

Studying Expression of Leptin Gene in Different Tissues of Kermani Sheep Using Real Time PCR

Mohammadreza Mohammadabadi

* Professor, Department of Animal Science, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Tel: +989133987534, Email: mrm@uk.ac.ir

Mahboubeh Kord

MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: kord.006@gmail.com

Mahmood Nazari

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal science and Food Technology, Agricultural Science and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran. Email: fat_sa_2005@yahoo.com

Abstract

Objective

Leptin is produced by white adipose tissue and plays an important role in regulation of feed intake, energy balance, fertility and immune functions. Thus, the aim of this research was to study leptin gene expression in adipose tissue, liver, kidney, lung and heart of Kermani sheep.

Materials and methods

Tissue samples obtained from 6 animals and RNA was extracted. Extracted RNA were immediately stored at -80°C. Quality and quantity of RNA were evaluated and cDNA was synthesized and Real Time PCR was performed. PCR Products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and were evaluated different levels of expression in studied different tissues.

Results

Results showed that the leptin gene was expressed in all the tested tissues and the highest level of expression was observed in adipose tissue and liver and the lowest level was detected in heart.

Conclusions

These results may show that leptin plays a particular role in fat metabolism. Further studies are needed to clarify role of leptin in the physiology of fat metabolism and other materials. This would help us to better understand the mechanisms for the known effect of nutritional factors and body fatness on various functions.

Keywords: expression, leptin gene, Kermani sheep, tissue.

Citation: Mohammadabadi MR, Kord M, Nazari M (2017) Studying expression of leptin gene in different tissues of Kermani sheep using Real Time PCR. *Agricultural Biotechnology Journal* 10 (3), 111-123.

Agricultural Biotechnology Journal 10 (3), 111-123.

DOI: 10.22103/jab.2018.2211

Received: August 23, 2018; Accepted: November 3, 2018

© Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time

PCR

محمد رضا محمد آبادی

* نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. تلفن: 09133987534، ایمیل:

mrm@uk.ac.ir

محبوبه کرد

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. ایمیل: kord.006@gmail.com

محمود نظری

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران. ایمیل:

fat_sa_2005@yahoo.com

تاریخ دریافت: 1397/06/10، تاریخ پذیرش: 1397/08/12

چکیده

هدف: لپتین به وسیله بافت چربی سفید تولید می‌شود و نقش مهمی در تنظیم مصرف غذا، تعادل انرژی، باروری و فعالیت‌های ایمنی بازی می‌کند. لذا، هدف از این پژوهش، مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های چربی، کبد، کلیه، شش و قلب در گوسفند کرمانی بود.

مواد و روش‌ها: از بافت‌های شش گوسفند کرمانی نمونه برداری و RNA استخراج شد. RNA استخراج شده در دامی منفی 80 درجه سانتیگراد نگهداری شد. کیفیت و کمیت RNA بررسی و سنتز cDNA انجام شد. واکنش Real Time PCR برای ژن لپتین و بتا‌کتین صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد نیز الکتروفورز شد و سطوح مختلف بیان در بافت‌های ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت‌های بررسی شده بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت چربی و کبد و کمترین سطح بیان در بافت‌های قلب مشاهده شد.

نتیجه گیری: این نتایج می‌تواند نشان دهنده این امر باشد که لپتین در متابولیسم چربی نقش ویژه‌ای دارد. مطالعات بیشتری باید انجام شود تا نقش لپتین در فیزیولوژی ساخت و متابولیسم چربی و مواد دیگر مشخص شود. این امر کمک خواهد کرد تا مکانیسم‌هایی برای شناخت اثر فاکتورهای تغذیه‌ای و چربی‌های بدن در فرآیندهای مختلف درک شوند.

کلمات کلیدی: بافت، بیان، ژن لپتین، گوسفند کرمانی.

