Archive of SID

مجله پژوهش های علوم دامی/ جلد 20/4 شماره 2/ سال1389

چگونگی استفاده از روش PCR-SSCP برای بررسی چند شکلی ژن لپتین گوسفند کرمانی

مسلم شجاعی[1]، محمدرضا محمدآبادی[2*]، مسعود اسدی فوزی[2]، علی اسمعیلی زاده کشکوئیه[2]، محمدحسین فردوسی[1]، اعظم ترابی[3]، مهدی طیارزاده[1]، حجت میرزاخانی[4]

تاریخ دریافت: 88/10/18 تاریخ پذیرش: 89/5/23

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی و عضو انجمن پژوهشگران جوان دانشگاه شهید باهنر کرمان
2- به ترتیب دانشیار و استادیاران گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان
3- دانشجوی دکتری علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد
4- کارشناس علوم دامی و عضو انجمن پژوهشگران جوان دانشگاه شهید باهنر کرمان
* مسئول مکاتبه: E-mail: mmohammadabadi@yahoo.ca

چکیده

شناسایی ژن‌های موثر بر تعادل انرژی، تولید شیر و مصرف خوراک از علاقه‌مندی‌های اخیر پژوهشگران اصلاح نژاد است. در ایران علی رغم وجود منابع غنی حیوانی، تلاش‌های اندکی برای شناسایی ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات در آنها صورت گرفته است. بنابراین، شناسایی ژن‌های کاندیدای موثر بر صفات اقتصادی می‌تواند به اصلاح نژاد گوسفند در کشور کمک شایانی نماید. در این تحقیق برای بررسی چند شکلی ژن لپتین از 120 رأس گوسفند نر و ماده‌ی کرمانی ایستگاه اصلاح نژاد شهر بابک خونگیری شد. پس از استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج استاندارد، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر قطعه‌ی 275 جفت بازی از اگزون سوم این ژن انجام شد. پس از تعیین چند شکلی فضایی تک‌رشته‌ای، محصولات PCR، الگوهای باندی مربوط به ژن لپتین با استفاده از ژل آکریل آمید و رنگ آمیزی نیترات نقره، بدست آمد. برای ژن لپتین در نمونه‌ی مورد مطالعه، 10 الگوی A/A، C/C، A/B، A/C، A/B/C، A/B/E، A/B/F، A/C/F، A/B/D/E و A/B/C/F بدست آمد که نشان دهنده‌ی چندشکلی بالای در ژن لپتین گوسفندان نژاد کرمانی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لپتین، گوسفند کرمانی، چند شکلی،PCR-SSCP

www.SID.ir

Archive of SID

Using PCR-SSCP Technique to Investigate Polymorphism of Leptin Gene in Kermani Sheep

M Shojaei [1], MR Mohammadabadi*[2], M Asadi Fozi [2], KA Esmailizadeh [2], MH Ferdowsi[1] ATorabi [3], M Tayyarzadeh[1] and H Mirzakhani [4]

Received: January 08, 2010 Accepted: August 14, 2010
[1]MSc Student of Shahid Bahonar University of Kerman and Member of Young Researchers Association, Kerman, Iran
[2] Associate professor and Assistant professors respectively, Department of Animal Science, Shahid Bahonar University, Kerman,
[3]Ph.D. Student, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[4]BSc Student of Shahid Bahonar University of Kerman and Member of Young Reserchers Association, Kerman, Iran
*Corresponding author: E-mail: mmohammadabadi@yahoo.ca

