

## TỐI ƯU HOÁ ĐIỀU KIỆN PCR TRONG KHUẾCH ĐẠI ĐOẠN INTRON 2 CỦA GEN LEPTIN VÀ VÙNG 5'UTR CỦA GEN THYROGLOBULIN TRÊN DNA TÁCH CHIẾT TỪ GỐC LÔNG BÒ

Hồ Lê Quỳnh Châu\*, Dương Thị Hương, Thân Thị Thanh Trà, Đinh Văn Dũng,  
Nguyễn Hữu Văn, Lê Đình Phùng

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

\*Tác giả liên hệ: [holequynhchau@huaf.edu.vn](mailto:holequynhchau@huaf.edu.vn)

Nhận bài: 29/10/2023 Hoàn thành phản biện: 30/11/2023 Chấp nhận bài: 06/12/2023

### TÓM TẮT

Đoạn intron 2 của gen leptin (LEP) và vùng 5' không dịch mã (5' UTR) của gen thyroglobulin (TG5) được xem là gen dự tuyển để chọn lọc các tính trạng liên quan đến năng suất và chất lượng thịt bò. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hoá các điều kiện PCR trong việc phát hiện khuếch đại đoạn gen LEP và TG5. Các mẫu gốc lông bò được sử dụng để tách chiết DNA tổng số bằng AccuRive sDNA/RNA Prep kit của KT Biotech. Trong 20µl thể tích phản ứng có chứa 1,25 µM mỗi; 200µM dNTP; 1× PCR buffer; 0,75 đơn vị Taq polymerase và DNA tổng số. PCR được tối ưu với việc xác định nhiệt độ gắn mỗi và nồng độ DNA khuôn mẫu. Nồng độ DNA khuôn mẫu được thăm dò trong khoảng 25-150 ng. Khoảng nhiệt độ gắn mỗi được khảo sát là 55-64°C đối với cặp mỗi LEPF/LEPR và 52-58°C đối với cặp mỗi TGF/TGR. Kết quả cho thấy khoảng nhiệt độ gắn mỗi phù hợp để khuếch đại gen LEP bằng cặp mỗi LEPF/LEPR là 58-62°C, tối ưu ở 62°C. Trong khi đó, nhiệt độ gắn mỗi cho sản phẩm khuếch đại đặc hiệu khi sử dụng cặp mỗi TGF/TGR trong khoảng 52-58°C, tối ưu ở 55°C. Nồng độ DNA tổng số phù hợp cho khuếch đại hai gen nói trên là 50-75 ng khi sử dụng nồng độ mỗi mỗi loại là 1,25 µM. Trong trường hợp cần sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để khuếch đại đồng thời 2 gen LEP và TG5, có thể tiến hành gắn mỗi ở nhiệt độ 58°C.

**Từ khóa:** Gen leptin, Gen thyroglobulin, Gốc lông, Tối ưu PCR

## OPTIMIZATION OF PCR CONDITIONS FOR AMPLIFYING THE INTRON 2 OF THE LEPTIN AND THE 5'UTR REGION OF THE THYROGLOBULIN GENES USING DNA EXTRACTED FROM HAIR ROOTS OF CATTLE

Ho Le Quynh Chau\*, Duong Thi Huong, Than Thi Thanh Tra, Dinh Van Dung,  
Nguyen Huu Van, Le Dinh Phung

