بررسی چند شکلی موجود در ناحیه اینترون دو ژن لپتین (Leptin) گاو نژاد سرابی

• **آرش جوانمرد و • قربان الیاسی زرین‌قبائی**، کارشناسان ارشد پژوهشی ژنتیک و اصلاح نژاد مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی
• **علی‌اکبر قره داغی**، عضو هیات علمی‌موسسه تحقیقات علوم دامی‌کشور
• **نادر اسدزاده**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
• **محمدحسین بنابازی**، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
• **محمدرضا نصیری**، عضو هیات علمی گروه علوم دامی‌دانشگاه فردوسی مشهد
• **علی جوادمنش**، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی‌دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: فروردین ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

Email: Javanmard@azarn.org.ir

چکیده

شناخت جنبه های ژنتیکی و ژن‌های عمده تاثیر گذار روی توازن انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوراک از علاقه‌مندی‌های اخیر محققان ژنتیک و اصلاح نژاد می‌باشد. ژن لپتین از جمله ژن‌هایی است که چند شکلی‌های موجود در آن با صفات اقتصادی و مهم مرتبط است. در این پژوهش نمونه‌های خون از ۶۶ گاو نژاد سرابی از ایستگاه‌های اصلاح نژاد سراب و شبستر گرفته شد. استخراج DNA به کمک روش Boom و همکاران(۳) و واکنش زنجیره پلی مراز(PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت بازی از اینترون ۲ این ژن انجام گرفت. قطعه تکثیر شده بوسیله آنزیم محدودالاثر Sau۳AI جهت تشخیص ژنوتیپ‌های ژن لپتین مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپ‌های AB، Aa و Bb به‌ترتیب ۰/۳۹ ، ۰/۴۷ و۰/۱۴ در ایستگاه سراب و ۰/۱۸، ۰/۴۹ و ۰/۳۳ در ایستگاه شبستر تشخیص داده شدند. فراوانی‌های آللی نیز برای آلل‌های A و B به‌ترتیب ۰/۶۳ و۰/۳۷ در ایستگاه سراب و ۰/۴۲ و ۰/۵۸ در ایستگاه شبستر برآورد گردید. مقایسه فراوانی آلل B (آلل مطلوب) محاسبه شده در گاوهای سرابی با تحقیقات مشابه در نژادهای مختلف دنیا، نشان داد که فراوانی این آلل در گاوهای سرابی در سطح مناسبی می‌باشد. در هر دو جمعیت ، از لحاظ این جایگاه، تعادل هاردی- واینبرگ برقرار بود. با توجه به اینکه صفات کمی‌توسط برآیند تعداد زیادی ژن کوچک اثر و همچنین اثر متقابل بین آنها، کنترل می‌شود، فلذا مناسب بودن فراوانی آلل مطلوب درسطح یک لوکوس، نمی‌تواند گواهی بر عملکرد مطلوب یک صفت در یک نژاد باشد و بالطبع بررسی وضعیت جایگاه‌های ژنی دیگر مورد نیاز می‌باشد.

کلمات کلیدی: ژن لپتین، گاو سرابی، PCR-RFLP، پلی مورفیسم

Pajouhesh & Sazandegi No:70 pp: 2-8

Molecular analysis of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*)

By: A. Javanmard., Agriculture Faculty, UPM, Malasia.
G. Elyasi Zarin Gabay., East Azarbaijan Research Center for Agriculture and Natural Resources.
A. K. Gharedaghi, N. Asadzadeh and M.H. Banabazi, Animal Science Research Institute of Iran.
M.R. Nasiri and A. Javadmanesh Agriculture Faculty Ferdowsi University of Mashhad.

There is evidence of a genetic correlation between energy balance, milk yield and state of luteal activity. Leptin is a 16 kD protein that synthesis by white adipose tissue and it involves in regulation of feed Intake, energy balance, fertility and immune function. In cattle, the leptin gene is located on chromosome four. It consists out of 3 exons and 2 introns of which only 2 exon are translated in to protein. In total 66 animals from Sarab and Shabestar Stations were genotyped for this project. A strategy employing polymerase chain reaction was used to amplify a 422-bp fragment of intron 2 from blood DNA. Digestion of amplicons with sau3AI revealed two alleles: allele A had 2 fragments 390 and 32 bp and allele B had 3 fragments 303, 88 and 32 (88 and 32 fragment have not detected on the gel). Three patterns were observed. Frequencies were 0.31, 0.43 and 0.15 for AA, AB and BB respectively. This polymorphism could be evaluated for marker assisted selection and the developed PCR method would expedite screening for large number of animals for such these studies.