Abstract
Identification of associated genes with energy balance, yield and feed intake are recent interests of the animal breeding researchers. With consider to rich resources of animals, in our country-Iran, accomplish a little assay for identification of genes that controlling its traits with molecular techniques. Identify the candidate genes in sheep breeds using DNA test can have a great help for their breeding progress. In this research, for analysis of leptin gene polymorphism in Kermani sheep, we collected blood samples of one hundred and twenty male and female Kermani sheeps which were rearing in breeding center of Shahre Babak, Kerman. Genomic DNA was extracted using commercial DNA extraction Kit. The exon 3 (275 bp segment of exon 3) of leptin gene was amplified with specific primers. The single stranded conformation polymorphism (SSCP) patterns of PCR product were studied using Acrilamid gel and silver staining method. We obtained 10 band patterns for leptin gene: A/A, C/C, A/B, A/C, A/B/C, A/B/E, A/B/F, A/C/F, A/B/D/E and A/B/C/F. The results showed that leptin gene is so polymorphic in studied population.

Keywords: Kermani sheep, Leptin, PCR-SSCP, Polymorphism

مقدمه

افزایش رشد جمعیت، باعث تغییر و تنوع سیستم تولید و افزایش نیاز به فرآورده‌های حیوانی شده است. در این راستا حفظ تنوع ژنتیکی حیوانات امری لازم است. توفیق برنامه‌های اصلاح نژادی بستگی به تنوع ژنتیکی جمعیت دارد. با توجه به پیشرفت‌هایی که در زمینه‌ی ژنتیک مولکولی صورت گرفته است، استفاده از نشانگرهای DNA در اصلاح دام به علت تاثیر نپذیرفتن از شرایط محیطی، زمینه‌ی مناسبی جهت بررسی صفات مهم در دام‌ها و شناسایی سریع و دقیق ژن‌های کنترل کننده‌ی صفات تولیدی فراهم کرده است (مورس و همکاران 1991). شناخت ژن‌های عمده‌ی موثر بر تعادل انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوراک از علاقمندی های اخیر محققان اصلاح نژاد می باشد.

لپتین یک پروتئین 16 کیلو دالتونی است. این هورمون در نتیجه‌ی جهش ایجاد شده در سطح ژن مسئول چاقی تولید می شود. منبع اصلی تولید و ترشح لپتین، سلول های بافت چربی یا آدیپوسیت‌ها می باشند. لپتین عمده‌ترین کنترل کننده‌ی اشتها، متابولیسم انرژی، بلوغ، سندرم چاقی، افزایش وزن، تغییر برون ده سمپاتیک و

www.SID.ir

Archive of SID

دیابت نوع دوم در انسان می باشد. ژن لپتین دارای 3 اگزون و 2 اینترون می‌باشد (نصیری و همکاران 2008، زو و همکاران 2009). لپتین دارای چندین فعالیت مهم نظیر تنظیم وزن بدن (پلیمونتر و همکاران 1995)، تولید مثل (هنسن و کاستراکان 2003)، فعالیت های ایمنی (لرد و همکاران 1998) و شکل‌گیری استخوان‌ها و رشد (گراسو و همکاران 1997، هامریک و همکاران 2004) می‌باشد. ژن لپتین در گاو روی کروموزوم 4 نقشه یابی شده است (استن و همکاران 1996). لپتین، با نگهداری تعادل میان دریافت غذا و هزینه‌ی انرژی، وزن بدن را کنترل می‌کند (فریدمن 1998، ماتارس و همکاران 2002). واندرلند و همکاران (2005) گزارش کردند وجود چندشکلی در ژن لپتین انسان با سطوح پایین لپتین، افزایش وزن و مرض قند غیر وابسته به انسولین، رابطه دارد. این چند شکلی ها در ژن لپتین گاو ارتباط معنی‌دار با مصرف غذا (لاگونیگرو و همکاران 2003)، تولید شیر (لیفرز و همکاران 2003، بوچانان و همکاران 2003) و صفات کیفیت گوشت و لاشه (شنکل و همکاران 2005) دارند.

