و بتا کازئین) بوده که با کلسیم تشکیل کمکپلکس می‌دهند و از انعقاد آن‌ها جلوگیری می‌کنند. یکی از خصوصیات اصلی کاپاکازئین تشکیل یک کمپلکس کازئین مقاوم است که مقاومت خاصی به میسل‌های کازئین می‌بخشد. کاپا کازئین در سطح میسل تمرکز یافته است. فسفات کلوئیدی که سبب اتصال ساختارهای فرعی با یکدیگر می‌شود خود به گروه‌های استری فسفات آلفا اس یک، آلفا اس دو و کازئین[2] متصل شده است (با کاپا کازئین اتصالی ندارد). ساختارهای فرعی واجد میزان پائین کاپا کازئین در داخل میسل و انواع دارای مقادیر بالای آن در سطح میسل مستقر شده‌اند این امر از رشد نامحدود میسل‌ها جلوگیری به عمل می‌آورد. ترکیبات منومرها و میسل‌های کازئین بستگی به نژاد، تغذیه دام، دوران شیردهی دام و اندازه میسل دارد (میرنظامی، ۱۳۷۵).

چندشکلی پروتئین‌های شیر، به واسطه ارتباط آن‌ها با صفات تولیدی نظیر ترکیبات شیر و کیفیت آن امروزه مورد توجه پژوهشگران اصلاح نژاد قرار گرفته است. چندشکلی مشاهده شده در پروتئین‌های شیر نتیجه جهش‌هایی است که توالی نوکلئوتیدی ژن‌های ویژه‌ای را تغییر می‌دهد و باعث اختلاف در بیان اسیدآمینه‌های پروتئین شیر می‌گردد.(میولی و همکاران، ۱۹۹۸; لاگال و همکاران، ۲۰۰۲). در گوسفند ژن کاپاکازئین بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار گرفته و شامل پنج اگزون و چهار اینترون است (مادوکس وهمکاران، ۲۰۰۱). در سال ۲۰۰۱، این ژن با استفاده از روش PCR-SSCP بر روی ۴۰ نمونه از گوسفندان نژاد پرتغالی چورا دا ترا کوانتی مورد مطالعه قرار گرفت و جایگاه این ژن را مونومورفیک مشاهده کردند (باستوس و همکاران، ۲۰۰۱). به چند شکلی بودن ژن کاپاکازئین در گوسفند توسط محققین مختلف اشاره شده است. در گوسفندان نژادهای آلپاین مرینو، الی دی فرانس، و آلتامورنا دو شکلی آللی با استفاده از آنزیم‌های *HindIII*، و *PluII* و سه شکل آللی با استفاده از آنزیم *PstI* مشاهده گردید (سریوتی و همکاران، ۲۰۰۴). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بر روی پلی مورفیسم ژن‌های کازئین در گوسفندان شیری با استفاده از PCR-RFLP، چند شکلی در ژن کاپاکازئین گزارش گردیده است (اورداس و همکاران، ۱۹۹۷).

با توجه به این‌که تحقیقی در گوسفندان نژاد ماکویی در مورد ژن کاپاکازئین صورت نگرفته است لذا هدف از این تحقیق، شناسایی تنوع و جهش‌های موجود در ناحیه اگزون چهارم ژن کاپاکازئین با استفاده از روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در این نژاد بود.

مواد و روش‌ها

۱- نحوه نمونه گیری و استخراج DNA

در این تحقیق، ۱۰۰ نمونه خون از میش‌های مرکز اصلاح نژاد گوسفند ماکویی به‌طور تصادفی اخذ گردید. برای جلوگیری از انعقاد نمونه‌های خون از اتیلن آمین ترا استیک اسید[3] استفاده شد و نمونه‌ها تا زمان استخراج DNA ژنومی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی که از نمایندگی شرکت فرمنتاز[4] در ایران (*سینا-ژن*) تهیه شده بود، صورت گرفت.

[1] N-Acetylneuramin Acid

[2] αs_1 ،αs_2 و β, casein

[3] EDTA

[4] Fermentas

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز یک درصد انجام گرفت و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، رنگ آمیزی به روش نیترات نقره انجام شد.

