جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۱۹ شماره ۱/ سال ۱۳۸۸

بهینه سازی شرایط PCR جهت نشانگرهای ملکولی ISSR به منظور انگشت نگاری ژنوم گاو

مریم قاسمی[1]، محمدرضا محمدآبادی[2*]، امین باقی زاده[3] و علی اسمعیلی‌زاده کشکوئیه[3]

تاریخ پذیرش: 87/6/10

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، علوم دامی، دانشگاه زابل
2- هسته تحقیقاتی ژنتیک و حیوانات ترانسژنیک و بخش علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
3- مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان
*مسئول مکاتبه: E-mail:mmohammadabadi@yahoo.ca

چکیده

امروزه نشانگرهای ملکولی زیادی در دسترس هستند. به دلیل سادگی و نیاز به مقادیر کم DNA، تحقیقات بر مبنای PCR رایج هستند. ISSR، نشانگرهای چند جایگاهی اختیاری میباشند که بوسیله PCR با یک پرایمر میکروساتلایتی تکثیر می شوند. به دلیل عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنوم، استفاده از این نشانگرها فواید زیادی دارد. بعلاوه، به خاطر عدم نیاز به اطلاعات توالی ژنومی که در دو طرف آنها قرار دارند تجزیه ISSR از نظر تکنیکی ساده تر از بیشتر سیستم های نشانگری دیگر است. این روش نتایجی را فراهم می کند که قدرت تکرارپذیری بالایی دارند و چند شکلی بالایی را در بیشتر سیستم ها ایجاد می کنند. در این پژوهش، شرایط متفاوت PCR از جمله، غلظت های DNA، پرایمر، $MgCl_2$ و dNTP، تعداد چرخه و دمای اتصال مورد آزمون قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، بهترین شرایط عبارت بودند از: ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر پرایمر با غلظت اولیه ۱۰ میکرومولار، ۰/۳۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی مولار، ۲۰۰ میکرو مولار از هر چهار dNTP در ۳۰ چرخه. همچنین، تکرارپذیری نشانگرهای ISSR برآورد شد و مشخص شد که این نشانگرها انتخاب بسیار مناسبی جهت انگشت نگاری ژنوم گاو می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: انگشت‌نگاری ژنوم، فاکتورهای PCR، نشانگرهای ISSR

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Optimization of PCR Conditions for ISSR Markers in Genome Fingerprinting of Cattle

M Ghasemi[1], MR Mohammadabadi[2*], A Baghizadeh[2]and A Esmailizadeh Koshkoieh[3]

[1]MSc Student of Animal Sciences, Zabol University, Iran
[2]Research Division of Genetic and Transgenic Animals and Animal Science Department, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
[3]International Centre for Science & High Technology & Environmental Sciences, Kerman, Iran
*Corresponding author:E-mail: mmohammadabadi@yahoo.ca

Abstract

Many molecular markers are available today. PCR-based approaches are in demand because of their simplicity and requirement for only small quantities of DNA. Inter simple sequence repeats (ISSRs) are arbitrary multiloci markers produced by PCR amplification with a microsatellite primer. They have many advantageous because no prior genomic information is required for their use. In addition to freedom from the necessity of obtaining flanking genomic sequence information, ISSR analysis is technically simpler than many other marker systems. The method provides highly reproducible results and generates abundant polymorphisms in many systems. We examined different PCR conditions, such as DNA, primer, MgCl2 and dNTP concentrations, number of cycles and annealing temperatures. Based on our study, the best PCR conditions were 100 ng genomic DNA, 2 µl primer with 10 µM primary concentration, 0.375 µl MgCl2 with 100 mM primary concentration, 200 µM from every four dNTP's and 30 cycles. We also estimated reproducibly of ISSR markers and demonstrated that these markers are good choices for genome fingerprinting of cattle.