لپتین از ریشه یونانی لپتوس (به معنای نازک یا کوچک) مشتق شده، وزنش 16 کیلودالتون است، محصول ژن *obese* (*ob*) است، به وسیله بافت چربی سفید تولید می‌شود و نقش مهمی در تنظیم مصرف غذا، تعادل انرژی، باروری و فعالیت‌های ایمنی بازی می‌کند (Javanmard et al. 2008). این ژن 3 اگزون و 2 اینترون دارد، اما فقط 2 اگزون آن به پروتئین ترجمه می‌شوند (Shojaei et al. 2010). این ژن هم عملکرد اندوکراینی در مغز و در بافت‌های پیرامونی دارد و هم عملکرد اتوکراین/پاراکراین در بافت‌ها دارد (Zieba et al. 2003). مشخص شده که لپتین در ادیپوسیت‌ها (Chilliard et al. 2001)، جنین (Yuen et al. 2002)، سینه (Bartha et al. 2005)، شکمبه (Yonekura et al. 2002)، روده کوچک (Yonekura et al. 2002)، سلول‌های فولیکول تخمدان (Batista et al. 2013) و هیپوفیز (Yonekura et al. 2003) نشخوارکنندگان بیان می‌شود. این ژن منجر به کاهش مصرف غذا، کاهش وزن بدن، کاهش وزن چربی ذخیره شده و افزایش متابولیسم انرژی می‌شود (Javanmard et al. 2008). لپتین می‌تواند برای کنترل تولید مثل ضروری باشد به این صورت که احتمالاً به عنوان نشانه‌ای برای سیستم تولیدمثلی عمل می‌کند، چرا که چربی کافی و متناسب در بدن به لقاح و آبستنی موفق کمک می‌نماید (Liefers and Veerkamp 2002). نشان داده شده که همبستگی مستقیمی بین سطح پلاسمایی لپتین و توده چربی بدن و تعادل انرژی در گاو و گوسفند وجود دارد (Shojaei et al. 2010). ژن لپتین بر عملکرد شیر در گاو شیری و تولیدمثل در گاو گوشتی اثر دارد. بیان این ژن در مراحل فیزیولوژیکی و رشد مختلف در حیوان تغییر می‌کند، بنابراین، از لپتین می‌توان به عنوان نشانگری برای رشد، بازده خوراک و سلامتی حیوان استفاده کرد. از طرفی، گوسفند حیوان مهم تولید کننده گوشت در نواحی گرمسیری، از جمله کشورهای خاورمیانه است و عملکرد اقتصادی آن بستگی به توانایی رشد و تولید مثل مطلوب دارد (Zamani et al. 2015; Mohammadabadi 2017). بیش از 50 میلیون رأس گوسفند در ایران وجود دارد که شامل 27 نژاد و اکوتیپ هستند (Mohammadabadi et al. 2017a; Khodabakhshzadeh et al. 2016). گوسفند کرمانی یکی از مهمترین نژادهای گوسفند بومی ایران است که به خوبی با شرایط محیطی خشن و نامطلوب قسمت جنوب شرقی کشور یعنی آب و هوای گرم و خشک و همچنین مراتع کم و دارای کیفیت پایین این مناطق سازگار شده است. این گوسفند دنبه دار است و اندازه بدن آن متوسط و دارای پشم سفید می‌باشد که برای تولید گوشت و پشم نگهداری می‌شود (Mohammadabadi & Sattayimokhtari, 2013; Vajed Ebrahimi et al. 2016) و در استان کرمان بسیاری از نیازهای مردم عشایر و دامپروران این استان را تأمین می‌کند. لذا، ضروری به نظر می‌رسد به صنعت پرورش و مطالعه ژنتیکی گوسفند به عنوان یکی از منابع تأمین کننده گوشت، پشم، پوست و غیره توجه ویژه‌ای شود و در جهت شناسایی پتانسیل‌ها، استعدادهای نژادهای بومی، رفع موانع و مشکلات بهبود و اصلاح این نژادها اقدامات اصولی و قاطعی صورت گیرد. در موضوع بیان ژن مطالعات اندکی در گوسفند کرمانی انجام شده است (Aminafshar et al. 2014; Jafari Darehdor et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017b)، که در این مطالعات نیز ژن‌های دیگری بررسی شده‌اند. برای نمونه،

