نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۹۱-۸۷

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 6, No. 1, Spring 2014, p. 87-91

بررسی ناحیه تنظیمی ژن لپتین در گاوهای نجدی خوزستان

فاطمه امرایی[1*]- هدایت‌اله روشنفکر[2]- جمال فیاضی[3]- محمد بوجارپور[4]

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۳/۸
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۱۱/۱

چکیده

شناخت جنبه‌های ژنتیکی و ژن‌های عمده تأثیرگذار بر روی توازن انرژی، تولید شیر، باروری، ایمنی و مصرف خوراک از علاقه‌مندی‌های اخیر محققان ژنتیک و اصلاح نژاد می‌باشد. گاو نجدی شاخص‌ترین نژاد گاو بومی استان خوزستان می‌باشد. برای انجام این تحقیق از ۱۵ رأس گاو نجدی در ایستگاه گاو نجدی شوشتر خون‌گیری به عمل آمد. DNA از خون کامل به کمک روش بوم و همکاران استخراج شد و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر دو قطعه ۵۶۶ و۵۴۴ جفت‌بازی از جایگاه پروموتوری ژن لپتین انجام شد. پس از اطمینان از صحت توالی تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد، توالی‌یابی انجام گردید و اجزای پروموتور ژن لپتین در گاو نجدی مشخص گردید. در این بررسی شش جهش در قطعه اول (۵۶۶ جفت‌بازی) مشاهده گردید که دو جهش آن نقطه‌ای، از نوع Transition و Transversion بود و چهار جهش Frameshift که سه جهش آن از نوع Deletion و یکی از نوع Insertion بود شناسایی شد. همچنین در قطعه دوم (۵۴۴ جفت‌بازی) سه جهش مشاهده گردید که شامل دو جهش نقطه‌ای، از نوع Transition و Transversion و یک جهش Frameshift از نوع Deletion در ناحیه پروموتور ژن لپتین بودند. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که جهش‌های مزبور بر روی باکس‌ها و اجزای پروموتور ژن لپتین تأثیر نداشتند. همچنین در این بررسی توالی های مربوط به تک‌تک نمونه‌ها در هر دو قطعه از لحاظ میزان شباهت با توالی‌های ثبت شده مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج BLAST درصد شباهت بالایی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: ژن لپتین، پروموتور، جهش

مقدمه

علم بیوتکنولوژی با پیشرفت چشمگیری که در سال‌های اخیر داشته است سبب تحول و انقلابی عظیم در علوم زیستی گردیده است. با استفاده از این فناوری امروزه می‌توانیم به محصولات تغییریافته‌ای دسترسی پیدا کنیم که در اصل محصولات طبیعی به شمار می‌آیند و از محصولاتی که به صورت شیمیایی سنتز می‌شوند، متمایز هستند (۳). احتمالاً مهم‌ترین فناوری در دسترس زیست‌شناسان مولکولی، توالی‌یابی DNA است که به وسیلهٔ آن ترتیب دقیق نوکلئوتیدها را در قطعه‌ای از DNA می‌توان تعیین کرد (۱). ژن‌های کاندیدا برای یک صفت خاص عبارتاند از ژن‌های توالی‌یابی شده‌ای که فعالیت بیولوژیکی آن‌ها شناخته شده و در تکامل یا فیزیولوژی آن صفت دخالت دارند (۳). مشخص شده است که لپتین توسط ژن لپتین که به چاقی مشهور است کد می‌شود. ژن *ob* در سال ۱۹۹۴ پس از هشت سال تلاش تیم دکتر جفری فریدمن، در دانشگاه راکفلر از مطالعه روی موش‌های جهش‌یافته ژانگ و همکاران (۱۲) کشف شد. (بر مبنای کلمه یونانی Leptos به معنای لاغری) لپتین در بین گونه‌هایی مانند انسان، شامپانزه، خوک، موش، سگ و گاو نزدیک به ۶۷ درصد دارای توالی یکسانی می‌باشد. این پروتئین در ابتدا از ۱۶۷ اسیدآمینه ساخته شده و پس از جدا شدن ۲۱ اسیدآمینه به داخل خون رها می‌شود (۶). ژن لپتین گاوی دارای سه اگزون ودواینترون می‌باشد و در روی کروموزوم شماره چهار گاو واقع شده است (۹). لپتین یک پروتئین ۱۶کیلودالتونی است. این هورمون در نتیجه‌ی جهش ایجاد شده در سطح ژن مسئول چاقی، تولید می‌شود (۱۳). لپتین در بافت‌های مختلف از قبیل بافت چربی، جفت، غده‌های پستانی، اسکلت ماهیچه، مخاط معده، مغز و هیپوفیز وجود دارد (۷). و عمدتاً به وسیله بافت چربی سفید ترشح می‌شود (۸). این هورمون نقش مهمی در جذب غذا، بالانس انرژی، تولید مثل، تولید شیر، اعمال ایمنی، تبدیل غذایی ومتابولیسم ایفا می‌کند (۱۰). اخیراً پلی‌مورفیسم‌هایی بر روی این ژن و یا مرتبط با آن گزارش شده‌اند که این ژن را قویاً به‌عنوان کاندیدایی مؤثر بر افزایش میزان تولید شیر و

