نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۳، تابستان ۱۳۹۳
ص‌ص: ۵۵~۶۰

شناسایی چند شکلی نواحی اگزون ۴ و UTR'3 ژن TNFα در گوسفند ماکویی با روش PCR-SSCP

- **پریسا بیابانی**(نویسنده مسئول)
  دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه
- **علی هاشمی**
  استادیار، دانشگاه ارومیه
- **کریم مردانی**
  دانشیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه
- **محمد قادرزاده**
  دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه
- **فاطمه پوربایرامیان**
  دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت : آبان ماه ۹۱ تاریخ پذیرش : فروردین ماه ۹۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۸۶۲۰۴۸۵۹
Email: parisabiabani@yahoo

چکیده:

عامل نکروز تومور آلفا(TNFα) یک سیتوکین پیش التهابی است که در تنظیم پاسخ ایمنی از جمله فعالیت ماکروفاژها و مرگ سلولی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. ژن TNFα به صورت چندشکلی است و هاپلوتیپ های آن با مقاومت یا حساسیت به انواع بیماری در ارتباط هستند. تحقیق حاضر به منظور شناسایی چند شکلی ژنTNFα در گوسفند نژاد ماکویی با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی-مراز(PCR) و تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP) انجام گرفت. برای این منظور از ۹۰ رأس گوسفند ماکویی واقع در مرکز پرورش و اصلاح نژاد ماکو به طور تصادفی نمونه های خون جمع آوری شدند. DNA ژنومی از نمونه های خون استخراج شد و قطعه ای با اندازه ۲۷۳ جفت باز شامل قسمتی از ناحیه اگزون ٤ و ناحیه غیرکد شونده '۳ (UTR '۳) ژن TNFα تکثیر شد. الکتروفورز محصولات PCR براساس روش SSCP، منجر به شناسایی الگوهای نواری متفاوت در جمعیت گوسفندان مورد مطالعه شد. برای این جایگاه از ژن TNFα، سه آلل E، O و R به ترتیب با فراوانیهای ۷۳/۳۳، ۱۷/۷۸ و ۸/۸۹ درصد و سه ژنوتیپ EE، OE و RE به ترتیب با فراوانی های ٤٦/٦٧، ۳۵/۵٦ و ۱۷/۷۷ درصد شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: چند شکلی، گوسفند ماکویی، ژن عامل نکروز تومور آلفا، PCR-SSCP

Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 103 pp: 55-60

Detection of polymorphism in the exon 4 and 3' UTR of TNFα gene in Makoei sheep, using PCR-SSCP

By: P. Biabani, MSc Graduated of Department of Animal Science, Urmia University (Corresponding Author; Tel: +989386204859), A. Hashemi, Assistant Professor of Department of Animal Science, Urmia University, K. Mardani, Associate Professor of Department of Food Hygiene and Quality control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, M. Ghaderzadeh, MSc Graduated of Department of Animal Science, Urmia University and F. Purbayramian, MSc Graduated of Department of Animal Science, Urmia University. , Email: parisabiabani@yahoo.com , Tel.: +989386204859

Received: November 2012 **Accepted: April 2013**

Tumor necrosis factor -alpha (TNFα) is a proinflammatory cytokine that plays critical roles in the regulation of immune responses including macrophages activity and apoptosis. TNFα gene is polymorphic and its haplotypes have been associated with resistance or susceptibility to disease. This study was undertaken to identify the polymorphism of TNFα gene in Makoei sheep, using polymerase chain reaction (PCR) and single strand conformation polymorphism (SSCP) technique. A total number of 90 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 273 bp fragment comprising part of the fourth exon and the 3' untranslated region (3' UTR) of the ovine TNFα gene. PCR products were subjected to SSCP analysis. Based on the obtained SSCP patterns three alleles E, O and R with frequencies of 73.33, 17.78 and 8.89 % and three genotypes EE, OE and RE with frequencies of 46.67, 35.56 and 17.77 % were identified, respectively.