Aminafshar et al. (2014) بیان ژن CD44 را در اووسیت‌های بالغ و نابالغ و جنین گوسفند کرمانی مطالعه کردند و نشان دادند که این ژن در همه بافت‌های مورد مطالعه، به جز اووسیت‌های نابالغ بیان می‌شود. در پژوهشی دیگر Jafari Darehdor et al. (2016) بیان ژن CIB4 را در بافت‌های مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد، تخمدان و بیضه در گوسفند کرمانی بررسی کردند و نشان دادند که این ژن فقط در بیضه گوسفند کرمانی بیان می‌شود و در بافت‌های مغز، قلب، شش، طحال، کلیه، کبد و تخمدان بیان نمی‌شود، لذا پیشنهاد دادند که این ژن در باروری قوچ‌ها نقش دارد. لذا هدف این مطالعه بیان ژن لپتین در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از تکنیک Real Time PCR برای اولین بار بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بافتی شامل قلب، شش، کلیه، کبد و بافت چربی (از هر بافت 3 تکرار) از گوسفندان کرمانی (6 نر) ایستگاه تحقیقاتی گوسفند و بز دانشگاه شهید باهنر کرمان در هنگام کشتار در کشتارگاه تهیه شد. بلافاصله پس از کشتار دام قطعات کوچکی از اندام‌های مورد بررسی توسط تیغ استریل جدا و داخل میکروتیوب‌های 1/5 میلی لیتری قرار داده شدند. سپس هر سه عدد از میکروتیوب‌ها پس از بسته بندی داخل یک قطعه فویل آلومینیومی، داخل تانک ازت نگهداری شدند. پس از انجماد سریع، نمونه‌ها به فریزر -80 منتقل شدند. از آنجا که استخراج RNA بایستی در محیط عاری از RNase¹ انجام شود، قبل از انجام استخراج RNA تمامی وسایل توسط آب DEPC² (سیناژن، MR8244) از RNase عاری شدند. استخراج RNA کل از بافت طبق دستورالعمل کیت استخراج One Step RNA Reagent (شرکت بیوبیسیک کانادا) صورت گرفت. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز روی ژل آگارز و UV اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. RNA استخراج شده تا انجام مراحل بعدی آزمایش به فریزر با دمای -80 درجه سانتی گراد منتقل شد.

برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت فرمنتاز استفاده شد (RerertAidTM H Minus First Strand) (cDNA Synthesis Kit #K1631). برای این منظور از مقدار 1µg RNA کل استفاده شد. ممکن است حین استخراج مقادیر متفاوتی RNA از هر بافت به دست آید، لذا جهت یکسان کردن RNA به کار رفته در ساخت cDNA، از مقدار 1 میکروگرم از RNA استفاده شد. برای انجام واکنش‌های RT-PCR باید نمونه RNA عاری از آلودگی به DNA باشد، به این منظور RNA با استفاده از DNaseI تیمار شد. محصول واکنش نسخه برداری معکوس در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شد. آغازگرها (جدول 1) با واسطه شرکت تکاپوزیست (ایران) توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) ساخته شدند (Batista et al. 2013).

¹RNase-free environment

²Di Etyhyl Pyro Carbonate water

جدول 1. توالی آغازگرهای استفاده شده برای بیان ژن لپتین با شماره دسترسی GU944974 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی

Table 1. Oligonucleotide primer pairs used for leptin gene expression in different tissues of Kermani sheep with accession no. GU944974

طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)	توالی آغازگر Primer sequence	نام ژن Gene name
199	5'-GCCTATGTGGGCATCCTTTA-3'	ژن leptin leptin gene
	5'-TGGAACAGGGAGGAAGACTG-3'	آغازگر برگشت Antisense Primer
200	5'-ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT-3'	ژن بتا اکتین Beta actin Gene
	5'-TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC-3'	آغازگر برگشت Antisense Primer