۲- تکثیر اگزون چهارم ژن کاپاکازئین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مطابق آزمایش بارسو و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد. آغازگرها به شرح زیر بودند:

-TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG- ´۵´۳:رفت

GCGTTGTCCTCTTTGATGTCTCCTTAG- ´۳-´۵:برگشت

شرایط دمائی: دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه تکثیر شامل واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ثانیه، اتصال ۶۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و نهایتاً یک بسط انتهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد (بارسو و همکاران، ۱۹۹۸). به منظور ارزیابی صحت قطعات تکثیر شده، محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱٪ و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. سپس، تجزیه نمونه‌های تکثیر شده به روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) و به روش نیترات نقره انجام گرفت.

۳- روش چندشکلی فضایی رشته منفرد[5]

برای تجزیه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به کمک روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد، از ژل آکریل سرد استفاده شد. برای این منظور، دو میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر SSCP dye (شامل۱۰میکرولیتر بروموفنل۱۰درصد + ۲ میکرولیتر EDTA نیم مولار + ۱۹۰میکرولیتر گلیسرول + ۸۰۰ میکرولیتر فرمامید) مخلوط گردید و به مدت ۵ دقیقه در ترموسایکلر مدل (UNIOII) با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

سپس نمونه‌ها به سرعت به داخل یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید.

نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید سرد با ولتاژ ۳۲۰ و مدت زمان ۱۵۰ دقیقه جهت مشاهده تفاوت موجود در آن‌ها، الکتروفورز شدند (نصیری و همکاران،۱۳۸۹) که این روش جدید، آسان و تقریباً مشابه روش پیپالیا و همکاران (۲۰۰۴) بود (پیپالیا و همکاران ۲۰۰۴). بعد از پایان الکتروفورز، ژل پلی‌آکریلامید با استفاده از نیترات نقره جهت دیدن نوارهای DNA تک رشته‌ای رنگ آمیزی شد (بنزوآ و همکاران، ۲۰۰۶).

نتایج و بحث

بعد از استخراج DNA به‌وسیله کیت استخراج محصول شرکت (*سیناژن-ایران*) به منظور تعیین کیفیت و کمیت نمونه‌ها بر روی ژل آگارز یک درصد برده شدند (شکل ۱)، سپس با استفاده از نمونه‌های DNA استخراج شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، قطعه ۴۵۹ جفت بازی از ناحیه اگزون چهارم ژن کاپاکازئین تکثیر شد (شکل ۲). محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت شناسایی جهش‌های احتمالی توسط روش چندشکلی فضایی رشته‌های منفرد (SSCP) تجزیه و تحلیل شدند که نوارهای تشکیل شده بر روی ژل، یک شکل یکسان را نشان دادند که حاکی از مونومورف بودن این جایگاه ژن کاپاکازئین در گوسفند ماکویی بود.

نتایج به‌دست آمده عدم وجود جهش را تأیید می‌کند (شکل ۳). نتایج این تحقیق مطابق با یافته‌های باستوس و همکاران (۲۰۰۱) بود. در آزمایش آن‌ها بر روی جایگاه اگزون چهارم ژن کاپاکازئین در نمونه‌های اخذ شده از گوسفندان بومی نژاد چورادا پرتغالی تک شکلی آللی مشاهده شد (باستوس و همکاران ۲۰۰۱). این یافته‌ها حاکی از آن است که این گله‌های بومی به‌صورت کاملاً بسته و بدون اختلاط و یا آمیخته گری با سایر نژادهای محلی و بومی پرورش داده شده‌اند و آمیزش‌ها نیز فقط به صورت درون آمیزی شکل گرفته است.

با توجه به فرهنگ دامداری و شرایط پرورشی نژاد ماکویی و علاقه بسیار زیاد پرورش دهندگان به نگهداری آن به طور خالص و به دلیل عدم ترکیب این نژاد با دیگر نژادهای استان آذربایجان غربی از قبیل: قزل و هرکی و دیگر نژادها، ژنوتیپ‌ها در سالیان

[5] SSCP

متوالی به صورت خالص و وحشی باقی مانده‌اند. فلیجینی و همکاران (۲۰۰۲) با هدف بررسی چندشکلی تک نوکلئوتیدی در سه نژاد گوسفند *پاگ*، *ساردا* و *پرامنکا* سه شکل ژنوتیپی مختلف برای این ژن مشاهده کردند (فلیجینی و همکاران ۲۰۰۲). سایر محققان با هدف بررسی تأثیر این ژن بر روی تولید در گوسفند نژاد فریزن شرقی، دو آلل T و C را شناسایی نمودند (استایگر و همکاران، ۲۰۱۰). محققان با پژوهشی که بر روی ژن کاپا کازئین گوسفند به روش PCR-SSCP انجام دادند، موفق به شناسایی یک چند شکلی تک نوکلئوتیدی شدند که در آن جهش تبدیل (Ser104→Leu104) روی داده بود و سایر نمونه‌های بررسی شده در این ژن، یک ژنوتیپ یکسان CC را نشان دادند.