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیاران گروه علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین، خوزستان
(*- نویسنده مسئول: Email:amraei.fa@gmail.com)

ترکیبات آن مطرح کرده است (۵).

اولین بار در سال ۲۰۰۲ ساختمان ژنومی پروموتور لپتین گاوی مورد بررسی قرارگرفت. در این بررسی در ناحیه جانبی ´۵ بالادست جایگاه شروع رونویسی ژن لپتین، عناصر توالی و فاکتورهای تنظیمی Sp1 و موتیف‌های پروتئین اتصالی CCAAT/enhancer (C/EBP) شناسایی شد. در این بررسی در ناحیه ۲۸- تا ۳۳- جایگاه شروع رونویسی یک موتیف TATA شناسایی شد. نتایج نشان داد که ناحیه جانبی ´۵ ناحیه مهمی در پروموتور لپتین می‌باشد و C/EBPα شناسایی شده در این ناحیه می‌تواند فعال کننده پروموتور ژن لپتین گاو باشد (۱۱).

زیستگاه گاو نجدی در جنوب و جنوب غرب کشور است و شاخص‌ترین نژاد گاو در استان خوزستان می‌باشد. این نژاد بعنوان یک منبع خوب تولید شیر و گوشت نقش مؤثری در تامین پروتئین حیوانی و اقتصاد این منطقه ایفا می‌نماید. هدف از انجام این تحقیق تکثیر ناحیه تنظیمی ژن لپتین و تعیین‌توالی آن و همچنین تعیین واریانت‌های احتمالی ژن لپتین در ناحیه تنظیمی ژن که منجر به کاهش یا افزایش بیان ژن می‌شود، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای انجام این طرح در ایستگاه گاو نجدی شوشتر واقع در ۱۵ کیلومتری جاده شوشتر- اهواز از ۱۵ رأس گاو نجدی خون‌گیری به عمل آمد. خون‌گیری از ورید وداج گردن با استفاده از لوله‌های حاوی خلاء و ماده ضد انعقاد EDTA[1] انجام گرفت. نمونه‌ها همراه با یخ به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رامین منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از خون تام با استفاده از روش بوم و همکاران با استفاده از کیت DIAtom (Iso Gene Moscow) انجام گرفت (۴). این روش مبتنی بر استفاده از ماده لیز کننده گوانیدین تیوسیانات و جذب کننده سیلیکاژل می‌باشد. در این روش ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از خون را برداشته و سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر هضم کننده ۵ مولار گوانیدین تیوسیانات (EDTA ۲۰ میلی‌مولار، ۱۰ گرم بر لیتر تریس اسیدی، ۴۰ گرم بر لیتر تریتون ۱۰۰ مرتبه، ۱۰گرم بر لیتر DTT (دای‌تریتون)) اضافه شده، سپس نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری نگهداری شدند. جذب‌کننده نوکلئوس به میزان ۲۰ میکرولیتر به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه به آرامی ورتکس گردید. در مرحله بعد ۴۰۰ میکرولیتر سالین بافر به محیط همگن شده اضافه و در نهایت از طریق ماده Extra Gene، DNA از سایر ناخالصی‌ها جدا گردید. جهت تعیین کمیت DNA استخراج شده، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