جهت انجام واکنش، 4/7 میکرولیتر آب دو بار تقطیر، 7/5 میکرولیتر SYBRPermixon Taq II و 0/3 میکرولیتر ROX به همراه 0/5 میکرولیتر آغازگر رفت، 0/5 میکرولیتر آغازگر برگشت و مقدار 1/5 میکرولیتر cDNA الگو در میکروتیوپ 0/2 با هم مخلوط شدند. میکروتیوپ‌ها اسپین شدند تا همه مواد در یک نقطه جمع شوند و سپس با شرایط زیر در دستگاه روتور ژن 3000 قرار داده شد. برای ژن لپتین و بتا اکتین، واسرشت اولیه 95 درجه سانتیگراد برای 5 دقیقه، واسرشت ثانویه 95 درجه سانتیگراد 15 ثانیه، اتصال 60 درجه سانتیگراد 30 ثانیه، 40 سیکل تکرار مراحل 2-4 و گسترش در دمای 72 درجه سانتی گراد 45 ثانیه انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از Real Time PCR از روش Pfaffl et al. (2002) استفاده شد. در این روش برای بررسی درصد بازده واکنش PCR ابتدا نمودار استاندارد برای ژن‌های لپتین و بتا اکتین ترسیم شد. برای ترسیم نمودار استاندارد، از غلظت‌های مختلف cDNA (1، 10/1، 100/1، 1000/1) برای PCR استفاده شد و بازده واکنش PCR برای ژن‌های لپتین و بتا اکتین به ترتیب 98 و 99 درصد برآورد شد. در ادامه روی نمونه‌های تیمار شده و نرمال واکنش‌های PCR انجام شد و نتایج حاصله برای بررسی میزان نسبی تکثیر بیان با فرمول Pfaffl et al. (2002) محاسبه گردید.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CT}_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

در این رابطه E_{target} و E_{ref} به ترتیب بازدهی PCR ژن مورد مطالعه و ژن مرجع یا کنترل داخلی می‌باشند. ΔCt حاصل تفریق Ct^1 (حد آستانه) ژن لپتین از Ct ژن بتاکتین می‌باشد.

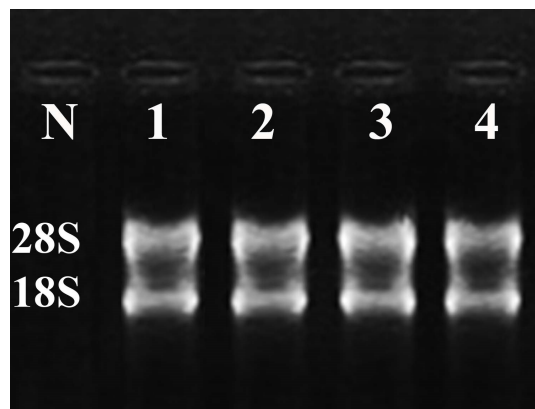
نتایج و بحث

نتایج حاصل از اعداد جذب نمونه‌های استخراج شده در طول موج A260/A280 بین 1/9-1/8 بود که بیانگر کیفیت مناسب و مطلوب RNAهای استخراج شده بود و وجود دو باند 18S و 28S در RNA نشان دهنده سالم بودن RNA و عدم وجود باند اضافی نشان دهنده خلوص آن بود (شکل 1). برای یافتن دمای اتصال مناسب آغازگرهای ژن هدف (لپتین) و کنترل (بتاکتین)، واکنش PCR با شیب دمایی² انجام شد و مناسب ترین دما برای اتصال آغازگرهای اختصاصی (دمای 60°C) انتخاب گردید.

