



دانشگاه گوارز و منابع طبیعی

نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان

جلد پنجم، شماره چهارم، ۱۳۹۶

<http://ejrr.gau.ac.ir>

## شناسایی چند شکلی در ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین و ارتباط آن با صفات وزن بدن و خصوصیات دنبه در گوسفندان لری بختیاری

احسان اله نوبخت<sup>۱</sup>، \*ایوب فرهادی<sup>۲</sup>، قدرت رحیمی<sup>۳</sup> و محسن قلی‌زاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار و <sup>۲</sup>استاد گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۴

### چکیده

**سابقه و هدف:** هدف از پژوهش حاضر بررسی تنوع آلی در ناحیه تنظیمی بالا دست ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک ژن‌های مورد نظر و ارتباط آماری واریانت‌های آلی با صفات وزن بدن و دنبه در گوسفند لری بختیاری بوده است.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۱۵۰ نمونه خون به‌طور تصادفی تهیه و دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید<sup>۲</sup> با روش نمکی بهینه یافته استخراج شد. سپس جفت آغازگرهای اختصاصی با نرم‌افزار Oligo7 به‌ترتیب برای تکثیر قطعاتی با اندازه‌های ۲۴۵ و ۲۲۵ جفت بازی از ناحیه بالا دست ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین طراحی شدند. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۳</sup> فرآورده‌های تکثیری حاصل از جایگاه‌های نشانگری کالپاستاتین و کالپاین به ترتیب در معرض هضم با آنزیم‌های اندونوکلاز *PstI* و *HaeIII* قرار گرفتند. به‌دلیل یک شکل بودن نتایج حاصل RFLP، برای ارزیابی دقیق تر توالی‌های تکثیر شده از تکنیک SSCP استفاده شد. بعد از تعیین ژنوتیپ، از هر الگوی بانندی ژن کالپاین یک نمونه مورد توالی‌یابی قرار گرفت. برای شناسایی موتیف‌های درگیر در فرآیند تنظیم ژنی و همچنین جهش‌های موجود در الگوهای بانندی مختلف، توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزارهای DNASIS MAX و BioEdit مورد بررسی قرار گرفتند. ارتباط الگوهای بانندی مشاهده شده در جایگاه کالپاین با صفات وزن بدن در تولد، ۳، ۶ و ۱۲ ماهگی و صفات دنبه شامل وزن، محیط بالا و پایین و ارتفاع دنبه در گوسفند لری بختیاری با استفاده از رویه Glimmix نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** سه الگوی بانندی مختلف A، B و C در جایگاه کالپاین در نمونه‌های لری بختیاری به‌ترتیب با فراوانی‌های ۶۶، ۹ و ۲۵ در صد مشاهده شدند. ناحیه بالادست جایگاه ژنی کالپاستاتین در پژوهش حاضر یک شکل بود. تجزیه و تحلیل آماری وجود ارتباط آماری معنی داری را بین الگوهای بانندی در جایگاه نشانگر کالپاین و صفت وزن تولد در گوسفندان لری بختیاری نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین هم‌ترازی توالی‌های الگوهای بانندی مشاهده شده برای جایگاه نشانگر کالپاین در گوسفندان مورد مطالعه وجود شش چند شکلی تک نوکلئوتیدی را در موقعیت‌های مختلف نشان داد. نتیجه توالی‌یابی ژن کالپاستاتین رفتار یک شکل بودن الگوهای بانندی این ژن را تایید کرد، به طوری که تفاوتی بین توالی‌های بدست آمده برای این ژن مشاهده نشد. آنالیز

\*نویسنده مسئول: [ayoub\\_farhadi@gmail.com](mailto:ayoub_farhadi@gmail.com)

2 - DNA

3 - PCR

مقایسه‌ای موتیف‌ها بین توالی‌های مورد مطالعه نشان داد که تمامی موتیف‌ها بین الگوهای بانندی مشترک بودند به جز موتیف‌های PEA3\_CS و yeast\_terminationCS1 که در الگوی بانندی C وجود نداشته و موتیف alpha\_INF.2 که فقط در الگوی بانندی C وجود داشت.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به چند شکل بودن ناحیه تنظیمی بالادست جایگاه کالپاین و معنی‌دار بودن ارتباط آن با صفت وزن تولد، احتمالاً بتوان از این جایگاه نشانگری در برنامه‌های اصلاح نژادی برای بهبود کیفیت گوشت در گوسفند بهره برد.

**واژه‌های کلیدی:** ژن کالپاستاتین، ژن کالپاین، گوسفند لری بختیاری، ناحیه تنظیمی بالادست، بیوانفورماتیک.

کالپاستاتین نیز جزء این ژن‌ها به شمار می‌آید. از سوی دیگر ژن‌های خانه دار معمولاً یک سیستم آنزیمی به وجود می‌آورند که هر گونه تغییر در نسبت این آنزیم‌ها موجب بروز بیماری‌های مختلف می‌شود که اهمیت مطالعه این ژن را بیان می‌کند (۱۵). ترکیباتی چون اپی نفرین، بتا-آدرژنیک، سیماترول، کاتکولامین و کلین بوتارل باعث افزایش کالپاستاتین می‌شوند. تجزیه ترکیبات بتا-آدرژنیک فعالیت کالپاین I و کالپاین II را تغییر نمی‌دهد ولی باعث هیپرتروفی عضلانی شده و فعالیت کالپاستاتین در طی تجویز این ترکیبات افزایش می‌یابد. فرآیند ساخته شدن mRNA کالپاستاتین روی فعالیت و بیان این ژن تاثیر می‌گذارد. تنوع در طول mRNA ژن کالپاستاتین در نتیجه تفاوت در طول توالی غیرکد شونده ۳' آن می‌باشد. در ماهیچه‌های طولی گاو ایزوفرم‌های ۳/۸، ۳ و ۱/۵ کیلو باز mRNA این ژن گزارش شده است و نشان داده شده است که تیمار با ترکیبات بتا آدرژنیک نسبت ایزوفرم‌های ۳kb به ۳/۸kb را افزایش می‌دهد. اختلاف مولکولی کالپاستاتین در ناحیه انتهای آمینی و یا ناحیه ۳' غیرکد شونده بر روی میزان رونویسی و ترجمه این ژن تاثیر می‌گذارد (۱۴). ژن کالپاین در سال ۱۹۷۶ پس از ته نشین کردن عصاره عضله در  $Ph = 6/2$  شناسایی شد که بعدها m-کالپاین نام گرفت. کالپاین‌ها خانواده وسیعی از پروتئازهای سیستمی وابسته به  $Ca^{2+}$  هستند (۹ و ۱۷). سیستم پروتئازی کالپاین-کالپاستاتین جز دسته پروتئازهای