Keywords: Genome fingerprinting, ISSR markers, PCR parameter

مقدمه

از اواسط سال ۱۹۸۰، تشخیص و انتخاب سریع ژنوتیپ های برتر با استفاده از تکنیک PCR گسترش یافت و نشانگرهای مختلف مبتنی بر PCR مورد استفاده قرار گرفت، که از آن جمله می توان به نشانگرهای AFLP، RAPD، SSR و PBR اشاره نمود.

انتخاب نوع نشانگرهای ملکولی به تکرارپذیری و سادگی روش کار آن بستگی دارد. بهترین نشانگرها برای تهیه نقشه ژنومی، انتخاب به کمک نشانگرها و نشانه گذاری صفات اقتصادی نشانگری است که دارای هزینه اجرای پایین و قابلیت اعتماد بالایی باشد (هاگو و سزار ۱۹۹۸). در سال ۱۹۹۴ نوع جدیدی از نشانگرهای ملکولی که به اختصار ISSR[1] نامیده شدند مورد استفاده قرار گرفت. این نشانگرها شباهت بسیار نزدیکی با نشانگرهای RAPD دارند و به طور بسیار گسترده ای در نواحی بین میکرو ساتلایتی در سرتاسر ژنوم پراکنده شده اند (گوپتا و وارشنای ۲۰۰۰). نشانگرهای ISSR

[1]Inter-Simple-Sequence-Repeat

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تکرارهای میکروساتلایت ۴ تا ۱۲ واحدی (تکراری) هستند و در یک انتهایشان ۲ تا ۴ نوکلئوتید اختیاری دارند. پرایمرهای ISSR امکان میدهند قطعاتی از DNA را تکثیر کرد که بین دو توالی میکروساتلایتی به اندازه کافی نزدیک هم قرار گرفته اند (لرد و همکاران ۱۹۹۸). کار کردن با این نشانگرها بسیار ساده است و نیازی به داشتن اطلاعات قبلی از توالی نوکلئوتیدی ژنوم موجود مورد مطالعه نیست. وراثت پذیری جایگاههای ISSR بالاست و وراثت آنها شباهت بسیار زیادی به نسبتهای مندلی دارد. تغییر پذیری بالا و حساسیت زیاد نسبت به تغییر اجزا واکنش PCR در روش RAPD باعث شده که نشانگرهای ISSR به صورت غالب برای تولید نقشه های ژنتیکی مورد توجه قرار گیرند. این مزایا به همراه تکرار پذیری بالا و کاهش تغییر در باندها در تکرارهای مختلف نشان از عملکرد بالای این نشانگرها در بررسی صفات اقتصادی میباشند. امروزه مطالعات بسیار کمی در مورد استفاده از ISSR در تشخیص یا بررسی ژنوتیپ واریته های بسیار مهم کشاورزی، به خصوص حیوانات اهلی از جمله گاو و گوسفند منتشر شده است و بیشتر مطالعات با استفاده از این نشانگرها روی گیاهان و حشرات انجام شده است.

گلازکو و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از نشانگرهای ISSR، RAPD و چندشکلی پروتئین ها تنوع ژنتیکی در گاوهای کوهان دار و بدون کوهان آمریکایی واروپایی را بررسی کردند. آنها نشان دادند که ارزیابی ژنتیکی داخل گونه ای با استفاده از نشانگرهای DNA نسبت به تعیین چندشکلی پروتئینی ارجحیت دارد. در مطالعات بعدی توسط زوبتس و همکاران (۲۰۰۱) چندشکلی ژنتیکی و ملکولی در سه نژاد گاو مورد بررسی قرار گرفت. در این طرح به بررسی اهمیت کاربرد PCR در دسته بندی ژنتیکی DNA پرداخته شد و از نشانگرهای RAPD و ISSR برای بررسی چندشکلی و تعیین میزان هتروزایگوسیتی الل ها استفاده شد. اثرات نشانگرهای ISSR برروی تفاوتهای مخازن ژنی گاو توسط گوردنایا و گلازکو (۲۰۰۳) مورد بررسی قرار گرفت. در آن مطالعه ساختمان ژنتیکی در ۵ نژاد گاو اکراینی با استفاده از روش ISSR-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بررسی چندشکلی DNA گاو با استفاده از نشانگرهای ISSR توسط تریاپتیسنا و گلازکو (۲۰۰۵) مورد بررسی قرار گرفت. در آن طرح تجزیه فامیلی، نشان داده شد که نشانگرهای ISSR در نسل F_0 و نتاج F_1 و F_2 در گاو هولشتاین در ناحیه متغیر ژنتیکی وراثت پذیری و چندشکلی بالایی دارند.