Key words: Polymorphism, Makoei sheep, Tumor necrosis factor alpha gene, PCR-SSCP

مقدمه

گوسفند ماکویی، نژادی دنبه‌دار با اندازه بدن متوسط است. در این نژاد رنگ بدن، سفید با لکه‌های سیاه در اطراف چشم، گوش، پوزه و پا می-باشد که در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی پرورش می‌یابد و محصولات اصلی آن، گوشت و پشم هستند. نژاد ماکویی در مقابل تغییرات جوی تحمل زیادی داشته و از نژادهای مقاوم می‌باشد (صفری، ۱۳۷۱). جمعیت این نژاد تقریباً ۲/۷ میلیون رأس برآورد شده است (Abbasi and Ghafouri, 2011). پیشرفت‌های اخیر در ژنتیک مولکولی فرصت‌هایی را جهت افزایش بهبود کارایی برنامه‌های اصلاح نژادی فراهم آورده است تا از طریق تشخیص نواحی ژنی مرتبط با صفات اقتصادی بتوان انتخاب بر اساس نشانگر را با دقت بالایی انجام داد (Dekkers and Hospital, 2002). از جمله این برنامه‌های اصلاح نژادی افزایش مقاومت ژنتیکی به انواع بیماری‌ها است که برای تحقق این امر، شناسایی ژن‌هایی که باعث ایجاد مقاومت نسبت به بیماری‌ها می‌شوند، امری ضروری است. با بررسی این ژن‌ها و تعیین ارتباط آلل‌های آن با بروز بیماری، می‌توان از طریق تشخیص چند شکلی‌های مرتبط، بیماری را از بدو تولد و یا حتی قبل از تولد تشخیص داد و جهت مقاومت در برابر بیماری اقدام نمود. ژن عامل نکروز تومور آلفا (TNFα) در ناحیه کلاس III در مکان ژنی مجموعه اصلی سازگاری بافتی (MHC) روی کروموزوم ۲۰ گوسفند قرار گرفته است (Dukkipati et al, 2006 b). چندین مطالعه، ارتباط بین MHC و مقاومت یا حساسیت به بیماری در گوسفند را نشان داده‌اند (Dukkipati et al, 2006 a). TNFα، یک سیتوکین القاکننده مرگ سلولی و تنظیم کننده تکثیر لنفوسیت‌ها است و نقش حیاتی در القا، ماندگاری و ایجاد بعضی از پاسخ‌های ایمنی دارد. این فاکتور توسط سلول‌های مختلفی تولید می‌شود اما منبع اصلی آن، ماکروفاژهای فعال شده هستند (Ruuls and Sedgwick, 1999). این پروتئین اولین بار در سال ۱۹۷۵ توسط کارسول در سرم حیوانی که در بدن موجود باعث نکروز تومورها می‌شد، کشف شد (Carswell et al, 1975). ژن کدکننده پروتئین TNFα دارای ۴ اگزون و ۳ اینترون است (Awasthi et al, 2008). گزارش شده است که بیان ژن TNFα

