مجله
تحقیقات دام و طیور
جلد۲- شماره ۳- پائیز ۱۳۹۲- ص ص۴۳-۴۸

تاریخچه مقاله:
دریافت:۹۱/۱۲/۲۶
پذیرش: ۹۳/۰۱/۱۷

مطالعه چند شکلی بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین و شناسایی SNPها در این جایگاه در بز نژاد مهابادی با روش PCR- SSCP

زهرا عزیزی[۱*]، حسین مرادی شهر بابک[۲]، محمد مرادی شهر بابک[۳] و ابوالفضل زالی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشگاه تبریز

۳،۲ و۴- به ترتیب استادیار، استاد و دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم زراعی و دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

چکیده

لپتین پروتئینی۱۶ کیلودالتونی است که غالباً از بافت چربی سفید و اندکی در اپیتلیوم دستگاه گوارش و جفت ترشح شده و نقش مهمی در کنترل وزن بدن، خوراک مصرفی، ایمنی، تولید شیر و تولید مثل دارد و محصول ژن چاقی (obs) است که توسط ژن بزرگی به نام ژن Ob کد می‌شود. هدف از این پژوهش، مطالعه چند شکلی بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین با روشPCR- SSCP در بز نژاد مهابادی بود. برای این منظور از تعداد ۱۵۰ رأس از بزها و بزغاله‌های مهابادی موجود در مزرعه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی دانشگاه تهران (کرج) به صورت تصادفی خونگیری به عمل آمد. استخراج DNA با استفاده از روش نمکی و تعیین کمیت و کیفیت آن توسط اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۱٪ انجام شد. تکثیر قطعه اختصاصی ۲۷۱ جفت بازی از بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و برای بررسی چند شکلی این بخش از روش چندشکلی ساختاری رشته‌های منفرد (SSCP) استفاده شد. پس از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ با ولتاژ ۳۰۰ ولت به مدت ۲۱ ساعت، رنگ‌آمیزی ژل‌ها با روش نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور انجام شد. در مجموع همه الگوهای به دست آمده شبیه به هم بود و این جایگاه برای افراد مونومورف بود. برای این جایگاه، هفت جهش مشاهده شد که قبلاً در بز گزارش و در NCBI ثبت شده بود.

کلمات کلیدی: لپتین- چند شکلی-SNP - PCR-SSCP – بز مهابادی

نگارنده پاسخگو: زهرا عزیزی. آدرس: تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی- گروه علوم دامی

پست الکترونیک: Zahra_azizi@yahoo.com

مقدمه

روش‌های نوین مولکولی بر تجزیه و تحلیل ژنوم متمرکز است، تا امکانات جدیدی را برای ارزیابی صفات مهم اقتصادی در حیوانات مزرعه‌ای فراهم آورد. از جمله صفات مهم اقتصادی در دام‌های مزرعه‌ای که جزء صفات کمی محسوب می‌شوند می‌توان به تولید شیر و گوشت اشاره کرد. این صفات توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند، اما تعدادی ژن با اثرات بزرگ نیز بر عملکرد آنها مؤثر هستند. شناخت این ژن‌ها و تعیین توالی و موتاسیون‌هایی که رخ می‌دهد و ممکن است عملکرد حیوانات و همچنین ارزش اصلاحی آن‌ها را تغییر دهد، امری ضروری به نظر می‌رسد (مادجا و همکاران، ۲۰۰۴). بنابراین، تعیین چندشکلیِ ژن‌های کاندیدای مؤثر بر صفات تولیدی و شناسایی آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مطلوب در محل ژن‌های کاندیدا برای صفات مورد نظر می‌تواند زمینه را برای انتخاب به کمک نشانگر (MAS) فراهم کند (ماراکاریجو و همکاران، ۲۰۰۸).

