

تعیین توالی و بررسی بخشی از ناحیه پرموتوری ژن آلفا لاکتالبومین در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه ایران

Sequencing and analysis of partial promoter region of Alpha Lactalbumin gene in Iranian Dromedary and Bactrian camels

نغمه ساعدی^۱، مجتبی طهمورث پور^{۱*}، محمد رضا نصیری^۱، محمدهادی سخاوتی^۱، مریم راعی طرقي^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادان، استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه
فردوسی مشهد

Saedi N¹, Tahmoorespur M^{*1}, Nassiri MR¹, Sekhavati MH¹, Raei Toroqi M¹

1- MSc Student, Professors, Assistant Professor, Department of Animal Science,
College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_tahmoorespur@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶)

چکیده

آلفا لاکتالبومین یکی از پروتئین‌های مهم آب‌پنیر شیر شتر است. هدف از این تحقیق بررسی ساختار ناحیه تنظیمی ژن آلفا لاکتالبومین به طول حدود ۱۰۲۰ نوکلئوتید در دو گونه شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایران با استفاده از تعیین توالی و بررسی بیوانفورماتیکی است. ۱۰ نمونه خون از شتر تک کوهانه از کشتارگاه مشهد واقع در جاده فریمان روستای تپه سلام و پنج نمونه خون از شتر دو کوهانه از ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل واقع در روستای جهاد آباد جمع‌آوری شد. ناحیه مورد نظر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر و توالی‌یابی شد. پس از تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایشی، پنج هاپلوتاایپ (چهار جهش) در گونه‌های شتر تک کوهانه و چهار هاپلوتاایپ (سه جهش) در گونه‌های شتر دو کوهانه و همچنین هفت موتیف اتصال فاکتورهای رونویسی در گونه شتر تک کوهانه و هفت موتیف در گونه شتر دو کوهانه مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی

آلفا لاکتالبومین
شتر تک کوهانه و دو کوهانه ایران
ناحیه تنظیمی
هاپلوتاایپ

عمده‌ترین محصولات شتر شیر و گوشت آن می‌باشد. شیر شتر سفید، غیر شفاف (مات) و دارای طعم مطبوعی است (Dilanyan 1995). شیر شتر سرشار از ویتامین C بوده و در مناطق بیابانی، که دسترسی به سبزی و میوه کم است، منبع مناسبی از این ویتامین محسوب می‌شود (Sawaya et al. 1984; Farah 1992; Haddadin et al. 2008). میزان کلسیم، منیزیم، فسفر، پتاسیم و کبالت در شیر شتر بیشتر از شیر انسان ولی میزان لاکتوز و عنصر روی آن کم‌تر از شیر انسان می‌باشد (Shamsia 2009).

پروتئین‌های شیر شامل کازئین‌ها و پروتئین‌های آب پنیر می‌باشد. کازئین‌ها شامل آلفاکازئین ۱ و ۲، بتا کازئین، لاکتالبومین و گاما کازئین می‌باشند. آب‌پنیر نیز شامل بتالاکتوگلوبولین، آلفا لاکتالبومین، ایمونوگلوبولین‌ها، آلبومین سرمی و پروتئین‌های کم اهمیت می‌باشد. در مقایسه با گاو، آب‌پنیر شیر شتر دارای مقادیر بالاتری از عوامل ضد میکروبی مانند لیزوزیم، ایمونوگلوبولین‌ها و... می‌باشد. ترکیب اصلی آب‌پنیر در شیر شتر و آغوز گاو شباهت بالایی با هم دارد (Ikonen et al. 1997) و حداکثر سطح لاکتالبومین در آب‌پنیر شتر، سه روز پس از زایمان مشاهده می‌شود (Schlee and Rotmann 1992). پس از بتا لاکتالگوبولین، لاکتالبومین دومین پروتئین عمده آب‌پنیر شیر شتر می‌باشد که حدود دو درصد از کل پروتئین‌های شیر و ۱۳ درصد از پروتئین‌های آب‌پنیر را تشکیل می‌دهد و به دو زیر شاخه آلفا و بتا تقسیم می‌شود. آلفا لاکتالبومین با دارا بودن وزن مولکولی ۱۴/۱۶ کیلو دالتون و متشکل از ۱۲۳ اسیدآمین (Beg et al. 1985)، یک پروتئین گلوبولی باند شونده با کلسیم می‌باشد که در غدد شیری ترشح شده و جز تنظیمی سیکل سنتز لاکتوز می‌باشد (Hill and Brew 1975; Permyakov and Berliner 2000).