University of Agriculture and Forestry, Hue University

### ABSTRACT

The intron 2 of the leptin gene (LEP) and the 5' untranslated region (5' UTR) of the thyroglobulin gene (TG5) are considered candidate genes for selecting traits related to beef yield and quality. This study was conducted to optimize the PCR conditions required to amplify the LEP and TG5 genes. The AccuRive sDNA/RNA Prep kit was used to extract genomic DNA from hair roots of cattle. The reaction mixture of 20 µL final volume contained 1.25 µM primers, 200 µM dNTP, 1× PCR buffer, 0.75 unit Taq polymerase, and genomic DNA. PCR is optimized with the determination of primer annealing temperature and template DNA concentration. The investigated annealing temperature range was 55-64°C for the LEPF/LEPR primers and 52-58°C for the TGF/TGR primers. The optimal concentration of template DNA was tested in the range of 25-150 ng. The results showed that the suitable annealing temperature range for LEPF/LEPR and TGF/TGR primer pairs were 58-62°C and 52-58°C, respectively. The optimal annealing temperature to amplify the LEP and TG5 genes was 62°C and 55°C. The genomic DNA concentration of about 50-75 ng was essential to achieve this amplification in the case using 1.25 µM of primers. The multiplex PCR for LEP and TG5 genes can be implemented with annealing temperature of 58°C.

**Keywords:** Leptin gene, Thyroglobulin gene, Hair root, PCR optimization

## 1. MỞ ĐẦU

Phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) là một trong những kỹ thuật không thể thiếu trong sinh học phân tử để khuếch đại *in vitro* một đoạn DNA cụ thể với độ nhạy và độ chính xác cao (Coleman và Tsongalis, 2006; Garibyan và Avashia, 2013). Hiện nay, kỹ thuật PCR được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực trong chăn nuôi, thú y, đặc biệt là chọn giống và chẩn đoán bệnh. Việc kiểm tra ở mức độ DNA nhằm xác định các gen liên quan đến các tính trạng kinh tế quan trọng sẽ giúp cải tiến di truyền các tính trạng này thuận lợi hơn.

Gen leptin và gen thyroglobulin là các gen liên quan trực tiếp đến trao đổi lipid. Ở bò, gen LEP nằm trên nhiễm sắc thể số 4, có kích thước 16.735bp, chứa 3 exon và 2 intron (Javanmard và cs., 2008). Đa hình gen LEP/*Sau3AI* (g.1926C>T) xuất hiện trên đoạn intron 2 đã được sử dụng để chọn lọc phân tử các tính trạng như năng suất sữa (Moravčíková và cs., 2012; Trakovická và cs., 2013), năng suất sinh sản (Moussavi và cs., 2006; Öner và cs., 2017; Ferchichi và cs., 2018), khối lượng cơ thể (Almeida và cs., 2003; Nobari và cs., 2010; Hussain và cs., 2017), tỷ lệ mỡ (Sedykh và cs., 2016) và lượng thức ăn thu nhận (Liefers và cs., 2002).

Gen thyroglobulin mã hóa cho thyroglobulin, đây là một loại hormone glycoprotein được tổng hợp trong các tế bào nang tuyến giáp. Sự thay thế cytosine (C) bằng thymine (T) ở vị trí nucleotide 442 trong vùng 5' UTR của gen thyroglobulin (TG5) có liên quan đến tỷ lệ mỡ giết hay độ vân mỡ ở bò thịt (Barendse, 1999). Từ kết quả nghiên cứu này, gen TG5 được xem là gen dự tuyển để cải thiện độ vân mỡ và chất lượng ở bò thịt (Anwar và cs., 2017). Gen TG5 cũng đã được sử dụng làm chỉ thị phân tử trong cải thiện độ vân mỡ và các tính

trạng liên quan đến tổng hợp lipid ở bò *Bos taurus* và *Bos indicus* (Casas và cs., 2005; van Eenennaam và cs., 2007; Anton và cs., 2011).

Việc phát hiện đa hình các gen này có thể được thực hiện thông qua kỹ thuật PCR-RFLP hoặc giải trình tự gen trên các mẫu DNA tách từ các mẫu lông, mô, máu hoặc tinh (Eenennaam, 2006). Trên đại gia súc, việc thu mẫu máu hay mẫu mô để tách chiết DNA làm khuôn mẫu trong PCR gặp nhiều khó khăn, chẳng hạn như người thu mẫu phải có kỹ thuật tốt, số lượng mẫu thu được trong một ngày ít, việc bảo quản mẫu khó khăn... Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thu các mẫu gốc lông của bò để tách chiết DNA tổng số. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu hoá các điều kiện PCR trong khuếch đại đoạn gen LEP và TG5 với DNA tổng số từ gốc lông bò.