هدف از اجرای این مطالعه بررسی اثرات عوامل مختلف موثر بر فرایند PCR در جهت افزایش وی‌ژگی-های اختصاصی و تجدید شوندگی نتایج در نشانگرهای ISSR و کاربرد این اجزا و بهینه سازی آنها در گاو بود.

مواد و روش‌ها

با توجه به اینکه هدف بعدی از این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی گاوهای محلی و هلشتاین بود، در این طرح از ۱۲۰ گاو هلشتاین شهر کرمان در قالب ٤ گله خون گیری انجام شد ولی برای انجام این مطالعه فقط از چند نمونه ثابت استفاده گردید. خون گیری از رگ زیر دمی و در مواردی از رگ وداجی صورت گرفت. نمونه های گرفته شده در داخل لوله های ونوژکت حاوی EDTA جمع آوری گردیدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت Diatom DNA Prep به روش گوانیدین-سیلیکا ژل انجام و ملکول‌های بزرگی به طول تقریبی ۵۰-۶۰ هزار جفت باز حاصل شد.

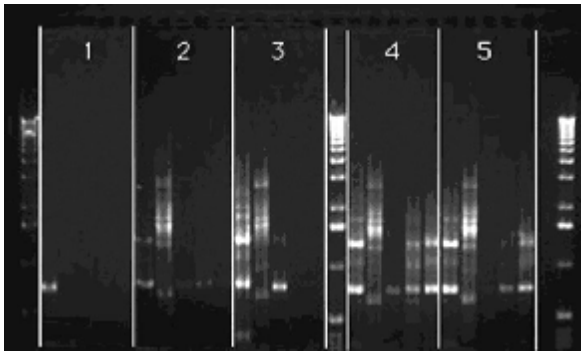
در این روش به ۱۵۰۰ میکرولیتر خون ۴۰۰ میکرولیتر عامل لیز کننده اضافه و در درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد وبه مدت ۵ دقیقه انکوباسیون شد، سپس ۲۰ میکرولیتر ماده جاذب به نام نوکلئوز افزوده و بعد از انجام سانتریفیوژ رسوب را نگه داشته و باقی مانده بیرون ریخته شد. آنگاه ۴۰۰ میکرولیتر بافر نمکی به رسوب اضافه و بخوبی مخلوط شد. پس از سانتریفیوژ رسوب را نگه داشته و مابقی بیرون ریخته شد. مرحله قبل مجددا" تکرار شد. رسوب خشک شد و به آن ۱۰۰ میکرولیتر Extra Gene اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شد. محلول باقی مانده سانتریفیوژ شد و محلول بالایی که حاوی DNA بود در لوله تمیز دیگری ریخته و مابقی دور ریخته شد. راندمان استخراج DNAی خالص با دستگاه اسپکتروفتومتر آزمون گردید.

شرایط PCR

در این طرح از دو پرایمر ۱۹ نوکلئوتیدی با توالی های $(AG)_9C$ و $(GA)_9C$ به منظور تکثیر استفاده شد. برای بهینه سازی شرایط تکثیر، چندین پارامتر مورد آزمون قرار گرفت. این پارامترها شامل غلظت DNA، غلظت پرایمر، غلظت $MgCl_2$، غلظت dNTP (جدول ۱)، دمای اتصال (۴۹، ۵۱، ۵۳، ۵۵ و ۵۷ درجه سانتیگراد) و تعداد سیکل (۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰) بودند. تکثیر بدون DNA به عنوان عامل کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از انجام PCR، نمونه ها بلافاصله از دستگاه خارج و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای انجام الکتروفورز و آنالیز محصولات تکثیری از ژل آگارز ۱% استفاده گردید. برای اطمینان از نتایج بدست آمده، آزمون های مربوط به تعیین بهترین پارامترهای موثر سه مرتبه تکرار شدند.

