

## مقایسه چند شکلی ژن کالپاستاتین به روش PCR-SSCP در گوسفندان قزل و گاوهای سرابی

آیدین مهدوی ممقانی<sup>۱</sup>، جلیل شجاع<sup>۲</sup>، نصرالله پیرانی<sup>۲\*</sup> و قربان الیاسی<sup>۳</sup>

تاریخ پذیرش: 87/10/28

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

3- مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی، استان آذربایجان شرقی

\*مسئول مکاتبه E-mail: [npirany@gmail.com](mailto:npirany@gmail.com)

### چکیده

تردیی گوشت یکی از صفات مهم در صنعت تولید گوشت و یکی از خصوصیات مهم از نظر مصرف کنندگان می باشد. کالپاستاتین به عنوان یکی از ژنهای شاخص در تعیین کیفیت گوشت و رشد حیوانات می باشد. در این پژوهش از تعداد 200 رأس گوسفند نر و ماده قزل گله های واقع در منطقه میاندواب و 50 رأس گاوهای سرابی واقع در منطقه سراب به طور تصادفی خونگیری به عمل آمد. بعد از استخراج DNA، تکثیر قطعه 622 جفت بازی از اگزون 1 ژن کالپاستاتین با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی انجام گرفت. برای مشاهده چند شکلی فضایی تک رشته ای (SSCP) محصولات PCR از ژل آکرلامید 8% و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید. در گوسفندان قزل سه آلل a، b و c به ترتیب با فراوانی 0/62، 0/35 و 0/03 مشاهده گردید. نتایج نشان داد که تعادل هاردی - واینبرگ در جمعیت مورد مطالعه برای گوسفندان قزل وجود ندارد ( $P < 0/05$ ). در جمعیت گاوهای سرابی نیز سه آلل a، b و c به ترتیب با فراوانی های 0/70، 0/26 و 0/04 مشاهده شدند که این جمعیت در تعادل هاردی - واینبرگ بود. تنوع ژنتیکی در گوسفندان قزل و گاوهای سرابی برای جایگاه کالپاستاتین به ترتیب 49% و 44% به دست آمد. بنابراین نتایج نشان داد که می توان از تکنیک SSCP برای شناسایی تنوع ژنتیکی و همچنین به عنوان یک ابزار مفید در برنامه های انتخاب بر اساس مارکرها استفاده نمود.

واژه های کلیدی: چند شکلی، کالپاستاتین، گاو سرابی، گوسفند قزل، PCR-SSCP

## PCR-SSCP Comparison of the Calpastatin Gene Polymorphism in Iranian Ghezel Sheep and Sarabi Cows

A Mahdavi Mamaghani<sup>1</sup>, J Shodja<sup>2</sup>, N Pirany<sup>2\*</sup> and G Elyasi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Former MSc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

<sup>3</sup>Researcher, East Azarbaiejan, Agricultural and Natural Center, Tabriz

### Abstract

Tenderness is one of the important characteristics of meat and desired to consumers. Calpastatin is to be known one of the genes which affecting meat quality and growth of animals. For this study, the blood samples of 200 Ghezel sheep and 50 Sarabi cows were randomly collected from

Miandoab and Sarab cities respectively. After extracting of genomic DNA, exon 1 of calpastatin gene with 622 bp was amplified with specific primers. The SSCP technique was used for detecting the PCR products using 8% polyacrilamid gel and silver staining method. Gene frequencies for a, b and c alleles in Ghezel sheep were 0.62, 0.35 and 0.03 respectively. Comparison of allele frequencies indicated that Ghezel population was not in Hardy-Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ). Gene frequencies for a, b and c alleles in Sarabi cows were 0.70, 0.26 and 0.04 respectively but allele frequency in Sarabi cows were in Hardy-Weinberg equilibrium. Gene diversity (Heterozygosity) for Ghezel sheep and Sarabi cows were 49% and 44% respectively. Therefore, the results confirmed that SSCP technique can be used to identify different genotypic variation in these breeds and is a useful tool for selection programs based on marker-assisted selection.