آن‌ها در توضیح یافته‌های خود عنوان کرده‌اند که این جهش منجر به ایجاد ژنوتیپ TC شده است که فراوانی آن در نمونه‌های بررسی شده بسیار اندک بوده است (سریوتی و همکاران، ۲۰۰۴).

این ژن در سایر حیوانات بررسی شده به‌طوریکه تنوع ژنتیکی بالایی از این ژن در بز و گاو گزارش شده است (یاهویویی و همکاران، ۲۰۰۳: پریزنبرگ، ۲۰۰۵). در حالی‌که در تحقیقاتی که بر روی گوسفند انجام شده تنوع به میزان چشمگیر و معناداری نبوده است.

با توجه به نتایج حاصل از بررسی منابع مختلف می‌توان گفت این ژن که دارای پروتئین کاپا-کازئین است نقش محافظتی میسل‌های کازئین را در شیر بر عهده دارد و همچنین در کیفیت پنیر تولید شده و سرعت دلمه بستن و راندمان تبدیل شیر به پنیر اهمیت به سزایی دارد (میولی و همکاران،۱۹۹۸ : گراگوریو و همکاران۱۹۹۱). لذا باید بررسی و تحقیقات بیشتر و وسیع‌تری در مورد این ژن و ارتباط و نقش آن در میزان تولید شیر گوسفندان بومی بررسی شود و جنبه‌های مثبت و کاربردی آن مورد مقایسه و آزمایش قرار گیرد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از مشاهدات این تحقیق و آزمایشات انجام گرفته بر روی ناحیه اگزون چهارم ژن کاپاکازئین، در نمونه-های بررسی شده نژاد ماکویی جهش رخ نداده است.

یکی از علل عدم وجود چندشکلی در این جمعیت ممکن است به علت بسته بودن جمعیت و عدم تلاقی و تداخل گوسفندان بومی منطقه با میش‌های این مرکز باشد. از طرف دیگر عدم مشاهده چندشکلی و جهش می‌تواند به علت ناکافی بودن تعداد نمونه‌های بررسی شده در این آزمایش باشد.

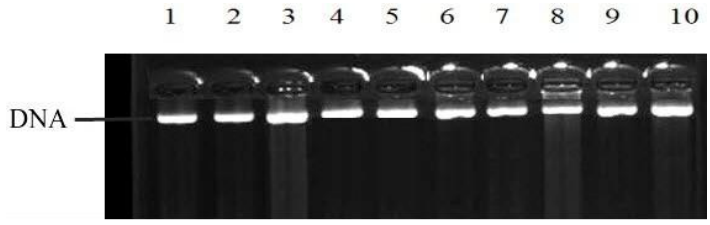
جهش‌های این ژن در سایر نژادها شناسائی شده‌اند، پس صرفاً با بررسی این گله و این ناحیه از ژن نمی‌توان نظر قطعی در مورد تک شکلی یا چندشکلی این ژن در نژاد مذکور صادر نمود. لذا پیشنهاد می‌شود، تعداد نمونه‌های بیشتری از این نژاد در این گله و سایر گله‌های خارج از این مرکز نژاد ماکویی و سایر جایگاه‌های این ژن جهت مقایسه و بررسی کامل‌تر مورد بررسی قرار گیرند. پیشنهاد می‌شود در صورت مشاهده چندشکلی بهترین ژنوتیپ‌ها با توجه به محیط پرورش حیوانات، اعمال مدیریتی و هزینه‌های نهاده و قیمت محصولات تعیین گردد.

جهت تعیین بهترین ژنوتیپ مطلوب برای صفات، آنالیز کامل و دانستن اثرات متقابل بین اجزای سیستم ضروری است.