## مقدمه

تعیین چند شکلی‌های ژنتیکی مرتبط با تردی گوشت می‌تواند صنعت تولید گوشت را از طریق شناسایی ژنوتیپ‌های شاخص برای تردی گوشت یاری رساند و بنابراین امکان اتخاذ روش اصلاحی مناسب را برای حصول پیشرفت ژنتیکی در صنعت تردی گوشت ایجاد نماید. نشانگرهای شناسایی شده در این روش می‌توانند برای پیشگویی تردی گوشت قبل از کشتار در حیوانات به کار رفته و در صنعت تولید گوشت می‌توانند به‌عنوان ابزاری در گروه‌بندی صحیح لاشه‌ها بر پایه کیفیت خوراکی آن‌ها مورد استفاده قرار گیرند (۲۴). ژن کالپاستاتین به‌عنوان یک ژن شاخص برای صفت تردی گوشت حیوانات شناسایی شده و در نتیجه قسمت‌های ساختاری مختلف این ژن از جمله، آگزون‌های ۱، ۳، ۶، ۱۰ و ۱۱ که در تنوع بین حیوانات برای صفت تردی گوشت درگیر هستند با نشانگرهای مختلف بررسی شده‌اند (۱۴ و ۲۰). ژن کالپاستاتین به طول ۱۰۰ کیلو باز روی کروموزوم شماره ۵ گوسفند (۱۵) شماره ۷ گاو (۳) و شماره ۲ خوک (۱) جای دارد. انتهای ۵ پروموتور ژن کالپاستاتین در بسیاری از گونه‌ها غنی از توالی GC است و جعبه TATA ندارد. این چنین خصوصیتی ویژه ژن‌های خانه‌دار<sup>۱</sup> است که

1- House keeping

در سیتوزول سلول‌های زنده می‌باشد. این مشکل با حضور فسفولیپیدها برطرف و نشان داده شده است که در حضور فسفاتیدیل اینوزیتول سطح کلسیم مورد نیاز برای اتولیز  $\mu$ -کالپاین و  $m$ -کالپاین کاهش می‌یابد (۱۱).

برخلاف  $\mu$ -کالپاین (CAPNI)، نگهداری گوشت پس از کشتار در مقدار  $m$ -کالپاین (CAPNII) تغییری ایجاد نمی‌کند. در آزمایشات برون تنی زمانی که غلظت کلسیم عصاره استخراج شده ماهیچه به سطحی که باعث اتولیز  $m$ -کالپاین می‌شود افزایش می‌یابد،  $m$ -کالپاین فعال شده و دچار اتولیز می‌شود. اتولیز  $m$ -کالپاین به وسیله تست کازئین سنجیده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که غلظت  $Ca^{2+}$  در ماهیچه پس از مرگ فقط برای فعال کردن  $\mu$ -کالپاین کافی است. تحقیقات انجام گرفته روی بره‌ها نشان داده است که در طی ۱۵ روز اول نگهداری لاشه معمولاً کاهش در سطح  $m$ -کالپاین دیده نمی‌شود. داده‌های به دست آمده از فعالیت تجزیه کازئین به وسیله  $\mu$ -کالپاین و  $m$ -کالپاین تأییدکننده این مطلب می‌باشد (۲۳).

گوسفند لری بختیاری یک نژاد گوشتی محسوب شده و زیستگاه اصلی آن استان چهارمحال بختیاری است. رنگ غالب گوسفندان در این نژاد سفید (کرم رنگ) بوده اما گاهی قهوه‌ای کم رنگ و درصدی نیز دارای رنگ قهوه‌ای تیره (قنقر) دیده می‌شوند. گوش‌های بزرگ و آویزان از مشخصات اکوتیپ این نژاد می‌باشد. لری بختیاری سری بزرگ با نیم‌رخی محدب و برآمدگی روی بینی دارد که ظاهر اصلی این اکوتیپ بوده و این وضعیت در قوچ‌ها بارزتر است. همچنین در برخی گوسفندان تارهای موی بلند روی قسمت سر و در محل رویش شاخ‌ها (اصطلاحاً چرک یا کاکل) به خصوص در جنس نر وجود دارد که گاهی اوقات صورت و گوش‌ها را می‌پوشاند. میانگین

خنثی وابسته به کلسیم است. این سیستم، به طور کلی، شامل سه مولکول است: دو پروتئاز وابسته به کلسیم با نام‌های کالپاین I ( $\mu$ -کالپاین) و کالپاین II ( $m$ -کالپاین) و یک پلی‌پپتید به نام کالپاستاتین که فعالیت پروتئازهای ذکر شده را مهار می‌کند (۹) این سیستم در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی وابسته به کلسیم از قبیل تمایز مایوبلاست و یاخته‌های چربی، توسعه و تجزیه عضلات، تردی گوشت بعد از کشتار، فرآیند تمایز اندام، سیکل سلولی، تشکیل آب مروارید، نقل و انتقالات سلولی و مرگ سلولی موثر است (۴ و ۹). تقسیم‌بندی کالپاین‌ها به اسامی  $m$ -کالپاین و  $\mu$ -کالپاین براساس میزان غلظت یون  $Ca^{2+}$  مورد نیاز برای فعالیت آن‌ها در شرایط برون تنی می‌باشد.  $m$ -کالپاین و  $\mu$ -کالپاین به ترتیب به غلظت‌های بالا (میلی‌مولار) و پایین (میکرومولار)  $Ca^{2+}$  برای فعال شدن نیاز دارند. مکانیسمی که به وسیله آن کالپاین‌ها فعال شده و پروتئین‌های هدف خود را شناسایی می‌کنند پیچیده است. کالپاین یک پروتئاز سیتوپلاسمی با وفور بالاست که می‌تواند بسیاری از پروتئین‌های ساختاری و علامت دهنده را تجزیه کند. اتصال کالپاین‌ها به غشای سلولی یک مکانیسم مهم در تنظیم فعالیت آن‌ها است به طوریکه اتصال کالپاین به غشای سلولی سبب می‌شود از شکل پروآنزیم غیرفعال به آنزیم فعال پروتئولیتیک تبدیل شود. کالپاین پس از فعال شدن روی غشای سلولی در داخل سیتوزول منتشر می‌شود و در مقابل فعالیت مهارکننده کالپاستاتین مقاومت می‌کند. فعالیت کالپاین‌ها به وسیله فسفریلاسیون افزایش یافته و به وسیله آنزیم ERK/MAP کیناز کاهش می‌یابد (۱۰). معمولاً سطح کلسیم مورد نیاز برای آغاز اتولیز کالپاین بالاتر از سطح مورد نیاز برای فعالیت پروتئولیتیک کالپاین بوده و خیلی بیشتر از سطح  $Ca^{2+}$  آزاد موجود