**Keywords:** Calpastatin, Ghezel sheep, Heterozygosity, PCR-SSCP, Sarabi cows

#### مقدمه

بالایی دارد ( $h^2 = 0.65 \pm 0.19$ ) بنابراین امکان حصول پاسخ ژنتیکی سریع در انتخاب بر علیه فعالیت کالپاستاتین وجود دارد و انتخاب بر علیه فعالیت این ژن می تواند منجر به بهبود صفت تردی گوشت حیوانات شود (شکل‌فورد و همکاران 1994).

نتایج مطالعات انجام شده بر روی گوسفندان نژاد دورست داون و کاپ ورث به منظور تعیین ارتباط مابین صفت تردی گوشت و تنوع ژنتیکی کالپاستاتین نشان داده است که کالپاستاتین در سیستم SSCP دارای سه آلل a, b و c می باشد و گوسفندان با ژنوتیپ ac در مقایسه با ژنوتیپ aa وزن زنده بیشتری به میزان 12-17 درصد ( $P < 0/05$ ) و همچنین وزن لاشه بیشتری به میزان 15-18 درصد ( $P < 0/05$ ) داشتند. در این مطالعه همچنین نیروی لازم برای بریدن 20 کیلو گرم گوشت<sup>2</sup> برای ژنوتیپ ac در مقایسه با ژنوتیپ aa, 4-12 درصد ( $P < 0/05$ ) بیشتر بود و ژنوتیپهای واجد آلل c به طور معنی داری از رشد بیشتر و کیفیت گوشت بالاتری برخوردار بودند (پالمر و همکاران 1999). در مطالعه دیگری (مهدوی و همکاران

کالپاستاتین به همراه کالپین خانواده ای از پروتئازهای وابسته به کلسیم می باشند که نقش مهمی در رشد حیوانات زنده و همچنین تردی گوشت پس از کشتار دارند (چانگ و همکاران 2002). کالپاستاتین به طول 100 کیلو جفت باز بر روی کروموزوم شماره 5 گوسفند و کروموزوم شماره 7 گاو قرار دارد و جزء ژنهای خانه دار<sup>1</sup> می باشد. انتهای 5' پرموتور این ژن غنی از GC است و جعبه TATA ندارد (هونگ و همکاران 1994). سیستم کالپین - کالپاستاتین در فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی درگیر می باشد. در این سیستم کالپینها با تجزیه میوفیبریلهای ماهیچه نقش مهمی در تردی گوشت پس از کشتار دارند و فعالیت این آنزیمها در سلول توسط کلسیم و کالپاستاتین کنترل می شود (سنسکی و همکاران 2000). کاربرد ژنتیک مولکولی برای مطالعه صفت تردی گوشت در گوسفند، ژن کالپاستاتین را به عنوان یک ژن شاخص برای این صفت معرفی کرده است (پالمر و همکاران 1997). فعالیت کالپاستاتین وراثت پذیری

<sup>2</sup>Share force value

<sup>1</sup>House keeping

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه چند شکلی جایگاه کالپاستاتین، فراوانی آللی و ژنوتیپی این ژن در گوسفندان قزل و گاوهای سرابی بود.

#### مواد و روش ها

##### نمونه برداری

نمونه های خون از 200 رأس گوسفند قزل از گله های قزل منطقه میانداوب و 45 رأس گاو سرابی از منطقه سراب به طور تصادفی جمع آوری شدند. به منظور جلوگیری از لخته شدن خون، هر کدام از لوله ها حاوی 0/5 میلی لیتر EDTA، 13/6% بودند.

#### استخراج DNA

استخراج DNA از 2 میلی لیتر خون کامل و به کمک روش استخراج نمکی اصلاح شده انجام گرفت (میلر و همکاران 1998). کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از ژل آگارز 0/8% و غلظت آن با اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد.

#### تکنیک PCR

برای تکثیر منطقه L از اولین دامنه تکراری ژن کالپاستاتین به طول 622 جفت باز از یک جفت آغازگر به شرح زیر که بر اساس توالی ژن کالپاستاتین گوسفند و گاو طراحی شده بود استفاده شد (کولینقوود و همکاران 1992).

