

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 علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
- نادر اسدزاده، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
- محمدحسین بنابازی، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
- محمدرضا نصیری، عضو هیات علمی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد
- علی جوادمنش، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

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

Email: Javanmard@azarn.org.ir

چکیده

شناخت جنبه های ژنتیکی و ژن های عمده تاثیر گذار روی توازن انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوراک از علاقه مندی های اخیر محققان ژنتیک و اصلاح نژاد می باشد. ژن لپتین از جمله ژن هایی است که چند شکلی های موجود در آن با صفات اقتصادی و مهم مرتبط است. در این پژوهش نمونه های خون از ۶۶ گاو نژاد سرابی از ایستگاه های اصلاح نژاد سراب و شبستر گرفته شد. استخراج DNA به کمک روش Boom و همکاران (۳) و واکنش زنجیره پلی مرز (PCR) جهت تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت بازی از اینترون ۲ این ژن انجام گرفت. قطعه تکثیر شده بوسیله آنزیم محدودالایتر ۳ (Sau3AI) جهت تشخیص ژنوتیپ های ژن لپتین مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپ های Aa، AB و Bb به ترتیب ۰/۳۹، ۰/۴۷ و ۰/۱۴ در ایستگاه سراب و ۰/۴۹، ۰/۱۸ و ۰/۳۳ در ایستگاه شبستر تشخیص داده شدند. فراوانی های آللی نیز برای آلل های A و B به ترتیب ۰/۶۳ و ۰/۳۷ 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 می باشد. در هر دو جمعیت، از لحاظ این جایگاه، تعادل هاردی-واینبرگ برقرار بود. با توجه به اینکه صفات کمی توسط برآیند تعداد زیادی ژن کوچک اثر و همچنین اثر متقابل بین آنها، کنترل می شود، فلذا مناسب بودن فراوانی آلل مطلوب در سطح یک لوکوس، نمی تواند گواهی بر عملکرد مطلوب یک صفت در یک نژاد باشد و بالطبع بررسی وضعیت جایگاه های ژنی دیگر مورد نیاز می باشد.

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 (۲، ۷، ۱۰). لذا شناخت ژن های عمده موثر بر این صفات از علاقمندی های محققان در سال های اخیر بوده است. لپتین یک پروتئین ۱۶ کیلو دالتونی می باشد که از بافت های آدیپوز به خصوص آدیپوز سفید، ترشح می شود. این پروتئین اولین بار در موش کشف شد (۴). پروتئین لپتین در حال گردش در خون، دارای ۱۴۶ اسید آمینه می باشد. اعتقاد بر این است که لپتین عمده ترین کنترل کننده اشتها، متابولیسم انرژی، باروری، ایمنی، افزایش وزن می باشد. ژن لپتین گاوی سه آلل دارد و دو اینترون می باشد و در روی کروموزوم شماره ۴ گاو واقع شده است (۸). Lienderson و همکاران (۶) مکان های کنترل کننده صفات کمی (QTL) برای صفات تولید شیر را در ۸۲/۸ سانتی مورگان و برای درصد چربی و پروتئین شیر در ۷۵ و ۹۵ سانتی مورگانی ژن لپتین مکان یابی کردند. Liefers و همکاران (۵) گزارش کردند که تلیسه هایی با ژنوتیپ ۱/۳۲ AB، ۱ کیلو گرم در روز شیر بیشتری نسبت به ژنوتیپ Aa تولید کردند همچنین نشان دادند که آلل B باعث افزایش تولید شیر بدون ایجاد توازن منفی انرژی و کاهش بیش از حد باروری در گاوهای هلشتاین می شود. در این مطالعه فراوانی های ژنوتیپ های AB، Aa و Bb بترتیب ۸۱/۳، ۱۸/۵ و ۰/۲ درصد گزارش شده است.