اطلاعات مربوط به ژن لپتین در گوسفند بسیار اندک می باشند. تحقیقات بوچر و همکاران (2006) و زو و همکاران (2009) از جمله‌ی اندک تحقیقاتی می‌باشد که در ژن لپتین گوسفند انجام شده است. طهمورث پور و همکاران (1387) برای اولین بار به بررسی چند شکلی ژن لپتین با استفاده از PCR-SSCP در گوسفندان بلوچی پرداختند و سه الگوی باندی برای اگزون 3 در ژن لپتین گزارش کردند.

حفظ نژادها و ذخیره ژنی دام‌های بومی کشور با تشکیل بانک ژنی به عنوان یک سرمایه‌ی ملی از ضروریات دامپروری کشور می‌باشد. به همین دلیل در پژوهش حاضر تنوع درون جمعیتی گوسفند کرمانی با استفاده از تکنیک PCR-SSCP در جایگاه ژن لپتین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه و نمونه گیری

در پژوهش حاضر، 120 راس گوسفند کرمانی (96 راس گوسفند ماده و 24 راس گوسفند نر) که در مرکز اصلاح نژاد شهربابک استان کرمان پرورش داده می-شدند، مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از خونگیری نمونه-های خون در لوله‌های ونوژکت حاوی 50 میلی مول EDTA ریخته شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای 20- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، کیت DIAtom DNA Prep شرکت ژن فن آوران استفاده شد. جهت ارزیابی کمیت DNA به دست آمده از ژل آگارز 2 درصد استفاده شد (قاسمی و همکاران 1388).

تکثیر ژن لپتین با استفاده از PCR

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) جهت تکثیر قطعه‌ی 275 جفت بازی اگزون سوم ژن لپتین با استفاده از کیت پی سی آر (PCR Master Kit) شرکت سینا ژن انجام شد. هر کدام از آغازگرهای استفاده شده شامل 25 باز و با توالی زیر بودند.

LeptF: 5'-GCT CCA CCC TCT CCT GAG TTT GTC C-3

و

LeptR: 5-TGT CCT GTA GAG ACC CCT GTA GCC G-3

واکنش PCR در حجم 25 میکرولیتر و با برنامه ی حرارتی 95 درجه سانتیگراد جهت واسرشت اولیه‌ی DNA بمدت 240 ثانیه، واسرشت ثانویه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 45 ثانیه، دمای 66/5 درجه سانتیگراد جهت اتصال آغازگرها بمدت 55 ثانیه، دمای 72 درجه سانتیگراد جهت بسط آغازگرها بمدت 75 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد برای بسط نهائی به مدت 600

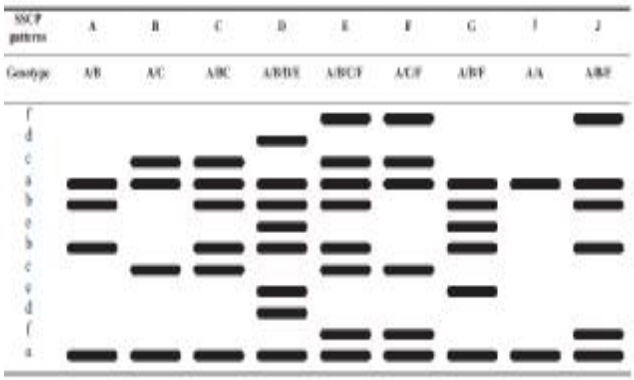
www.SID.ir

Archive of SID

ثانیه و به تعداد 38 سیکل انجام شد. صحت قطعه‌ی بدست آمده از محصول PCR با استفاده از ژل آگارز 2 درصد انجام شد.