گوشت بز به عنوان گوشت بدون چربی با کیفیت مطلوب، انتخاب ایده‌آل برای سلامتی مصرف کننده است. اسید چرب اشباع و کلسترول آن در مقایسه با گوشت گاو، بره و خوک در سطح پایینی می‌باشد (USDA, 2001). به علت ارتباط بین سطوح بالای چربیهای اشباع شده حیوانی در رژیم غذایی و بیماری‌های قلبی- عروقی، بالا رفتن کلسترول خون، انسداد شرایین، بالا رفتن فشار خون و چاقی مفرط و با توجه به بالا بودن اسید چرب غیر اشباع و پایین بودن اسیدهای چرب اشباع گوشت بز، باعث گردیده است که به عنوان گوشت سالم تلقی گردد (بنسکالیوا و همکاران، ۲۰۰۰). بز مهابادی دارای رنگ بدن سفید با لکه‌های سیاه می‌باشند و تولید شیر این نژاد تقریباً ۱/۶ کیلوگرم می‌باشد. همچنین ۵۰ درصد چند قلوزایی در این نژاد رخ می‌دهد. لپتین هورمونی است که غالباً از بافت چربی سفید و اندکی در اپیتلیوم دستگاه گوارشی و جفت ترشح شده و نقش مهمی در کنترل وزن بدن، خوراک مصرفی، ایمنی، تولید شیر و تولید مثل دارد. پروتئین لپتین شامل ۱۶۷اسید آمینه است و ۱۶ کیلو دالتون وزن دارد و محصول ژن چاقی (obest) است که توسط ژن بزرگی به نام ژن ob کد می‌شود (هاوسنچت و همکاران، ۱۹۹۸). ژن لپتین شامل ۳ اگزون و دو اینترون است که اگزون اول در لپتین ترجمه نمی‌شود. این ژن در سال ۱۹۹۴ توسط ژانگ وهمکاران کشف گردید. ژن لپتین به عنوان یک QTL مورد توجه بوده و بر روی صفات اقتصادی از جمله تولید شیر (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۲؛ مادجا و همکاران، ۲۰۰۴)، گوشت (بوچانان و همکاران، ۲۰۰۲) و تولید مثل (لیفرز و همکاران، ۲۰۰۳) تأثیرگذار است. لیندرسون و همکاران (۱۹۹۸) یک QTL مؤثر بر صفات تولید شیر را در گاو روی کروموزوم ۴ در ناحیه‌ای که ژن لپتین و آمیلاز-۱ واقع شده است، گزارش نمودند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی چند شکلی بخشی از اگزون ۲ و اینترون ژن لپتین با ۲۷۱ جفت باز به روش PCR-SSCP و توالی یابی است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

ابتدا خونگیری از تعداد ۱۵۰ بز و بزغاله نژاد مهابادی واقع در مزرعه آموزشی و پژوهشی گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج با استفاده از ونوجکت‌های حاوی EDTA، از رگ وداجی گردن بز انجام شد. نمونه‌ها خون تا زمان استفاده برای استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از ۲-۱/۵ میلی‌لیتر خون کامل به روش استخراج نمکی انجام گرفت (ایرانپور و اسماعیل زاده، ۲۰۱۰) و برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از روش اسپکتروفتومتری (دستگاه نانودراپ) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (شکل ۱ و ۲).

تکثیر قطعه ۲۷۱ جفت بازی بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر قطعه ۲۷۱ جفت‌بازی بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین انجام گرفت. آغازگرهای اختصاصی رفت 5'- CGCAAGGTCCAGGATGACACC-3' و برگشت 5'- GTCTGGGAGGGAGGAGAGTGA -3' که جهت تکثیر جایگاه ژن لپتین مورد استفاده قرار گرفتند، توسط بوچر و همکاران (۲۰۰۶) طراحی و معرفی و توسط شرکت متابیون سنتز شدند. جهت بهینه سازی واکنش PCR برنامه‌های حرارتی زیر با ۳۵ سیکل ایده‌آل ترین شرایط برای تکثیر بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین تشخیص داده شد: دمای واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه، دمای واسرشت ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۹ درجه سانتیگراد به مدت۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگرها، دمای بسط ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه برای بسط قطعه مورد نظر و در نهایت دمای بسط نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به

مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد که در دستگاه ترموسایکلر مدل BIOER شرکت TECHNE ساخت انگلیس انجام شد.