Key words: Leptin, Polymorphism, PCR-RFLP

مقدمه

انتخاب گاوهای شیرده برای افزایش تولید شیر، سبب کاهش برخی خصوصیات تولید مثلی این گاوها شده است(۸). مقالات مختلفی وجود همبستگی ژنتیکی منفی بین توازن انرژی، تولید شیر و شروع فعالیت تولید مثلی را گزارش کرده اند(۱۰،۷،۲). لذا شناخت ژن های عمده موثر بر این صفات از علاقمندی‌های محققان در سال‌های اخیر بوده است. لپتین یک پروتیین ۱۶ کیلو دالتونی می‌باشد که از بافت‌های آدیپوز به‌خصوص آدیپوز سفید، ترشح می‌شود. این پروتئین اولین بار در موش کشف شد(۴). پروتئین لپتین درحال گردش در خون، دارای ۱۴۶ اسید آمینه می‌باشد. اعتقاد بر این است که لپتین عمده‌ترین کنترل کننده اشتها، متابولیسم انرژی، باروری، ایمنی، افزایش وزن می‌باشد. ژن لپتین گاوی دارای سه اگزون و دو اینترون می‌باشد و در روی کروموزم شماره ۴ گاو واقع شده است(۸) . Liendersson و همکاران (۶) مکان‌های کنترل کننده صفات کمی[1](QTL) برای صفات تولید شیر را در ۸۲/۸ سانتی مورگان و برای درصد چربی و پروتیین شیر در ۷۵ و ۹۵ سانتی مورگانی ژن لپتین مکان‌یابی کردند. Liefers و همکاران (۵) گزارش کردند که تلیسه‌هایی با ژنوتیپ۱/۳۲ ، AB کیلو گرم در روز شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ Aa تولید کردند همچنین نشان دادندکه آلل B باعث افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش بیش از حد باروری در گاوهای هلشتاین می‌شود. در این مطالعه فراوانی‌های ژنوتیپ‌های Aa، AB و Bb بترتیب ۸۱/۳، ۱۸/۵ و ۰/۲ درصد گزارش شده است.

Almeida و همکاران (۱) گزارش کردند که آلل یک RFLP-Sau۳AI[2] ژن لپتین، باعث افزایش فاصله گوساله زائی به مدت ۸۱-۷۹ روز می‌شود و بنابراین انتخاب بر اساس جهش‌های این ژن، حداقل ۲ ماه باعث کاهش فاصله نسلی خواهد شد. در این مطالعه افراد هتروزیگوت نسبت به هموزیگوت‌ها، وزن تولد بالاتری را در اولین گوساله زائی ، نشان دادند. Langonigro و همکاران (۴) گزارش کردند که افراد با ژنوتیپ AB نسبت به افراد ژنوتیپ Aa، حدود ۱۹٪ مصرف خوراک بیشتری را از خود نشان می‌دهد.Zwierzchowsk وهمکاران (۱۱) با استفاده از تکنیک PCR-RFLP به بررسی فراوانی آللی این ژن پرداختند. ابتدا یک قطعه ۱۸۲۰ جفت بازی از ژن لپتین را تکثیر کرده و سپس توسط آنزیم Sau۳AI مورد هضم قرار دادندکه نتیجه آن سه آلل A،B و C تعیین و فراوانی‌های اللی برای این سه آلل به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۱۱ و ۰/۱۰ محاسبه گردید.