کیفیت گوشت را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هدف از پژوهش حاضر بررسی تنوع آللی در ناحیه تنظیمی بالا دست ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک ژن‌های مورد نظر و ارتباط آماری واریانت‌های آللی با صفات وزن بدن و دنبه در گوسفند لری بختیاری بوده است.

### مواد و روش‌ها

**خون‌گیری و استخراج دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید:** تعداد ۱۵۰ نمونه خون (۱۲۰ راس ماده و ۳۰ راس نر) به طور تصادفی از نژاد لری بختیاری در مرکز اصلاح نژاد شولی شهر کرد در لوله‌های آغشته اتیلن‌دی-تترایک اسید<sup>۱</sup> به جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه با رعایت زنجیره سرد، دئوکسی-ریبونوکلئیک اسید نمونه‌ها با روش نمکی بهینه یافته استخراج شد (۱۴). در این تحقیق برای تعیین کیفیت دئوکسی‌ریبونوکلئیک از ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد.

**انتخاب ناحیه ژنومی مورد نظر و طراحی آغازگرهای اختصاصی:** با استفاده از پایگاه‌های داده‌های ژنومی NCBI و Ensemble توالی ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین در گوسفند استخراج و پس از تعیین ناحیه بالادست آن‌ها، آغازگرهای اختصاصی با نرم افزار Oligo7 طراحی شده (جدول ۱)، سپس با استفاده از سایت Nebcutter آنزیم‌های برشی مناسب برای این نواحی انتخاب شدند.

وزن تولد بره‌های این نژاد بسته به جنسیت ۴/۲ تا ۴/۶ و میانگین وزن پشم تولیدی قوچ و میش به ترتیب ۲/۴۵۲ و ۱/۸۱۰ کیلوگرم می‌باشد. میزان باروری این نژاد ۹۲ درصد و میزان دوقلو زایی در آن ۱۹/۵ درصد است (۱۲).

در مطالعه‌ای ارتباط چند شکلی ژن کالپاستاتین با افزایش وزن روزانه در گوسفند کردی با استفاده از روش PCR-SSCP بررسی شده و سه نوع ژنوتیپ AA، AB و AC با فراوانی ۰/۵۵، ۰/۳۲ و ۰/۱۳ گزارش شده و نتایج نشان داد که ژنوتیپ کالپاستاتین اثر معنی‌داری روی افزایش وزن از تولد تا شیرگیری دارد (۲) ( $P < 0.05$ ). هم چنین نتایج تحقیق مذکور نشان داد که ژنوتیپ AB وزن تولد بیشتری نسبت به دو ژنوتیپ دیگر داشت. نشان داده شده است که فعالیت کالپاستاتین وراثت‌پذیری بالایی دارد ( $h^2 = 0.65$ ). بنابراین امکان حصول پاسخ ژنتیکی سریع در انتخاب علیه فعالیت کالپاستاتین وجود دارد و انتخاب علیه فعالیت کالپاستاتین می‌تواند منجر به بهبود صفت تردی گوشت حیوانات شود (۲۱). کاسا و همکاران (۵) ارتباط بین چند شکلی‌های ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین را با صفت مربوط به تردی گوشت در گاوهای اروپایی و هندی بررسی کردند. نتایج نشان داد که جهش‌های تک نوکلئوتیدی در ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین به طور بسیار معنی‌داری بر صفت تردی گوشت اثر می‌گذارد. محققین پیشنهاد دادند که ژنوتیپ‌های کالپاستاتین می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی بعنوان مارکر انتخابی برای بهبود کیفیت گوشت و خصوصیات لاشه مورد استفاده قرار گیرند. کوه‌ماری و همکاران (۱۳)، چند شکلی ژن‌های CAST، RN و RYR 1 را با آنزیم‌های *HinfI* و *RsaI* مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که لوکوس CAST/*HinfI* در خوک بسیاری از فاکتورهای موثر بر

جدول ۱: آغازگرهای طراحی شده در پژوهش حاضر

Table 1. Primers designed in present study

شماره دسترسی	طول قطعه (جفت باز)	توالی آغازگر	نام ژن
Accession number	Fragment length (bp)	Primer sequence	Gene name
L14450	245	F: 5'-TGG GGC CCA ATG ACG CCA TCG ATG-3' R: 5'-GGT GGA GCA GCA CTT CTG ATC ACC-3'	کالپاستاتین (Calpastatin)
J05065	225	F: 5'- AAC ATT CTC AAC AAA GTG GTG -3' R: 5'- ACA TCC ATT ACA GCC ACC AT -3'	کالپاین (Calpain)

اندونوکلاز قرار گرفتند. مخلوط واکنش هضم در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۰/۲ میکرولیتر (۱۰ واحد) آنزیم، ۱/۵ میکرولیتر بافر هضم (۱۰x)، ۸ میکرولیتر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و ۵/۳ میکرولیتر آب استریل تهیه و به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. محل شناسایی و محصولات برش آنزیم‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از الکتروفورز، محصولات حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند.