استفاده از روش SSCP جهت تعیین ژنوتیپ حیوانات

جهت انجامSSCP، مقدار 10-7 میکرولیتر از محصولات تکثیر شده با 7 میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط شد. بعد از اضافه کردن DNA، میکروتیوب ها برای مدت 5 دقیقه درون حمام آب گرم با دمای 95 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس، بلافاصله پس از خارج کردن، میکروتیوب ها روی یخ قرار گرفتند. بعد از گذشت 7-5 دقیقه 15 میکرولیتر از مخلوط محصولات PCR با بافر بارگذاری SSCP با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی اختریان (Vertical Slab Unit) مدل VSS-100 دارای سیستم خنک کننده با آب و با ولتاژ 200 به مدت 5-4 ساعت روی ژل آکریل آمید غیر واسرشته ساز[1] الکتروفورز شد. سیستم دارای خنک کننده بود و دمای بافر(1X) TBE و ژل در دمای 5-4 درجه سانتیگراد ثابت نگه داشته شد. برای مشاهده ژنوتیپ‌ها از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد (باسام و همکاران، 1991). برای نامگذاری الگوهای ژنوتیپی از الگوی ارایه شده توسط موسوی‌زاده و همکاران (2009)، استفاده شد که در شکل 1 نشان داده شده است.



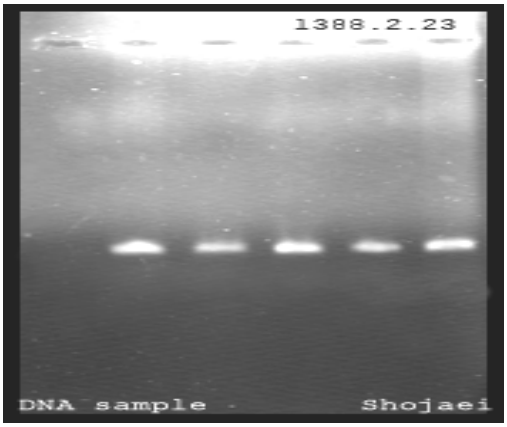
شکل 1 - الگوهای باندی ارائه شده جهت نامگذاری الگوهای SSCP (برگرفته از موسوی زاده و همکاران، 2009)

تعیین فراوانی الگوها (ژنوتیپ ها)

عکس های تهیه شده از ژل مورد نظر، بررسی و الگوهای باندی ایجاد شده شمارش شدند. بر اساس الگوهای باندی ژنوتیپ حیوانات تعیین و سپس با استفاده از نرم افزار Pop GENE32 معیارهای مربوط به چندشکلی ژن لپتین محاسبه شدند.

نتایج و بحث

نتیجه‌ی الکتروفورز DNAی استخراج شده و قطعه 275 جفت بازی تکثیر شده از ژن لپتین به ترتیب در شکل 2 و 3 نشان داده شده است.

