بررسی جهش در اینترون ۲ ژن لپتین در گاوهای بومی و آمیخته گیلان به‌روش PCR-RFLP

- **مجتبی رضایی**: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱
- **سیدضیاءالدین میرحسینی***: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱
- **سیدحسین حسینی‌مقدم**: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱
- **محمد آیت‌اللهی**: گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق پستی: ۱۸۴۱

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

ژن لپتین به‌عنوان یک ژن کاندیدا و تنظیم‌کننده مهم در فرآیندهای مرتبط با صفات اقتصادی شناخته شده است. در این تحقیق، به‌منظور شناسایی چندشکلی ژن لپتین از ۲۰۰ راس گاو نژاد بومی و آمیخته استان گیلان خون‌گیری شد. استخراج DNA به‌روش نمکی و تکثیر یک قطعه ۵۲۲ جفت بازی این ژن توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت و سپس با آنزیم محدودگر BsaAI هضم و نمونه‌ها تعیین ژنوتیپ شدند. برای جایگاه مورد مطالعه دو الگوی باندی A و B به‌ترتیب با فراوانی ۰/۴۵۵ و ۰/۵۴۵ در گاو بومی و ۰/۳۶۵ و ۰/۶۳۵ در گاو آمیخته شناسایی شد. فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده AA، AB و BB به‌ترتیب ۰/۱۹، ۰/۵۳ و ۰/۲۸ در گاوهای بومی و ۰/۱۴، ۰/۴۵ و ۰/۴۱ در گاوهای آمیخته به‌دست آمد. براساس نتایج آزمون مربع‌کای، جمعیت‌های مورد بررسی در تعادل هاردی- واینبرگ قرار داشتند. شاخص‌های نئی و شانون، هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار به‌ترتیب ۰/۴۹۶ و ۰/۶۸۹، ۰/۵۳ و ۰/۴۹۸ در گاو بومی و ۰/۴۶۴ و ۰/۶۵۶، ۰/۴۵ و ۰/۴۶۶ محاسبه گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که این ناحیه از ژنوم در گاوهای مورد مطالعه چندشکل بوده و تکنیک PCR-RFLP توانای شناسایی چندشکلی‌ها را دارد.

کلمات کلیدی: چندشکلی DNA، ژن لپتین، گاو بومی، آمیخته، PCR-RFLP

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: szmirhoseini@gmail.com

مقدمه

انتخاب به‌کمک نشانگرهای DNA که ترکیبی از اطلاعات ژنتیک مولکولی و داده‌های فنوتیپی صفت مورد نظر است، می‌تواند باعث بهبود شاخص انتخاب و پیشرفت ژنتیکی شود (Israel و همکاران، ۲۰۰۲). ژن‌های کاندیدا برای مطالعات، بر پایه ارتباطات شناخته شده بین فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیولوژیکی انتخاب می‌شوند. ژن لپتین به‌عنوان یک ژن کاندیدا و تنظیم‌کننده مهم در فرآیندهای مرتبط با صفات اقتصادی شناخته شده است (Houseknecht و همکاران، ۱۹۹۸). لپتین یک هورمون پروتئینی با وزن مولکولی ۱۶ کیلو دالتون است که غالباً از بافت چربی سفید سنتز و ترشح می‌شود. پروتئین لپتین در حال گردش در خون، دارای ۱۴۶ اسیدآمینه است. ژن لپتین روی کروموزوم شماره ۴ گاو واقع شده (Accession No: Y11369)، این ژن به‌طور کامل توالی یابی شده و دارای سه اگزون و دو اینترون است (Pfister-Geneskow و همکاران، ۱۹۹۶). ژن لپتین در بافت‌های مختلفی از جمله بافت چربی، جفت، غدد پستانی، ماهیچه‌های اسکلتی، غشای مخاطی معده، مغز و غدد هیپوفیزی بیان می‌شود(Houseknecht و همکاران، ۱۹۹۸). مطالعات نشان داده‌اند که لپتین یک ژن بزرگ اثر است و از اصلی‌ترین کنترل‌کننده‌های مصرف خوراک، توازن انرژی، باروری، تنظیم وزن و پاسخ‌های ایمنی است (Hamann و Mattaei، ۱۹۹۶).