نتیجه گیری و بحث

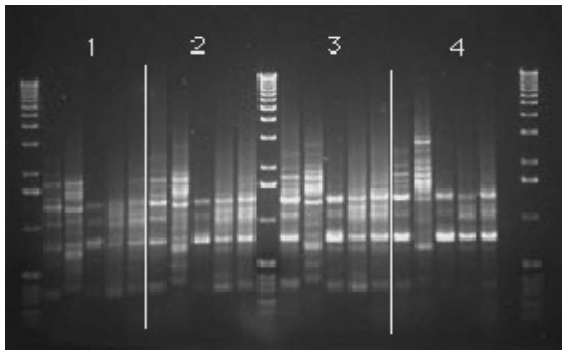
در این آزمون چندین پارامتر که می توانست بر کیفیت و تجدید شوندگی انگشت نگاری اثر بگذارد مورد بررسی قرار گرفت. در هر بار یک پارامتر متغیر و بقیه پارامترها ثابت در نظر گرفته شدند. برای اطمینان از نتایج بدست آمده، آزمون های مربوط به تعیین بهترین پارامترهای موثر سه مرتبه تکرار شدند. در ابتدا اثرات دمای اتصال مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). با استفاده از سختی بالا (دمای اتصال نزدیک به دمای ذوب پرایمرها) باندهای تکرارپذیری را تا زمانی که واکنش توسط سختی بالا محدود شد را نشان داد. در دماهای پایین تر سایه (اسمیر) های بزرگی، که با کاهش حجم محصولات بارگذاری شده حذف شدند آشکار گردید. این نوارهای سایه باعث تکثیر غیراختصاصی نشد، اما بر بزرگی محصولات تکثیری موثر بود. نهایتا" دمای ۵۵ درجه برای پرایمرها انتخاب شد که بالاترین تکثیر محصولات و باندهای مجزا را تولید کرد. در نتیجه بهترین دمای اتصال برای این پرایمرها ۵۵ درجه سانتیگراد تعیین شد.



شکل ۱- مقایسه دماهای مختلف اتصال در شفافیت و وضوح باند های ایجاد شده (۱- دمای ۴۹ درجه ۲- دمای ۵۱ درجه ۳- دمای ۵۳ درجه ۴- دمای ۵۵ درجه ۵- دمای ۵۷ درجه)، نشانگر استاندارد M100 (از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز)

تغییر دمای اتصال[1] اثر مهمی بر روی روشنی و وضوح انگشت نگاری داشت. در تحقیقی مشابه دماهای پایینی برای اتصال و تکثیر DNA با پرایمرهای متفاوت استفاده شد که نتایج ما را تأیید می کند (هنگاریو و همکاران ۱۹۹۷). اگرچه دمای پایین ممکن است تکثیر های غیراختصاصی را افزایش دهد، که این امر یاد آور مشکلات استفاده از RAPD به منظور انگشت نگاری میباشد (بورنت و برانچارد ۲۰۰۱)، در این حالت دمای اتصال برای هر پرایمر اختصاصی و همیشه پایین تر از دمای ذوب پرایمر می‌باشد. در این طرح باندهای واضح و کاملی در حضور پرایمرهای اختصاصی مشاهده شد. انگشت نگاری فقط با تعداد اندکی نوار مشابه توصیف می گردد.

عامل مورد بررسی بعدی غلظت پرایمر بود. تنوع در غلظت پرایمر یکی از مهمترین منابع تنوع الگو در RAPD بحساب می آید (هنگاریو و همکاران ۱۹۹۷)، در حالی که نتایج این طرح بیانگر این مساله است که در نشانگرهای ISSR با تغییر غلظت پرایمرها هیچگونه تغییری در الگوها بوجود نمی آید اما وضوح و شفافیت باندها تحت تاثیر قرار می گیرد (شکل۲).