## 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu gốc lông được thu thập từ các tổ hợp bò lai nuôi ở các hộ chăn nuôi ở tỉnh Quảng Ngãi (Lai Sind, Brahman × Lai Brahman, BBB × Lai Brahman, Droughtmaster × Lai Brahman, Red Angus × Lai Brahman, Charolais × Lai Brahman). Số lượng cá thể bò trong mỗi tổ hợp lai được thu mẫu là 50. Số lượng gốc lông thu ở mỗi con bò tối thiểu là 30 để đảm bảo tách chiết đủ lượng DNA cần thiết cho nghiên cứu.. Sau đó, các mẫu gốc lông cho vào túi đựng mẫu, ký hiệu mã số và chuyển về phòng thí nghiệm. DNA tổng số được tách bằng AccuRive sDNA/RNA Prep kit của KT Biotech (Việt Nam). Để tăng hiệu quả tách chiết DNA, các gốc lông được đồng hoá bằng thiết bị Bullet blender (Next Advance) trong thời gian 5 phút trong dung dịch đệm của bộ kit. Sau đó tiến hành tách chiết theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch của DNA được đo bằng máy

quang phổ Nanodrop (Thermo Scientific, USA).

**2.2. Tối ưu quy trình PCR**

Đoạn gen LEP và TG5 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR trên máy luân nhiệt Axygen® MaxyGene™. Trình tự các cặp mồi và kích thước sản phẩm được trình bày ở Bảng 1. Các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu này do công ty IDT (Mỹ) cung cấp.

Phản ứng khuếch đại đoạn gen LEP và TG5 được thực hiện với tổng thể tích 20µL, trong đó chứa 1,25 µM mồi; 200µM dNTP; 1× PCR buffer; 0,75 đơn vị Taq polymerase (Solgent, Hàn Quốc) và DNA tổng số. Nồng độ DNA khuôn mẫu trong mỗi phản ứng được khảo sát trong khoảng

25-150 ng. Nhiệt độ gắn mồi được thăm dò đối với gen LEP lần lượt là 55, 58, 60, 62, 64°C. Đối với gen TG5, nhiệt độ gắn mồi được khảo sát là 52, 55, 58°C. Các phản ứng được thực hiện theo chương trình nhiệt sau: 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ (biến tính ở 94°C trong 40 giây, gắn mồi trong 40 giây, kéo dài ở 72°C trong 40 giây), 72°C trong 7 phút (đối với gen LEP) và 10 phút (đối với gen TG5). Sản phẩm PCR được nhuộm trực tiếp bằng thuốc nhuộm 6× GelRed (ABT, Việt Nam) và được điện di trên gel agarose 2% trong đệm 0,5× TAE ở 100V trong 25 phút. Kết quả điện di được phân tích trên máy Gel Doc™ XR+ (Bio Rad, Mỹ).

**Bảng 1.** Trình tự các cặp primer đặc hiệu

Gen	Trình tự primer (5' – 3')	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Kích thước sản phẩm (bp)	Mã số GenBank	Nguồn tham khảo
LEP	LEPF: TGGAGTGGCTTGTATTCTTCT	58,61	422	EU313203	Liefers và cs. (2022)
	LEPR: GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT	65,82			
	TGF: GGGGATGACTACGAGTATGACTG	59,75			
TG5	TGR: GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA	58,93	545	AY615525.1	Barendse (1999)

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Nồng độ DNA thu được từ các mẫu gốc lông bò dao động từ 12 - 298 ng/µl. Tỷ lệ A260/A280 dao động từ 1,85-2,05. Theo Pervaiz và cs. (2011), tỷ lệ A260/280 của DNA dao động từ 1,8 đến 2,0 cho thấy DNA có độ tinh sạch khá cao. Như vậy, việc sử dụng AccuRive sDNA/RNA Prep kit để tách chiết DNA tổng số từ gốc lông bò có kết quả khá tốt. Bên cạnh đó, so với lấy mẫu máu hay mẫu mô, việc thu mẫu gốc lông bò được thực hiện dễ dàng, nhanh chóng, và thuận lợi trong bảo quản mẫu hơn nhiều,

đặc biệt là đối với các cá thể bò lai có tầm vóc lớn.