Almeida و همکاران (۱) گزارش کردند که آلل یک RFLP-Sau3AI ژن لپتین، باعث افزایش فاصله گوساله زائی به مدت ۷۹-۸۱ روز می شود و بنابراین انتخاب بر اساس جهش های این ژن، حداقل ۲ ماه باعث کاهش فاصله نسلی خواهد شد. در این مطالعه افراد هتروزایگوت نسبت به هموزایگوت ها، 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 می دهد. Zwierzchowski و همکاران (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 Sau3AI مورد هضم قرار دادند که نتیجه آن سه آلل A، B و C تعیین و فراوانی های آللی برای این سه آلل به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۱۱ و ۰/۱۰ محاسبه گردید. تحقیق حاضر، به منظور شناسایی ژنوتیپ های ژن لپتین و فراوانی آلل های آن در گاوهای نژاد سرابی به کمک روش مولکولی PCR اجرا و بهینه گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

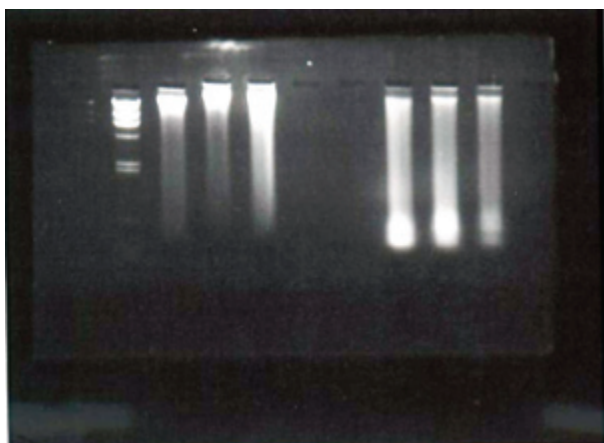
از تعداد ۶۶ راس گاو سرابی از هر دو جنس نمونه خون از ایستگاه‌های پرورش و اصلاح گاو سرابی واقع در شبستر و سراب گرفته شد (شکل شماره ۱). خون‌گیری در گاوهای بزرگ از ورید دم و در گوساله‌ها از ورید وداج با استفاده از لوله‌های حاوی خلأ و ماده ضد انعقاد EDTA^۳ همراه با یخ به آزمایشگاه اصلاح نباتات مولکولی دانشکده 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 روش Boom و همکاران (۳) با استفاده از کیت Diatom (Iso Gene Moscow) انجام گرفت. این روش مبتنی بر استفاده از ماده لیز کننده گوانیدین تیوسیانات و جذب کننده سیلیکاژل می‌باشد. بدین منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از خون برداشته و سپس ۵۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده ۵M گوانیدین تیوسیانات (۲۰mm EDTA، ۴۰mm Tris، ۴۰ گرم TritonX۱۰۰، ۱۰ گرم DTT^۵) به نمونه اضافه شده، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در بین ما ری حاوی درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول نوکلئاز (۴ گرم ذرات سیلیکا، ۱۰۰ میکرولیتر گوانیدین 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 Extra 20mM, Tris-HCl 10mM 1M TritonX۱۰۰ درصد ۰/۰۱، ۰/۰۲ ماده رنگی Orange، ۰/۰۱ درصد TritonX۱۰۰) (Gene ۱۰٪ رزین ۰/۰۲٪ ماده رنگی Orange، ۰/۰۱ درصد TritonX۱۰۰) (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).

انتخاب آغازگرها

آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش توسط تیم تحقیقاتی دانشگاه واخینگن هلند که سرپرستی آن را دکتر S.C.Liefers بر عهده دارد، طراحی گردیده است. آغازگرها دوجفت ۲۴ نوکلئوتیدی بودند که قطعه‌ای به طول 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 به همراه مارکر ۵۰۰ 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 تکثیر در ژن بانک (EBI) با شماره Y۱۱۳۶۹،۱ ثبت شده است. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارتند از:

Forward primer: 5' - TGgAGTGgCTtGTtATtttCTtCT
Reverse primer: 5' - GTCcccGCTtCTGgCTACcTAaCT