کلسیم ترشح لاکتالبومین را کنترل می‌کند. آلفا لاکتالبومین به طرز غیرمعمولی در حضور کلسیم مقاومت بیش‌تری نسبت به گرما از خود نشان می‌دهد. این در حالی است که اکثر پروتئین‌ها در حضور کلسیم حساسیت بیش‌تری نسبت به گرما از خود نشان می‌دهند (Hill and Brew 1975). تاکنون ساختار اولیه این پروتئین در موجوداتی مانند گاو، انسان، خوک، بز، خرگوش و موش گزارش شده‌است (Hall et al. 1982). لاکتالبومین در درمان

بیماری‌هایی مانند دیابت، آلرژی و هپاتیت مؤثر می‌باشد. آلفا لاکتالبومین خاصیت ضد باکتریایی داشته و علیه باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس پنومونیا عمل می‌کند (Pellegrini et al. 1999).

شناسایی محل اتصال فاکتورهای رونویسی به درک درستی از تنظیم بیان ژن نیاز دارد. شناسایی موتیف‌های تنظیم‌کننده در شرایط آزمایشگاهی به دلیل تنوع پذیر بودن توالی‌ها و عدم وجود اطلاعات کافی برای ایجاد موتیف توافقی به‌منظور پیش‌بینی ارزش‌های کمی و کیفی احتمالی به چالش کشیده شده‌است. ژن‌هایی که فاکتورهای رونویسی^۱ یکسانی در ناحیه بالادست خود دارند الگوی بیان یکسانی را نشان می‌دهند. رونویسی ژن توسط اثر متقابل بین فاکتورهای رونویسی و هدف‌های آن‌ها روی ژنوم تنظیم می‌شود. موتیف یک الگو در توالی است که توسط فاکتورهای رونویسی برای انجام این اثرات متقابل شناسایی می‌شود.

ساده‌ترین شکل تغییر DNA^۲، جانشینی یک نوکلئوتید به جای نوکلئوتید دیگر می‌باشد. این تغییرات چندشکلی تک نوکلئوتیدی SNP^۳ نامیده می‌شود که رایج‌ترین نوع تغییر یا چندشکلی ژنتیکی می‌باشد. به‌طور متوسط ۹۰ درصد از پلی‌مورفیسم‌های مؤثر در انسان از نوع SNP می‌باشد (Smith et al. 2003).

به دلیل این‌که بیش‌تر از ۹۷ درصد ژن‌ها را توالی‌های غیر کد کننده شامل می‌شود بیشتر جهش‌ها در این نواحی رخ می‌دهد. از آن‌جایی‌که SNPهای نواحی کدکننده اغلب سبب تغییر ساختار و عملکرد بیولوژیکی پروتئین‌ها می‌شوند بیش‌تر مورد توجه پژوهشگران می‌باشند ولی ایجاد موتاسیون در نواحی پروموتور ژن یا نواحی اینترون ژن نیز سبب تغییر در رونویسی ژن و پایداری RNA^۴ و در نهایت بیان ژن مربوطه می‌شود. SNPها هم‌چنین ممکن است در نواحی تنظیمی ژن نیز وجود داشته باشند که باعث تغییر در مقدار پروتئین تولیدی می‌شود. یافتن چنین SNPهایی مشکل‌تر است و چگونگی تنظیم بیان ژن نیز به آسانی مشخص نمی‌شود (Mike 2004).