نتایج منحنی‌های Real Time PCR و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز (2 درصد) نشان داد که ژن لپتین در بافت‌های مختلف تکثیر شده است. مشاهده تک باند در محدوده 199bp برای ژن لپتین در بافت‌های مختلف (شکل 2) و وجود باند در محدوده 200bp برای ژن بتاکتین در همه نمونه‌ها (شکل 3)، بیانگر صحت انجام آزمایش و تکثیر قطعه مورد نظر بود. طی انجام واکنش، دستگاه Real Time PCR میزان تغییرات نور فلورسنت در هر سیکل را به صورت منحنی تکثیر نشان می‌دهد. برای منحنی تکثیر همه نمونه‌ها، یک حد آستانه در فاز نمایی تعریف شد که نشان دهنده سیکلی می‌باشد که در آن شدت نور فلورسنت ساطع شده از تکثیر واکنش به حد آستانه رسیده است. منحنی ذوب ژن لپتین و بتاکتین، اختصاصی بودن و دمای T_m محصول (دمایی است که در آن نیمی از محصول از حالت دو رشته‌ای خارج شده است) واکنش Real Time PCR این دو ژن را نشان می‌دهد (شکل 4). در پژوهش حاضر بیان ژن لپتین در شش اندام مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این ژن در تمامی بافت‌های بررسی شده (بافت چربی، جگر، کلیه، شش و قلب) بیان شده است و بیشترین سطح بیان در بافت چربی و کبد و کمترین سطح بیان در بافت قلب مشاهده شد. در پژوهشی Bonnet et al. (2002) توانایی غدد پستانی گوسفند برای سنتز لپتین در طی آبستنی و شیردهی را مورد مطالعه قرار دادند. آنها بیان ژن را در غدد پستانی در روزهای مختلف آبستنی و شیردهی بررسی کردند. بیان آن در آغاز و پایان آبستنی بالا و در اواسط آبستنی و در طی شیردهی پایین بود.