انتخاب آغازگرها

آغازگرهای استفاده شده (با شماره ثبت توالی AJ571671.1 در پایگاه اطلاعاتی NCBI) در این پژوهش توسط تیم تحقیقاتی دانشگاه واخنگین[2] هلند که سرپرستی آن‌را دکتر S.C.Liefers بر عهده دارد، با استفاده از نرم افزار الیگوآنالایزر طراحی گردیده است. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای قطعات ۵۶۶ و ۵۴۴ جفت‌بازی به ترتیب عبارتند از:

Leptin-F 5´-GGG GGA GGC GGA GAG GAG

Leptin-R 5´-TAC ATG GCC ACT AAA AAG GTT G-3´

Leptin-F 5´-TAG TAC AAT ATC CTT CCT TTC TT -3´

Leptin-R 5´-CCT GCC TTG ATG ATG GTG TGG- -3´

برای بررسی صحت طراحی، آغازگرها با توالی رفرنس توسط نرم‌افزار وکتور Nti و الیگوآنالایزر مقایسه شدند و بعد از اطمینان از اتصال هر چهار پرایمر با توالی الگو این پرایمرها مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR)

واکنش PCR[3] در حجم ۲۵ میکرولیتر و با برنامه‌ی حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشته اولیه‌ی DNA به مدت ۳۰۰ ثانیه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط آغازگرها به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهائی به مدت ۶۰۰ ثانیه برای قطعه ۵۶۶ جفت‌بازی انجام شد و برای قطعه دوم (۵۴۴ bp) دمای اتصال ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ایده‌آل‌ترین شرایط را برای تکثیر آغازگرهای مورد نظر فراهم کرد.

الکتروفورز

جهت مشاهده محصولات PCR از ژل آگارز ۱ درصد و ولتاژ ۸۰

1- Ethylen Diamin Tetra Acetic acid

2- Wageningen

3- The Polymerase Chain Reaction

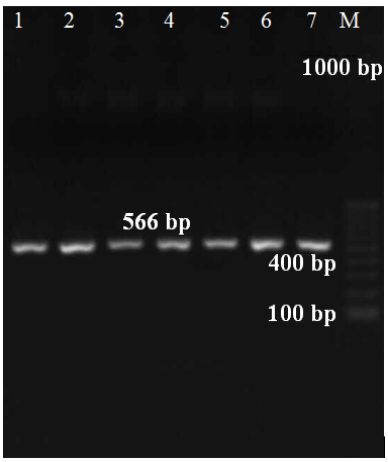
ولت به مدت ۱ ساعت استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با DNA SafeStain انجام گرفت. قطعه تکثیر شده زیر لامپ UV مشاهده و عکس‌برداری توسط دستگاه ژل‌داک[1] صورت گرفت.

تعیین توالی

پس از حصول اطمینان نسبی به صحت توالی‌های تکثیر شده، به منظور اطمینان کامل و تشخیص توالی قطعات مورد نظر، محصولات PCR برای تعیین‌توالی به شرکت تکاپوزیست و از آنجا به شرکت بایونیر کره‌جنوبی فرستاده شد وتعیین‌توالی نمونه‌ها با دستگاه ABI 3730 sequencer انجام گرفت. سپس به کمک نرم‌افزار Chromas وBioEdit این توالی‌ها خوانده و با توالی الگو، توسط نرم‌افزارMEGA5 و clustalw2 مقایسه شدند.

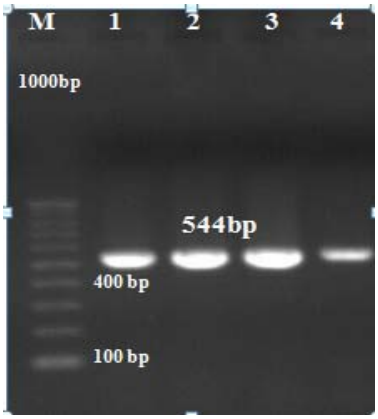
نتایج و بحث

بعد از انجام واکنش PCR، محصول PCR، الکتروفورز شد. با توجه به این‌که تنها ۲ میکرولیتر از محصول پی.سی.آر برای الکتروفورز استفاده شده است، واکنش PCR ژن لپتین باعث تکثیر اختصاصی دو قطعه مشخص با طول‌های۵۶۶ و ۵۴۴ جفت‌بازی شده است. جهت بررسی اندازه‌ی قطعات تکثیر شده از سایز مارکر ۱۰۰bp استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، تکثیر قطعات مورد نظر را تأیید کرد. به دلیل نیاز به محصولات PCR برای توالی‌یابی، باید محصولات PCR بر روی ژل آگارز فاقد هر گونه باند کاذب یا Smear باشند. نتیجه‌ی الکتروفورز محصولات PCR قطعه ۵۶۶ جفت‌بازی و قطعه ۵۴۴ جفت‌بازی به ترتیب در تصویر ۱ و ۲ نشان داده شده است.