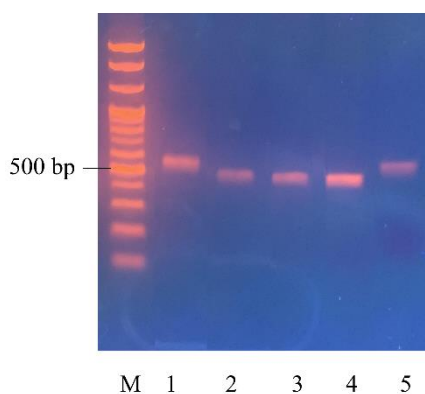
**3.1. Tối ưu nhiệt độ gắn mồi**

Để tối ưu hóa các điều kiện chu trình nhiệt PCR, người ta phải xác định nhiệt độ và thời gian tối ưu trong từng phân đoạn của chương trình và số chu kỳ khuếch đại. Trong số đó, thông số quan trọng nhất là nhiệt độ gắn mồi, vì ngay cả độ lệch nhỏ nhất 1°C hoặc 2°C cũng có thể tạo ra sự khác biệt giữa khuếch đại đặc hiệu và không đặc hiệu (Lo và Chan, 2006; Roux, 2009). Nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho PCR phụ thuộc

vào thành phần bazơ của môi, độ dài trình tự môi, và thường thấp hơn khoảng 3-5°C so với nhiệt độ nóng chảy của môi được tính toán (Grunenwald, 2003; Mamedov và cs., 2008). Nhìn chung, nhiệt độ gắn môi thường dao động trong khoảng từ 55°C đến 72°C (Mamedov và cs., 2008).

Kết quả khảo sát nhiệt độ gắn môi tối ưu đối với gen LEP được thể hiện ở Hình 1.

Với nhiệt độ gắn môi là 55°C và 64°C, sản phẩm PCR thu được không đặc hiệu, kích thước lớn hơn 500bp. Trong khi đó với nhiệt độ gắn môi 58 - 62°C, phản ứng diễn ra tốt, tổng hợp được sản phẩm đặc hiệu đúng với kích thước mong đợi. Ở nhiệt độ gắn môi 62°C, băng DNA sáng hơn so với ở 58-60°C. Do đó, nhiệt độ gắn môi 62°C là tối ưu để khuếch đại gen LEP với cặp môi LEPF/LEPR.

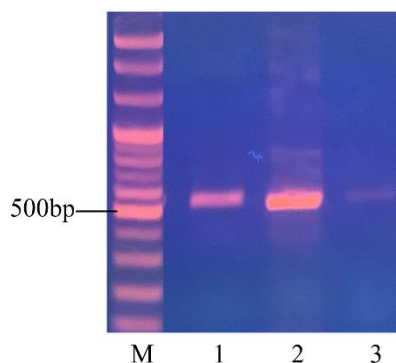


**Hình 1.** Tối ưu nhiệt độ gắn môi của cặp môi LEPF/LEPR

*M: thang chuẩn DNA 100bp, 1: 55 °C, 2: 58 °C, 3: 60 °C, 4: 62 °C, 5: 64 °C*

Đối với gen TG5, nhiệt độ gắn môi được khảo sát là 52, 55, 58°C. Kết quả điện di cho thấy trong dải nhiệt độ khảo sát đều

xuất hiện sản phẩm PCR đặc hiệu. Tuy vậy, nhiệt độ tối ưu để gắn môi đối với cặp môi TGF/TGR là 55°C.