در زمان ابتلا به لوکوز گاوی و بیماری یون در گوسفندان افزایش می-یابد (Kabeya et al, 2001; Smeed et al, 2007). تحقیقات نشان داده است که، فقدان بیان ژن TNFα باعث افزایش ماندگاری عفونت BLV در موش‌ها می‌شود (Mullar et al, 2003). این یافته‌ها به نقش مهمی که پروتئین TNFα در مراحل اولیه حذف عفونت ایفا می‌کند، اشاره دارد. ژن TNFα کاندیدایی برای مقاومت به بیماری در دام محسوب می‌شود و همبستگی بالقوه‌ای بین چندشکلی‌های این ژن و صفات مرتبط با ایمنی در دام‌ها وجوددارد (Shirasun et al, 2011; Szydlowski et al, 2011). در نژادهای مختلف گوسفند اطلاعات کمی در مورد چندشکلی ژن TNFα وجود دارد. ناش و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند که کپی واحدی از ژن TNFα در ژنوم گوسفند وجود دارد. در دهه ۱۹۹۰، ژن TNFα گوسفند توسط سه گروه مختلف تکثیر و توالی‌یابی شد. این توالی‌ها در دو مطالعه، کاملاً مشابه بودند که در آنها ژن TNFα گوسفند، کد کننده یک توالی هدایت‌گر ۷۶ آمینو اسیدی و یک پروتئین بالغ ۱۵۷ آمینو اسیدی بود و این توالی‌ها بالای ۸۸ درصد مشابه پروتئین TNFα انسان بودند (Green and Sargan, 1991; Young et al, 1990). توالی که در سومین مطالعه بدست آمد مشابه دو بررسی قبلی بود، به استثنای اینکه فاقد یک اسید آمینه در توالی هدایت‌گر بود (Nash et al, 1991). در یک مطالعه، چندشکلی ژن TNFα گوسفندان نژادهای Latxa و Rasa با استفاده از روش تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR-SSCP[1]) بررسی شد و سه جهش در ناحیه اگزون ۴ و UTR'3 این ژن گزارش شد. این جهش‌ها در یک حذف و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) با هم اختلاف داشتند و هیچ تفاوتی در توالی آنها در دو نژاد پیدا نشد. این جهش‌ها با TNF*01 (حذف نوکلئوتید ۶۴)، TNF*02 (حذف نوکلئوتیدهای۲۰۲-۲۰۰) و TNF*03 (SNP در نوکلئوتید ۲۴۸) توصیف شده‌اند (Alvarez-Busto et al, 2004). تجزیه SSCP قطعه ژن تکثیر یافته توسط PCR برای ژن TNFα مفید گزارش شده است (Alvarez-Busto et al, 2004). بنابراین برای بررسی تنوع ژنتیکی در ژن TNFα، روش PCR-SSCP مناسب و دقیق به نظر می‌رسد. این روش قادر است تنوع ژنتیکی در حد یک نوکلئوتید را مشخص کند (Goto et al, 2002). تا بحال هیچ گزارشی مبنی بر وجود چندشکلی در ژن TNFα در بین گوسفندان ایران ارائه نشده است. همچنین ناحیه اگزون ۴ و UTR'3ناحیه‌ای است که چندشکلی آن در مطالعات گذشته گزارش شده است (Alvarez-Busto et al, 2004). لذا این تحقیق به منظور شناسایی و بررسی الگوهای مختلف ژنوتیپی در نواحی اگزون ۴ وUTR'3 ژن TNFα با استفاده از روش PCR-SSCP در گوسفند نژاد ماکویی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این تحقیق، نمونه‌های خون از ۹۰ رأس از گوسفندان نژاد ماکویی مرکز اصلاح نژاد و پرورش گوسفند ماکویی در شهرستان ماکو به صورت تصادفی که مخلوطی از هر دو جنس بودند، گرفته شد. خونگیری از ورید وداجی توسط لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انجام گرفت. نمونه‌های خون همراه با یخ به آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون کامل با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی *(Fermentas, EU)* و مطابق دستورالعمل کیت صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید، ارزیابی شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (*Polymerase chain reaction*) با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی پیشنهاد شده توسط آلوارز و همکاران (۲۰۰۴)، یک قطعه ۲۷۳ جفت بازی شامل قسمتی از ناحیه اگزون ۴ و ناحیه UTR'3 ژن TNFα با استفاده از واکنش PCR تکثیر شد که توالی آغازگرها به صورت زیر بود:

ovTNF-C1: 5′-CTGCCGGAATACCTGGACTA-3'

ovTNF-C2: 5'-TCCAGTCCTTGGTGATGGTT-3′

این آغازگرها طبق دستورالعمل کارخانه سازنده با آب دو بار تقطیر رقیق شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۴ میکرولیتر dNTP ۱/۲۵ میلی مولار، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۲۵ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* پلی-مراز و ۴ میکرولیتر از DNA ژنومی انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر با استفاده از یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه و سپس مرحله اصلی تکثیر به تعداد ۳۵ چرخه (واسرشته سازی در

دمای $94^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها $56^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه و دمای تکثیر $72^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه) و یک دمای تکثیر نهایی $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Master cycler (*Eppendrof, Germany*) جهت گسترش زنجیره DNA استفاده شد.