آزمون PCR-SSCP روی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین: برای انجام SSCP از ژل پلی‌اکریل‌امید ۱۲ درصد متصل به دستگاه سیرکولاتور در دمای ثابت ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۷ ساعت و ولتاژ ۳۲۰ الکتروفورز استفاده شد. برای جدا کردن دو رشته دئوکسی‌ریبونوکلیک، ۴ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ۸ میکرولیتر بافر SSCP مخلوط و پس از ورتکس و سانتریفیوژ کردن به مدت ۷ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به سرعت و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل به یکدیگر ممانعت به‌عمل آید. سپس این نمونه‌ها در داخل چاهک‌ها ریخته شد.

تکثیر قطعات مورد نظر از ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط مادر (کیت مستر میکس شرکت سیناژن)، ۱/۵ میکرو-لیتر DNA با غلظت ۱۰۰-۵۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۲ میکرولیتر مخلوط آغازگرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر و برای رساندن حجم نهایی نمونه به ۲۰ میکرولیتر از آب دیونیز استفاده شد. برنامه حرارتی برای تکثیر نواحی مورد نظر شامل واسرشته‌سازی آغازین در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۶۸ درجه سانتی‌گراد (کالپاستاتین) و ۵۹ درجه سانتی‌گراد (کالپاین) به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، صحت قطعه‌های تکثیر شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تأیید شد.

آزمون RFLP روی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین: پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصولات تکثیر شده در معرض هضم با آنزیم‌های

برای مشاهده قطعات حاصله از رنگ آمیزی به روش نیترات نقره استفاده شد (۸).

جدول ۲: محل برش و محصولات برش آنزیم‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر

**Table 2. Restriction site and digestion products of enzymes used in present study**

محل برش Restriction site	دمای فعالیت (°C) Activity temperature (°C)	آنزیم Enzyme	ژن مورد مطالعه Studied genes
5'...CCGG...3' 3'...GGCC...5'	37	<i>HaeIII</i>	کالپاین (Calpain)
5'...CCATGG...3' 3'...GGTACC...5'	37	<i>PstI</i>	کالپاستاتین (Calpastatin)

فرآیند تنظیم ژنی<sup>۱</sup> با استفاده از نرم‌افزار DNASIS MAX مورد بررسی قرار گرفت. همچنین توالی‌های به‌دست آمده برای شناسایی دقیق جهش‌های موجود در الگوهای بانندی مختلف با یکدیگر و با توالی رفرنس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار BioEdit هم‌تراز شدند.

### نتایج و بحث

**تکثیر جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه:** قطعات مورد نظر از ناحیه بالا دست ژن‌های کالپاستاتین و کالپاین به ترتیب با طول‌های ۲۵۲ و ۲۲۷ جفت باز و توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شدند. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز این جایگاه روی ژل آگارز ۱ درصد و همراه با نشانگر وزن مولکولی انجام شد و سپس با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید زیر اشعه UV در دستگاه مستند سازی ژل تصویربرداری شد. صحت تکثیر این قطعات بدون حضور باندهای غیراختصاصی تأیید شد (شکل ۱).

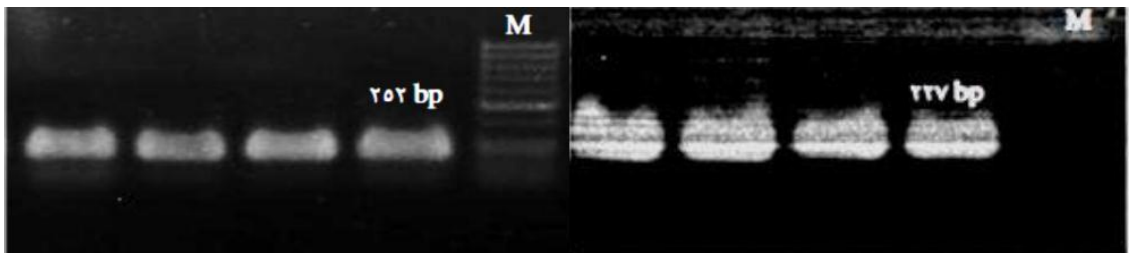
تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات به دست آمده از ژنوتیپ‌ها: وفور الگوهای بانندی مشاهده شده با شمارش مسقیم آن‌ها از روی ژل پلی‌اکریل‌آمید تعیین شد. در پژوهش حاضر بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های مشاهده شده در هر جایگاه و همچنین سال تولد و جنسیت گوسفندان با صفات وزن بدن در تولد، ۳، ۶ و ۱۲ ماهگی و صفات دنبه شامل وزن، محیط بالا و پایین و ارتفاع دنبه در گوسفند لری بختیاری، از رویه Glimmix در نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۱) و بر اساس مدل زیر استفاده شد (SAS Institute ۲۰۰۵): (Inc.

مدل آماری به صورت زیر می‌باشد:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + S_j + Y_k + (GS)_{ij} + e_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$ : ارزش فنوتیپی صفت مورد نظر،  $\mu$ : میانگین صفت مورد نظر در جامعه،  $G_i$ : اثر ژنوتیپ‌ها،  $S_j$ : اثر جنسیت،  $Y_k$ : اثر سال تولد،  $(GS)_{ij}$ : اثر متقابل ژنوتیپ و جنسیت و  $S_j$ : اثر خطای باقیمانده. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین: بعد از شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف برای ناحیه تنظیمی بالادست ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین، از هر الگوی بانندی حاصل شده یک نمونه برای توالی‌یابی ارسال شد. سپس توالی به‌دست آمده از نظر وجود موتیف‌های مختلف درگیر در

<sup>1</sup> - Domain Analysis



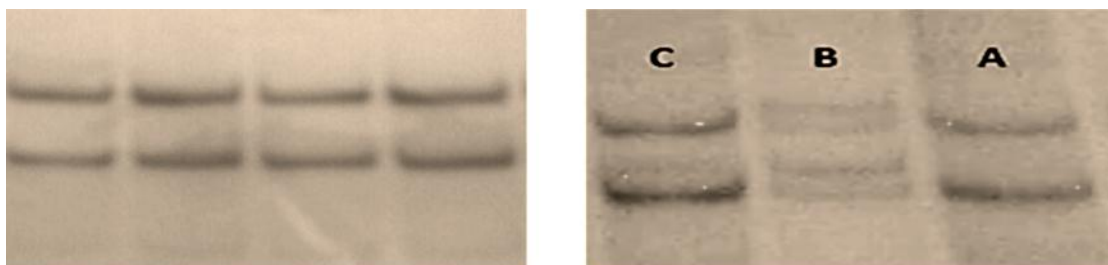
شکل ۱: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ناحیه تنظیمی بالا دست ژن‌های کالپاستاتین (چپ) و کالپاین (راست). M: نشانگر وزن مولکولی ۵۰ جفت بازی شرکت فرمتاز

Figure 1. PCR products of upstream regulatory region of calpastatin (left) and calpain (right) genes. M: 50 bp molecular weight marker of Fermentas Company.