¹ Transcription Factor (TF)

² Deoxyribonucleic Acid

³ Single nucleotide polymorphism

⁴ Ribonucleic acid

در این بررسی از یک جفت آغازگر جهت جداسازی و تکثیر بخشی از ناحیه کدکننده و غیرکدکننده ژن آلفا لاکتالبومین شتر استفاده شد.

جدول ۱- ترکیب و غلظت نهایی و برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش

PCR جهت تکثیر ناحیه پروموتور ژن آلفا لاکتالبومین

مواد PCR	حجم (میکرولیتر)	غلظت (در ۵۰ میکرولیتر)	
آب دیونیزه	۱۵/۸	–	
بافر (10x)	۲/۵	10x	
دی‌اکسی نوکلئوتیدتری فسفات (10mM)	۲	0. 8mM of each	
کلرید منیزیم (50mM)	۱/۵	1. 6mM	
پرایمر (5P mol/μl)	۰/۵	0. 2 Pmol	
آنزیم Taq polymerase	۰/۲	1. 5 Unit	
DNA	۲/۵	≈ 100 ng	
مراحل واکنش PCR	دما (C°)	زمان (S)	تعداد چرخه
واسرشت ابتدایی	۹۴	۳۰۰	۱
واسرشت	۹۴	۳۰	
اتصال	۶۱	۳۰	۳۵
بسط	۷۲	۳۰	
بسط نهایی	۷۲	۶۰۰	۱

پرایمر رفت: 5'-GCTACCAAGTGAAGGACTCATTC-3'

پرایمر برگشت: 5'-GAGCAGAGAGACCAAGGACATCA-3'

در مجموع قطعه‌ای به طول ۱۰۱۸ جفت‌باز توسط این جفت پرایمر تکثیر شد. جفت پرایمر با استفاده از توالی ثبت شده شتر تک کوهانه با شماره دسترسی NW_006210498 در پایگاه اطلاعاتی NCBI^۴ و با استفاده از نرم‌افزار Primer premier 5 طراحی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ۳۵ سیکل و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش PCR و غلظت مواد تشکیل دهنده و برنامه حرارتی در جدول شماره ۱ ارایه شده‌است.

واکنش PCR برای تمام نمونه‌ها با استفاده از جفت آغازگر انجام شد. ابتدا طی چند واکنش ابتدایی فرایند PCR برای هر کدام از

با توجه به اهمیت ناحیه پروموتور و فاکتورهای رونویسی، هدف از این مطالعه بررسی ساختار ژنتیکی ناحیه پروموتور ژن آلفا لاکتالبومین در این ناحیه در شترهای تک کوهانه و دو کوهانه ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای اجرای این طرح نمونه‌های خون به‌صورت تصادفی به تعداد ۱۰ نمونه خون شتر تک کوهانه از کشتارگاه مشهد واقع در جاده فریمان روستای تپه سلام و تعداد پنج نمونه خون شتر دو کوهانه از ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل واقع در روستای جهاد آباد تهیه شد. نمونه‌های خون گرفته شده در داخل تیوب‌های حاوی EDTA^۱ و بر روی یخ به آزمایشگاه‌های بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافت و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به‌منظور استخراج DNA از کیت Bioneer (K3032) استفاده شد. به‌دلیل بالا بودن غلظت نمونه‌های خون تهیه شده از حیوانات، پروسه استخراج با مشکل عبور دادن نمونه‌های خون از فیلترهای داخل ستون‌ها همراه بود. برای حل این مشکل، با کمی تغییر در دستورالعمل توصیه شده توسط شرکت، مقدار نمونه خون گرفته شده در اولین مرحله نصف شده و باقی‌مانده آن با PBS^۲ به حجم مورد نظر در دستورالعمل کیت رسانده شد. این عمل باعث رقیق شدن نمونه‌ها شد و عمل استخراج با این تغییر صورت گرفته برای تمامی نمونه‌ها با موفقیت به انجام رسید. به منظور بررسی کیفیت DNA و تعیین حضور DNA در محلول استخراج شده، از الکتروفورز استفاده شد. در این روش چهار میکرولیتر از DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید در داخل دستگاه Gel Document، مجهز به لامپ UV^۳ مورد بررسی قرار گرفت، تا نمونه‌های محلول استخراجی از لحاظ حضور DNA نیز مورد تأیید قرار گیرد. برای تعیین کمیت DNA نیز از دستگاه نانودراپ استفاده شد.