تحقیق حاضر، به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های ژن لپتین و فراوانی آلل‌های آن در گاوهای نژاد سرابی به‌کمک روش مولکولی PCR اجرا و بهینه گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

از تعداد ۶۶ راس گاو سرابی از هر دو جنس نمونه خون از ایستگاه‌های پرورش و اصلاح گاو سرابی واقع در شبستر و سراب گرفته شد(شکل شماره۱). خون‌گیری در گاوهای بزرگ از ورید دمی و در گوساله‌ها از ورید وداج با استفاده از لوله‌های حاوی خلأ و ماده ضد انعقاد EDTA[۳] همراه با یخ به آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA[۴] در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

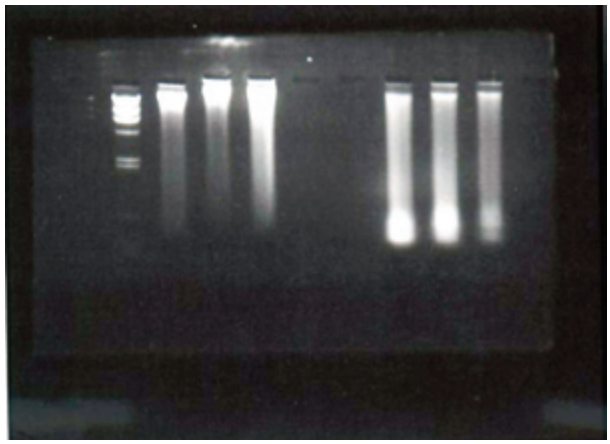
استخراج DNA

استخراج DNA از خون تام با استفاده از روشBoom و همکاران (۳) با استفاده از کیت Diatom (Iso Gene Moscow) انجام گرفت. این روش مبتنی براستفاده از ماده لیز کننده گوانیدین تیوسیانات و جذب کننده سیلیکاژل می‌باشد. بدین منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از خون برداشته وسپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده ۵M گوانیدین تیوسیانات(۲۰mm EDTA،۴۰mm Tris، ۴۰ گرم TritonX۱۰۰، ۱۰ گرم[۵] DTT) به نمونه اضافه شده، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در بن ما ری حاوی درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول نوکلئاز (۴ گرم ذرات سیلیکا،۱۰۰ میکرولیترگوانیدین) اضافه شد و مجموعاً به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی ورتکس گردید. سپس به محیط همگن شده، ۴۰۰ میکرو لیتر بافرسالین(KCl NaCl 1M EDTA 20mM,Tris-HCl10mM1M) اضافه و در نهایت از طریق ماده Extra Gene (۱۰٪ رزین ۰/۰۲ ٪ ماده رنگی Orang،۰/۰۱ درصدTritonX۱۰۰ DNA) زرد رنگ از سایر ناخالصی‌ها جدا گردید. جهت تعیین غلظت نمونه‌های استخراج DNA شده، از روش الکتروفورز مقایسه‌ای آگارز با استفاده از مقادیر مشخصی DNA فاژ لامبدا و الکتروفورز استفاده گردید (شماره ۲).

شکل شماره ۱- محل اخذ نمونه‌های خون گاو سرابی از ایستگاه‌های اصلاح نژاد سراب و شبستر

انتخاب آغازگرها

آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش توسط تیم تحقیقاتی دانشگاه واخنیگن هلند که سرپرستی آن را دکترS.C.Liefers بر عهده دارد، طراحی گردیده است. آغازگرها دوجفت ۲۴ نوکلئوتیدی بودند که قطعه‌ای به‌طول ۴۲۲ جفت باز از اینترون دو ژن لپتین گاوی را تکثیر می‌نمایند. در داخل این قطعه دو جایگاه برشی برای آنزیم Sau۳AI (یک جایگاه مونومورف



شکل شماره ۲: قطعه ۴۲۲ جفت باز تکثیر بوسیله PCR به‌همراه مارکر۵۰M bp (سمت راست)

و یک جایگاه اصلی پلی مورف) وجود دارد. برای بررسی صحت طراحی آغازگرها از نرم افزار DNAsis و Primer Premier استفاده شد. ساخت آغازگرها توسط شرکت SYNTOL (مسکو) صورت پذیرفت. توالی مورد تکثیردر ژن بانک EBI)[۶]با شماره Y۱۱۳۶۹,۱ ثبت شده است. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارتند از:

3′ -Forward primer: 5′ - TGgAGTGgCTtGTtATtttCTtCT

3′ -Reverse primer 5′ - GTCcccGCTtCTGgCTACcTAaCT

واکنش زنجیرهای پلیمراز(PCR)

انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز به کمک کیت لیوفیلزه PCR (Universal Iso Gene–Moscow) که حاوی PCR Diluent Mix و Mineral Oil بود، به روش استاندارد انجام گرفت(شکل شماره۳). غلظت نهایی مواد در ۲۵ میکرولیتر ع آنزیم ۲۰۰، Taq Polymerase میکرومول از هر dNTP، ۲۰۰ میلی مول $MgCl_2$ ، ۲۰-۱۰ پیکامول مخلوط آغازگرها، ۱۰۰-۵۰ نانوگرم DNA و بافر استاندارد. واکنش PCR با برنامه حرارتی زیر به تعداد ۳۵ سیکل در دستگاه ترموسایکلر (UNIOII) انجام شد. برنامه حرارتی عبارت بود از: ۹۴ درجه سانتیگراد جهت واسرشته شدن DNA به‌مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد جهت اتصال آغازگرها به‌مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت سنتز به‌مدت ۱ دقیقه.

هضم آنزیمی(RFLP)

جهش نقطه‌ای اتفاق افتاده(G→C) در موقعیت ۳۱۰۰ جفت بازی اینترون ۲ ژن لپتین برای آنزیم محدودالاثر Sau۳AI ایجاد یک محل اثر

جدید نموده اســت که با هضم آنزیمی‌تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف فراهم خواهد شد. هضم آنزیمی‌در حجم ۳۰ میکرولیتر با مصرف ۱۵ واحد آنزیمی تحت شــرایط بافری و دمای مناسب با استفاده از آنزیم برشی Sau۳AI که جایگاه برشی GATC را شناسایی می‌کند انجام گرفت. هنگام هضم آنزیمی محصولات PCR، در صورت هتروزیگــوت بودن(AB)، قطعات ۳۹۰، ۳۰۳، ۸۸ و۳۲ جفت بازی حاصل می‌شــود و در صورت هموزایگوتی Aa قطعات ۳۹۰ و۳۲ و هموزایگوتــی Bb قطعــات ۳۰۳، ۸۸ و۳۲ جفت بازی بدســت خواهد آمد(شکل شماره۴).