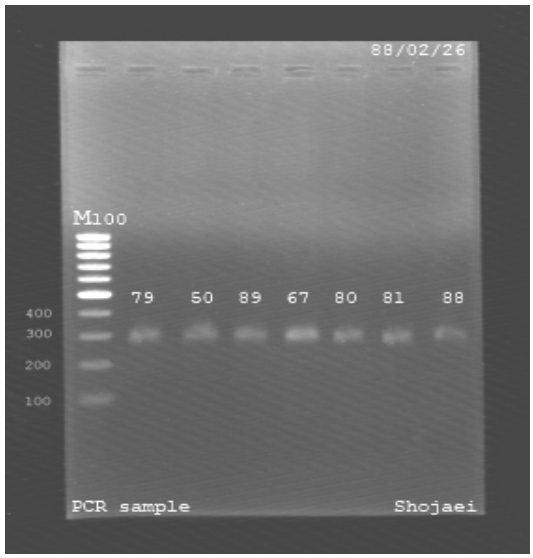


شکل 2- نتایج استخراج DNA چند دام

[1] - Nondenaturing polyacrylamide gel

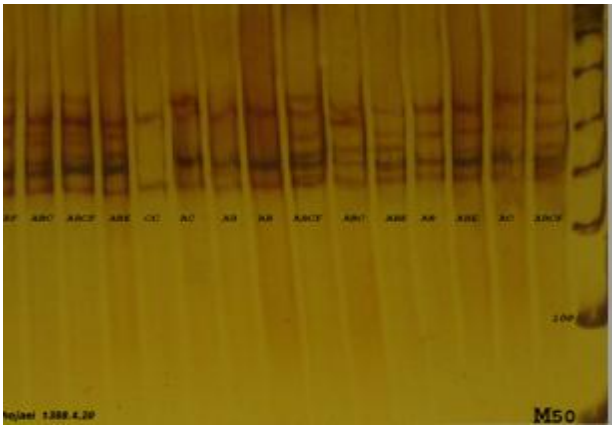
www.SID.ir

Archive of SID



شکل 3- نتایج حاصل از انجام PCR. در اولین چاهک از سمت چپ نشانگر و در چاهک‌های دیگر محصولات PCR مربوط به نمونه های 79، 50، 89، 67، 80، 81 و 88 هستند.

با استفاده از الگوی ارایه شده توسط موسوی زاده و همکاران (2009)، و با روش رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید، ژنوتیپ حیوانات تعیین شد (شکل3).



شکل 4- الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از PCR-SSCP

کل نمونه‌ی مورد مطالعه شامل 120 راس گوسفند کرمانی بود که الگوهای مربوط به 118 راس قابل مشاهده و بررسی بود. نتایج نشان داد که در نمونه‌ی مورد مطالعه، 10 الگوی A/A، C/C، A/B، A/C، A/B/C، A/B/E، A/B/F، A/C/F، A/B/D/E، A/B/C/F وجود داشت (شکل4). فراوانی‌های الگوهای ژنوتیپی و آللی به ترتیب در جدول‌های 1 و 2 ارایه شده است.

بنابراین، تکنیک PCR-SSCP می‌تواند در جمعیتی از حیوانات جهت تعیین ژنوتیپ واریانت های گوناگون ژن های مختلف مورد استفاده قرار گیرد. بهینه سازی شرایط SSCP برای یک قطعه‌ی معین توسط تنظیمات دقیق شرایط الکتروفورز تنها از طریق تجربی امکان‌پذیر می‌باشد. هنگامی که یک جهش ژنتیکی ناشناخته، در ژن-های بزرگ آنالیز می‌شود، شرایط متفاوت باید بدقت کنترل شوند. بر اساس نتایج بدست آمده در تحقیقات، دمای مناسب جهت دستیابی به بهترین نتایج در دامنه‌ی بین دماهای 5، 10 و 15 درجه بودند که به نظر می‌رسد دمای 5 درجه یک نقطه شروع بسیار مناسبی جهت تشخیص اکثر جهش ها باشد زیرا قطعات DNA تک رشته ای تمایل به داشتن ترکیبات به هم فشرده‌تری در دماهای پایین تر دارند. نتایج این تحقیقات نشان داد که مدت زمان 3-4 ساعت جهت ران کردن قطعات بین 185 و 350 جفت بازی بسیار مناسب می‌باشد. با کاهش زمان ران کردن، قطعات کمتر حرکت کرده و در نزدیکی باند مرجع خود قرار می گیرند و ران کردن طولانی تر باعث مهاجرت بیشتر باندها و حرکت بیش از اندازه‌ی قطعات کوچکتر خواهد شد. در مطالعه‌ی حاضر این نتیجه حاصل شد که غلظت DNA و نمونه های مورد استفاده در PCR در الگوهای باندی حاصل از SSCP دخالتی ندارد و قرار دادن محصولات PCR بعد از واسرشت سازی روی یخ لازم و ضروری می باشد. آنالیزهای SSCP در قطعات کوتاه‌تر بسیار حساس‌تر می باشند که این ممکن است بخاطر این باشد که تغییرات بازی در یک قطعه‌ی کوتاه تر بیشتر باعث تغییر شکل و ایجاد ساختارهای چند بعدی نسبت به قطعات بزرگتر می شوند. کنترل دما جهت انجام بهتر آنالیز های SSCP لازم می باشد. جوانمرد و همکاران (2008)، به بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