**Hình 2.** Tối ưu nhiệt độ gắn môi của cặp môi TGF/TGR

*M: thang chuẩn DNA 100bp, 1: 52 °C, 2: 55 °C, 3: 58 °C*

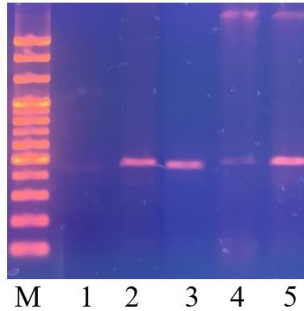
### 3.2. Tối ưu nồng độ môi

Kết quả khảo sát nồng độ DNA tối ưu để khuếch đại gen LEP và TG5 cho thấy khi sử dụng DNA tổng số với nồng độ 25-150 ng đều cho các sản phẩm đúng với kích

thước mong đợi. Tuy vậy, với nồng độ DNA khuôn mẫu là 25 ng thì sản phẩm PCR rất mờ nhạt trên hình ảnh điện di (hình 3). Trong khi đó, nếu sử dụng DNA tổng số với nồng độ từ 100-150 ng thì tỷ lệ DNA khuôn mẫu/môi quá cao, làm xuất hiện thêm 1

band DNA nằm phía trên cùng. Do đó, với nồng độ mỗi mỗi loại là 1,25  $\mu$ M thì 50-

75ng DNA tổng số là phù hợp để thực hiện PCR.



**Hình 3.** Tối ưu nồng độ DNA khuôn mẫu

*M: thang chuẩn DNA 100bp; 1: 25 ng DNA; 2: 50 ng DNA; 3: 75ng DNA; 4: 100 ng DNA; 5: 150g DNA*

Đã có một số công bố trước đây về khuếch đại gen LEP và TG5 trên DNA của bò bằng kỹ thuật PCR (Barendse, 1999; Liefers và cs., 2002; Hồ Lê Quỳnh Châu và cs., 2023). Tuy vậy, khi chúng tôi thực hiện PCR dựa trên các thông tin đã công bố của Barendse (1999), Liefers và cs. (2002) thì kết quả khuếch đại rất kém hoặc tạo ra sản phẩm PCR đặc hiệu. Trong khi đó, áp dụng theo thành phần và điều kiện PCR khuếch đại đoạn gen LEP và TG5 của nhóm tác giả Hồ Lê Quỳnh Châu và cs. (2023) thì cho hiệu quả khuếch đại khá tốt. Tuy vậy, việc thực hiện PCR với hiệu quả càng cao thì sẽ càng tiết kiệm được chi phí cho nghiên cứu, tổng hợp được một lượng DNA lớn hơn, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo, đặc biệt là nghiên cứu về đa hình gen và giải trình tự nucleotide. Chính vì vậy, việc tối ưu hoá các điều kiện PCR là rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tập trung vào việc khảo sát khoảng nhiệt độ gắn mồi và nồng độ DNA tổng số. Những thành phần phản ứng khác như nồng độ Taq polymerase, ion  $Mg^{2+}$ , tỉ lệ DNA/dNTP cũng cần phải tiếp tục được khảo sát để tiếp tục tăng hiệu quả PCR. Bên cạnh đó từ kết quả nghiên cứu cũng cho thấy trong trường hợp sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để

khuếch đại đồng thời 2 gen LEP và TG5, có thể tiến hành gắn mồi ở nhiệt độ 58°C.

#### 4. KẾT LUẬN

Khoảng nhiệt độ gắn mồi phù hợp để khuếch đại gen LEP bằng cặp mồi LEPF/LEPR và TG5 bằng cặp mồi TGF/TGR lần lượt là 58-62°C và 52-58°C. Nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho 2 gen là 62°C đối với LEP và 55°C, đối với TG5. Nồng độ DNA tổng số phù hợp cho khuếch đại hai gen nói trên là 50-75 ng khi sử dụng nồng độ mồi mỗi loại là 1,25  $\mu$ M. Trong trường hợp cần sử dụng kỹ thuật multiplex PCR để khuếch đại đồng thời 2 gen LEP và TG5, có thể tiến hành gắn mồi ở nhiệt độ 58°C.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu từ Đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Đại học Huế, mã số DHH2022-02-164.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

##### 1. Tài liệu tiếng Việt

Hồ Lê Quỳnh Châu, Dương Thị Hương, Thân Thị Thanh Trà và Đinh Văn Dũng. (2023). Đa hình gen leptin và thyroglobulin liên quan đến tính trạng năng suất và chất lượng thịt ở tổ hợp bò lai Senepol  $\times$  Lai Brahman nuôi tại tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 132(3B), 191-204.