CAST1C:

5'-TGGGGCCCAATGACGCCATCGATG-3'

CAST1D:

5'-GGTGGAGCAGCACTTCTGATCACC-3'

حجم نهایی واکنش PCR 10 میکرولیتر بود که

شامل دو میکرولیتر DNA استخراج شده با غلظت 5

نانوگرم، 0/8 میکرولیتر مخلوط آغازگرها با غلظت 10

پیکومول بر میکرولیتر، 5/8 میکرولیتر آب دو بار تقطیر و

1/28 میکرولیتر مخلوط واکنش<sup>3</sup> بود. برای تکثیر قطعه

(1387) اثر ژنوتیپ بر افزایش وزن بره های نژاد قزل از تولد تا 6 ماهگی معنی دار بوده است ( $P < 0/05$ ).

فعالیت ژن کالپاستاتین بین نژادهای مختلف گاو نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در این آزمایشات ژن کالپاستاتین به دست آمده از ژنوم گاو های جنس بوس تاروس<sup>1</sup> و بوس ایندیکوس<sup>2</sup> مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج به دست آمده نشان داده است که تنوع در فعالیت ژن کالپاستاتین عامل اصلی اختلاف در تردی گوشت است و گوشت نژاد بوس تاروس تردتر از نژاد بوس ایندیکوس می باشد (کاوالو و فلومینهان 2002).

چند شکلی ژن کالپاستاتین در گاوهای نژاد آنگوس و ارتباط آن با صفت رشد نیز مطالعه شده است. در آن مطالعه ژنوتیپهای به دست آمده برای ژن کالپاستاتین، بر وزن 28، 42، 56 و 140 روزگی تأثیر معنی داری داشتند اما اثری بر وزن تولد نداشتند (چانگ و همکاران 2002).

بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین در اگزون 1 این ژن به منظور تعیین ارتباط آن با صفت رشد روزانه در گوسفندان نژاد کردی با روش PCR-SSCP منجر به شناسایی 3 ژنوتیپ aa، ab، ac به ترتیب با فراوانی های 0/55، 0/32 و 0/13 شده است و میانگین حداقل مربعات ژنوتیپ ab (215/22 گرم) به طور معنی داری ( $P < 0/05$ ) بیشتر از ژنوتیپهای aa (204/88 گرم) و ac (17/62 گرم) بود (نصیری و همکاران 2006).

چند شکلی ژن کالپاستاتین در اگزون 1 این ژن در گوسفندان نژاد قره گل با روش PCR-RFLP و با آنزیم برشی MspI نیز مورد بررسی قرار گرفته است و دو آلل M و N به ترتیب با فراوانی 0/79 و 0/21 شناسایی شده است و همچنین متوسط هتروزیگوسیتی برای این جایگاه در نژاد قره گل 33% گزارش شده است (افتخاری شاهرودی و همکاران 2006).

<sup>3</sup>Master mix

<sup>1</sup>Bos taurus

<sup>2</sup>Bos indicus

### آنالیز آماری

هتروزیگوسیتی مشاهده شده که یکی از معیارهای ساده اندازه گیری تنوع ژنتیکی در جامعه می باشد بیانگر فراوانی مشاهده شده افراد هتروزیگوت است. در این تحقیق برای محاسبه هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای یک لوکوس از فرمول زیر استفاده شد که  $\pi_{uv}$  تعداد هتروزیگوت ها و  $n$  اندازه نمونه می باشد (هارلت و همکاران 1989):

$$H = \sum_u \sum_{u \neq v} n_{uv} / n$$

برای بررسی وجود تعادل هاردی- واینبرگ، تعیین فراوانی آلی و محاسبه شاخص هتروزیگوسیتی از نرم افزار Popgen32 استفاده شد (یه و همکاران 1999).