چند شکلی ژن لپتین دو نژاد گاو ایرانی (سرابی) از طریق تکثیر ناحیه‌ی اینترون و با روش PCR-RFLP پرداختند و سه نوع ژنوتیپ AA، AB و BB تشخیص دادند. لندرسون و همکاران (1998) QTLهایی برای صفات تولید شیر، درصد چربی و پروتئین شیر در 82/8، 75 و 95 سانتی‌مورگانی این ژن مکان یابی کردند. لیفرز و همکاران (2003) فراوانی‌های ژنوتیپی ژن لپتین در گاوهای هلشتاین را 81/3، 18/5 و 0/2 درصد بترتیب برای AA، AB و BB گزارش کردند. آلمدیا و همکاران (2003) گزارش کردند یک آلل از RFLP-Sau3AI باعث افزایش فاصله‌ی گوساله‌زائی به مدت 81-79 روز می شود و انتخاب بر اساس جهش های این ژن، حداقل 2 ماه فاصله‌ی نسل را کاهش می‌دهد. لاگونیگرو و همکاران (2003) گزارش کردند اشتهای افراد با ژنوتیپ AT نسبت به افراد AA 19% بیشتر است. در این پژوهش فراوانی ژنوتیپ A/B/C بیشترین فراوانی (22/88 درصد) و ژنوتیپ C/C کمترین فراوانی (1/69 درصد) را داشتند (جدول 1) که نیاز به مطالعات بیشتر برای بررسی رابطه آن ها با اشتها دارد. زیرچوسفکی و همکاران (2002) به بررسی فراوانی آللی ژن لپتین در گاو پرداختند و گزارش نمودند که فراوانی آلل‌های A ، B و C به ترتیب 0/79، 0/11 و 0/10 است. در این پژوهش نیز فراوانی آلل A بیشترین مقدار (28/8 درصد) را داشت (جدول 2) که با نتایج این محققین مطابقت دارد. لیندرسون و همکاران (1998) و چودهاری و همکاران (2005) نیز با تکثیر یک ناحیه‌ی 522 جفت بازی بین اینترون 2 و اگزون 3 و یک ناحیه‌ی 94 جفت بازی از اگزون 2 ژن لپتین در گاوهای هندی و اروپایی 3 الگوی هضمی GG، GA و AA را مشاهده کردند. میانگین شاخص شانون (I) و نئی (h) نیز به ترتیب 0/42 و 0/28 برای این پژوهش (جدول 2) به دست آمد، که نشان دهنده تنوع خوبی می باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های معاونت پژوهشی و فناوری و انجمن پژوهشگران جوان دانشگاه شهید باهنر کرمان تشکر و قدردانی می شود.

جدول1- فراوانی های ژنوتیپی

ژنوتیپ	A/A	C/C	A/B	A/C	A/B/C	A/B/E	A/C/F	A/B/F	A/B/D/E	A/B/C/F	جمع
تعداد	3	2	12	23	27	13	11	9	10	8	118
فراوانی (درصد)	2/54	1/69	10/17	19/49	22/88	11/02	9/32	7/63	8/48	6/78	100

جدول 2- فراوانی های آللی و معیارهای نشان دهنده چندشکلی

آلل	A	B	C	D	E	F	جمع
فراوانی	0/381	0/227	0 /239	0/0212	0/0579	0/0734	1
							میانگین
na	2	2	2	2	2	2	2
ne	1/293	1/498	1/884	1/100	1/215	1/297	1/456
h	0/227	0/478	0/470	0/091	0 /177	0/229	0/280
I	0/387	0/680	0/662	0/192	0/321	0/390	0/439

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

قاسمی م، محمدآبادی م ر، باقی زاده ا و اسمعیلی زاده کشکوئیه ع، 1388. بهینه سازی شرایط PCR جهت نشانگرهای ملکولی ISSR به منظور انگشت نگاری ژنوم گاو. مجله پژوهش های علوم دامی (دانش کشاورزی). شماره 1، جلد 19، صفحه های 31 تا 39.