شکل ۲- تاثیر غلظتهای مختلف پرایمر در شفافیت و وضوح باندهای ایجاد شده (۱- ۰/۲ میکرو مولار ۲- ۰/۴ میکرو مولار ۳- ۰/۸ میکرو مولار ۴- ۱/۶ میکرو مولار)، نشانگر استاندارد M100 (از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز)

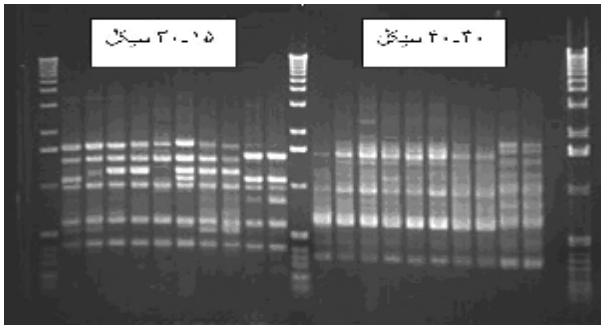
غلظت کمتر از ۰/۲ میکرو مولار برای انگشت نگاری مناسب نمی باشد و شدت باندها کم می شود. باندهای پر قدرت در غلظت ۰/۲ تا ۰/۸ میکرو مولار در هر واکنش مشاهده شدند. با افزایش غلظت، تعداد و وضوح باندها کمتر می شود. لازم به ذکر است که تازگی پرایمرها هم مهم می باشد و در کیفیت محصولات PCR تأثیر دارد. اگر مقدار پرایمرها خیلی زیاد باشد، باندهایی در انتهای ژل مشاهده خواهند شد.

یکی دیگر از عواملی که بر وضوح و شدت باندها موثر است تعداد چرخه‌های واکنش پلی مراز است، نتایج نشان داد که افزایش چرخه‌ها از ۱۵ تا ۳۰ به صورت صعودی شدت باندها را افزایش می دهد، اما بعد از ۳۰ چرخه باندها به صورت اسمیر در آمده و نتایج کاملا واضح نمی‌باشد (شکل ۳).

[1]Annealing temperature

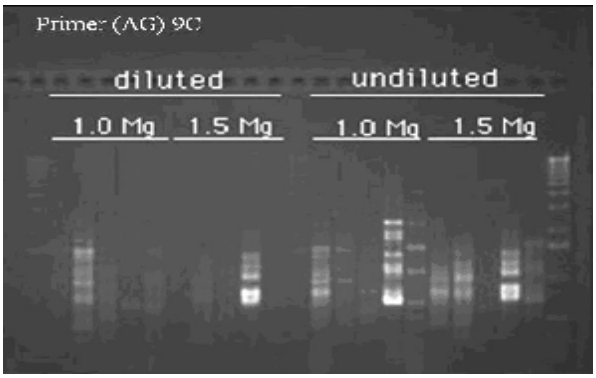
جدول 1- غلظت اولیه، مقدار برداشت شده و غلظت نهایی مواد مصرف شده

	DNA	پرایمر	$MgCl_2$	dNTP از هر کدام
غلظت اولیه	100 نانوگرم در میکرولیتر	10 میکرومولار	100 میلی مولار	2500 میکرومولار
مقدار برداشت شده	0/5 میکرولیتر	0/5 میکرولیتر	0/25 میکرولیتر	0/5 میکرولیتر
	1 میکرولیتر	1 میکرولیتر	0/375 میکرولیتر	1 میکرولیتر
	2 میکرولیتر	2 میکرولیتر	0/5 میکرولیتر	1/5 میکرولیتر
	4 میکرولیتر	4 میکرولیتر	0/75 میکرولیتر	2 میکرولیتر
غلظت نهایی در حجم 25 میکرولیتر (حجم نهایی واکنش)	50 نانوگرم	0/2 میکرومولار	1 میلی مولار	50 میکرومولار
	100 نانوگرم	0/4 میکرومولار	1/5 میلی مولار	100 میکرومولار
	200 نانوگرم	0/8 میکرومولار	2 میلی مولار	150 میکرومولار
	400 نانوگرم	1/6 میکرومولار	3 میلی مولار	200 میکرومولار