الکتروفورز

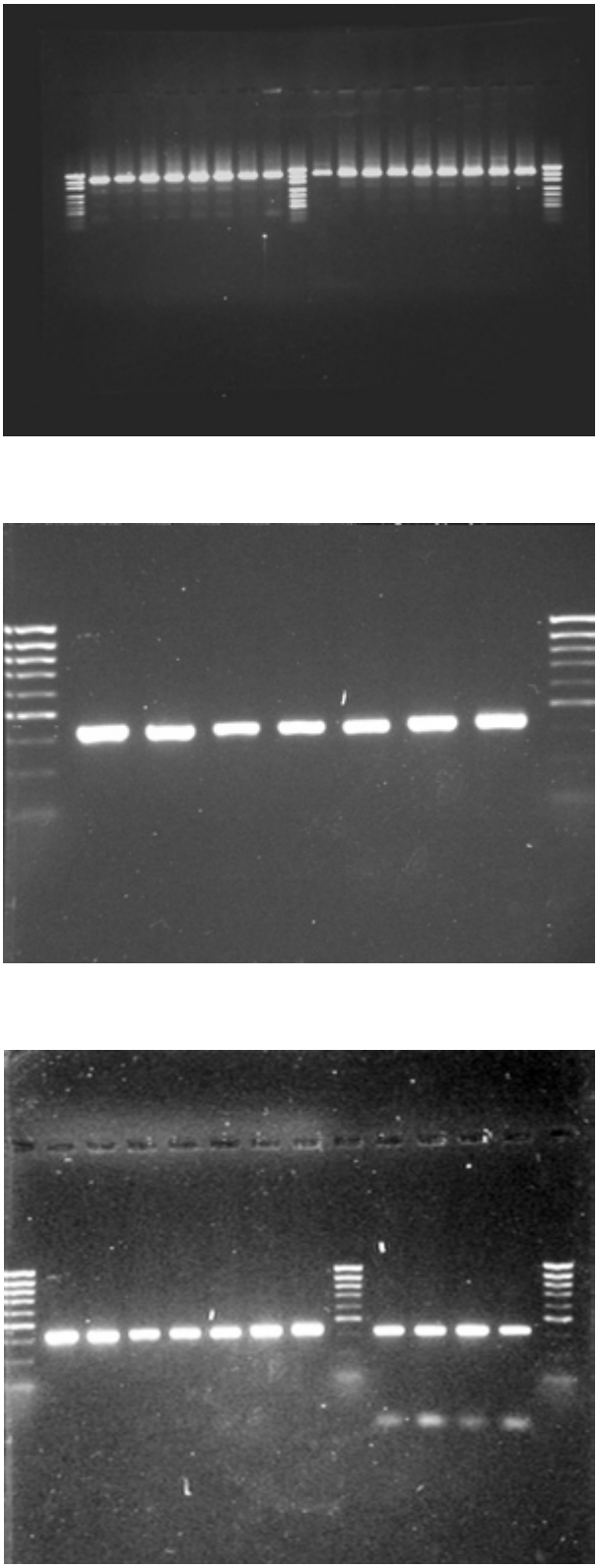
جهت مشــاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۸ ٪ و ولتاژ ۱۰۰-۷۰ ولت به‌مدت ۲ ســاعت اســتفاده شــد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) انجام گرفت. قطعه تکثیر شــده زیر لامپ UV با طول موج ۲۳۰ نانومتر مشــاهده و عکس‌برداری توســط دســتگاه مدل Biometra صورت گرفت. برای مشــاهده قطعات هضم شــده نیز ژل اکریلامید ۱۲٪ درصــد تهیه و نمونه‌ها همراه بافر ســنگین کننده در چاهک ژل قرار داده شــدند. الکتروفورز با ولتاژ ۶۰ ولت بمدت ۴ ساعت انجام شد و پس از آن رنگ آمیــزی به کمک نیترات نقره صورت گرفــت. باندهای ۳۹۰ و ۳۰۳ به‌خوبی قابل رویت و مناســب برای تعیین ژنوتیپ بودند.

تجزیه و تحلیل آماری

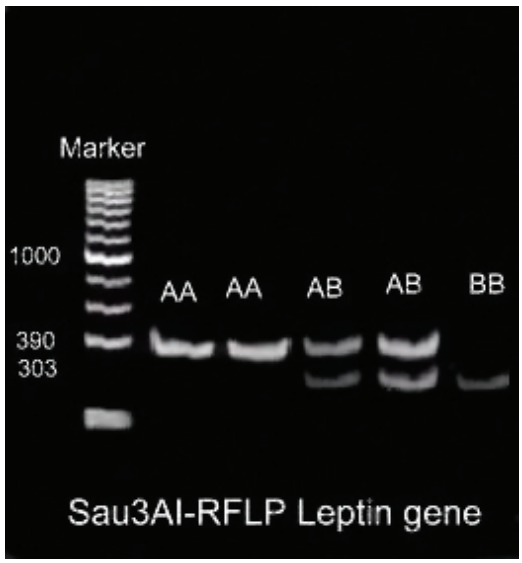
بــرای برآورد فرآوانــی آللها، محاســبه هتروزیگوتــی و آزمون کای اســکوار^{۷}($\chi^{۲}$) از نرم افزار PopGene$_{۳۲}$ اســتفاده گردید(جداول شماره ۱و ۲).