محصولات PCR روی ژل آگارز دو درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲ ساعت الکتروفورز شدند. قطعه تکثیر شده با استفاده از دستگاه ترانس‌لومیناتور مشاهده و عکس‌برداری شد. برای تشخیص قطعات تکثیر شده از نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی (*Cinagen, Iran*) استفاده شد.

روش SSCP (*Single-strand conformation polymorphism*)

برای تجزیه محصولات PCR به روش SSCP، ابتدا محصولات PCR، تک رشته‌ای شدند. برای این منظور ۲ میکرولیتر از محصول PCR با ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری SSCP (شامل فرمامید ۹۵٪، EDTA (PH=8) ۰/۰۲ مولار، بروموفنل‌بلو ۰/۰۵٪ و گزیلن سیانول ۰/۰۵٪) مخلوط شد و به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس نمونه‌ها به سرعت به داخل یخ منتقل شدند تا از به هم چسبیدن دوباره رشته‌های مکمل ممانعت به عمل آید (Pipalia et al, 2004). برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی به ابعاد ۰/۱×۱۸×۲۰ سانتی‌متر و از ژل آکریلامید غیرواسرشته‌ساز ۸ درصد استفاده شد.

نمونه‌ها در ژل آکریلامید با ولتاژ ۲۰۰ ولت و مدت زمان ۳ ساعت در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و با بافر TBE (0.5 X) جهت مشاهده تفاوت موجود در نمونه‌ها الکتروفورز شدند.

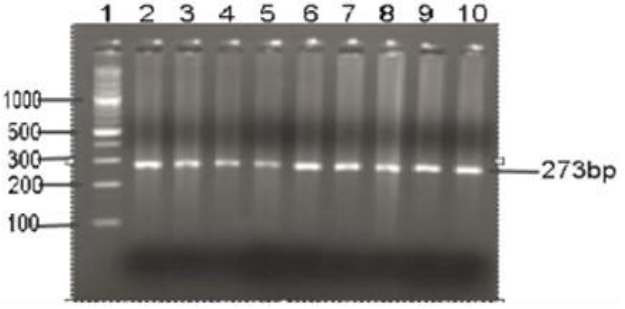
برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد (Benbouza et al, 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، شاخص هتروزیگوسیتی، اندازه مؤثر آللی و آزمون مربع کای از نرم افزار PopGene32 استفاده شد (Yeh et al, 1999) که در آن تعداد آلل‌های مؤثر بر اساس رابطه کیمورا و کراو (Kimura and Crow, 1979) و شاخص هتروزیگوسیتی بر اساس رابطه تنوع ژنی نئی (Nei, 1973) به دست آمدند.