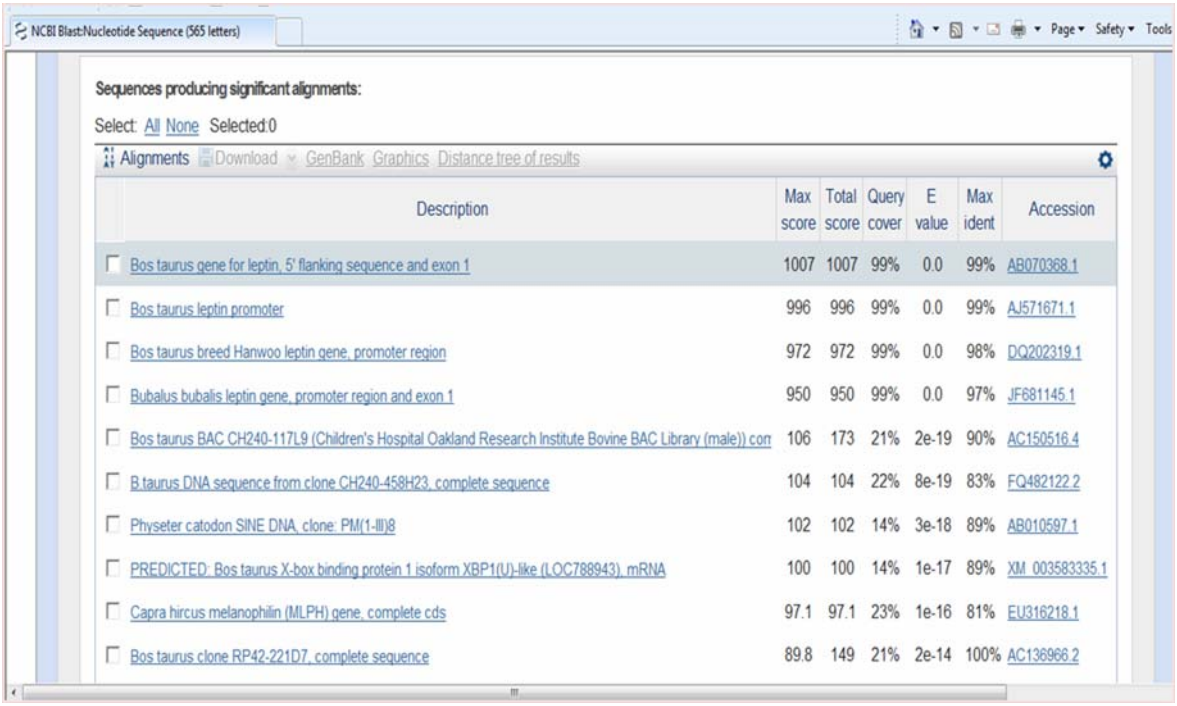
شکل۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز ۱درصد برای چند نمونه از قطعه اول (bp ٥٦٦).
(سایز مارکر 100 bP)

1- Gel Documentation



شکل۲- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل آگارز ۱درصد برای چند نمونه از قطعه دوم (bp ٥٤٤).
(سایز مارکر 100 bp)