نتایج و بحث

اســتفاده از روش Boom و همکاران(۳) برای استخراج DNA از نمونه خــون برتری خوبــی را از لحاظ کمیــت و کیفیت و صــرف زمان لازم در اســتحصال DNA نشــان داد(شــکل شــماره ۲). تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت بــازی از اینتــرون ۲ ژن لپتیــن به کمــک واکنش زنجیرهای پلــی مراز با اســتفاده از آغازگرهــای اختصاصی به‌خوبــی صورت گرفت. با اســتفاده از برنامه حرارتی مناســب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط خوب آزمایشگاهی فراهم شــده، قطعه ۴۲۲ جفت بــاز بدون قطعات غیر اختصاصی، بدســت آمد. درشــکل شــماره ۳ ، تفکیــک قطعات ۳۹۰ و ۳۰۳ جفــت باز را پس از هضم آنزیمی قطعه ۴۲۲ جفت بازی بوســیله آنزیــم Sau۳AI را بخوبی می‌توان مشــاهده کرد. گاوهای با ژنوتیــپ هتروزیگوت دارای قطعات ۳۹۰ و ۳۰۳ و ژنوتیپ‌های هموزیگوت (Aa و Bb) به‌ترتیب دارای قطعات ۳۰۹ و ۳۰۳ جفت باز نوکلئوتیدی هســتند. برای برآورد فراوانی آلل‌ها، محاسبه هتروزیگوتــی و آزمــون کای اســکوار($\chi^{۲}$) از نرم افزار PopGene اســتفاده گردیــد. تعداد ژنوتیپهای مختلف و فراوانی آللــی ژن لپتین در جدول یک برای ایستگاههای سراب و شبستر آورده شده است. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بیشــترین فراوانی آللی در ایستگاه سراب، متعلق به آلل A با فراوانی ۰/۶۳ و در ایستگاه شبستر، به آلل B با فراوانی ۰/۵۸ می‌باشد. درمجموع، فراوانی آللی در دو ایستگاه نشان داد که فراوانی آلل A به اندازه ۴٪ بیشــتر از درصد فراوانی آلل B می‌باشــد(نمودار ۱). این یافته با نتایج پژوهش Zwierzchowsk و همکاران (۱۳) در نژاد لهســتانی مغایرت دارد و



شکل شماره ۳: ژنوتیپ‌های مختلف ژن لپتین
پس از هضم آنزیمی(سمت چپ)



شکل شماره ۴: هضم آنزیمی با آنزیم برشی Sau3AI

در صورتی که با نتایج Pomp و همکاران(۱۰) در نژادهای هرفورد همسانی دارد. آزمون کای- اسکوار(χ^2) نشان داد که تعادل هاردی- واینبرگ در جمعیت ایستگاه‌های سراب و شبستر برای این جایگاه از ژن لپتین برقرار است. جدول شماره ۲ نشان می‌دهد که میزان هتروزیگوتی برآورد شده بوسیله شاخص Nei در دو جمعیت سراب و شبستر به‌ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۴۹ می‌باشد. این پارامتر حاکی از این است که تنوع ژنتیکی این دو جمعیت از نظر ژن لپتین متوسط می‌باشد. نمودارهای شماره ۱ و۲ متوسط فراوانی بالای آلل A را نسبت به B و متوسط فراوانی بالای ژنوتیپ AB را نشان می‌دهند. مقایسه متوسط فراوانی آلل‌های A و B بدست آمده در نژاد سرابی با نژادهای گاو سیاه و سفید لهستانی(۱۳)، هلشتاین(۶)، گرل بویچ سمینتال، لیموزین و هرفورد(۱۰) در نمودار شماره ۳ آورده شده است.

منابع مختلف (۵، ۸) آلل B را به‌عنوان آلل مطلوب جهت اصلاح نژاد و بهبود تولید شیر معرفی کردند. لذا با توجه به اینکه فراوانی این آلل در جمعیت‌های سرابی از فراوانی متوسطی برخوردار است، بنابراین استفاده از تنوع موجود در نژادهای بومی در این جمعیت از اهمیت خاصی برخوردار است. آزمون هاردی- واینبرگ نشان داد که هر دو جمعیت متعادل می‌باشند که ممکن است به‌علت عدم انتخاب برای این ژن باشد. با توجه به اینکه این جایگاه دارای دو شکل آللی می‌باشد به نظر می‌رسد که احتمالاً تعداد نمونه برای برآورد فراوانی‌های محاسبه شده مناسب باشد. هتروزیگوتی متوسطی که در هر دو جمعیت سراب و شبستر بدست آمده نشان دهنده تنوع پایین این جایگاه ژنی در جمعیت سرابی است. با توجه به پتانسیل بالای ژنتیکی دام‌های بومی‌کشور و وجود فراوانی بالای آلل‌های مطلوب ضرورت حفظ و استفاده از این پتانسیل‌ها احساس می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از سرپرست محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی جناب آقای دکتر ابولقاسم محمدی به جهت حمایت های بی شائبه شان کمال تشکر و قدردانی را داریم . از دکتر Liefers از انستیتو تحقیقات ژنتیک