### نتایج و بحث

نتیجه الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای پلی مرز بر روی ژل آگارز صحت قطعه 622 جفت بازی تکثیر شده از ژن کالپاستاتین گوسفند قزل و گاو سرابی را توسط نشانگر وزنی M100 مورد تأیید قرار داد (شکل 1). نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آکرلامید برای گوسفند قزل نشان داد که جایگاه ژن کالپاستاتین در گوسفند قزل حالت چند شکلی از خود نشان می دهد که منجر به شناسایی سه آلل a، b و c به ترتیب با فراوانی 0/62، 0/35 و 0/03 شد (شکل 2).

در این مطالعه بیشترین فراوانی آلی در گوسفندان قزل و گاوهای سرابی برای آلل a به ترتیب با فراوانی 62% و 70% و کمترین فراوانی آلی برای آلل c به ترتیب با فراوانی 3% و 4% به دست آمد (جدول 1). نتایج مشابهی نیز در گوسفندان نژاد دورست داون و کاپ ورث برای این جایگاه ژنی گزارش شده است. در آن تحقیق بیشترین فراوانی آلی برای آلل a در نژاد دورست داون و کاپ ورث به ترتیب با فراوانی 69% و 46% گزارش شده است. در آن نژادها کمترین فراوانی آلی نیز برای آلل c به ترتیب با فراوانی 13% و 27% به دست آمده است

مورد نظر از دستگاه ترموسایکلر مدل UNO II شرکت Biometra استفاده شد. برنامه حرارتی شامل 35 چرخه با دمای واسرشت اولیه 95 درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، دمای واسرشت 95 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، دمای اتصال 62 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه، دمای تکثیر 72 درجه سانتی گراد به مدت 2 دقیقه و دمای تکثیر نهایی 72 درجه سانتی گراد به مدت 7 دقیقه بود.

برای تعیین اندازه قطعه به دست آمده از مرحله تکثیر، 5 میکرولیتر از محصول PCR با 1 میکرولیتر بافر بارگذاری (6X) مخلوط شد و با نشانگر وزنی M100 با ولتاژ 80 ولت و به مدت 1 ساعت بر روی ژل آگارز 1/2 درصد الکتروفورز شدند.

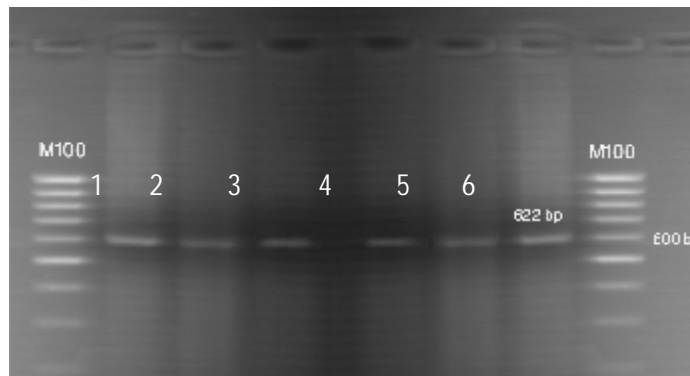
### چند شکلی ساختاری رشته های منفرد

برای انجام SSCP دو میکرولیتر از محصول PCR با 6 میکرولیتر بافر بارگذاری<sup>1</sup> SSCP مخلوط گردید. برای واسرشته کردن رشته ها، نمونه ها به مدت 10 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی گراد در دستگاه PCR قرار داده شدند. سپس نمونه ها به مدت 10 دقیقه در داخل یخ قرار گرفتند تا از اتصال مجدد رشته های مکمل ممانعت شود. برای مشاهده ژنوتیپها از دستگاه الکتروفورز عمودی به ابعاد 18 × 20 × 0/1 سانتی متر و از ژل آکرلامید غیر واسرشته ساز 8% استفاده شد. برای این منظور 4 میکرولیتر از مخلوط محصول PCR با بافر بار گذاری SSCP در داخل هر کدام از چاهک ها ریخته شد و با ولتاژ 53 ولت و به مدت 23 ساعت در دمای 18 درجه سانتی گراد و با بافر TAE (IX)، الکتروفورز شدند. برای مشاهده ژنوتیپها از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد (باسام و همکاران 1991).