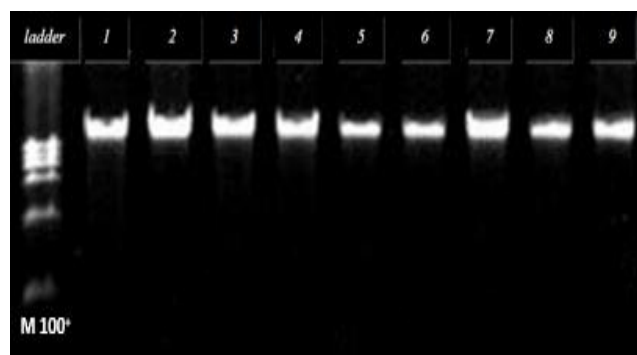
^۱ Ethylene diamine tetra acetic acid

^۲ Phosphate buffered saline

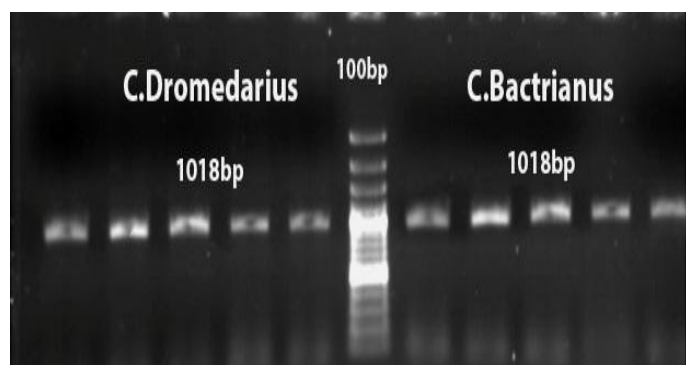
^۳ Ultra violet

^۴ National center of biotechnology information

زیر هم چینی توالی‌های حاصل، نشان داد توالی مورد توافق برای ژن آلفا لاکتالبومین برای شتر تک کوهانه ۱۰۰۰ جفت باز (شکل ۳) و شتر دو کوهانه ۱۰۱۲ جفت باز (شکل ۴) بود و این توالی‌ها به ترتیب با شماره ثبت KP217170 و KP217171 در پایگاه NCBI ثبت شدند. این توالی در شترهای تک کوهانه شامل ۲۷۵ نوکلئوتید A، ۲۲۱ نوکلئوتید C، ۲۲۸ نوکلئوتید G و ۲۷۶ نوکلئوتید T می‌باشد (شکل ۵) که نسبت C + G، ۴۴/۹۰ درصد و A + T، ۵۵/۱۰ درصد است و وزن مولکولی یک رشته از این توالی ۳۰۳۳۸۲ دالتون و وزن مولکولی دو رشته آن ۶۰۷۰۶۹ دالتون می‌باشد.



شکل ۱- الکتروفورز تمام نمونه‌های استخراج شده بر روی ژل آگارز یک درصد نشان‌دهنده باندهای کاملاً شفاف و روشن، فاقد شکستگی و بدون کشیدگی در اثر آلودگی با نمک یا RNA بودند. هم‌چنین شفاف و متراکم بودن باندها بیانگر غلظت بالای DNA می‌باشد این امر نشان‌دهنده موفقیت این روش در استخراج DNA از خون کامل در شترهای تک کوهانه و دوکوهانه می‌باشد.



شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR برای ناحیه پرموتور ژن آلفا لاکتالبومین به طول ۱۰۰۰ جفت‌باز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

آغازگرها به‌طور جداگانه بهینه شد و سپس از برنامه بهینه شده برای تمامی نمونه‌ها استفاده شد. جهت تفکیک محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. حدود ۲۵ میکرولیتر از محصول تخلیص شده PCR داخل تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس تیوب‌ها شماره‌گذاری شده و در نهایت درب تیوب‌ها با پارافیلیم مسدود شد. نمونه‌ها در داخل جعبه‌های یونولیت حاوی یخ خشک بسته‌بندی شده و جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر (Bioneer, south Korea) ارسال شدند.

از نرم‌افزار CLC برای بررسی صحت توالی‌یابی نمونه‌ها استفاده شد (www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-main-workbench). هم‌چنین از این نرم‌افزار برای به‌دست آوردن توالی توافقی و تشخیص پلی مورفیسم استفاده شد. نرم‌افزار N-site (<http://www.softberry.com>) برای مشخص کردن موتیف‌های موجود در توالی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی نوکلئوتیدهای توالی توافقی برای شتر تک کوهانه و دو کوهانه به کمک رویه Composition برنامه BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج طیف‌سنجی نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای واکنش‌های PCR برخوردار است. شکل ۱ نشان دهنده موفقیت روش استخراج DNA از خون در شترهای تک کوهانه و دو کوهانه می‌باشد. عدد به دست آمده از نانودراپ ۱/۸۱ بود که نشان دهنده خلوص مطلوب DNA استخراج شده بود. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داد که پرایمرها به‌خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ناحیه پرموتور به‌همراه قسمتی از اگزون شماره یک آن که در مجموع شامل ۱۰۱۸ جفت‌باز می‌باشد، به خوبی تکثیر شده‌اند که در شکل ۲ مشاهده می‌شود.

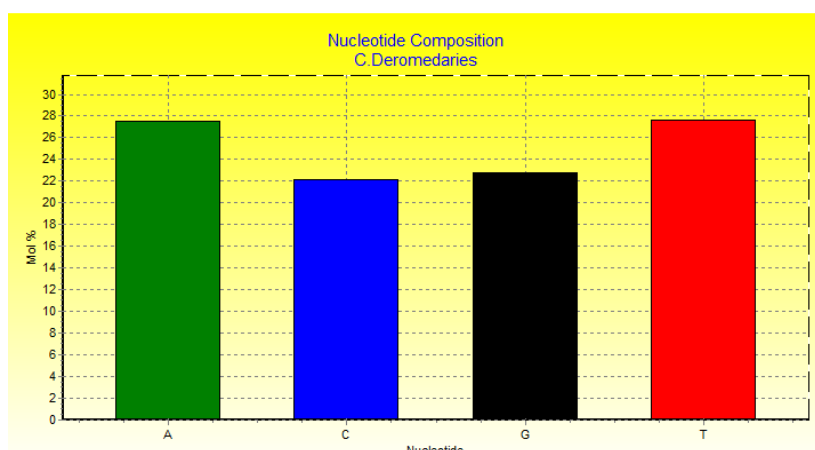
یکی از اهداف این تحقیق تعیین توالی مورد توافق برای هر یک از شترهای تک کوهانه و دوکوهانه بود. برای این منظور فایل‌های کروماتوگرام (با فرمت ab1) مربوط توالی‌های هر کدام از شترهای تک کوهانه و دوکوهانه به‌طور جداگانه مورد استفاده قرار گرفتند.