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

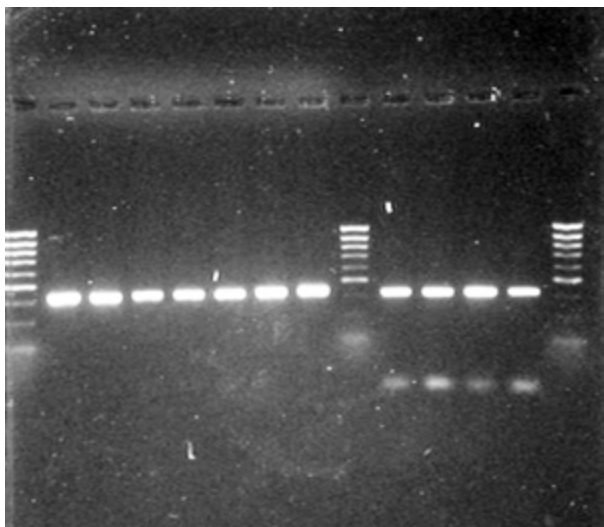
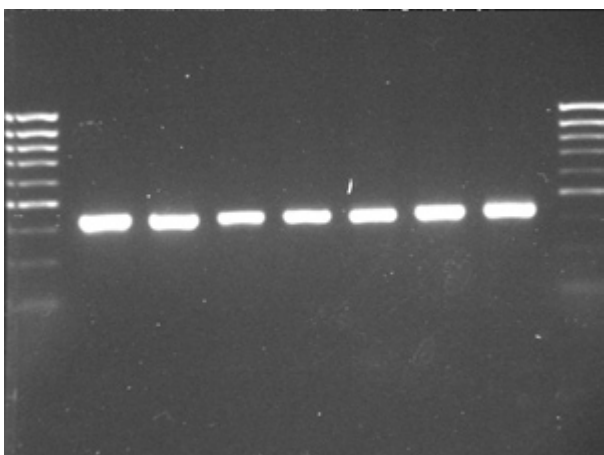
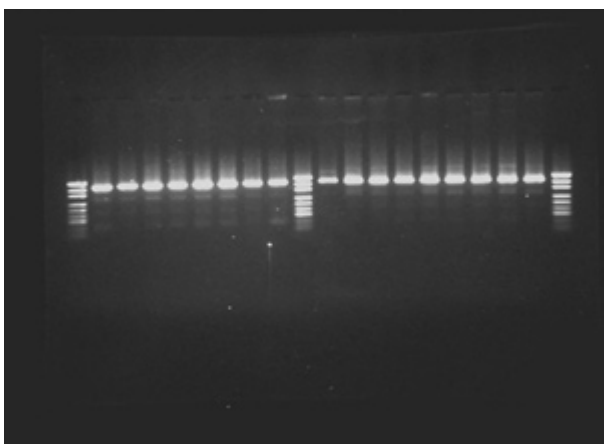
انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز به کمک کیت لیوفیلزه PCR Diluent Mix (Universal Iso Gene-Moscow) که حاوی PCR و Mineral Oil بود، به روش استاندارد انجام گرفت (شکل شماره ۳). غلظت نهایی مواد در ۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq Polymerase، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۲۰ میلی مول MgCl_۲، ۲۰-۱۰ پیکامول مخلوط آغازگرها، ۱۰۰-۵۰ 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 به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتیگراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت سنتز به مدت ۱ دقیقه.

هضم آنزیمی (RFLP)

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



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



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

جدید نموده است که با هضم آنزیمی تشخیص ژنوتیپ‌های مختلف فراهم خواهد شد. هضم آنزیمی در حجم ۳۰ میکرولیتر با مصرف ۱۵ واحد آنزیمی تحت شرایط 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 هتروزایگوت بودن (AB)، قطعات ۳۰۳، ۳۹۰، ۸۸ و ۳۲ جفت بازی حاصل می‌شود و در صورت هموزایگوتی Aa قطعات ۳۹۰ و ۳۲ و هموزایگوتی Bb قطعات ۳۰۳، ۸۸ و ۳۲ جفت بازی بدست خواهد آمد (شکل شماره ۴).