با توجه به اهمیت ژن‌های کالپاین و کالپاستاتین در زمینه صفات کمی و کیفی گوشت، پژوهش‌های زیادی در رابطه با اثر این ژن‌ها در گونه‌های مختلف دام انجام شده است که تعدادی از تحقیقات انجام شده روی نژادهای مختلف گوسفند بوده است. در مجموع در مطالعات انجام شده روی نژادهای بومی گوسفند و برخی از نژادهای خارجی، فراوانی آلل A ژن کالپاین بیشتر از فراوانی آلل B برآورد شده است. به طوری که فراوانی آلل A این ژن در نژادهای مختلف به ترتیب ۰/۹۶ در گوسفندان نژاد کردی (۱۸)، ۰/۸۵ در گوسفندان قره‌گل (۲۲)، ۰/۵۶ در گوسفندان بلوچی (۱۹) و ۰/۸۹ در گوسفندان پُلی‌پلی (۶) گزارش شده است.

نتایج شناسایی چند شکلی در جایگاه‌های مورد مطالعه با روش RFLP: محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شدند. پس از هضم آنزیمی همه نمونه‌های مورد مطالعه برای هر دو ژن یک شکل بودند. بنابراین برای حصول اطمینان بیشتر از عدم وجود چند شکلی در نواحی مورد نظر، تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها با روش SSCP نیز انجام شد.

نتایج شناسایی چند شکلی در جایگاه‌های مورد مطالعه با روش SSCP: برای نشانگر کالپاستاتین هیچ نوع چند شکلی مشاهده نشد اما در جایگاه کالپاین سه الگوی بانندی A، B و C به ترتیب با فراوانی‌های ۶۶، ۹ و ۲۵ درصد مشاهده شدند (شکل ۲).



شکل ۲: الگوهای بانندی SSCP مشاهده شده در جایگاه کالپاستاتین (چپ) و کالپاین (راست) در گوسفندان لری بختیاری

Figure 2. Observed SSCP banding patterns in calpastatin (left) and calpain (right) loci in Lori-Bakhtiari sheep

برنامه آماری SAS وجود ارتباط آماری معنی داری را بین الگوهای بانندی مشاهده شده و صفت وزن تولد نشان داد ( $P < 0.05$ ). تفاوت میانگین حداقل مربعات الگوهای مختلف بانندی ژن کالپاین برای صفت وزن تولد در جدول ۳ آمده است.

تجزیه و تحلیل ارتباطی نشانگر- صفت: در پژوهش حاضر جایگاه کالپاستاتین مونومورف بود، از این رو امکان تحلیل آماری برای این جایگاه وجود نداشت. اما برای جایگاه کالپاین تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام شد. نتایج آنالیز آماری حاصل از رویه Glimmix در

جدول ۳: تفاوت میانگین حداقل مربعات الگوهای بانندی مختلف ژن کالپاین برای صفت وزن تولد

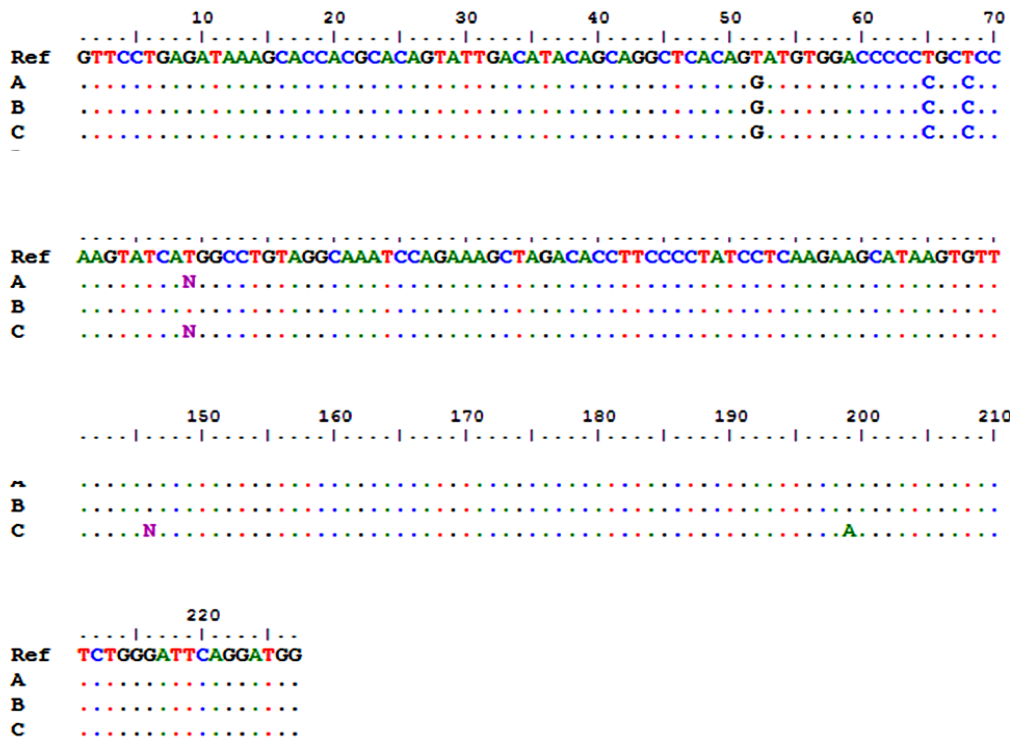
**Table 3. Least square means differences of different banding patterns of calpain gene for birth weight trait**

P-value	خطای استاندارد	تخمین	باند-باند	
0.0691	0.2542	-0.4661	A	B
0.2420	0.1988	0.2338	A	C
0.0223	0.3022	0.6999	B	C

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی ژنهای مورد مطالعه در پژوهش حاضر: برای تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی الگوهای بانندی مشاهده شده در ناحیه تنظیم بالادست ژن کالپاین یک نمونه از هر الگوی بانندی بدست آمده از روش PCR-SSCP، برای تعیین توالی به شرکت ( Daejeon 306-220, Republic of Korea) Bioneer ارسال شد. بعد از دریافت نتیجه توالی یابی، تعیین همولوژی توالی بدست آمده از طریق برنامه BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) انجام شد. این نتایج، صحت تکثیر و توالی یابی قطعه‌های مورد نظر را نشان داد. در ادامه با استفاده از نرم افزار BioEdit همترازی توالی‌ها انجام شد. نتایج هم‌ترازی این توالی‌ها در شکل ۳ نشان داده شده است.