شکل ۳-تاثیر تعداد چرخه در شفافیت و وضوح باند ها، نشانگر استاندارد M100 (از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز)

DNA با غلظتهای متفاوت به صورت رقیق شده و رقیق نشده و در مقدارهای مختلف آزمون شد. نتایج نشان داد که DNA به صورت رقیق نشده (در صورتی که غلظت اولیه آن خیلی بالا نباشد یعنی بین ۵۰ تا ۲۰۰ نانوگرم در میکرولیتر باشد) و مقدار ۱ میکرو لیتر (بهترین حالت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر) در هر واکنش بهترین نتیجه را می دهد

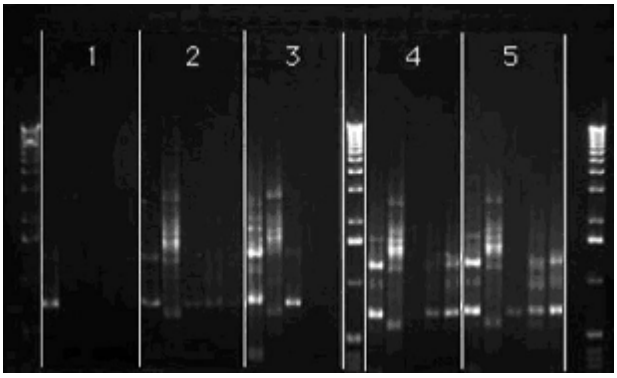


شکل ۴- تاثیر غلظتهای مختلف DNA، نشانگر استاندارد M100 (از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز)

یکی دیگر از عواملی که بر ماهیت PCR موثر می باشد، غلظت $MgCl_2$ در واکنش می باشد. غلظت نهایی $MgCl_2$ در مخلوط واکنش می تواند متغیر باشد. معمولا این میزان ۱/۵ تا ۳ میلی مولار (متناسب با نوع کار) است. یون منیزیم قادر است که با dNTPها یک کمپلکس محلولی تشکیل دهد و آنها را برای انجام واکنش قابل استفاده نماید که این امر برای وارد کردن dNTPها ضروری است. این یون همچنین فعالیت پلیمراز را تحریک می کند و دمای ذوب DNAی واکنش متقابل پرایمر/الگو را افزایش می دهد.

غلظت $MgCl_2$ دارای اثرات عمیقی بر روی ویژگی و محصولات PCR می باشد.

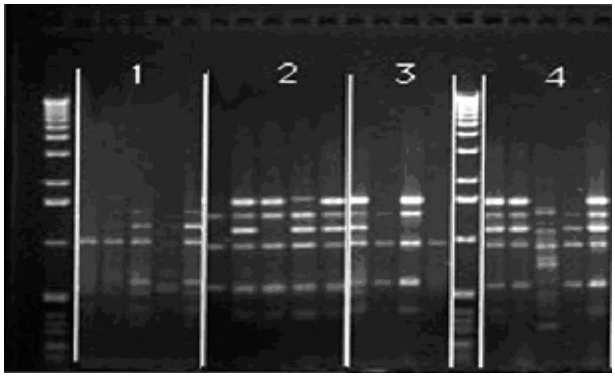
منیزیم کاتیونی دو ظرفیتی است که با آنزیم های پلیمراز باند شده و به عنوان یک فاکتور ضروری برای فعالیت پلیمراز ها عمل می کند. غلظت ۲-۱/۵ میلی مولار از آن معمولا یک غلظت بهینه است. اما در برخی موارد ممکن است مقادیر متفاوتی مورد نیاز باشد. به طور معمول، مقدار کم $MgCl_2$ منجر به محصول کم و Mg^{2+} اضافی منجر به جمع شدن محصول غیر اختصاصی و ناخواسته می شود (تایک ۱۹۹۷).