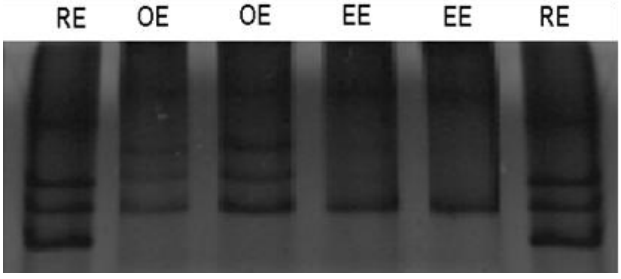
نتایج و بحث

دی ان ای‌های استخراج شده از نظر کمیت و کیفیت یکسان نبودند، طوریکه در بعضی نمونه‌ها نوارهای ضعیف و در برخی دیگر نوارهای قوی و بدون کمترین کشیدگی مشاهده شدند. نمونه‌هایی که نوارهای ضعیفی داشتند، دوباره استخراج شدند. در مرحله بعد، نتایج جذب نوری نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر، کمیت و کیفیت مناسب دی ان ای های استخراجی را تصدیق کرد زیرا نسبت A260/A280 بین ۱/۸ تا ۲ بود و در نتیجه خلوص DNA بالا بوده و فاقد RNA یا پروتئین بودند. بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به منظور اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده (۲۷۳ bp)، از ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱- محصولات PCR بارگذاری شده بر روی ژل آگارز دو درصد.
چاهک ۱ نشانگر مولکولی 100 bp(سیناژن، ایران)،
چاهک های ۱۰- ۲ محصولات PCR (قطعه ۲۷۳ جفت بازی) ژن TNFα.

لازم به ذکر است که صحت توالی آغازگرهای مورد استفاده، با استفاده از نرم افزار *Amplifx* مورد تأیید قرار گرفت. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، فقط یک نوار bp ۲۷۳ و بدون نوار اضافی به دست آمد که حاکی از اختصاصی بودن آغازگرها است. تکثیر اختصاصی قطعات در روش SSCP بسیار حائز اهمیت است زیرا وجود نوارهای غیراختصاصی بر روی ژل باعث اشتباه در تفسیر نتایج می‌شود. تجزیه و تحلیل نوارهای حاصل از الکتروفورز با ژل آکریلامید غیر واسرشته‌ساز ۸ درصد و رنگ‌آمیزی با نیترات‌نقره با استفاده از روش SSCP، منجر به شناسایی سه الگوی نواری متفاوت در جمعیت مورد مطالعه گردید (شکل ۲).



شکل ۲ – الگو های مختلف SSCP مشاهده شده ژن TNFα در گوسفندان ماکویی بر روی ژل آکریلامید ۸ درصد

ملاک تشخیص و نحوه نامگذاری و تعیین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نتایج مطالعه آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد زیرا در این مطالعه، محل و جایگاه جهش مشخص شده و الگوهای باندی متفاوت، توالی‌یابی شده بودند. در این تحقیق، ۳ ژنوتیپ و ۳ آلل شناسایی شدند. فراوانی ژنوتیپ‌های EE، OE و RE به ترتیب ۴۶/۶۷، ۳۵/۵۶ و ۱۷/۷۷ درصد و فراوانی آلل‌های E، O و R به ترتیب ۷۳/۳۳، ۱۷/۷۸ و ۸/۸۹ درصد محاسبه شد (جدول۱). نتایج به دست آمده نشان داد که آلل E و R به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فراوانی آللی و ژنوتیپ EE و RE به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فراوانی ژنوتیپی بودند. آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) سه جهش را در ناحیه اگزون ۴ و UTR'3 ژن TNFα بر روی ۱۱۱ رأس از گوسفندان نژادهای Latxa و Rasa گزارش کردند که منجر به شناسایی ۵ نوع ژنوتیپ OO, RR, OR, OE و RE و ۳ آلل O، R و E برای این ناحیه شد. نتایجی که از مطالعه حاضر به دست آمد تقریباً مشابه نتایجی بود که آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) ارائه داده بودند به طوریکه در این مطالعه نیز ۳ آلل O، R و E شناسایی شد ولی ۳ ژنوتیپ به دست آمد که دو ژنوتیپ RE و OE مشابه نتایج آنها ولی ژنوتیپ EE متفاوت از نتایج آنها بود. این تفاوت در نوع و تعداد ژنوتیپ‌ها ممکن است اولاً مربوط به تفاوت در پتانسیل ژنتیکی نوع نژادهای مورد مطالعه باشد و ثانیاً مربوط به کوچک بودن تعداد نمونه گرفته شده از جمعیت گوسفندان ماکویی در مطالعه حاضر باشد. البته از آنجایی که هیچ گونه تحقیقی غیر از مطالعه آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) در گوسفند به شکل فوق گزارش نشده است، نمی‌توان مقایسات خوبی در این مورد انجام داد.