در بررسی انجام شده در جایگاه ۲۰۹ در قطعه اول و جایگاه ۵۶ در قطعه دوم تمام نمونه‌ها یک نوع جهش نقطه‌ای یا جایگزینی از نوع Transition مشاهده شد. همچنین در موقعیت ۳۶۳ قطعه اول و موقعیت ۲۱۷ قطعه دوم یک نوع جهش نقطه‌ای از نوع Transversion اتفاق افتاده است. جهش‌های نقطه‌ای در مناطق کدکننده‌ی ژن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند. این نوع جهش باعث تغییر نوع فاکتور رونویسی متصل شونده می‌شود و باعث عدم تولید پروتئین مورد نظر یا تغییر پروتئین از لحاظ ترتیب، تعداد و یا نوع اسیدهای آمینه سازنده آن می‌گردد که این خود باعث تغییر عملکرد پروتئین می‌شود. همچنین نمونه‌های مورد بررسی در موقعیت‌های ۶۶، ۳۴۶ و۳۴۷ قطعه اول و جایگاه ۴۸۵ قطعه دوم یک نوع جهش تغییرقالب از نوع حذف را نشان دادند. در موقعیت ۴۰۴ قطعه ۵۶۶ جفت‌بازی نیز وارد شدن باز G به توالی این قطعه منجر به تغییرقالب می‌شود و اثرات مشخصی را روی قابلیت کدکنندگی ناحیه تنظیمی ژن لپتین می‌گذارد، که در نتیجه‌ی آن همه کدون‌های فرودست جهش پروموتور لپتین با چارچوب خواندن متفاوت از چارچوب مورد استفاده برای ژن بدون جهش رونویسی می‌شوند. متناسب با این تغییر کدون‌ها در پروموتور ژن لپتین، آمینواسیدهای مربوط به هر کدون نیز تغییر می‌کنند. به طور کلی Insertion و تغییرقالب‌های متعاقب آن باعث می‌شوند، که رونویسی فعال ژن برخورد زود یا دیر هنگامی به کدون پایان داشته باشد که منجر به پایان رونویسی و تولید یک پروتئین کوتاه یا بلند می‌شود. پروتئین ساخته شده احتمالاً در تعدادی نمونه‌ها باعث تغییر تدریجی ژنتیکی ژن لپتین می‌شود. تغییرقالب پروموتور ژن لپتین باعث عدم اتصال فاکتورهای رونویسی متصل شونده می‌شود. به طور کلی اثرات جهش های تغییر چارچوب شدیدتر از جانشینی می باشد چون ممکن است ترتیب رمزها را تا انتها دچار تغییر نمایند.



شکل۳- مقایسه میزان شباهت توالی مربوط به نمونه L21 قطعه اول (۵٦٦ bp) در مقایسه با ۱۰ توالی ثبت شده دیگر درپایگاه اطلاعاتی NCBI

تمام نمونه‌ها برای جهش‌های اتفاق افتاده در هر دو قطعه هموزیگوت بودند و هیچ‌گونه حالت هتروزیگوتی مشاهده نشد. توالی و اجزای پروموتور ژن لپتین در این پژوهش نشان داد که جهش‌های رخ داده در جایگاه‌های ذکر شده، در هیچ‌کدام از باکس‌ها و اجزای پروموتور وجود نداشتند و بنابراین هیچ تأثیری بر روی باکس‌ها و اجزای پروموتور ندارند. بعد از بررسی جهش‌ها و اجزای پروموتور ژن لپتین، در پایگاه اطلاعاتی NCBI توالی تک‌تک نمونه‌ها از لحاظ درصد شباهت با توالی‌های ثبت شده مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتیجه بلاست[1] توالی L21 در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه ۶۴ توالی ثبت شده با توالی مورد نظر بود که ۱۰ توالی که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر نشان دادند در تصویر شماره ۳ آورده شده است. در این سایت با استفاده از نرم افزارBLAST می‌توان توالی اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها یا توالی نوکلئوتیدها را در DNA با هم مقایسه کرد و یک توالی را با توالی دیگر یا توالی که در بانک اطلاعاتی وجود دارد، مورد مقایسه قرار داد، همچنین می‌توان توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر دارد شناسایی کرد.

همانطور که درتصویر شماره ۳ مشاهده می‌کنیم بیشترین درصد شباهت مربوط به توالی ۱ و ۲ می‌باشد. در توالی ۱ با شماره ثبت AB070368.1 که اولین توالی ثبت شده ناحیه پروموتور لپتین گونه گاوی می‌باشد، میزان هم پوشانی بین توالی L21 و توالی ذکر شده ۹۹ درصد می‌باشد که در این ۹۹ درصد هم‌پوشانی ۹۹ درصد شباهت وجود دارد. در سایر نمونه‌ها نیز در بالاترین درصدهای هم‌پوشانی ۹۵ تا ۹۹ درصد شباهت وجود داشت. میزان شباهت قطعه تکثیر شده با توالی ثبت شده از لپتین گاو میش نیز میزان شباهت بالایی را نشان داد. همچنین در مورد قطعه دوم BLAST انجام شدکه نتیجه مشابه قطعه اول و بیشترین تشابه، با توالی‌های ۱ و ۲ با شماره ثبت AB070368.1 و AJ571671.1 پیدا شد. لازم به ذکر است که این دو توالی به ترتیب، اولین توالی ثبت شده پروموتور لپتین گاو و دومی مربوط به شماره ثبت توالی می‌باشد که پرایمرهای انتخابی این تحقیق از آن گرفته شده است که این تأکید کننده درصد شباهت بالا و توالی‌یابی درست ناحیه پروموتور ژن لپتین گاوهای نجدی می‌باشد. پروموتور یک بخش حساس است و کوچکترین تغییر در نواحی فعال بخش تنظیمی، باعث برهم زدن کمپلکس رونویسی می‌شود. با توجه به اثر جهش‌ها در نسخه‌برداری و توالی و اجزای پروموتور، جهش‌ها در نقاطی هستند که احتمالاً پروموتور ژن لپتین به صورت فعال می‌باشد. البته با توجه به این‌که برای اولین بار این پژوهش ناحیه پروموتوری ژن لپتین را در گاو نجدی مورد بررسی قرار داده است