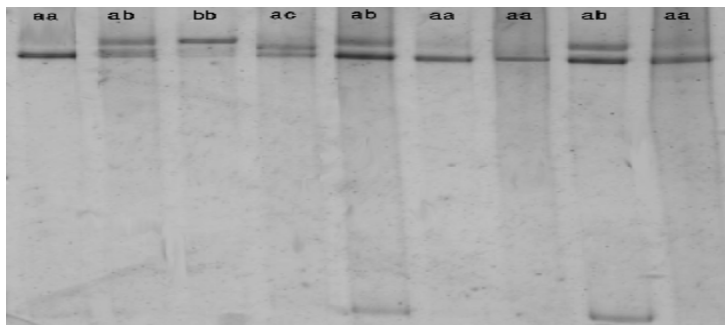
<sup>1</sup> ترکیب بافر بارگذاری SSCP: شامل فرمامید 95%، سود سوزآور 10 میلی مولار، برومو فنل بلو 0/05%، زایلن سیانل 0/05%.

جدول 2 آورده شده است. نتایج این مطالعه با نتایج پالمر و همکاران (1997) که شش ژنوتیپ مشاهده کرده بودند مطابقت نداشت. طهمورث پور و همکاران (1384) ژنوتیپ bb را در گوسفند بلوچی مشاهده نکردند ولی در گوسفندان قزل این ژنوتیپ با فراوانی 0/1 مشاهده شده است. این تفاوتها می‌تواند در نتیجه عوامل مختلفی چون تفاوت‌های نژادی و تعداد دام مورد مطالعه باشد.

(روبرت و همکاران 1996). طهمورث پور و همکاران (1384) نتایج مشابهی برای این جایگاه ژنی در گوسفندان بلوچی گزارش کرده اند. آنها بیشترین فراوانی آلی را برای آلل a و کمترین را برای آلل c به ترتیب با فراوانی 70% و 22% گزارش نموده اند. از میان شش ژنوتیپ مورد انتظار در جمعیت گوسفندان قزل، تنها چهار ژنوتیپ aa، ab، ac و bb مشاهده شدند. تعداد، فراوانی و آزمون کای مربع در



شکل 1- الکتروفورز محصولات PCR گوسفندان قزل و گاوهای سرابی با نشانگر وزنی (چاهک‌های 1-3 مربوط به گوسفند قزل و چاهک‌های 4-6 مربوط به گاو سرابی می‌باشد)



شکل 2 - ژنوتیپ‌های به دست آمده برای ژن کالپاستاتین در گوسفندان قزل با تکنیک PCR-SSCP

جدول 1- فراوانی آلی و هتروزیگوسیتی در جایگاه ژنی کالپاستاتین در گوسفندان قزل و گاوهای سرابی

فراوانی			هتروزیگوسیتی	هتروزیگوسیتی	نوع و نژاد دام
a	b	c	مورد انتظار Nei	مشاهده شده	
0/62	0/35	0/03	0/49	0/67	گوسفند قزل
0/70	0/26	0/04	0/44	0/48	گاو سرابی

جدول 2 - تعداد و فراوانی ژنوتیپهای ژن کالپاستاتین و نتایج آزمون کای مربع در گوسفندان قزل

ژنوتیپ	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	$\chi^2$	فراوانی
aa	57	77	5/19	0/39
bb	9	24	9/37	0/13
cc	0	1	1	0/00
ab	121	87	13/28	0/44
ac	13	7	5/14	0/04
bc	0	4	4	0/00
جمع	200	200	37/98*	1

\* معنی دار در سطح احتمال کمتر از 0/05

مربع برای ژنوتیپهای این جایگاه ژنی در جدول 3 آورده شده است.