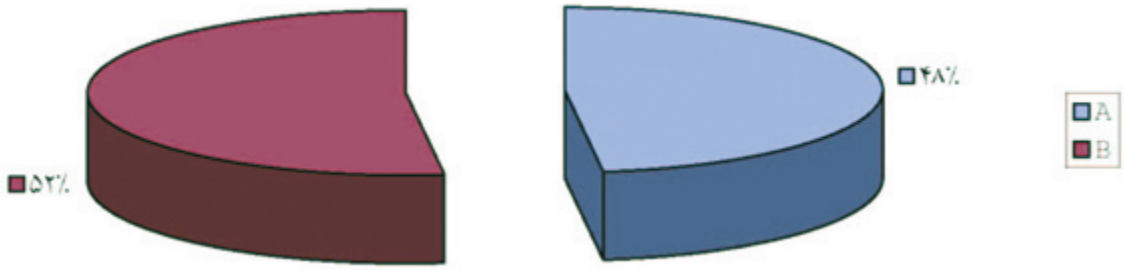
جدول شماره ۱: تعداد ژنوتیپ‌ها، فراوانی آللی و آزمون کای- اسکوار(χ^2) برای ژن لپتین در گاوهای نژاد سرابی

N	تعداد ژنوتیپ			χ^2	فراوانی اللی (درصد)	
	AA	AB	BB		A	B
ایستگاه سراب	۱۵	۱۴	۶	۰/۸۷ns	۰/۶۳	۰/۳۷
ایستگاه شبستر	۶	۱۴	۱۱	۰/۲۸ns	۰/۴۲	۰/۵۸
جمع کل N=۶۶	۲۱	۲۸	۱۷		۰/۵۳	۰/۴۷

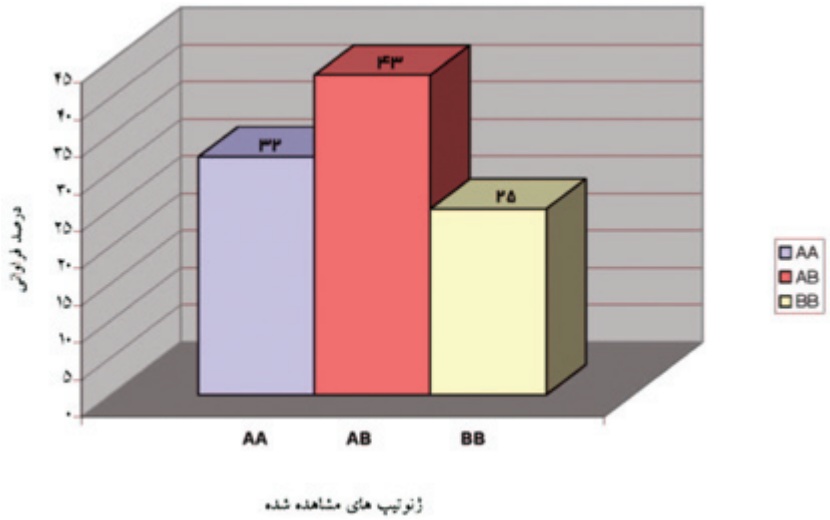
ns: عدم معنی دار بودن فراونی ژنوتیپی

جدول شماره ۲: هتروزیگوتی مشاهده شده ، مورد انتظار و محاسبه شده بر اساس فرمول Nie در جمعیت نژاد سرابی برای ژن لپتین