طبق دانش ما تا به حال تحقیقی روی نواحی بالادست ژنهای کالپاستاتین و کالپاین صورت نگرفته است و نتایج پژوهش حاضر نمایانگر وجود چند شکلی ژنتیکی در ناحیه مورد نظر در ژن کالپاین بود و در مجموع سه الگوی بانندی A، B و C مشاهده شد که در ادامه با روش تعیین توالی چند شکلی‌های مورد نظر یافت شدند. با وجود چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی جایگاه‌های برشی متفاوتی ایجاد شد و هم چنین ساختار موتیف‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف باهم متفاوت بود که با توجه به اهمیت موتیف‌ها می‌تواند در برنامه‌های اصلاح نژادی به کار گرفته شود. هم چنین تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که هیچ ارتباط معنی داری بین الگوهای بدست آمده و صفات مورد مطالعه به جز وزن تولد ( $P < 0.05$ ) در پژوهش حاضر وجود ندارد.





شکل ۳: هم‌ترازی توالی الگوهای بانندی مشاهده شده در ناحیه تنظیمی بالادست ژن کالپاین در گوسفند لری بختیاری. N نمایانگر ژنوتیپ هتروزیگوت، حروف A تا C نشان دهنده الگوهای بانندی به دست آمده و Ref نشان دهنده توالی ژن رفرنس (J05065) می‌باشد.

Figure 3. Sequences alignments of observed banding patterns in upstream regulatory region of calpain gene in Lori-Bakhtiari sheep. N showed heterozygote genotypes, A to C alphabets showed banding patterns and Ref showed reference gene (J05065).

NEBcutter2 / مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که برخی از این چند شکلی‌ها در محل آنزیم‌های برشی قرار دارند که احتمالاً می‌توان از این نشانگرها در مطالعات بعدی به منظور تعیین چند شکلی با تکنیک RFLP استفاده نمود (جدول ۴).

نتایج بررسی‌های حاصل از هم‌ترازی الگوهای بانندی مشاهده شده برای ژن کالپاین در گوسفندان لری بختیاری وجود شش چند شکلی تک نوکلئوتیدی را در موقعیت‌های مختلف نشان داد. چند شکلی‌های حاضر با استفاده از سرور <http://tools.neb.com>

جدول ۴: جایگاه‌های برشی شناسایی شده در الگوهای بانندی ژن کالپاین در گوسفندان لری بختیاری

**Table 4. Detected restriction sites in banding patterns of calpain gene in Lori-Bakhtiari sheep**

الگوهای بانندی			آنزیم برشی Restriction enzyme	موقعیت Position	شماره Number
Banding patterns					
C	B	A			
*	*	*	FspEI	34	1
*	*	*	BtsCI	57	2
*	*	*	MspJI	61	3
*	-	*	LpnPI	62	4
*	*	*	AciI	64	5
*	*	*	FokI	64	6
*	*	*	FauI	71	7

*	*	*	MspJI	80	8
-	*	-	FspEI	80	9
*	-	*	AlwNI	82	10
*	*	*	Hpy188III	95	11
*	-	-	DraIII	151	12
*	-	-	MspJI	158	13
*	*	-	BbvI	172	14
*	*	*	Fnu4HI	186	15
*	*	*	FspEI	197	16

\*نمایانگر وجود جایگاه آنزیم برشی و علامت - نشان دهنده عدم وجود محل آنزیم برشی می باشد.

\*Showed the restriction site and - showed the absence of restriction site

موتیف‌های تنظیمی متعددی هستند که برای کنترل رونویسی ژن‌ها ضروری می‌باشند. شواهد زیادی نشان می‌دهند که تغییر در این موتیف می‌تواند به طور بحرانی فعالیت‌های تنظیمی بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد. از آنجایی که موتیف‌ها فاکتورهای کلیدی در حفظ ساختار پروموتورها هستند. یک رهیافت موثر برای فهم بیشتر تکامل نواحی پروموتوری در مهره داران مقایسه فراوانی و الگوی پراکنش این موتیف‌ها در بین گونه‌ها و نژادهای مختلف است. موتیف‌های دئوکسی‌نوکلئیک‌اسید اهمیت زیادی در تجزیه و تحلیل تنظیم بیان ژن دارند. این موتیف‌ها توالی‌های کوتاهی از دئوکسی‌نوکلئیک‌اسید با الگوی تکرار شونده هستند که دارای عملکرد بیولوژیک می‌باشند. اغلب این موتیف‌ها، جایگاه‌های اتصال اختصاصی پروتئین‌هایی از قبیل نوکلئازها و فاکتورهای رونویسی هستند. برخی از آن‌ها نیز در فرآیندهای مهم در سطح ریبونوکلئیک‌اسید<sup>۱</sup> از جمله اتصال به ریپوزوم، فرآیند mRNA (اسپلایسینگ، ویرایش، پلی آدنیلایسیون) و خاتمه رونویسی درگیر هستند. برای مثال TCF-1 در ناحیه دیستال خود شبیه خانواده فاکتورهای رونویسی Ets (specific E26 transformation) است که در سه فرم مختلف splice وجود دارند. Ets بزرگترین خانواده فاکتورهای رونویسی خاص حیوانات پر

شناسایی موتیف‌های درگیر در فرآیند تنظیم بیان ژن در ناحیه بالادست ژن‌های مورد مطالعه: برای شناسایی موتیف‌ها، توالی‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار DNASIS MAX مورد آنالیز قرار گرفتند. لیست تمامی موتیف‌های شناسایی شده در جدول ۵ آمده است. با آنالیز مقایسه‌ای موتیف‌ها بین توالی‌های موردنظر، مشاهده شد که برخی از موتیف‌ها فقط در یک الگوی بانندی یافت می‌شوند. مانند موتیف alpha\_INF.2 که فقط در الگوی بانندی C وجود داشت. همچنین مشاهده شد تمامی موتیف‌ها بین الگوهای بانندی مشترک بودند به جز موتیف‌های PEA3\_CS و yeast\_terminationCS1 که در الگوی بانندی C وجود نداشتند.