آزمون مربع کای انجام شده بر روی گله، عدم برقراری تعادل هاردی-واینبرگ را از لحاظ ژن TNFα نشان داد ($P<0.05$) که مخالف نتیجه آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) بود. عدم تعادل مشاهده شده در گله گوسفند ماکویی می‌تواند به دلیل تعداد نسبتاً کم نمونه‌های مورد بررسی و وجود عوامل برهم زننده تعادل، نظیر انتخاب به دلیل اجرای برنامه‌های اصلاحی در جمعیت مورد بررسی باشد.

یکی از خصوصیات نشانگر مولکولی، تعداد آلل مؤثر است. در گوسفند ماکویی در جایگاه مورد مطالعه از ژن TNFα، تعداد آلل واقعی (Na) برابر ۳ و تعداد آلل مؤثر (Ne) برابر ۱/۷۳ محاسبه شد که نزدیکی مقادیر این دو عدد به همدیگر می‌تواند نشان دهنده کارایی خوب آلل‌ها در ایجاد چندشکلی و تنوع ژنتیکی بالا باشد. هتروزیگوسیتی موردانتظار در این تحقیق ۰/۴۲۵۱ محاسبه شد (جدول۲) که پایین‌تر از نتایج گزارش شده توسط آلوارز و همکاران (۲۰۰۴) (به ترتیب ۰/۴۸۰ و ۰/۵۱۹ برای گوسفندان Latxa و Rasa) بود. شاخص نئی، متوسط هتروزیگوسیتی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و شاخص شانون به ترتیب برابر ۰/۴۲۲۷، ۰/۴۲۲۷، ۰/۵۳۳۳ و ۰/۷۴۹۷ برآورد شد که حاکی از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای این جمعیت از نظر ژن TNFα می‌باشد. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی، با تلفیق نتایج این پژوهش و مطالعه نژادهایی که رکوردها و اطلاعات فنوتیپی آنها در دسترس است، ارتباط بین آلل‌های موجود در جایگاه مورد بررسی، با صفات اقتصادی و میزان مقاومت به بیماری‌ها در دام‌ها ارزیابی شود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقای مهندس شجاع جعفری مسئول محترم مرکز پرورش و اصلاح‌نژاد گوسفند ماکویی و از آقای مهندس سیاحی مسئول محترم آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه به پاس زحماتشان تشکر و قدردانی می‌شود.

جدول ۱- فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی و آزمون مربع کای مشاهده‌شده برای ژن TNFα در گوسفندان ماکویی. خطای استاندارد فراوانی‌ها: ۰/۰۲۸

χ^2	فراوانی آلل‌ها (٪)			فراوانی ژنوتیپ‌ها (٪)		
	R	O	E	RE	OE	EE
۱۱/۶۱*	۸/۸۹	۱۷/۷۸	۷۳/۳۳	۱۷/۷۷	۳۵/۵۶	۴۶/۶۷

* : معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

جدول ۲- تنوع درون‌جمعیتی برای ژن TNFα در گوسفندان ماکویی

شاخص شانون	هموزیگوسیتی مشاهده‌شده	هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده	هموزیگوسیتی موردانتظار	هتروزیگوسیتی موردانتظار	هتروزیگوسیتی Nei	متوسط هتروزیگوسیتی
۰/۷۴۹۷	۰/۴۶۶۷	۰/۵۳۳۳	۰/۵۷۴۹	۰/۴۲۵۱	۰/۴۲۲۷	۰/۴۲۲۷

منابع

۱- صفری، الف. (۱۳۷۱). گزارش شناسایی گوسفند اکوتیپ ماکویی. اداره دامپروری، جهاد سازندگی استان آذربایجان‌غربی.

2- Abbasi, M.A. and Ghafouri-Kesbi, F. (2011). Genetic co (variance) components for body weight and body measurements in Makooei sheep. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, Vol, 24, No, 4. pp: 739-743.

3- Alvarez-Busto, J. Ruiz-Nunez, A. Mazon, L.I. and Jugo, B.M. (2004). Detection of polymorphisms in tumour necrosis factor alpha candidate gene in sheep. *European Journal of Immunogenetics*, Vol, 31, No, 4. pp: 155-158.