طهمورث پور م، نصیری م ر، انصاری م، هروی موسوی ع، وفای واله م و افتخار شاهرودی ف، 1387. بررسی چند شکلی ژن لپتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. سومین‌کنگره‌علوم‌دامی کشور. دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

Almeida SEM, Almeida EA, Moraes JCF and, Weimer TA, 2003. Molecular markers in the leptin gene and reproductive performance of beef cattle. J Anim Breed Genetics 120(2): 106-113.

Boucher D, Palin MF, Castonguay F, Gariépy C and Pothier F, 2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptine (LEP) gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Canadian J Anim Sci 86: 31-35.

Bassam BJ, Anolles GC and Gresshoff PM, 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196: 80-83.

Buchanan FC, kessel V and Waldner AG, 2003. Hot topic. An Association between A Leptin single polymorphism and milk and protein yield, J Dairy Sci 86: 3164–3166.

Choudhary V, Kumar P, Bhattacharya TK, Bhushan B and Sharma A, 2005. DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Genetics Molecul Biology 28: 740-742.

Grasso P, Leinung MC, Ingher SP and Lee DW, 1997. In vivo effects of leptin-related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob/ob mice: Localization of leptin activity to domains between amino acid residues. Endocrinology 138: 1413–1418.

Friedman JM and Halaas JL, 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature 395: 763–770.

Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A and Asadzadeh N, 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine Leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). Russian J Genet 44(4): 1–4.

Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D and Isales C, 2004. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. Bone 34: 376-383.

Henson MC and Castracane VD, 2003. "Leptin and Reproduction." Kluwer Academic/Plenum, New York.

Lagonigro RP, Wiener F, Pilla JA and Woolliams J, 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Anim Genetic 34(5): 371-374.

Liefers SC, Veerkamp RF and Te Pas MFW, 2003. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cattle. J Dairy Sci 86(3): 800–806.

Liendersoon ML, Anderson D and Konine J, 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. J Dairy Sci 81: 1454-1461.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR and Lecheir RI, 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation induced immunosupression. Nature 394: 897-901.

www.SID.ir

Archive of SID

Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI and Fontana S, 2002. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin. Trends in Immunology 23: 182–187.

Moores S, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M and Hatzel DJS, 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allow the use of heterologous RCR primer pairs in closely related species. Genomics 10:654-660.

Mousavizadeh A, Mohammad Abadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H and Esmailizadeh Koshkoieh A, 2009. Genetic polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian J Biotechnology 7(1): 51-53.

Nassiry MR, Eftekhari Shahroud F, Heravi Mousavi A, Sadeghi B and Javadmanesh A, 2008. The diversity of *leptin* gene in Iranian native, Holstein and Brown Swiss cattle. African J Biotechnology 7(15): 2685-2687.

Pelleymonunter M A, Cullen MJ, Baker MB, Hetch R, Winters D, Boone T and Collins F, 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. Science 269: 540-543.

Schenkel FS, Miller SP, Ye X, Moores S, Nkrumah JD and Li C, 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. J Anim Sci 83: 2009–2020.

Stone RT, Kappes SM and Beattie CW, 1996. The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. Mamm Genome 7: 399–400

Vanderlande T, Te Pas MF, Veerkamp RF and Liefers SC, 2005. Leptin gene polymorphisms and their phenotypic associations. Vitamins and Hormones 71: 373–404.

Zhou H, Hickford JGH and Gong H, 2009. Identification of allelic polymorphism in the ovine leptin gene. Mol Biotechnol 41: 22–25.

Zwierzchowski L, Krzyzewski J, Strzalkowska N, Siadkowska E and Rynieweaz Z, 2002. Effects of polymorphism of growth hormone, Pit-1, leptin gene, cows age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black- White cows. Anim Science Papers and Reports 20 (4): 213-227.

www.SID.ir