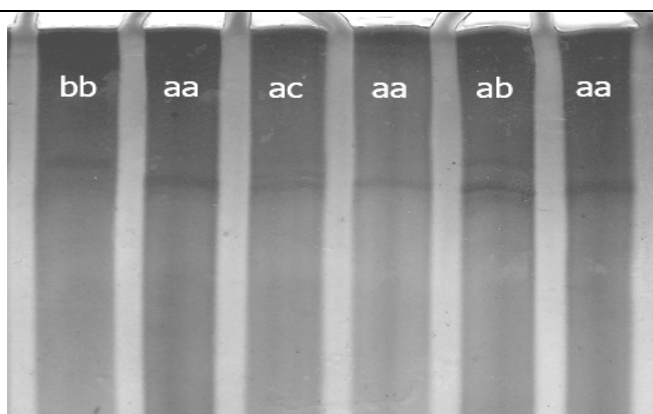
نتایج به دست آمده در جمعیت گاوهای سرابی همچنین نشان داد که آلل a بالاترین فراوانی (0/70) و آلل c کمترین فراوانی (0/04) را در این نژاد دارد که با نتایج مطالعات قبلی در گاوهای آنگوس و نژادهای مختلف گاو شیری مطابقت داشت (چانگ و همکاران 2002). نتایج به دست آمده نشان داد که جمعیت گاوهای سرابی مورد مطالعه در تعادل هاردی - واینبرگ قرار دارد. لذا می توان نتیجه گرفت که در این جمعیت هیچگونه انتخاب مستقیم و یا غیر مستقیم برای این جایگاه صورت نگرفته است.

فراوانی آللی و شاخصهای مرتبط با هتروزیگوسیتی برای جایگاه ژنی کالپاستاتین در گاوهای سرابی نیز در جدول 1 نشان داده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که چند شکلی ژنتیکی در حیوانات مورد مطالعه در جایگاه ژنی کالپاستاتین وجود دارد و تنوع ژنتیکی آن بالا می باشد و تکنیک PCR-SSCP یک روش مفید در شناسایی تنوع ژنتیکی بوده و می تواند به عنوان نشانگری مؤثر در برنامه های انتخاب بر اساس نشانگرها به کار گرفته شود.

نتایج به دست آمده نشان می دهد که جمعیت مورد مطالعه برای گوسفندان قزل در تعادل هاردی - واینبرگ قرار ندارد (جدول 2) و این امر ممکن است بدلیل انجام انتخاب برای ژن کالپاستاتین در گله مورد نظر باشد.

هتروزیگوسیتی مورد انتظار برای جایگاه ژنی کالپاستاتین در گوسفند قزل سطح بالاتری (0/49) در مقایسه با گوسفند بلوچی (0/48) در مطالعه طهمورث پور و همکاران (1384) داشت. در صورتی که میزان تنوع ژنتیکی همین ژن در گوسفندان نژاد مغانی که به روش RFLP مطالعه شده بود نیز در حد متوسط (0/49) گزارش شده است (ترابی و همکاران 1387). بنابراین می توان اظهار کرد که جایگاه ژنی کالپاستاتین در نژاد قزل از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است که دلیل این امر می تواند بکارگیری روشهای اصلاحی اعمال شده باشد. به عنوان مثال در این ایستگاه تعداد زیادی حیوان ماده به ازای هر قوچ در نظر گرفته می شود.

نتایج حاصل از الکتروفورز ژل آکرلامید برای گاو سرابی حالت چند شکلی از خود نشان داد که منجر به شناسایی سه آلل a، b و c با فراوانی به ترتیب 0/70، 0/26 و 0/04 شد (شکل 3). از بین شش ژنوتیپ مورد انتظار در جمعیت گاوهای سرابی، چهار ژنوتیپ aa، ab، bb و ac مشاهده شدند. تعداد، فراوانی و آزمون کای



شکل 3 - ژنوتیپ‌های به دست آمده برای ژن کالپاستاتین در گاوهای سرابی با تکنیک PCR-SSCP

جدول 3 - تعداد و فراوانی ژنوتیپ‌های ژن کالپاستاتین و نتایج آزمون کای مربع در گاوهای سرابی

ژنوتیپ	تعداد مشاهده شده	تعداد مورد انتظار	$X^2$	فراوانی
aa	20	22	0/18	0/49
bb	3	3	0	0/07
cc	0	1	1	0/00
ab	18	16	0/25	0/36
ac	4	2	2	0/05
bc	0	1	1	0/02
جمع	45	45	4/43*	1