در حیوانات اهلی، چندشکلی‌های یک ژن می‌تواند با صفات اقتصادی مهم که تحت کنترل بسیاری از ژن‌ها با اثر اندک هستند مرتبط باشد (Gelderman، ۱۹۹۷). چندشکلی قطعات با طول محدود شده (RFLP) ژن لپتین گاو برای اولین بار توسط Lien و همکاران (۱۹۹۷) گزارش شد.

تاکنون چندشکلی‌های زیادی از این ژن در گاو یافت شده است که در این مطالعات ارتباط ژن لپتین با مصرف خوراک (Liefers و همکاران، ۲۰۰۲)، تولیدشیر (Buchananو همکاران، ۲۰۰۳)، تولید گوشت، کیفیت لاشه و گوشت (Kononoff و همکاران، ۲۰۰۵؛ Schenkel و همکاران، ۲۰۰۵؛ Buchanan و همکاران، ۲۰۰۲)، تولیدمثل گاو شیری (Liefers و همکاران، ۲۰۰۵) و تولیدمثل گاو گوشتی (Almedia و همکاران، ۲۰۰۳) نشان داده شده که از لحاظ اصلاح نژادی حائز اهمیت است. هم‌چنین چندشکلی ژن لپتین در برخی از نژادهای گاو بومی (سرابی، سیستانی، گلپایگانی، مازندرانی، دشتیاری)، گاومیش، گاوهای هلشتاین و آمیخته ایران مورد بررسی قرار گرفته است (Ahani Azari و همکاران، ۲۰۱۲؛ Javanmard و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات مذکور نشان می‌دهد که لپتین می‌تواند به‌عنوان یک ژن کاندیدا درمورد برخی از صفات تولیدی مهم اقتصادی در گاو شیری باشد. بنابراین امکان استفاده از ژن لپتین به‌عنوان یک ژن کاندیدا و یا نشانگر ژنتیکی در بهبود انتخاب برای صفات اقتصادی در گاوهای بومی ایران، می‌تواند از گزینه‌های امیدوارکننده در این ارتباط باشد. هدف از این مطالعه، شناسایی چندشکلی و بررسی فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی ژن لپتین در گله‌های اقماری گاو بومی و آمیخته استان گیلان بود.

مواد و روش‌ها

به‌منظور استخراج DNA از ۱۰۰ راس گاو بومی ماده و نیز ۱۰۰ راس گاو آمیخته ماده مربوط به گله‌های اقماری استان گیلان به‌صورت تصادفی و انفرادی از سیاهرگ وداج و با استفاده از لوله‌های‌ونوجکت[1] (خلاء) حاوی ماده ضدانعقاد (۲٪ EDTA[2]) نمونه‌گیری خون به‌عمل آمد. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. DNA ژنومی به‌روش نمکی بهینه یافته (Javanrouh و همکاران، ۲۰۰۵) استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به‌روش الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی و غلظت مناسب و عدم آلودگی نمونه جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تأیید شد. تکثیر قطعه ۵۲۲ جفت بازی از اینترون ۲ و اگزون ۳ ژن لپتین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی زیر صورت گرفت (Lien و همکاران، ۱۹۹۷):

F (5´ GTC TGG AGG CAA AGG GCA GAG T 3´)
R (5´ CCA CCA CCT CTG TGG AGT AG 3´)

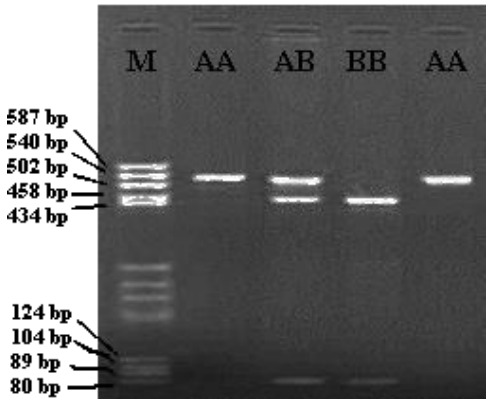
اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱۰۰ میکرومولار dNTPs mix، بافر PCR (1X)، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCL_2$ به‌همراه یک واحد آنزیم Taq پلیمراز و آب دیونیزه بود. مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با برنامه حرارتی زیر انجام گرفت: واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، تکثیر در ۳۵ چرخه (دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشته‌سازی