الکتروفورز

جهت مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۸٪ و ولتاژ ۱۰۰-۷۰ ولت به مدت ۲ ساعت استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (۱۰ mg/ml) انجام گرفت. قطعه تکثیر شده زیر لامپ UV با طول موج ۲۳۰ نانومتر مشاهده و عکس برداری توسط دستگاه مدل Biometra صورت گرفت. برای مشاهده قطعات هضم شده نیز ژل اکرلامید ۱۲٪ درصد تهیه و نمونه‌ها همراه بافر سنگین کننده در چاهک ژل قرار داده شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۶۰ ولت به مدت ۴ ساعت انجام شد و پس از آن رنگ آمیزی به کمک نیترا ت نقره صورت گرفت. باندهای ۳۹۰ و ۳۰۳ به خوبی قابل رویت و مناسب برای تعیین ژنوتیپ بودند.

تجربه و تحلیل آماری

برای برآورد فراوانی آلله‌ها، محاسبه هتروزایگوتی و آزمون کای اسکوار (χ^2) از نرم افزار PopGene_{۳۳} استفاده گردید (جدول شماره ۲ و ۳).

نتایج و بحث

استفاده از روش Boom و همکاران (۳) برای استخراج DNA از نمونه خون برتری خوبی را از لحاظ کمیت و کیفیت و صرف زمان لازم در استحصال DNA نشان داد (شکل شماره ۲). تکثیر قطعه ۴۲۲ جفت بازی از اینترون ۲ ژن لپتین به کمک واکنش زنجیره‌های پلی مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی صورت گرفت. با استفاده از برنامه حرارتی مناسب، آغازگرهای اختصاصی و شرایط خوب آزمایشگاهی فراهم شده، قطعه ۴۲۲ جفت باز بدون قطعات غیر اختصاصی، بدست آمد. در شکل شماره ۳، تفکیک قطعات ۳۹۰ و ۳۰۳ جفت باز را پس از هضم آنزیمی قطعه ۴۲۲ جفت بازی بوسیله آنزیم Sau۳AI را بخوبی می‌توان مشاهده کرد. گاوهای با ژنوتیپ هتروزایگوت دارای قطعات ۳۹۰ و ۳۰۳ و ژنوتیپ‌های هموزایگوت (Aa و Bb) به ترتیب دارای قطعات ۳۰۹ و ۳۰۳ جفت باز نوکلئوتیدی هستند. برای برآورد فراوانی آلله‌ها، محاسبه هتروزایگوتی و آزمون کای اسکوار (χ^2) از نرم افزار PopGene استفاده گردید. تعداد ژنوتیپ‌های مختلف و فراوانی آللی ژن لپتین در جدول یک برای ایستگاه‌های سراب و شبستر آورده شده است. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین 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. در مجموع، فراوانی آللی در دو ایستگاه نشان داد که فراوانی آلل A به اندازه ۰/۴ بیشتر از درصد فراوانی آلل B می‌باشد (نمودار ۱). این یافته با نتایج پژوهش Zwierzchowsk و همکاران (۱۳) در نژاد لهستانی مغایرت دارد و

می‌باشد. این پارامتر حاکی از این است که تنوع ژنتیکی این دو جمعیت از نظر ژن لپتین متوسط می‌باشد. نمودارهای شماره ۱ و ۲ 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 هرورد (۱۰) در نمودار شماره ۳ آورده شده است. منابع مختلف (۵، ۸) آلل B را به عنوان آلل مطلوب جهت اصلاح نژاد و بهبود تولید شیر معرفی کردند. لذا با توجه به اینکه فراوانی 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 به علت 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 بومی کشور و وجود فراوانی بالای آلل‌های مطلوب ضرورت حفظ و استفاده از این پتانسیل‌ها احساس می‌شود.

سیاسگزاری

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



شکل شماره ۴: هضم آنزیمی با آنزیم برشی Sau3AI

در صورتی که با نتایج Pomp و همکاران (۱۰) در نژادهای هرورد 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 به ترتیب ۰/۴۷ و ۰/۴۹