در قطعه تکثیر شده از ژن کالپاین در پژوهش حاضر موتیف‌های متعددی مشاهده شد، از جمله موتیف CAP\_site که محل اتصال فاکتور رونویسی CAP می‌باشد. این فاکتور یکی از فاکتورهای تحریک کننده رونویسی در چندین جایگاه بوده و متابولیسیم قند، اسیدهای آمینه، فرآیندهای انتقال، پیچش پروتئین‌ها و... را تحت تاثیر قرار می‌دهد. CAP می‌تواند اپران‌های حساس به کاتابولیت‌ها را در حضور افکتور آلوستریک cAMP تحریک کند [https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003\\_7/Pa-ge1.htm](https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2003_7/Pa-ge1.htm). پروموتور گونه‌های یوکاریوتی حاوی

طوری که تعداد موتیف‌های شناسایی شده بیش از تعداد پروتئین‌های تنظیمی شناخته شده می باشد. بنابراین نقش دقیق بسیاری از این موتیف‌ها و پروتئین‌های متصل شونده به آن‌ها هنوز ناشناخته هستند (۷).

سلولی هستند که در انسان و موش به ترتیب دارای ۲۹ و ۲۸ ژن بوده و در طیف وسیعی از عملکردها شامل تمایز، کنترل سیکل، مهاجرت و تکثیر و آپتوزیس سلولی نقش دارند. امروزه روش‌های کامپیوتری تعداد بسیار زیادی از موتیف‌های تنظیمی را در نواحی بالادست ژن‌ها شناسایی کرده است به

جدول ۵: موتیف‌های شناسایی شده در الگوهای باندی مختلف ناحیه تنظیمی بالادست ژن کالپاین در گوسفند لری-بختیاری

**Table 5. detected motifs in different banding patterns of upstream regulatory region of calpain gene in Lori-Bakhtiari sheep**

الگوهای باندی Banding patterns		
A	B	C
AP_2_CS4	AP_2_CS4	AP_2_CS4
AP_2_CS6	AP_2_CS6	AP_2_CS6
CAP_site	CAP_site	CAP_site
E1A_F_CS	E1A_F_CS	E1A_F_CS
EARLY_SEQ1	EARLY_SEQ1	EARLY_SEQ1
EF_1A_CS	EF_1A_CS	EF_1A_CS
Ets_1_CS	Ets_1_CS	Ets_1_CS
gamma_IRE_CS	gamma_IRE_CS	gamma_IRE_CS
GATA_1_CS	GATA_1_CS	GATA_1_CS
GCF_CS	GCF_CS	GCF_CS
LBP_1_RS	LBP_1_RS	LBP_1_RS
LF_A1_RS	LF_A1_RS	LF_A1_RS
PEA3_CS	PEA3_CS	-
TCF_1_CS	TCF_1_CS	TCF_1_CS
XRE_CS1	XRE_CS1	XRE_CS1
yeast_terminationCS1	yeast_terminationCS1	-
-	-	alpha_INF.2

\* Motifs common between all banding patterns.

\*موتیف‌های مشترک در تمامی الگوهای باندی.

بهبود کیفیت گوشت در گوسفند بهره برد. از دلایل احتمالی عدم معنی داری ارتباط بین ژنوتیپ و دیگر صفات مورد مطالعه می توان به تعداد کم نمونه‌ها اشاره داشت. پژوهش حاضر اولین بررسی در مورد شناسایی چند شکلی ژنتیکی در نواحی بالادست ژن‌های مذکور بوده است. متأسفانه امکان بررسی ارتباط ژن‌های مورد نظر با صفات کیفیت گوشت و لاشه به دلیل فراهم نبودن ملزومات اندازه‌گیری (اولتراسوند یا ذبح حیوان)، وجود نداشت. به هر حال انجام پژوهش‌های بیش‌تر و بررسی دقیق‌تر این جایگاه‌های ژنی و دیگر نواحی در این ژن‌ها (اینترن، اکزون و ...) برای تایید نتایج پژوهش حاضر ضروری به نظر می‌رسد.

### نتیجه‌گیری نهایی

در پژوهش حاضر، شناسایی چند شکلی‌های احتمالی دو جایگاه ژنی کالپاستاتین و کالپاین در جمعیت گوسفندان لری بختیاری با استفاده از روش‌های PCR-RFLP و PCR-SSCP مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات حاصل از این پژوهش حاکی از یک شکل بودن جایگاه کالپاستاتین بود، لذا به نظر می‌رسد که نشانگرهای ژنتیکی دیگری برای این جایگاه و یا دیگر جایگاه‌های ژنی باید مورد بررسی قرار گیرند. همچنین با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش مبنی بر چند شکل بودن جایگاه کالپاین و معنی دار بودن ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و صفت وزن تولد، احتمالاً از فرم‌های آللی مشاهده شده در این جایگاه ژنی می‌توان در برنامه‌های اصلاح نژادی برای