واکنش PCR جهت تکثیر یک قطعه ۲۷۱ جفت بازی از بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین، بعد از بهینه‌سازی غلظت مواد در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۰/۷ میکرولیتر از هر آغازگر 10 pm/µL، ۱/۵ میکرولیتر از هر 10 mM /µL dNTP، ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ از هر 25 mM/µL، ۰/۳میکرولیتر از آنزیم تک‌پلیمراز 5 unit/µL و ۱۶/۶ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد.

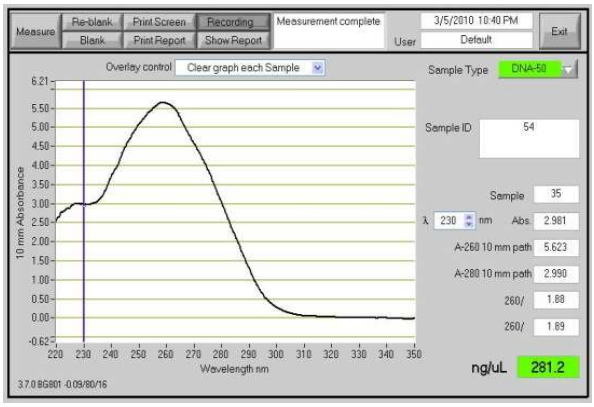
پس از انجام واکنش PCR برای اطمینان از صحت تکثیر و تعیین میزان DNA تکثیر شده، الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد.

تعیین ژنوتیپ محصولات PCR به روش چندشکلی ساختاری رشته‌های منفرد (SSCP)

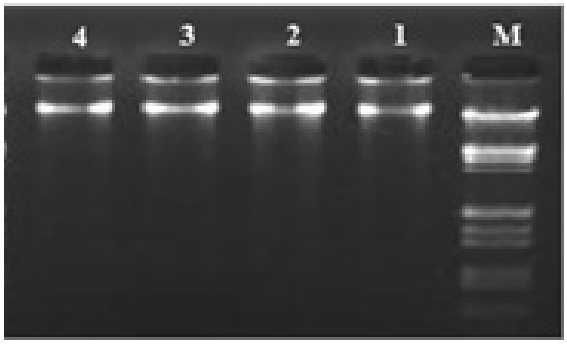
به منظور بررسی چگونگی چند شکلی‌های این جایگاه از روش چند شکلی فضایی تک رشته‌ای DNA (SSCP) در این قطعه استفاده شد که بر پایه‌ی میزان حرکت تک‌رشته‌های DNA بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید استوار است. بدین منظور ۱۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخصوص SSCP (شامل فرمامید ۹۹٪، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید[1] ۶ مولار، برموفنول بلو و زایلن سیانول ۱۰٪) با ۵ یا ۶ میکرولیتر محصول PCR مخلوط و ورتکس شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا رشته‌های DNA واسرشت شوند. نمونه‌های واسرشت شده به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند تا از اتصال مجدد رشته‌های مکمل جلوگیری شود. برای مشاهده الگوهای باندی از تانک الکتروفورز عمودی شرکت Bio Rad با صفحات شیشه‌ای به ابعاد ۰/۱ × ۲۰ × ۱۸ سانتی‌متر و ژل اکریل‌آمید ۱۲٪ استفاده شد. به این ترتیب که مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاریِ مخصوص SSCP درون چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. سپس الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۲۱ ساعت و با اختلاف پتانسیل ۳۰۰ ولت در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با بافر TBE (۰/۵X) انجام گرفت. درنهایت رنگ‌آمیزی ژل جهت مشاهده الگوهای باندی به روش نیترات نقره طی سه مرحله تثبیت، لکه‌گذاری و ظهور انجام شد و رنگ آمیزی تا ظهور باندها ادامه یافت (بسام و همکاران ۱۹۹۱). بعد از مشخص شدن الگوها، سه نمونه از این الگو برای توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