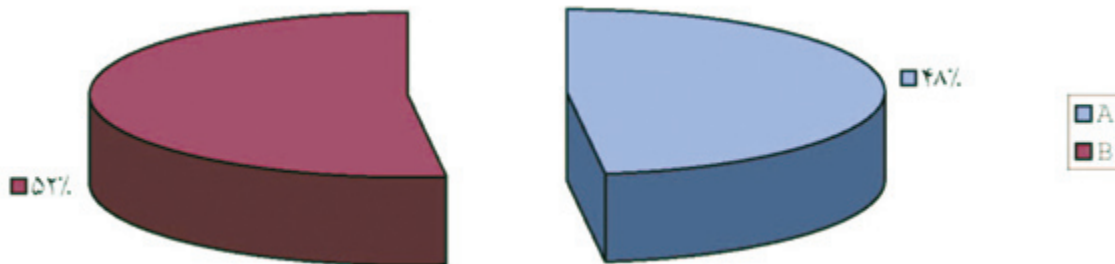
جدول شماره ۱: تعداد ژنوتیپ‌ها، فراوانی آللی و آزمون کای-اسکوار (χ^2) برای ژن لپتین در گاوهای نژاد سرابی

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

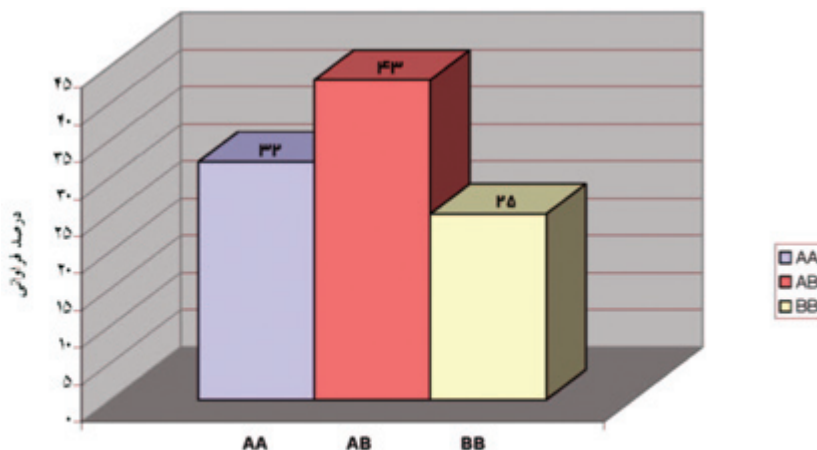
ns: عدم معنی دار بودن فراوانی ژنوتیپی

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

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

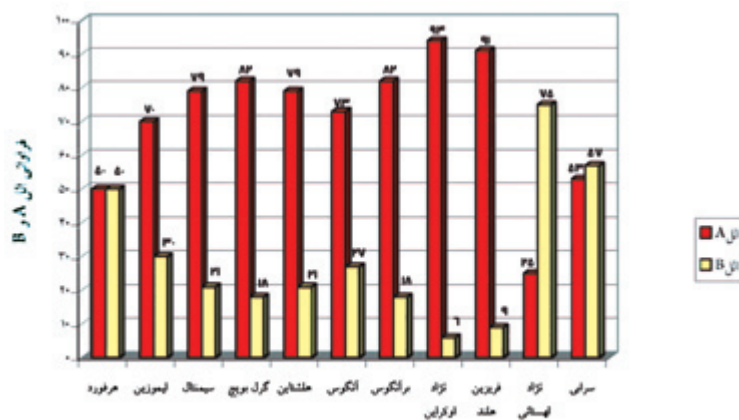


نمودار شماره ۱- فراوانی کل آلل‌های A و B ژن لپتین را در گاوهای سرابی مورد مطالعه



ژنوتیپ‌های مشاهده شده

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



نژاد های گاو

نمودار شماره ۳- مقایسه فراوانی آلل 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)

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 dairy cattle. [www. Missouri. edu](http://www.Missouri.edu) .

8-Pfister-Geneskow, M.H. Hayes, A. Eggen .M. D. Bishop. 1996; Chromosomal 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.

lelystand هلند به جهت طراحی آغازگر های مناسب و ارائه پروتکل های مربوطه تشکر و قدردانی را داریم. هزینه انجام این پروژه توسط سازمان مدیریت و برنامه ریزی استان آذربایجان شرقی تامین اعتبار شده است و جز طرح های مصوب این سازمان در سال ۸۲ محسوب می شود.

پاورقی ها

- 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