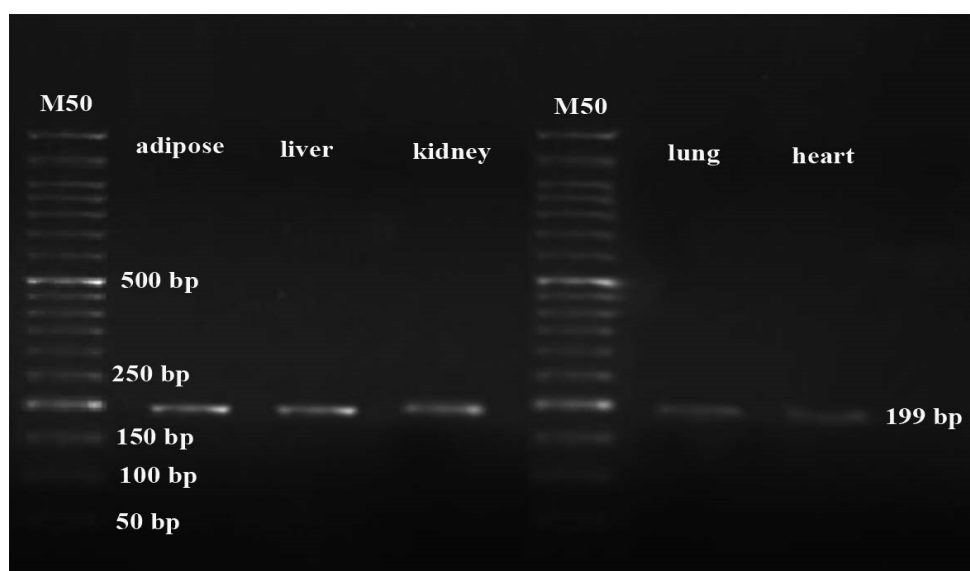
¹ Threshold cycle

⁶Gradient PCR



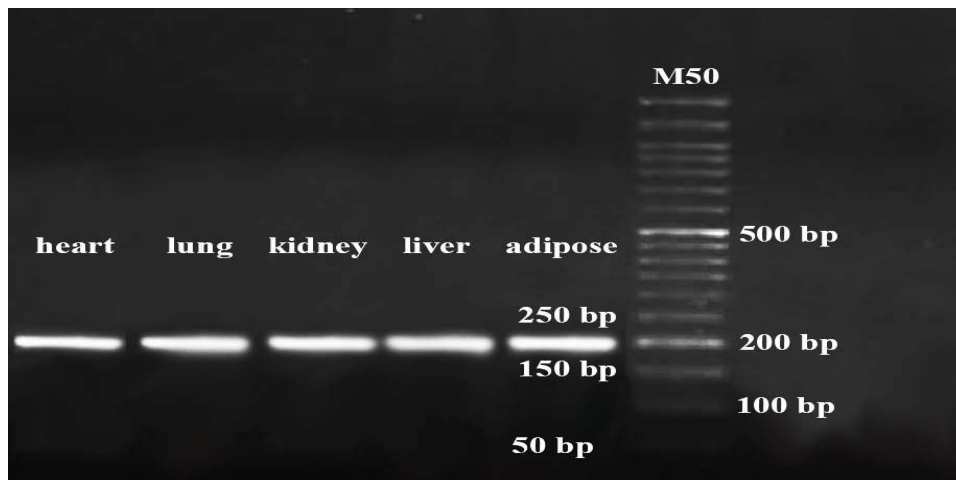
شکل 1. نمونه هایی از کیفیت RNA استخراج شده از چند بافت گوسفند کرمانی روی ژل آگارز. 1، 2، 3 و 4 نمونه ها و N کنترل منفی

Figure 1. Quality of RNA extracted from some tissues of Kermani sheep on agarose gel. 1, 2, 3 and 4 present samples and N is negative control



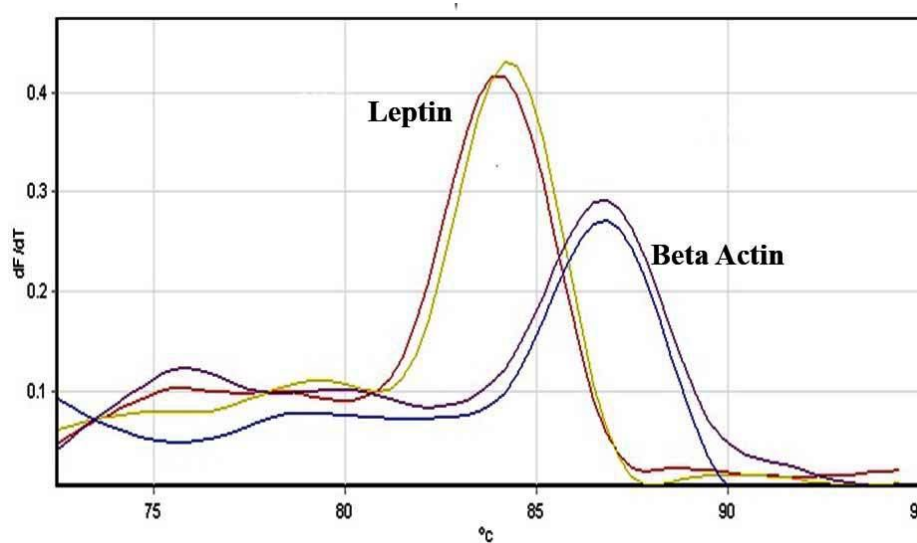
شکل 2. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای لپتین در گوسفند کرمانی روی ژل آگارز. M50؛ نشانگر اندازه. چاهک های 2، 3، 4، 6 و 7 به ترتیب مربوط به بافت چربی، جگر، کلیه، شش و قلب هستند

Figure 2. Electrophoresis of studied samples using leptin primers in Kermani sheep on agarose gel. M50; size marker. Lanes 2, 3, 4, 6 and 7 present adipose tissue, liver, kidney, lung and heart, respectively