نتایج و بحث

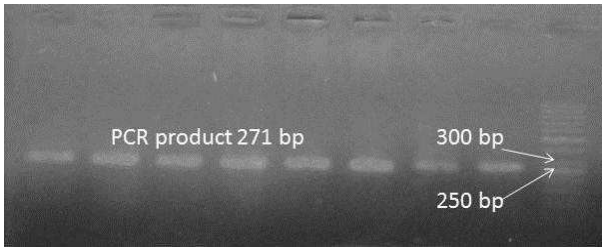
پس از استخراج DNA و اطمینان از کیفیت و کمیت آن که به روش اسپکتروفتومتر (شکل ۱) و ژل آگارز ۱٪ (شکل ۲) مشخص شد و قطعه مورد نظر به کمک واکنش‌های پلی مراز تکثیر یافت و محصول PCR روی ژل آگارز برده شد. باندهای واضحی که در شکل زیر نشان داده شده است بیانگر تکثیر خوب محصول PCR بوده و نشانگر وزن مولکولی استفاده شده در کنار محصولات PCR صحت تکثیر قطعه bp ۲۷۱ را تأیید می‌کند (شکل ۳).



شکل ۱- نانودراپ DNAهای استخراج شده



شکل ۲- الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز۱٪



شکل ۳- الکتروفورز قطعه ۲۷۱ جفت بازی حاصل از تکثیر بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین بر روی ژل آگارز ۲٪. نشانگر اندازه ۵۰ جفت بازی برای تعیین اندازه قطعات استفاده شد.

2. EDTA

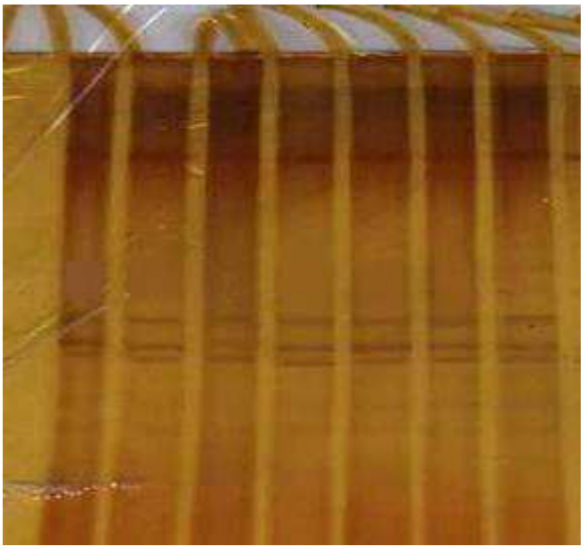
SSCP بخشی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین

محصولات ۲۷۱ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مورد آزمون SSCP واقع شدند. پس از بررسی ژل‌ها مشاهده شد که الگوهای باندی در همه نمونه‌ها یکسان و این جایگاه مونومورف می‌باشد. بدین معنی که بین نمونه‌ها از نظر الگوهای باندی در قسمتی از اگزون و اینترون ۲ ژن لپتین در توالی ذکر شده تفاوتی مشاهده نشد (شکل ۴). درحالی که برزه کار و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای بر روی سه نژاد گوسفند در این جایگاه دو الگو شناسایی کردند (برزه کار و همکاران، ۲۰۰۹). قطعه ۲۷۱ جفت بازی ژن لپتین با توالی GenBank accession no.EU 605296 معرفی شده در NCBI که مربوط به گوسفند می‌باشد، مقایسه شد (گرگوریو، ۲۰۰۱۱). همچنین این توالی با توالی‌های موجود برای بز و گاو مقایسه گردید (شکل ۵). برای اگزون و اینترون۲ نیز هفت جهش مشخص شد که این جهش‌ها نیز قبلاً در بز گزارش شده بود (مایترا و همکاران، ۲۰۱۲) (جدول ۱). در مطالعه‌ای که توسط بوچر و همکاران (۲۰۰۶) روی پلی مورفیسم ژن لپتین و ارتباط آن با رشد ماهیچه و کیفیت گوشت گوسفند صورت گرفت، سه SNP در ژن لپتین گوسفندی مشاهده شد که شامل دو SNP در اینترون دو و یک SNP در 3`UTR بود. طهمورث پور و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی چند شکلی ژن لپتین با استفاده از PCR-SSCP در گوسفندان بلوچی برای اگزون ۳، سه الگوی باندی گزارش کردند.