\* معنی‌دار در سطح احتمال کمتر از 0/05

#### تشکر و قدردانی

مدیریت محترم مرکز اصلاح نژاد گاو سرابی در تهیه نمونه‌های این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

بدین وسیله از مساعدت و همکاری‌های مدیریت محترم مرکز اصلاح نژاد گوسفند قزل میاندواب و

#### منابع مورد استفاده

- ترابی ا، شجاع ج، پیرانی ن، الیاسی زرین قبایی ق و ولی زاده م، 1387. بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین در گوسفندان نژاد مغانی با استفاده از روش PCR-RFLP. دانش کشاورزی، جلد 18، شماره 2، صفحه‌های 119-127.
- طهمورث پور م، ولی زاده ر، افتخاری شاهرودی ف و نصیری م، 1384. بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. مجله علوم و صنایع کشاورزی، جلد 20، شماره 5. صفحه‌های 47 تا 53.
- مهدوی آ، شجاع ج، پیرانی ن و شیخلو م، 1387. بررسی چند شکلی ژن کالپاستاتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند قزل. دانش کشاورزی، جلد 18، شماره 4، صفحه‌های 163-170.

- Bassam BJ, Anolles CG and Gresshoff PA, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamid gels. *Anal. Biochem.* 19: 680-830.
- Cavalho FAN and Fluminhan A, 2002. Study of the gene CAST in controlled studies of the bovine breeds: Nelore (*Bos indicus*), Simental (*Bos taurus*) and Simbrasil crossbreed. *Plant, Animal & Genomes X Conference*, January 12-16, Brazil.
- Chung HY, Kim CD, Cho CY, Yeon SH, Jin HJ, Joen KJ, Kim HC, Lee HJ, Hines HC and Davis ME, 2002. Effect of calpastatin gene on growth and carcass traits of Korean native cattle. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress Applied to Livestock Production*. August, 2002, Montpellier, France.
- Collingwood KM, Gilmour RS, Speak PA, Tucker RG and Bardsley J, 1992. Ontogenic expression of ovine calpastatin cDNA sequence. *Ninth International ICOP Conference on Proteolysis and Protein Turnover*, Williamsburg Virginia.
- Eftekhari Shahroudi FE, Nassiry MR, Valizadh R, Moussavi AH, Tahmoorespour M and Ghiasi H, 2006. Genetic polymorphism at MTR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iran. J Biotechnol* 4: 117-122.
- Harlt, DL and Clark AG, 1997. *Principal of population genetics* (3<sup>rd</sup> ed.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA, 542 p.
- Hong MA, Hong QY, Takano E, Hatanaka M and Maki M, 1994. Amino terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interaction with calmodual in-like domain of the proteinase. *J Biol Chem* 269: 24430-24436.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF, 1998. A simple salting out procedure for extraction of DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res* 16: 1215.
- Nassiry MR, Tahmoorespour M, Javadmanesh A, Soltani M and Foroutani Far S, 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. *Iran. J Biotechnol* 4: 188-192.
- Palmer BR, Hickford JGH and Bickerstaffe R, 1997. A candidate gene approach to animal quality traits. *Proc. NZ Society Anim Prod* 57: 294-266.
- Palmer BR, Morton J, Roberts N, Ilian MA and Bickerstaffe R, 1999. Marker assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. *Proc. NZ Society Anim Prod* 59: 266-268.
- Robert N, Palmer BR, Hickford JG and Bickerstaffe R, 1996. PCR-SSCP in the ovine CAST gene. *Anim Genet* 27: 211- 222.
- Sensky PL, Parr T, Bardsley RG and Buttery PJ, 2000. Postmortem proteolysis in muscle and meat quality and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, variable activity of the calpain proteolytic system. *Meat and Livestock Commission*, Loughborough, UK.
- Shackelford SD, Koohmaraie M, Cundiff LV, Gregory KE, Rohrer GA and Savell JW, 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlation for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, warner-bratzler shear force, retail product yield and growth rate. *J Anim Sci* 74: 857- 863.
- Yeh FC, Yang R and Boyle T, 1999. *POPGENE* (version 1.31). University of Alberta Edmonton Canada.