[1] Venoject
[2] Ethylene diamine tetra acetic acid

ثانویه، دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۵ ثانیه جهت اتصال آغازگرها، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه جهت تکثیر) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. برای تایید صحت قطعه به‌دست آمده حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌همراه نشانگر اندازه (DNA Ladder 50 bp) استفاده شد. هضم قطعه ۵۲۲ جفت بازی تکثیر شده ژن لپتین با استفاده از آنزیم برشی BsaAI (Ppu21I) که جایگاه برشی 5'...AC ↓ GT...3' را شناسایی می‌کند، انجام گرفت. واکنش هضم به‌مدت ۳ ساعت و در دمای ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد با مقادیر ۸ میکرولیتر محصول PCR، بافر هضم X ۱، ۵ واحد آنزیم برشی و ۸ میکرولیتر آب دیونیزه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. قطعات هضم شده روی ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تعیین ژنوتیپ شدند. برای تشخیص اندازه باندهای حاصل، از نشانگر اندازه (pBR322/BsuRI) استفاده شد. فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، شاخص‌های هتروزیگوسیتی و آزمون کای‌مربع (χ^2) با استفاده از نرم‌افزار Pop Gene V. 1.32 (Yeh و همکاران، ۲۰۰۰) محاسبه و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در جایگاه ژن لپتین جمعیت مورد مطالعه با نرم‌افزار HET 1.8 (Ott، ۲۰۰۱) برآورد شد.

نتایج

نتایج الکتروفورز نشان داد که DNA استخراج شده از کیفیت مناسبی برای PCR برخوردار بود. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد نشان داد که آغازگرهای طراحی شده به‌خوبی فعالیت نموده و قطعات اختصاصی برای ژن لپتین به‌طول ۵۲۲ جفت باز را تولید نمودند. برش قطعه ۵۲۲ جفت بازی ژن لپتین با آنزیم BsaAI با توجه به این‌که این آنزیم دارای ۱ جایگاه برشی در طول محصول PCR بود دو الگوی هضمی، شامل الگوی A، با اندازه قطعه ۵۲۲ جفت باز (فاقد محل برش آنزیم) و الگوی B، با اندازه قطعات ۴۴۱ و ۸۱ جفت باز ایجاد کرد که نتیجه آن سه ژنوتیپ AA (۵۲۲ bp)، AB (۵۲۲، ۴۴۱، ۸۱ bp) و BB (۴۴۱، ۸۱ bp) بود. شکل ۱ تفکیک قطعات ۵۲۲، ۴۴۱ و ۸۱ جفت باز را پس از هضم آنزیمی قطعه ۵۲۲ جفت بازی به‌وسیله آنزیم BsaAI نشان می‌دهد.



شکل۱: محصول هضم آنزیم BSAAI (PPU21I)

AA: 522 bp, **AB:** 522, 441 and 81 bp, **BB:** 441 and 81 bp, **M**: DNA size marker (pBR322/BsuRI)

فراوانی آللی و ژنوتیپی ژن لپتین برای دو جمعیت در جدول ۱ ارایه شده است. همان‌طورکه در این جدول مشاهده می‌شود، در این بررسی بیش‌ترین فراوانی آللی مربوط به آلل B به‌میزان ۰/۵۴۵ و ۰/۶۳۵، بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی مربوط به ژنوتیپ AB به‌مقدار ۰/۵۳ و ۰/۴۵ و کم‌ترین آن مربوط به ژنوتیپ AA به‌مقدار ۰/۱۹ و ۰/۱۴ به‌ترتیب در دو جمعیت گاو بومی و آمیخته است. فراوانی‌های ژنوتیپی و ژنی در هر دو جمعیت محاسبه شد. فراوانی ژنوتیپ‌های مشاهده شده AA، AB و BB به‌ترتیب ۰/۱۹، ۰/۵۳ و ۰/۲۸ در جمعیت گاوهای بومی و ۰/۱۴، ۰/۴۵ و ۰/۴۱ در جمعیت گاوهای آمیخته به‌دست آمد. به‌منظور بررسی تعادل هاردی- واینبرگ در جایگاه مورد مطالعه در این جمعیت از آزمون کای مربع

استفاده گردید که بیانگر وجود حالت تعادل در فراوانی‌های محاسبه شده در دو جمعیت مورد مطالعه برای جایگاه ژن لپتین بود (P<۰/۰۱).