شکل 3. الکتروفورز نمونه های مورد بررسی با استفاده از پرایمرهای بتا اکتین در گوسفند کرمانی روی ژل آگارز. M50؛ نشانگر اندازه. چاهک های 1 تا 5 به ترتیب مربوط به بافت چربی، جگر، کلیه، شش و قلب هستند. چاهک 7 کنترل منفی

Figure 3. Electrophoresis of studied samples using beta actin primers in Kermani sheep on agarose gel. M50; size marker. Lanes 1-5 present adipose tissue, liver, kidney, lung and heart, respectively. Lane 7 is negative control



شکل 4. منحنی ذوب محصول ژن لپتین و بتا اکتین حاصل از واکنش Real Time PCR برای گوسفند کرمانی

Figure 4. Melting curve of leptin and beta actin gene production using Real Time PCR for Kermani sheep

بیان ژن لپتین در گوسفند اولین بار توسط Dyer et al. (1997) با استفاده از تکنیک نورترن بلات مطالعه شد پس از آن Bocquier et al. (1998) به وسیله ارزیابی پروتئین ریبونوکلئاز و RT-PCR بیان آن را در گوسفند بررسی کردند. پژوهشگران نشان داده‌اند که بیان ژن لپتین در زن و مرد با استفاده از مقایسات دو متغیره تفاوتی ندارد (Schoof et al. 2004)، اما با آنالیز رگرسیون چند متغیره نشان دادند که جنس می‌تواند به عنوان یک فاکتور مستقل، که سطوح لپتین پلاسما را تحت تأثیر قرار می‌دهد در نظر گرفته شود، چرا که سطوح لپتین پلاسما در زنان بالاتر از مردان است (Ostlund et al. 1996). این امر دو دلیل می‌تواند داشته باشد، اول این که تستوسترون مهار تولید لپتین را القا می‌کند و دوم این است که توزیع رسوب و ذخیره چربی در زنان و مردان متفاوت است. آنها همچنین نشان دادند که چربی زیر پوستی نسبت به چربی شکمی برای ساخت لپتین ظرفیت بالاتری دارد که این امر می‌تواند باعث شود سطوح پلاسمایی لپتین در زنان بالاتر باشد.

پژوهش حاضر برای اولین بار بیان ژن لپتین را در بافت‌های مختلف گوسفند مطالعه کرده و نشان داد که بیان آن در بافت چربی و کبد بیشترین و در قلب کمترین است. این نتایج می‌تواند تایید کننده این امر باشد که لپتین در متابولیسم چربی نقش ویژه‌ای دارد. مطالعات بیشتری باید انجام شود تا نقش لپتین در فیزیولوژی ساخت و متابولیسم چربی و مواد دیگر مشخص شود. این امر کمک خواهد کرد تا مکانیسم‌هایی برای شناخت اثر فاکتورهای تغذیه‌ای و چربی‌های بدن در فرآیندهای مختلف درک شود.

منابع

جعفری دره در امیر حسین، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی، ریاحی مدوار علی (1395) بررسی بیان ژن CIB4 در بافت‌های مختلف گوسفند کرمانی با استفاده از Real Time qPCR. مجله پژوهش در نشخوارکنندگان 4(4)، 132-119.

واجد ابراهیمی محمدتقی، محمدآبادی محمدرضا، اسمعیلی زاده کشکوئیه علی (1394) بررسی تنوع ژنتیکی پنج جمعیت گوسفند ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی 7 (4)، 158-143.

References

- Aminafshar M, Bahrapour V, Baghizadeh A, Emanjomah N, Mohammadabadi MR (2014) CD44 gene expression in mature, immature oocytes and fetal Kermani, Baluchi sheep and Rayeni and Tali goats. J cell Anim Biol 8, 156-160.
- Bartha T, Sayed Ahmed A, Rudas P (2005) Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. Domestic Anim Endocrinol 29, 193-202.
- Batista AM, Silva DMF, Rêgo MJB, Silva FLM, Silva ECB, Beltrão EIC, Gomes Filho MA, Wischral A, Guerra MMP (2013) The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. Anim Reprod Sci 141, 142-147.