در بررسی شجاعی و همکاران (۲۰۱۰) روی گوسفند کرمانی که قطعه ۲۷۵ جفت بازی از اگزون ۳ ژن لپتین را تکثیر کردند، ۱۰ژنوتیپ مشاهده شد که ژنوتیپ‌های A/B/E, A/C, A/B/C/F و A/B/C/F وزن بدن بیشتری در سنین ۳، ۶، ۹ و ۱۲ ماهگی داشتند. در بررسی سینگ و روت (۲۰۰۹) روی بزهای هندی در ناحیه اگزون دو، پنج هاپلوتیپ و در ناحیه اینترون دو، شش هاپلوتیپ مشاهده شد.

جوانمرد و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی چند شکلی ژن لپتین با استفاده از PCR-RFLP در گاوهای سرابی برای اینترون ۲، سه الگوی باندی گزارش کردند.

در بررسی که توسط شنکل و همکاران (۲۰۰۵) روی گاو گوشتی انجام گرفت پنج SNP شناسایی شد که دو SNP در اگزون دو با چربی مرتبط بود. بوچانان و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که این جایگاه (اگزون دو) با مقدار چربی بدن در گاوهای گوشتی در ارتباط است.در تحقیقی دیگر روی گاوهای آمیخته (برانگوس و براهمان) دو SNP مشاهده شدکه یکی از این SNPها در ناحیه پروموتر و دیگری در اگزون۲ بررسی شد که SNP1 تأثیر معنی‌داری روی ناحیه عضله چشمی داشت و SNP2 اثر معنی داری روی ضخامت چربی پشت و بازده لاشه داشت، که هر دو SNP برخی از صفات گوشت را تحت تأثیر قرار دادند (سیلوا و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به نرخ بالای چندشکلی این جایگاه ژنی در گوسفند و گاو و ارتباط آن با مصرف خوراک، کنترل وزن و ذخیره چربی و ... این نکته حائز اهمیت است که مقایسات بین نژادی هم انجام شده و تفاوت‌ها مورد بررسی قرار گیرند.



شکل ۴- الگوی باندی دربخشی از اینترون واگزون ۲ ژن لپتین جمعیت بزهای نژاد مهابادی

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه همه الگوهای به دست آمده شبیه به هم بود و این جایگاه برای افراد مونومورف بود. برای این جایگاه، هفت جهش مشاهده شد که قبلاً در بز گزارش و در NCBI ثبت شده بود. با توجه به نرخ بالای چندشکلی این جایگاه ژنی در گوسفند و گاو و ارتباط آن با مصرف خوراک، کنترل وزن و ذخیره چربی و ... این نکته حائز اهمیت است که علاوه بر مقایسات بین نژادی و بررسی تفاوت‌ها، در تحقیقات بعدی با اندازه نمونه های بزرگتر مورد بررسی قرار گیرد.

جدول ۱- SNPهای موجود در مطالعه حاضر و مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی

ژنوتیپ		
مطالعه حاضر	Genbank: HE605296.1 Di Gregorio(2011)	موقعیت نوکلئوتیدی NCBI
T	A	۱۴۰۲
A	G	۱۴۰۵
G	A	۱۴۱۶
A	G	۱۴۵۴
T	C	۱۴۹۷
T	C	۱۵۰۹
G	A	۱۵۱۹

شکل ۵- همردیفی توالی‌های مربوط به NCBI، توالی مطالعه حاضر (بز مهابادی، توالی مربوط به بز، گوسفند و گاو)

منابع

طهمورث‌پور، م.، نصیری، م ر.، انصاری، م.، هروی موسوی، ع.، وفای واله، م. و افتخار شاهرودی، ف.،. ۱۳۸۷. بررسی چند شکلی ژن لپتین و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه در گوسفند بلوچی. سومین کنگره علوم دامی کشور. دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

Banskalieva, V., Sahlu, T. and Goetsch A.L. 2000. Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. Small Ruminant Research 37(3): 255-268.