1. Arthur, J.S.C. and Crawford, C. 1996. Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 3: 201-206.
2. Aslaminejad, A.A., Nassiry, M.R., Eftekhari Shahroudi, R., Valizadeh, R., Javadmensh, A., Norouzy A., Samei, A. and Ghiasi, H. 2006. Study on the genetic polymorphisms of candidate genes in Karakul. *J. Food Sci. Technol.* 74: 21-29 (in Persian).
3. Bishop, M., Koohmaraie, M., Killefer, J. and Kappes, S. 1993. Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin Gene. *J. Anim. Sci.* 71: 2277.
4. Boehm, M.L., Kendall, T.L., Thompson, V.F. and Goll, D.E., 1998. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. *J. Anim. Sci.* 76: 2415-34.
5. Casas, E., White, S.N., Wheeler, T.L., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M., Riley, D.G., Chase Jr, C.C., Johnson, D.D. and Smith, T.P.L. 2006. Effects of *calpastatin* and *-calpain* markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.* 84:520-525
6. Chung H., Davis, M. and Hines, H. 2001. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. *Anim. Genet.* 32: 53.
7. D'haeseleer, P. 2006. What are DNA sequence motifs? *Nature Biotech.* 24:423-425.
8. Dong, Y. and Zhu, H. 2005. Single-strand conformational polymorphism analysis: basic principles and routine practice. *Methods Mol. Med.* 108: 149-57.
9. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. 2003. The calpain system. *Physiol. Rev.* 83: 731-801.
10. Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L. and Jia, Z. 1999. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *The EMBO. J.* 18: 6880-6889.
11. Kapprell, H. and Goll, D. 1989 Effect of Ca<sup>2+</sup> on binding of the calpains to calpastatin. *J. Biol. Chem.* 264: 17888-17896.
12. Karimzadeh, S., Farhadi, A. and Tanha, T. 2016. Introduction and evaluation of livestock breeds (Iran and world). PartoVaghe Publication, Tehran, pp. 206. (In Persian).
13. Koohmaraie, M., Doumit, M. and Wheeler, T. 1996. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. *J. anim. Sci.* 74: 2935-42.
14. Lonergan, S.M., Ernst, C., Bishop, M., Calkins, C.R. and Koohmaraie, M. 1995. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 73: 3608-12.
15. Ma, H., Yang, H.Q., Takano, E., Hatanaka, M. and Maki, M. 1994. Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biologic. Chem.* 269: 24430-6.
16. Miller, S., Dykes, D. and Polesky, H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* 16, 1215.
17. Murachi, T. 1989. Intracellular regulatory system involving calpain and calpastatin. *Biochem. Inter.* 18: 263-94.
18. Nassiry, M.R., Shahroudi, F.E., Tahmoorespur, M. and Javadmanesh, A. 2007. Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. *Pak. J. Biol. Sci.* 10: 1062-7.
19. Nassiry, M.R., Tahmoorespur, M., Javadmanesh, A., Soltani, M. and Foroutani, Far S. 2006. Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. *Iranian J. Biotech.* 4: 188-92.
20. Page, B., Casas, E., Heaton, M., Cullen, N., Hyndman, D., Morris, C., Crawford, A., Wheeler, T., Koohmaraie, M. and Keele, J. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.* 80: 3077-85.
21. Shackelford, S., Koohmaraie, M., Cundiff, L., Gregory, K., Rohrer, G. and Savell, J. 1994. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin

- activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 72: 857-63.
22. Shahroudi, F.E., Nassiry, M.R., Valizadh, R., Heravi-Moussavi, A., Pour, M.T. and Ghiasi, H. 2006. Genetic polymorphism at MTNR1A, CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iranian J. Biotech.* 4: 117-22.
23. Veiseth, E., Shackelford, S., Wheeler, T. and Koohmaraie, M. 2001. Effect of postmortem storage on mu-calpain and m-calpain in ovine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 79: 1502-8.
24. Williams, J. 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev. Sci. Tech.* 24, 379-391.



Gorgan University of Agricultural  
Sciences and Natural Resources

*J. of Ruminant Research*, Vol. 5(4), 2018

<http://ejrr.gau.ac.ir>

## Detection of polymorphism in upstream regulatory region of calpain and calpastatin genes and its association with body weight and fat-tail characteristics traits in Lori-Bakhtiari sheep

E. Nobakht Langari<sup>1</sup>, A. Farhadi<sup>2\*</sup>, Gh. Rahimi<sup>3</sup>, M. Gholizadeh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.Sc. Graduated, <sup>2</sup>Assistant Prof., and <sup>3</sup>Professor, Dept. of Animal Sciences, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Received: 10/03/2017; Accepted: 12/15/2017

### Abstract

**Background and objective:** The aim of the present study was to investigate allelic diversity in the upstream regulatory region of calpastatin and calpain genes, bioinformatics analysis of studied genes and association of allelic variants with body weight and fat-tail traits in Lori-Bakhtiari sheep.

**Materials and methods:** One hundred and fifty blood samples were collected randomly and DNA was extracted by modified salting out method. The specific primer pairs were designed using Oligo7 software for amplification of fragments with lengths of 245 and 225 bp from the upstream regulatory region of calpastatin and calpain genes, respectively. After PCR, the amplified products of calpastatin and calpain marker sites were subjected to endonuclease digestion with *PstI* and *HaeIII* enzymes, respectively. Due to the monomorphic of RFLP results, the SSCP technique was used for more accurate assessment of amplified fragments. After genotyping, one sample from each banding patterns of calpain gene was sequenced. The obtained sequences were investigated for identification of motifs involved in gene regulation and also mutations in different banding patterns by DNASIS MAX and BioEdit software. Association between observed banding patterns and body weight traits at birth, 3, 6, and 12 months of age and weight, upper bound, lower bound, and the height of fat-tail was investigated by Glimmix procedure of SAS (version 9.1) software.

**Results:** Three banding patterns of A, B, and C with frequencies of 66, 9, and 25% were observed in Lori-Bakhtiari samples, respectively. The upstream region of calpastatin gene was monomorphic in present study. Statistical analysis showed significant association between banding patterns of calpain marker site and body weight at birth in Lori-Bakhtiari sheep ( $P < 0.05$ ). Also, sequences alignment of observed banding patterns for calpain gene in studied sheep showed six single nucleotide polymorphisms in different positions. Result of calpastatin gene sequencing confirmed its monomorphic behavior so that no differences were observed between the sequences of this gene. Comparative motifs analysis between studied sequences showed that all motifs were common between the banding patterns except PEA3\_CS and yeast\_terminationCS1 which were not observed C banding pattern and alpha\_INF.2 which observed only in C banding pattern.

**Conclusion:** According to the polymorphic pattern in upstream regulatory region of calpain locus and its significant association with birth weight, this marker site may be used in breeding programs to improve meat quality in sheep.

**Keywords:** Calpastatin gene, Calpain gene, Lori-Bakhtiari sheep, Upstream regulatory region, Bioinformatics.

---

\*Corresponding Author; ayoub\_farhadi@ymail.com