جدول ۱: مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی در جایگاه ژن لپتین (RFLP-BSAAI) بین دو جمعیت گاو بومی و آمیخته

نژاد	تعداد نمونه	فراوانی آللی		فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده			χ^2
		B	A	BB	AB	AA	
بومی	۱۰۰	۰/۵۴۵	۰/۴۵۵	۰/۲۸	۰/۵۳	۰/۱۹	۰/۴۰۵ ns
آمیخته	۱۰۰	۰/۶۳۵	۰/۳۶۵	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۱۴	۰/۱۱۸ ns
مجموع	۲۰۰	۰/۵۹	۰/۴۱	۰/۳۴۵	۰/۴۹	۰/۱۶۵	۰/۰۲۱ ns
±SE	-	۰/۰۴۵	۰/۰۴۵	۰/۰۶۵	۰/۰۴	۰/۰۲۵	۰/۱۱۵

χ^2 : آزمون کای مربع، **ns**: غیرمعنی‌دار

در این تحقیق بیش‌ترین فراوانی ژنوتیپی در دو نژاد مربوط به ژنوتیپ AB بود. هم‌چنین فراوانی آلل B بیش‌تر از آلل A در هر دو نژاد مورد بررسی بود. بیش‌ترین فراوانی آلل A و B به‌ترتیب مربوط به نژاد بومی (۰/۴۵۵) و نژاد آمیخته (۰/۶۳۵) بود. با توجه به آزمون کای مربع انجام گرفته اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ ٪ بین فراوانی‌های آللی (۵/۹۹ >۱/۶۸۱) و ژنوتیپی(۵/۹۹ >۳/۸۶) در دو جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد و مقادیر آن‌ها در دو جمعیت (نژاد) تقریباً برابر است.

جدول ۲: فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی مشاهده شده در جایگاه اینترون ۲ و اگزون ۳ ژن لپتین در مطالعات گذشته

نژاد	تعداد نمونه	منبع	B	A	BB	AB	AA
Hariana	۶۰	Choudhary و همکاران (۲۰۰۵)	۰/۶۶	۰/۳۴	۰/۴۰	۰/۵۳	۰/۰۷
Sahiwal	۳۲	Choudhary و همکاران (۲۰۰۵)	۰/۷۲	۰/۲۸	۰/۴۷	۰/۵۰	۰/۰۳
هلشتاین-فریزن	۱۷	Choudhary و همکاران (۲۰۰۵)	۰/۱۸	۰/۸۲	۰/۶۷	۰/۳۰	۰/۰۳
جرسی	۴۰	Choudhary و همکاران (۲۰۰۵)	۰/۷۶	۰/۲۴	۰/۵۷	۰/۳۸	۰/۰۵
بومی مازندران	۵۳	Ahani Azari و همکاران (۲۰۱۲)	۰/۴۴	۰/۵۶	۰/۱۳۲	۰/۶۲۲	۰/۲۴۵
هلشتاین	۵۲	Ahani Azari و همکاران (۲۰۱۲)	۰/۶	۰/۴	۰/۲۳	۰/۷۳	۰/۰۳۸
هلشتاین	۱۴۵	Nazari و همکاران(۲۰۱۲)	۰/۷۸	۰/۲۲	۰/۶۰	۰/۳۶	۰/۰۴

در پژوهش انجام شده، جایگاه مورد مطالعه در دو نژاد گاو بومی و آمیخته (۲۰۰ نمونه)، ۱۰۰ درصد چندشکلی را نشان دادند. معیارهایی که برای تعیین میزان چندشکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود تعداد آلل واقعی و تعداد آلل موثر است. نتایج مربوط به این دو معیار همراه با مقادیر محتوای چندشکلی مربوط به جایگاه ژن لپتین در دو جمعیت گاو بومی و آمیخته در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: شاخص‌های تنوع ژنتیکی (چندشکلی) در جایگاه ژن لپتین (RFLP-BsaAI) در جمعیت‌های گاو بومی و آمیخته استان گیلان

نژاد	Na	ne	Hom_e	Ave Het	Hete (unbiased-He)	Nei (biased-He)	I	PIC
بومی	۲	۱/۹۸	۰/۵۰۲	۰/۴۹۶	۰/۴۹۸	۰/۴۹۶	۰/۶۸۹	۰/۳۷۳
آمیخته	۲	۱/۸۶	۰/۵۳۴	۰/۴۶۴	۰/۴۶۶	۰/۴۶۴	۰/۶۵۶	۰/۳۵۶
مجموع	۲	۱/۹۴	۰/۵۱۵	۰/۴۸	۰/۴۸۵	۰/۴۸۴	۰/۶۷۷	۰/۳۶۷
±SE	-	۰/۰۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۶۵	۰/۰۰۸۵