شکل ۵- تاثیر غلظت Mg^{2+} و دمای اتصال در شفافیت و وضوح باندهای ایجاد شده (۱- یک میلی مولار $MgCl_2$ و دمای ۵۳ درجه، ۲- یک و نیم میلی مولار $Mgcl_2$ و دمای ۵۳ درجه، ۳- یک ونیم میلی مولار $MgCl_2$ و دمای ۵۵ درجه، ۴- دو میلی مولار $MgCl_2$ و دمای ۵۳ درجه، ۵- دو میلی مولار $MgCl_2$ و دمای ۵۵ درجه). نشانگر استاندارد M100 (از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز)

همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود بیشترین تعداد باند در غلظت ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و در دمای اتصال ۵۵ درجه سانتیگراد مشاهده شد.

در آخرین مرحله غلظت dNTP مورد بررسی قرار گرفت. اگر چه در غلظتهای پایین dNTP، یعنی ۱۰۰-۱۰ میکرو مولار آنزیم Taq پلیمراز داری صحت بالاتری است، با این حال غلظت بهینه dNTP بستگی به غلظت $MgCl_2$، سختی واکنش، غلظت پرایمر، طول محصول تکثیر شونده و تعداد چرخه‌های PCR دارد (کوین و همکاران ۲۰۰۱). جهت بهینه نمودن یک PCR ضروری است که بهترین غلظت dNTP به طور تجربی تعیین شود.



شکل ۶- تاثیر غلظتهای مختلف dNTP در شفافیت و وضوح باندهای ایجاد شده (۱- ۵۰میکرو مولار dNTP، ۲- 100میکرو مولار dNTP، ۳- 150میکرو مولار dNTP و ۴- 200 میکرو مولار dNTP) ، نشانگر استاندارد M100 (از ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز)

همانطور که در شکل ۶ دیده میشود غلظت ۲۰۰ میکرو مولار بهترین غلظت است که غلظت استاندارد نیز می باشد.

نتایج بالا نشان داد که نشانگرهای ISSR می توانند در دامنه وسیعی از تغییرات عمل کنند. در این طرح با حضور ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر پرایمر با غلظت اولیه ۱۰ میکرومولار، ۰/۳۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی مولار، ۲۰۰ میکرو مولار از هر چهار dNTP در ۳۰ سیکل بدست آمد. دامنه باندها از ۱۰۰ تا ۲۵۰۰ بود و سطح بالایی از چند شکلی مشاهده شد. نشانگرهای ISSR در دام های اهلی و بویژه بز و گوسفند استفاده نشده اند و در گاو هم به تعداد انگشت شماری

مورد استفاده قرار گرفته اند در صورتی که در موجودات دیگر از قبیل حشرات و گیاهان زیاد استفاده شده اند و چند شکلی بالایی را نشان داده اند (تانگ و همکاران ۲۰۰۱، ناگاراجو و گلداسمیت ۲۰۰۲، ناگاراجو و همکاران ۲۰۰۲، کریک و همکاران ۲۰۰۳، موتوسامی و همکاران ۲۰۰۳، جسی و والکر ۲۰۰۵، ناگسوارا و همکاران ۲۰۰۵)، لذا این مطالعه اولین گام در راستای استفاده از ملعات بعدی نشانگرها برای بررسی چند شکلی جمعیت های دام های بومی ایران است. با توجه به اینکه این نشانگرها با موفقیت کامل در گاو و با شرایط بهینه ذکر شده در این مطالعه قابل استفاده می باشند لذا گام بعدی استفاده وسیع از این نشانگرها در برآورد تنوع ژنتیکی جمعیت های گاو، گوسفند و بز ایران می باشد که مقدمات انجام آن صورت گرفته است. با توجه به اینکه برای کار با این نشانگرها نیازی به دانستن توالی ژنومی دام ها از قبل نیست و با توجه به تکرارپذیری بالای آنها و ارزان بودن و نیز سرعت بالای کار باآنها، پیشنهاد می‌شود بیشتر که استفاده گردند.