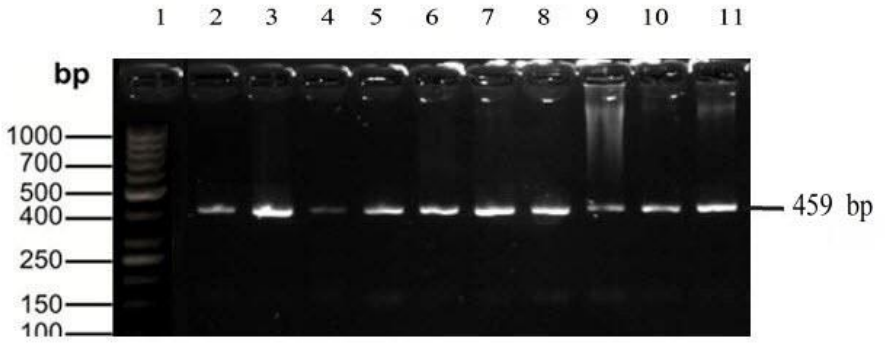
از آن‌جا که یکی از منابع درآمد دامداران استان آذربایجان غربی از طریق فروش شیر و محصولات لبنی می‌باشد لذا شناسایی گوسفندان دارای جهش و چندشکلی این ژن و بررسی صفات تولیدی در این گوسفندان و انتخاب آن‌ها به عنوان گوسفندان مولد نسل‌های بعدی، می‌توان کمک قابل توجهی به میزان تولیدات شیر و محصولات لبنی و وضعیت اقتصادی مالکان گله‌ها انجام داد.

سپاسگزاری

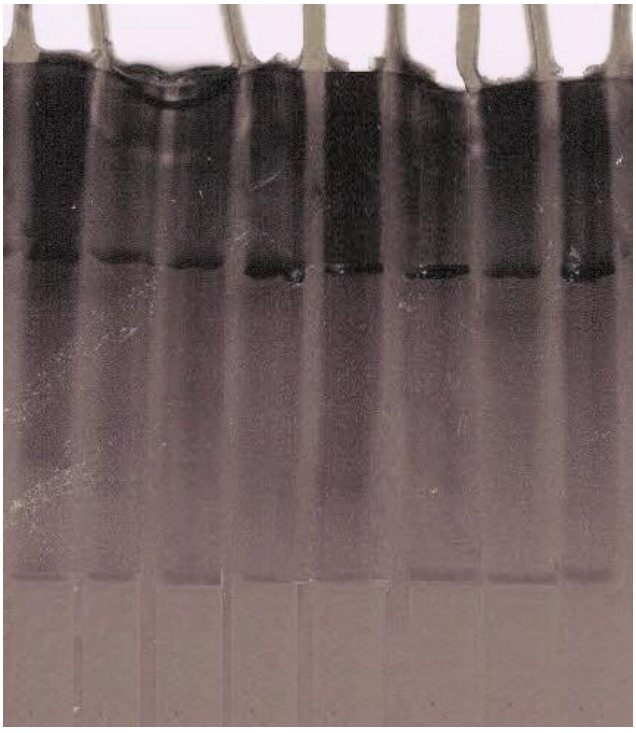
بدین‌وسیله از مسئولان محترم مرکز اصلاح نژاد گوسفند ماکویی به جهت همکاری صمیمانه‌ای که در اخذ نمونه‌های خون داشتند، سپاسگزاری می‌شود.



شکل ۱- نمونه‌های DNA استخراج شده گوسفند ماکویی و تعیین کیفیت شده بر روی ژل آگارز یک درصد



شکل ۲- محصولات PCR (قطعه ۴۵۹ جفت بازی) ژن کاپاکازئین گوسفندان ماکوئی الکتروفورز شده بر روی ژل آگارز ۲٪



شکل ۳- الگوهای یکسان تک شکلی PCR-SSCP مشاهده شده بر روی ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد

منابع

سیاه منصور، م و سعادت نوری، م. (۱۳۸۴). پرورش گوسفند، انتشارات آتا ۴۹۴ صفحه.

رسول‌زاده، م.، ۱۳۸۰. بررسی چندشکلی ژن کاپاکازئین در گاو سیستانی و گاو هلشتاین با استفاده از روش PCR-RFLP. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل. ص ۷۵-۸۰.

میرنظامی ضیابری، ح.، ۱۳۷۵. از شیر چه می‌دانید؟ (شیمی و تکنولوژی شیر). انتشارات مرسا. ص ۱۲-۲۰.