Barzehkar, R., Salehi A. and Mahjoubi, F. 2009. Polymorphisms of the ovine leptin gene and its association with growth and carcass traits in three Iranian sheep breeds. Volume 7, Issue 4, Pages 241-246.

Bassam, BJ, Anolles C.G. and Gresshoff, P.A .1991. Fast and sensitive silver staining of DNA inpolyacrylamid gels. Analytical Biochemistry 19: 680-830.

Boucher, D., Palin M.F., Castonguay F., Gariépy, C. and Pothier F .2006. Detection of polymorphisms in the ovine leptin LEP gene: Association of a single nucleotide polymorphism with muscle growth and meat quality traits. Canadian Journal of Animal Science 86:31-35. http://pubs.aic.ca/doi/pdf/10.4141/A05-052.

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

Di Gregorio,P., Rando,A. Laviano,L. 2011. sequence of the ovine ob gene. Unpublished.

Haegeman, A., Van Zeveren, A. and Peelman, L.J. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. Animal Genetics 31(1): 79-79.

Houseknecht, K. L., C. A. Baile, Matteri R.L. and Spurlock M.E. 1998. The biology of leptin: A review. Journal of Animal Science 76(5): 1405-1420.

Iranpur,V. M. and Esmailizadeh, A.K. 2010. Rapid Extraction of High Quality DNA from Whole Blood Stored at 4ºC for Long Period.

Javanmard, A. Mohammadabadi, MR. Zarrigabayi, GE. Gharahedaghi, AA. Nassiry, MR. Javadmansh, A. and Asadzadeh, N., 2008. Polymorphism within the intron region of the bovine Leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus). Russian J Genet 44(4): 1–4.

Liefers, S.C., Veerkamp R. F., and Te. Pas. 2003. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cattle. Journal of Dairy Science. 86(3):800-806.

Liendersoon, M.L., Anderson D. and Konine, J. 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome. Journal of Dairy Science. 81: 1454-1461.

Madeja, Z., T. Adamowicz, Chmurzynska A., Jankowski T., Melonek J., Switonski M. and Strabel, T.2004. Short communication: Effect of leptin gene polymorphisms on breeding value for milk production traits. Journal of Dairy Science 87(11): 3925-3927.

Maitra, A.,Sharma,R.,Pandey,A.K.,Singh,L.V. and Mishra, B.P. 2012.direct submition.Submitted Core Lab,National Bureau of Animal Genetic Resourses,G.T.Road, Baldi Bye Pass, Karnal,Haryana 132001,India.

Mara, A. Carrijo, S. Mello, D.E. Alencar, M. Luiz, B. Toral, F. and Correia de Almeida Regitano, L., 2008. Association of PIT1 genotypes with growth traits in canchim cattle. Jornal of Agricultual Science 65(2): 116-121.

Schenkel, F.S., Miller, S.P. Ye, X. Moore, S.S. Nkrumah, J.D. Li, C. Yu, J. Mandell, I.B. Wilton, W. and Williams, J.L., Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle." Journal of Animal Science.83(9).

Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M,2010. Association of growth trait and Leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Russian J Genet 2 (1), 67-73.

Silva, L.F.P., VandeHaar M.J., Weber Nielsen, M.S. and Smith, G.W., 2002. Evidence for a local effect of leptin in bovine mammary gland." Journal of Dairy Science. 85(12): 3277-3286.

Singh, S.K. Rout, P.K. Agarwal, R. Mandal, A. Singh, S.K. Shukla, S.N . And Roy, R., 2009. Characterization of exon 2 and intron 2 of leptin gene in Indian goats.Anim Biotechnol . 20(2): 80-85.

USDA. 2001. Nutrient database for standard reference, release 14. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M.1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature .372: 425-432.