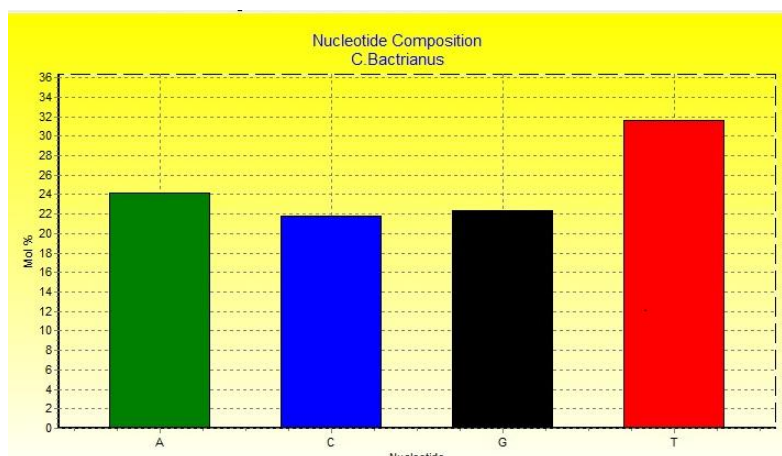
شکل ۳- توالی به دست آمده از شترهای تک کوهانه برای ژن آلفالاکتالبومین



شکل ۴- توالی به دست آمده از شترهای دو کوهانه برای ژن آلفالاکتالبومین



شکل ۵- ترکیب نوکلئوتیدی قسمتی از ناحیه پرموتور ژن آلفا لاکتالبومین در شترهای تک کوهانه ایرانی



شکل ۶- ترکیب نوکلئوتیدی قسمتی از ناحیه پرموتور ژن آلفا لاکتالبومین در شترهای دو کوهانه ایرانی

شد که در آنها به ترتیب بازهای $A \leftarrow T$ ، $G \leftarrow T$ و $C \leftarrow G$ تبدیل شده‌اند. در مطالعه‌ای بر روی ناحیه flanking - 5' از این ژن در گاو ۳ جهش دیده شده‌است (Bleck and Blemel 1993). در توالی توافقی شترهای تک کوهانه در مجموع هفت موتیف مشاهده شد که دو عدد آنها تکراری و از این بین یک عدد ناشناخته بودند (جدول ۲). در توالی توافقی شترهای دو کوهانه در مجموع هفت موتیف مشاهده شد که از این بین یک عدد ناشناخته بود (جدول ۳). در نواحی ابتدایی و انتهایی جهش کمتری نسبت به نواحی میانی مشاهده شد. همچنین بیش‌تر فاکتورهای رونویسی در شتر تک کوهانه در حدود جفت بازهای ۳۰۰ تا ۶۰۰ و در شتر دو کوهانه در فاصله ۸۳۰ جفت باز ابتدایی مشاهده شدند.

برای شترهای دو کوهانه این توالی شامل ۲۴۵ نوکلئوتید A، ۲۲۱ نوکلئوتید C، ۲۲۶ نوکلئوتید G و ۳۲۰ نوکلئوتید T می‌باشد (شکل ۶) که نسبت $C + G$ ، ۴۴/۱۷ درصد و $A + T$ ، ۵۵/۸۳ درصد است و وزن مولکولی یک رشته از این توالی ۳۰۶۰۷۶ دالتون و وزن مولکولی دو رشته آن ۶۱۴۲۲۷ دالتون می‌باشد.

در ناحیه پرموتوری ژن آلفا لاکتالبومین پنج هاپلوتایپ و چهار جهش در شترهای تک کوهانه در موقعیت‌های ۲۸۶، ۴۳۴، ۵۲۰ و ۷۷۲ bp^۱ دیده شد که در آنها به ترتیب بازهای $G \leftarrow T$ ، $A \leftarrow C$ ، $T \leftarrow A$ و $G \leftarrow T$ تبدیل شده‌اند. در شترهای دو کوهانه چهار هاپلوتایپ و سه جهش در موقعیت‌های ۲۵۰، ۴۰۷ و ۶۳۴ دیده

^۱ Base Paire

جهت شناخت ارتباط آن‌ها با میزان و ترکیبات شیر شتر پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از مجتمع صنعتی گوشت مشهد واقع در جاده فریمان روستای تپه سلام و ایستگاه تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اردبیل واقع در روستای جهاد آباد قدردانی می‌شود.