- Bocquier F, Bonnet M, Faulconnier Y, Guerre-Millo M, Martin P (1998) Effect of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Reprod Nutr Dev* 38, 489-498.
- Bonnet M, Gourdou I, Leroux C, Chilliard Y, Djiane J (2002) Leptin expression in the ovine mammary gland: Putative sequential involvement of adipose, epithelial, and myoepithelial cells during pregnancy and lactation. *J Anim Sci* 80, 723–728.
- Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Fauconnier Y, Leroux C (2001) Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol* 21, 271-295.
- Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH (1997) cDNA cloning and tissue specific gene expression of ovine leptin, NPY-Y1 receptor and NPY-Y2 receptor. *Domest Anim Endocrinol* 14, 295-303.
- Jafari Darehdor AH, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Riahi Madvar A (2016) Investigating expression of CIB4 gene in different tissues of Kermani Sheep using Real Time qPCR. *J Ruminant Res* 4, 119-132 (in Persian).
- Javanmard A, Mohammadabadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008) Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (*Iranian Bos taurus*). *Russ J Genet* 44, 495-497.
- Khodabakhshzadeh R, Mohammadabadi MR, Esmailizadeh AK, Moradi Shahrehabak H, Bordbar F, Ansari Namin S (2016) Identification of point mutations in exon 2 of GDF9 gene in Kermani sheep. *Polish J Vet Sci* 19, 281–289.
- Liefers SC, Veerkamp RF (2002) Association between leptin gene polymorphism and production, live weight energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. *J Dairy Sci* 85, 1633–1638.
- Mohammadabadi MR (2017). Inter-Simple Sequence Repeat loci Associations with Predicted Breeding Values of Body Weight in Kermani Sheep. *Genet in the 3rd Millennium* 14, 4383-4390.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017a) Using Inter Simple Sequence Repeat Multi-Loci Markers for Studying Genetic Diversity in Kermani Sheep. *J Res Dev* 5, 154.
- Mohammadabadi MR, Jafari AHD, Bordbar F (2017b) Molecular analysis of CIB4 gene and protein in Kermani sheep. *Braz J Med Biol Res* 50, e6177.
- Mohammadabadi MR, Sattayimokhtari R (2013) Estimation of (co) variance components of ewe productivity traits in Kermani sheep. *Slovak J Anim Sci* 46, 45-51.

- Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R (1996) Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 3909–3913.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30: e36.
- Schoof E, Stuppy A, Harig F, Carbon R, Horbach T, Stohr W, Rascher W, Dotsch J (2004) Comparison of leptin gene expression in different adipose tissues in children and adults. *Eur J Endocrinol* 150, 579–584.
- Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A (2010) Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. *J Cell Mol Res* 2, 67-73.
- Vajed Ebrahimi MT, Mohammad Abadi MR, Esmailizadeh AK (2016) Analysis of genetic diversity in five Iranian sheep population using microsatellites markers. *Agric Biotechnol J* 7, 143-158.
- Yonekura S, Kitade K, Furukawa G, Takahashi K, Katsumata N (2002) Effects of aging and weaning on mRNA expression of leptin and CCK receptors in the calf rumen and abomasum. *Domest Anim Endocrinol* 22, 25-35.
- Yonekura S, Senoo T, Kobayashi Y, Yonezawa T, Katoh K (2003) Effect of acetate and butyrate on the expression of leptin and short form leptin receptor in bovine and rat anterior pituitary cells. *Gen comp endocrinol* 133, 165-172.
- Yuen BS, Owens PC, McFarlane JR, Symonds ME, Edwards LJ (2002) Circulating leptin concentration are positively related to leptin messenger RNA expression in adipose tissue of fetal sheep in pregnant ewe fed at or below maintenance requirements during late gestation. *Biol Reprod* 67, 911-916.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. *Small Ruminant Res* 132, 123–127.
- Zieba AD, Amstalden M, Morton S, Gallino JL, Edwards JF (2003) Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status. *J Endocrinol* 178, 83-89.