منابع مورد استفاده

Borent M and Branchard M, 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: Reproducible and specific tools for genome finger printing. Plant Molecular biology Reporter 19: 209 – 215.

Coyne V, James M, Reid S and Rybicki E, 2001. Molecular biology techniques Manual 3rd Ed. Primer design and reaction optimization. http://www.mcb.uct.ac.za/pcroptim.htm#Elongation.

Glazko VI, Dyman TN, Tarasiuk SI, Dansercoer A, Mammens G, Coopman F, Bouquet Y, Burny A, Renaville R and Portetelle D, 1998. Evaluation of genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Beligian cattle breed. Animal Genetic 29:161-167.

Gorodnaya AV and Glazko AV, 2003. ISSR-PCR in differentiation of cattle breed gene pools. Sitologiya and Genetika 1: 61-67.

Gupta PK and Varshnay PK, 2000. The development and use of microsatellite marker for genetic analysis and plant breeding with emphasis on breed wheat. Euphytica 113:163-185.

Hago HM and Cesar AMH 1998. Use of molecular markers and major genes in genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology 1: 83-89.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH and Vogt PH, 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by step protocol. Biotechniques 23:504-511.

Jesse HL and Walker AJ, 2005. Genetic differentiation among geographic populations of Gonatocerus ashmeadi, the predominant egg parasitoid of the glassy-winged sharpshooter, Homalodisca coagulate. Journal of Insect Science 5:2-11.

Kirk WP, Sheri BC, Shawn PB, Snake CJ, Tera MB and Desmond RL, 2003. Assessment of genetic diversity of pawpaw (*Asimina triloba*) cultivars with Intersimple Sequence Repeat Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science 128:521-525.

Lord EA, Davis GH, Doods KG, Henry HM, Lumsden JM and Montogomery GW, 1998. Identification oF booroola carries using microsatellit markerrs. pp. 19-27. Proceedings of the 6th world congress of genetics applied to livestock production. Armidale, NSW, Australia.

Muthusamy V, Gurunathan S, Saladi SV, Bagavathi KCM and Govindaswamy S, 2003. Genomic instability and tumor-specific alterations in oral squamous cell carcinomas assessed by inter-(simple sequence repeat) PCR. Clinical Cancer Research 9: 1057–1062.

Nagaraju J and Goldsmith MR, 2002. Silkworm genomics – progress and prospects. Current Science 83: 415-425.

Nagaraju J, Kathirvel M, Subbaiah EV, Muthulakshmi M and Kumar LD, 2002. FISSR-PCR: A simple and sensitive assay for highthroughput genotyping and genetic mapping. Molecular and Cellular Probes, 16: 67–72.

Nageswara SR, Surendra BN and Saratchandra B, 2005. Characterization and phylogenetic relationships among microsporidia infecting silkworm, *Bombyx mori*, using inter simple sequence repeat (ISSR) and small subunit rRNA (SSU-rRNA) sequence analysis. Genome 48: 355-366.

Taek H, 1997. Upper limit of $MgCl_2$ in PCR. http://www.bio.net/bionet/mm/method.

Tang JCO, King YL, Simon L, Wong J and Srivastava G, 2001. Detection of genetic alterations in esophageal squamous cell carcinomas and adjacent normal epithelia by comparative DNA fingerprinting using Inter-Simple Sequence Repeat PCR. Clinical Cancer Research 7: 1539–1545.

Triapitsyna NV and Glazko VI, 2005. Polymorphism of DNA. Fragments flanked by microsattlite loci (ISSR-PCR) in cattle reprocuced under low-does irradiation condition. Tisitology and Genetics 39: 41-50.

Zubets MV, Burkat VP, Sivolap IM, Kuznetsov VE and Lovenchuk IN, 2001. Molecular and genetic polymorphism in three cattle breeds. Tsitology and Genetics 35: 3-11.