4- Awasthi, G. Singh, S. Dash, A.P. and Das, A. (2008). Genetic characterization and evolutionary inference of TNF-α through computational analysis. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*,Vol, 12, No, 5. pp: 374-379.

5- 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*, Vol, 10, No, 2. pp: 77-81.

6- Carswell, E.A. Old, L.J. Kassel, R.L. Green, S. Fiore, N. and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol, 72, No, 9. pp: 3666-3670.

7- Dekkers, J.C.M. and Hospital, F. (2002). The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. *Nature Reviews Genetics*, Vol, 3, No, 1. pp:22–32.

8- Dukkipati, V.S.R. Blair, H.T. Garrick, D.J. and Murray, A. (2006a). 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Role in genetic resistance to diseases. *New Zealand Veterinary Journal*, Vol, 54, No, 4. pp: 153- 160.

9- Dukkipati, V.S.R. Blair, H.T. Garrick, D.J. and Murray, A. (2006b). 'Ovar-Mhc' - ovine major histocompatibility complex: Structure and gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Research*, Vol, 5, No, 4. pp: 581-608.

10- Goto, R.M. Afanassieff, M. Ha, J. Iglesias, G.M. Ewald, S.J. Briles, W.E. et al. (2002) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. *Poultry Science*, Vol, 81, No, 5. pp: 1832-1841.

11- Green, I.R. and Sargan, D.R. (1991). Sequence of the cDNA encoding ovine tumor necrosis factor-alpha: problems with cloning by inverse PCR. *Gene*, Vol, 109, No, 2. pp: 203-210.

12- Kabeya, H. Ohashi, K. and Onuma, M. (2001). Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, Vol, 63, No, 7, pp: 703-708.

13- Kimura, M. and Crow, J. (1979). The number of alleles that can be maintained in a finite Population. *Genetics*, Vol, 49, No 46, pp: 725-738.

14- Mullar, C. Coffey, T.J. Koss, M. Teifke, J.P. Langhans, W. and Werling, D. (2003). Lack of TNF alpha supports persistence of a plasmid encoding the bovine leukemia virus in TNFα mice. *Veterinary Immunology Immunopathology*, Vol, 92, No, 2. pp: 15-22.

15- Nash, A.D. Barcham, G.J. Brandon, M.R. and Andrews, A.E. (1991). Molecular cloning, expression and characterization of ovine TNFα. *Immunology Cell Biology*, Vol, 69, No, 4. pp: 273-283.

16- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol, 70, No, 12. pp: 3321-3323.

17- Pipalia, 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*,Vol, 74, No, 6. pp: 637-639.

18- Ruuls, S.R. and Sedgwick, J.D. (1999). Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *American Journal of Human Genetic*, Vol, 65, No, 3. pp: 294-301.

19- Shirasuna, K. Kawashima, C. Murayama, C. Aoki, Y. Masuda, Y. Kida, K. et al. (2011). Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. *The Journal of Reproduction and Development*, Vol, 57, No, 1. pp: 135-142.

20- Smeed, J.A. Watkins, C.A. Rhind, S.M. and Hopkins, J. (2007). Differential cytokine gene expression profiles in the three pathological forms of sheep paratuberculosis. *BMC Veterinary Research*,Vol, 3, No, 18. pp: 1-11.

21- Szydlowski, M. Buszka, A. Mackowski, M. Lechniak, D. Switonski, M. (2011). Polymorphism of genes encoding cytokines IL6 and TNF is associated with pig fatness. *Livestock Science*. Vol, 136: pp:150–156.

22- Yeh, F.C. Boyle, T. and Yang, R. (1999). *POPGENE version 1.31*. Microsoft window based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Canada.

23- Young, A.J. Hay, J.B. and Chan, J.Y. (1990). Primary structure of ovine tumor necrosis factor alpha cDNA. *Nucleic Acids Research*, Vol, 18, No, 22. p: 6723