(n_a: تعداد آلل واقعی؛ n_e: تعداد آلل موثر؛ Hom_e: هموزیگوتی مورد انتظار؛ Ave Het : متوسط هتوزیگوتی؛ Het_e: هتروزیگوتی مورد انتظار؛ Nei (biased-He): هتروزیگویتی نئی؛ I: شاخص شانون؛ PIC: محتوای اطلاعات چند شکلی)

بحث

نتایج حاصل از برش آنزیمی و طول قطعات مشاهده شده در این تحقیق با نتایج Lien و همکاران (۱۹۹۷) که برای اولین بار جهش جایگزینی بازهای گوانین (G) به آدنین (A) را در اینترون ۲ ژن لپتین به‌وسیله آنزیم BsaAI در گاوهای نروژی مشاهده نمودند و به‌دنبال آن Choudhary و همکاران (۲۰۰۵)؛ Ahani Azari و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند، مطابقت دارد. این تحقیق نشان داد جمعیت‌های مورد مطالعه در این جایگاه با انجام آزمون کای‌مربع در تعادل هاردی-واینبرگ بوده، این مطلب به این معنا است که شرایط لازم برای جمعیت در حال تعادل مانند عدم انتخاب، عدم مهاجرت، جهش و ... در جمعیت مورد نظر وجود دارد که دلایل احتمالی آن را می‌توان به‌علت تلاقی‌های تصادفی و عدم تبادل ژنتیکی با سایر جمعیت‌ها دانست. در این جایگاه نتایج حاضر با نتایج Ahani Azari و همکاران (۲۰۱۲)؛ Nazari و همکاران (۲۰۱۲) و Choudhary و همکاران (۲۰۰۵) که فراوانی بالاتر آلل B نسبت به آلل A را گزارش کردند همانند فراوانی‌هایی که در جدول ۲ نشان داده شده مطابقت دارد. با توجه به این‌که در این تحقیق هتروزیگوتی مشاهده شده در گاو بومی (۰/۵۳) به‌طور نسبی بیش‌تر از هتروزیگوتی مورد انتظار (۰/۴۹۸) برآورد گردید، بنابراین نشان می‌دهد که هم‌خونی در این جمعیت کم و تنوع ژنتیکی آن در حد مطلوبی است. مقادیر نسبتاً بالای شاخص‌های شانون و نئی نیز، نشان از میزان تنوع ژنتیکی بالا در دو جمعیت مورد مطالعه است. Liefers و همکاران (۲۰۰۲) آلل B را به‌عنوان آلل خوب و مطلوب جهت اصلاح نژاد در جهت افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش باروری معرفی کرده‌اند. با توجه به مطابقت فراوانی آللی و ژنوتیپی به‌دست آمده در جمعیت گاو بومی و آمیخته گیلان با تحقیقات مشابه در نژادهای مختلف دنیا، از جمله سایر نژادهای بومی ایران نشان داد که فراوانی این آلل در گاو بومی و آمیخته گیلان در سطح مناسبی بوده بنابراین انتظار می‌رود که این رابطه در این تحقیق هم صادق باشد و می‌تواند بیانگر پتانسیل خوب این نژاد برای تولید شیر باشد. هم‌چنین با توجه به این‌که صفات کمی توسط برآیند تعداد زیادی ژن کوچک اثر و هم‌چنین اثر متقابل بین آن‌ها، کنترل می‌شوند، بنابراین مناسب بودن فراوانی آلل مطلوب در سطح یک جایگاه، نمی‌تواند گواهی بر عملکرد مطلوب یک صفت در یک نژاد باشد. پیشنهاد می‌شود که وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر به‌خصوص سایر ژن‌های کاندیدی که مربوط به کنترل صفات اقتصادی و مسئول بروز ناهنجاری‌های ژنتیکی در دام هستند به‌منظور بهبود و حفظ ذخایر ژنتیکی گاوهای بومی ایران که دارای پتانسیل بالای ژنتیکی به‌خصوص در مورد مقاومت به بیماری و سازگاری با شرایط نامناسب جوی و مدیریتی هستند مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱. **نظری، م.؛ رستم‌زاده، ج.؛ رشیدی، ا.؛ عزیزی، ع. و کریمی کردستانی، ز.، ۱۳۹۱.** ارزیابی چندشکلی ژن لپتین و ارتباط آن با صفات شیر در گاوهای نژاد هلشتاین. پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۹-۸ شهریور ماه، صفحات ۱۹۱ تا ۱۹۴.