نصیری، م.ر.، ولی زاده، ر.، طهمورث‌پور، م.، جوادمنش، ع و فروتنی، ص.،۱۳۸۹. بررسی وفور ژنوتیپی جایگاه‌های ژنی کالپاستاتین، کالپین و بتالاکتوگلوبولین در گوسفندان نژاد کردی خراسان شمالی. نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران. شماره ۲، ص ۱۶۳-۱۶۹.

Barroso, A., Dunner, S. and Canon, J., 1998. Detection of bovine Kappa - Casein variants A, B, C, and E by means of Polymerase Chain Reaction- Single Strand Conformation Polymorphism (PCR- SSCP). Journal of Animal Science. 76: 1535- 1538.

Bastos, E., Cravador, A., Azevedo, J. and Guedes-Pinto, H., 2001. Single strand conformation polymorphism (SSCP) detection in six genes in Portuguese indigenous sheep breed 'Churra da Terra Quente'. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 5: 7-15.

Benbouza, H., Jacquemin, M., Baudoin, J. and Mergeai, G., 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gel. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 10: 77-81.

Ceriotti, G., Chessa, S., Bolla, P., Budelli, E., Bianchi, L., Duranti, E. and Caroli, A., 2004. Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism. Journal of Dairy Science. 87: 2606-2013.

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

Gregorio, P., Rando, A., Pieragostini, E. and Masina, P., 1991. DNA polymorphism at the casein loci in sheep. Animl Genetics. 22: 21-30.

Lagal, V., Postic, D., Sabljic, E.R. and Baraton, G., 2002. Genetic diversity among Borrelia strains determined by single-strand conformation polymorphism analysis of the ospC gene and its association invasiveness. Journal of Clinical Microbiology. 41: 5059-5065.

Luccia, A., Mauriell, O.R., Chianese, L., Moio, L. and Addeo, F., 1990. Kappa casein polymorphism in Caprine milk. Scienza e tecnica lattiero-casearia. 41: 305-314.

Maddox, J.F., Davies, K.P., Crawford, A.M., Hulme, D.J., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Freking, B.A., Beh, K.J., Cockett, N.E., Kang, N., Riffkin, C.D., Drinkwater, R., Moore, S.S., Dodds, K.G., Lumsden, J.M., Van Stijn, T.C., Phua S.H., Adelson, D.L., Burkin, H.R., Broom, J.E., Buitkamp, J., Cambridge, L., Cushwa, W.T., Gerard, E., Galloway, S.M., Harrison, B., Hawken, R.J., Hiendleder, S., Henry, H.M., Medrano, J.F., Paterson, K.A. and Schibler, L., 2001. An enhanced link linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. Genome Research. 11: 1275–1289.

Moioli, B., Pilla, F. and Tripaldi, C., 1998. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats. Small Ruminant Research. 27: 185-195.

Ordas, J.G., Rando, A., Senese, C. and Masina P., 1997. DNA polymorphisms of casein genes in Spanish dairy sheep. Small Ruminant Research. 26: 9-13.

Piplia, D.l., Joshi, C.G., Brahmkshtri, B.P. and Sonlanki, J.V., 2004. PCR-SSCP typing of MHC in cattle and buffaloes. Indian Journal of Animal Sciences. 74: 637-639.

Prinzenberg, E., Gutscher, K., Chessa, S., Caroli, A. and Erhardt, G., 2005. Caprine k-casein polymorphism: New developments in molecular knowledge. Journal of Dairy Science. 88: 1490-1498.

Prinzenberg, E., Krause, I. and Erhardt, G., 1999. SSCP analysis at the bovine CSN3 locus discriminates six alleles corresponding to known protein variants (A, B, C, E, F, G) and three new DNA polymorphisms (H, I, A1). Animal Biotechnology. 10: 49-62.

Staiger, E., Thonney, M., Buchanan, J., Rogers, E., Oltenacu, p. and Mateescu, R., 2010. Effect of prolactin, β-lactoglobulin, and κ-casein genotype on milk in East Friesian sheep yield. Journal of Dairy Science. 93: 1736-1742.

Sztankoova, Z., Senese, C., Czernekova, V., Dudkova, G., Kott, T., Matlova, V. and Soldat, J., 2005. Genomic analysis of the CSN2 and CSN3 loci in two Czech goat breeds. Animal Science Papers and Reports. 23: 67-70.