در بین این موتیف‌های مشاهده شده موتیف SP1 که در شترهای دوکوهانه دیده شد، در ژن آلفا کازئین S1 گاو هم گزارش شده است (Szymanowska et al. 2003). در بررسی‌های انجام شده، نتایج بدست آمده حاکی از تفاوت ناچیز بین شتر تک کوهانه و دو کوهانه بود و این دو گونه در این قسمت تقریباً مشابه هم بودند، پس می‌توان این فرض را بیان کرد که شترهای تک کوهانه و دو کوهانه میزان تولید پروتئین آلفالاکتالبومین مشابه دارند. با توجه به اهمیت ناحیه پرموتوری در این ژن و چندشکلی مشاهده شده و اهمیت آن در شیر شتر انجام مطالعات تکمیلی

منابع

- Beg OU, von Bahr Lindstrom H, Ziadi ZH, Jornvall H (1985) A camel milk whey protein rich in half-cystine. *European Journal of Biochemistry*, 147:233-239.
- Bleck GT, Bremel RD (1993) Sequence and single-base polymorphisms of the bovine alpha lactalbumin 5'-flanking region. *Gene* 30; 126:213-8.
- Dilanyan SH (1959) Utilization of Mares, Ewes, Camels and Yaks' Milk in the USSR. Report international community. dairying in warm countries. brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Farah Z (1992) Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research* 59:229-231.
- Haddadin MSY, Gammoh SI, Robinson RK (2008) Seasonal variation in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research* 75:8-12.
- Hall L, Craig RK, Edbrooke, MR, Campbell PN (1982) Comparison of the nucleotide sequence of cloned human and guinea-pig pre alpha-lactalbumin cDNA with that of chick pre-lysozyme cDNA suggests evolution from a common ancestral gene. *Nucleic Acids Research* 10:3503-3515.
- Hill RL, Brew K (1975) Lactose synthetase. *Advances in enzymology and related areas of molecular of biology* 43:411-490.
- Ikonen T, Ojala M, Syvaola EL (1997) Effects of composite casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Journal of Agriculture and food science* 283-294.

- Konuspayeva G, Faye B, Loiseau G (2009) The composition of camel milk: a metaAnalysis of the Literature data. *Journal of Food Composition and Analysis* 22:95-101.
- Mike MG (2004) PCR-based detection of minoritypoint mutations. *Human mutation* 23: 406-412.
- Pellegrini A, Thomas V, Bramaz N, Hunziker P, von Fellenberg R (1999) Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine Alfa-Lactalbumin Molecule. *Biochemica et Biophysica Acta* 1426:439-448.
- Permyakov EA, Berliner LJ (2000) Alpha-Lactalbumin: structure and function. *Federation of European Biochemical Societies* 473:269-274.
- Sawaya WN, Kalil JK, Al-Shalhat A, Al-Mohammad H (1984) Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *Journal of Food Science* 49:744-747.
- Schlee P, Rotmann O (1992) Identification of bovine kappa-casein C by using the polymerase chain reaction. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 190:153-155.
- Shamsia SM (2009) Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 1:52-58.
- Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, Burke W, Costanza ME, Evans WP 3rd, Foster RS Jr, Hendrick E, Eyre HJ, Sener S (2003) American Cancer Society guidelines for cancer screening. *A Cancer Journal of Clinics* 53:141-69.
- Szymanowska M, Malewski T, Zwierzchowski L (2003) Transcription factor binding to variable nucleotide sequences in 5-flanking regions of bovine casein genes. *International Dairy Journal* 14: 103-115.