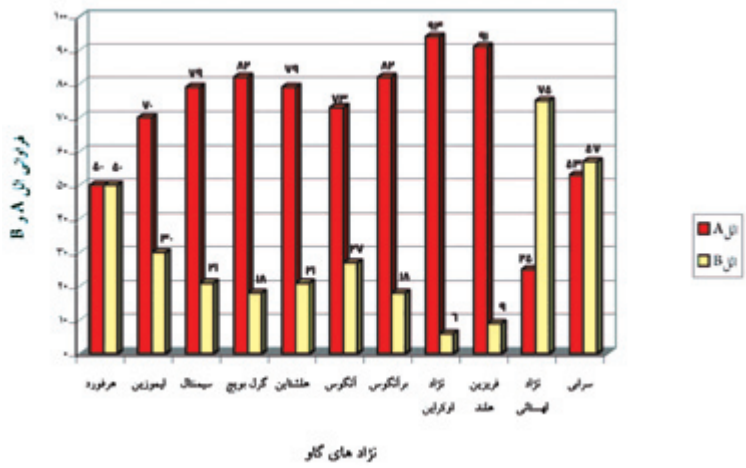
جایگاه ژنی		هتروزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مورد انتظار	شاخص Nie	میانگین هتروزیگوتی
لپتین	(سراب)	۰/۴۰۰۰	۰/۴۷۳۷	۰/۴۶۶۹	۰/۴۷۷۰
	(شبستر)	۰/۴۵۱۶	۰/۴۹۵۰	۰/۴۸۷۰	۰/۴۷۷۰
میانگین		۰/۴۲۴۲	۰/۵۰۲۰	۰/۴۹۸۲	۰/۴۷۷۰



نمودار شماره ۱- فراوانی کل آلل‌های A وB ژن لپتین را در گاوهای سرابی مورد مطالعه



نمودار شماره ۲- فراوانی کل ژنوتیپ‌های Aa، AB و Bb در گاوهای سرابی مورد مطالعه



نمودار شماره ۳- مقایسه فراوانی الل A و B ژن لپتین در نژادهای مختلف
(توجه داشته باشید که در تمام این نژادها آغازگرها و منطقه مورد تکثیر و آنزیم برشی مورد استفاده یکسان بوده است)-(۵، ۶، ۹، ۱۰)

lelystand هلند به جهت طراحی آغازگر های مناسب و ارائه پروتکل‌های مربوطه تشکر و قدردانی را داریم. هزینه انجام این پروژه توسط سازمان مدیریت و برنامه‌ریزی استان آذربایجان شرقی تامین اعتبار شده است و جز طرح‌های مصوب این سازمان در سال ۸۲ محسوب می‌شود.

پاورقی‌ها

1- Quantitative traits loci
2- Restriction fragment length polymorphism
3- Ethylenediaminetetra acetic acid
4- Deoxyribose nucleic acid
5- Dithiothreitol
6- European Bioinformatics Information
7- Chi-square test

منابع مورد استفاده

1- Almeidate, E. A. Almeida. J. C. F. Morqes and T. Weimer. 2003; Molecular marker in the Lep gene and reproductive performance of beef cattle. V120 (2)106.

2-Belby, C. R. Macmillan, Lucy. 1998; Comparative study of ovarian function in American Holstein. Journal of Dairy Science. 222.

3-Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E. & Van Der Noordaa, J. 1989; Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of Clinical Microbiology., 28(3) : 495-503.

4-Lagonigro, R. P. Wiener, F. Pilla. J. A. Woolliams. J. 2003;A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Animal Genetic 34(5) .371-374.

5-Liefers, S .C. M. F. W. Tepas, R .F. Veerkamp. 2002; Association between leptin gene polymorphism and protein, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein .J. Dairy Sci. 85: 1633 1638.

6-Liendersoon, M. L. Anderson. D. J. de konine. 1998; Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. J Dairy Sci. 81:1454-461.

7-Lucy. M .C. 2000; Reproductive physiology in High-yielding diary cattle. www. Missouri. edu .

8-Pfister-Geneskow, M.H. Hayes, A. Eggen .M. D. Bishop. 1996; Chromosal location of bovine obesity gene mammalian genome, 7: 398.

9-Pomp, D, zou. , Clutter, A. C. and Barendse, w. 1997; Mapping of leptin to bovine chromosome 1 by linkage analysis of a PCR- based polymorphism. J. Anim. Sci. 75: 1427

10-Veerkamp, R. F., J.K. Oldenbrok. 2000; Genetic correlation between days until start of luteal and milk yield, energy balance and live weight. J. Dairy Sci. 83: 577-583

11-Zwierzchowski L., J.Krzyzewski, N.Strzalkowska, E.Siadkowska and Z.Rynieweaz. 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. Animal Science Papers and Reports, Vol. 20, No.4, P: 213-27.