1-Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

نمی‌توان مقایسه گسترده‌تری را در این خصوص بیان کرد. برای اطمینان از نتیجه‌گیری باید تعداد نمونه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرد و تمامی جهش‌ها را در تمام مناطق ژنی اعم از اگزون و اینترون مورد بررسی قرار داد و بیان ژن در پروموتور اندازه‌گیری شود. همچنین می‌توان با بررسی‌های دقیق‌تر جهش‌ها و اندازه‌گیری بیان این ژن درک بهتری را در توضیح مکانیسم‌های زیر بنایی تنظیم هورمونی و متابولیکی این ژن داشت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم مهندس صدر مسئول آزمایشگاه مرکزی دانشگاه رامین به جهت حمایت‌های بی شائبه‌شان کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از مدیر گروه محترم علوم دامی جناب آقای دکتر چاجی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- ترانس اوستن، ب. ۱۳۹۰. مقدمه‌ای برکلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA. ترجمه: مجتبی طباطبایی‌یزدی، غلامرضا زرینی، ضرغام سپهری‌زاده عبداله قاسمیان و آرمان همت. انتشارات خانه‌ی زیست‌شناسی.

۲- فالکونر، د. س. ۱۳۷۷. آشنایی با ژنتیک کمی. ترجمه: مصطفی ولی‌زاده و محمد مقدم. انتشارات نشر دانشگاهی تهران.

۳- گله‌داری، ح.، ع. فروغمند، ه. روشنفکر و م. نظری. ۱۳۸۵. مهندسی ژنتیک جامع. انتشارات گل های بهشت.

4- Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wherteim-Van Dillen, and J. Van Der Noordaa. 1989. Rapid and simple method for purification of nucleic acid. J. Clin. Microbiol. 28: 495-503

5- Buchanan, F. C., C. J. Fitzsimmons, A. G. Van Kessel, T. D. Thue, D. C. Winkelman, and S. M. Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genet. Sel. Evol. 34: 105-116.

6- Cunningham, M. J., D. K. Clifton, and R. A. Steiner. 1999. Leptins actions on the reproductive axis: Perspectives and Mechanisms. Biol Reprod. 60: 216-222.

7- Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri, and M. E. Spurlock. 1998. The biology of leptin: a review. J. Anim. Sci.76: 1405–1420

8- Ji, S., G. M. Wills, R. R. Scott, and M. E. Spurlock. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. Anim. Biotechnal. 9: 1-4.

9- Lagonigro, R., P. Wiener, F. Pilla, J. A. Woolliams, and J. L. Williams. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Anim. Genet. 34: 371 – 374.

10- Nobari, K., S. Ghazanfari, M. R. Nassiry, M. Tahmoorespur, and E. Jorjani. 2010. Relationship Between Leptin Gene Polymorphism with Economical Traits in IranianSistani and Brown Swiss Cows. Int. J. Anim. Vet. Adv. 9: 2807-2810

11- Taniguchi, Y., T. Itoh, T. Yamada, and Y. Sasaki. 2002. Genomic Structure and Promoter Analysis of the Bovine Leptin Gene. Biochem. Mol. Biol. Int. 53: 131-135.

12- Zhang, F., M. B. Basinski, J. M. Beals, S. L. Briggs, and L. M. Churgay. 1997. Crystal structure of obese protein Leptin-Eloo. Nature. 387: 206-209.

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