2. **Ahani Azari, M.; Hasani, S.; Heidari, M. and Yousefi, S., 2012.** Genetic polymorphism of Leptin gene using PCR-RFLP method in three different populations. Slovak Journal of Animal Science. Vol. 45, No. 2, pp: 39-42.
3. **Almeida, S.E.; Almeida, E.A.; Moraes, J.C.F. and Weimer, T., 2003.** Molecular Marker in the LEP Gene and Reproductive Performance of Beef Cattle. Journal of Animal Breeding Genetic. Vol. 120, No. 2, pp: 106–110.
4. **Buchanan, F.C.; Fitzsimmons, C.J.; Van Kessel, A.G.; Thue, T.D.; Winkelman-Sim, C. and Schmutz, S.M., 2002.** Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genetics Selection Evolution. Vol. 34, pp: 105-116.
5. **Buchanan, F.C.; Van Kessel, A.G.; Waldner, C.; Christensen, D.A.; Laarveld, B. and Schmutz, S.M., 2003.** Hot topic: An association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. Journal of Dairy Science. Vol. 86, No. 10, pp: 3164-3166.
6. **Choudhary, V.; Kumar, P.; Bhattacharya, T.K.; Bhushan, B. and Sharma, A., 2005.** DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Genetics and Molecular Biology. Vol. 28, No. 4, pp: 740-742.
7. **Gelderman, H., 1997.** Investigations on inheritance oof quantitative characters in animals by gene markers. Methods theor. Applied genetic. Vol. 46, pp: 319-330.
8. **Hamann, A. and Mattaei, S., 1996.** Regulation of energy balance by leptin.

Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes. Vol. 104, pp: 293-300.

9. **Houseknecht, K.L.; Baile, C.A.; Matteri, R.L. and Spurlock, M.E., 1998.** The biology of leptin: A review. Journal of Animal Science. Vol. 76, pp: 1405–1420.
10. **Israel, C. and Weller, J.I., 2002.** Estimation of quantitative trait loci effects in dairy cattle populations. Journal of Dairy Science. Vol. 85, pp: 1285–1297.
11. **Javanmard, A.; Asadzadeh, N.; Banabazi, M.H. and Tavakolian, J., 2005.** The allele and genotype frequencies of bovine pituitary specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. Iranian Journal of Biotechnology. Vol. 3, No. 2, pp: 104-108.
12. **Javanrouh, A.; Banabazi, M.H.; Esmaeilkhanian, S.; Amirinia, C.; Seyedabadi, H.R. and Emrani, H., 2006.** Optimization on salting out method for DNA extraction from animal and poultry blood cells. The 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. Antalya, Turkey.
13. **Kononoff, P.J.; Deobald, H.M.; Stewart, E.L.; Laycock, A.D. and Marquess, F.L., 2005.** The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade and carcass weight of beef cattle. Journal of Animal Science. Vol. 83, pp: 927-932.
14. **Liefers, S.C.; Te Pas, M.F.; Veerkamp, R.F. and Van der Lende, T., 2002.** Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. Journal of Dairy Science. Vol. 85, No. 6, pp: 1633-1638.
15. **Liefers, S.C.; Veerkamp, R.F.; Te pas, M.F.; Chilliard, Y. and Van der lende, T., 2005.** Genetics and physiology of Leptin in periparturient dairy cows. Domestic Animal Endocrinology. Vol. 29, pp: 227-238.
16. **Lien, S.; Sundvold, H.; Klungland, H. and Vage, D.I., 1997.** Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). Animal Genetic. Vol. 28, pp: 45.
17. **Ott, J., 2001.** Program HWE Version 1.80. Utility programs for analysis of genetic linkage. Rockefeller University. New York, NY, USA.
18. **Pfister-Geneskow, M.; Hayes, H.; Eggen, A. and Bishop, M.D., 1996.** Chromosal location of bovine obesity gene. Mammalian Genome. Vol. 7, 398 p.
19. **Schenkel, F.S.; Miller, S.P.; Ye, X.; Moore, S.S.; Nkrumah, J.D.; Li, C.; Yu, J.; Mandell, I.B.; Wilton, J.W. and Williams, J.L., 2005.** Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. Journal of Animal Science. Vol. 83, pp: 2009-2020.
20. **Yeh, F.; Yang, R.; Boyle, T.; Ye, Z. and Mao, J.X., 2000.** Pop Gene, the user-friendly computer freeware for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers. Molecular Biology and Biotechnology Center. University of Alberta.