## 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Almeida, S. E. M., Almeida, E. A., Moraes, J. F. C., & Weimer, T.A. (2003). Molecular markers in LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(2), 106-113. DOI: 10.1046/j.1439-0388.2003.00377.x
- Anton, I., Kovács, K., Holló, G., Farkas, V., Lehel, L., Hajda, Z., & Zsolnai, A. (2011). Effect of leptin, DGAT1 and TG gene polymorphisms on the intramuscular fat of Angus cattle in Hungary. *Livestock Science*, 135(2), 300-303. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.07.012
- Anwar, S., Putra, A., Wulandari, A., Agung, P. P., Putra, W., Said, S. (2017). Genetic polymorphism analysis of 5' untranslated region of thyroglobulin gene in Bali cattle (*Bos javanicus*) from three different regions of Indonesia. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 42(3), 175-184. DOI: 10.14710/jitaa.42.3.175-184
- Barendse, W. J. (1999). Assessing lipid metabolism. *International Patent Application WO9923248 US6383751 (PCT/AU98/00882)*. Retrieved from <https://patentimages.storage.googleapis.com/b3/e5/55/16c9b8b49f15ee/US6383751.pdf>
- Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith T. P., Brenneman, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennett, G. L., & Chase, C. C. Jr. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, 83(1), 13–19. doi: 10.2527/2005.83113x
- Coleman, W. B., & Tsongalis, G. J. (2006). The polymerase chain reaction. In W. B., Coleman & G. J. Tsongalis (Eds). *Molecular diagnostics for the clinical laboratorian*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Ferchichi, M. A., Bayrem, J., Sihem, A., Abderrahmane, B. G., & Boulbaba, R. (2018). Effect of leptin genetic polymorphism on lameness prevalence in Tunisian Holstein cows. *Archives Animal Breeding*, 61(3), 305-310. doi: 10.5194/aab-61-305-2018
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. DOI: 10.1038/jid.2013.1
- Grunenwald, H. (2003). Optimization of polymerase chain reactions. In J. M. S. Bartlett & D. Stirling (Eds). *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols*. Second edition. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Hussain, D. A., Abboud, Z. H., & Abdulameer, T. A. (2017). Genetic structure analysis of leptin gene/*Sau3AI* and its relationship with body weigh in Iraqi and Holstein Frisian cows population (Comparative study). *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(3), 10-13. DOI: 10.9790/3008-1203041013
- Javanmard, A., Mohammadabadi, M. R., Zarrigabayi, G. E., Gharahedaghi, A. A., Nassiry, M. R., Javadmansh, A., & Asadzadeh, N. (2008). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian *Bos taurus*). *Russian Journal of Genetics*, 44(4), 495–497.
- Liefers, S. C., te Pas, M. F. W., Veerkamp, R. F., & van der Lende, T. (2002). Associations between LLeptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1633–1638. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74235-5
- Lo, Y. M. D., & Chan, K. C. A. (2006). Introduction to the polymerase chain reaction. In Y. M. D. Lo, R. W. K. Chiu, & K. C. A. Chan (Eds). *Clinical Applications of PCR*. Second edition. Totowa, NJ: Humana Press.
- Mamedov, T. G., Pienaar, E., Whitney, S. E., TerMaat, J. R., Carvill, G., Goliath, R., Subramanian, A., & Viljoen, H. J. (2008). A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates. *Computational Biology and Chemistry*, 32(6), 452–457. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021
- Moravčíková, N., Trakovická, A., & Kasarda, R. (2012). Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Slovak Pinzgau cattle. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 45(1), 211-214.

- Moussavi, A. H., Ahouei, M., Nassiry, M. R., & Javadmanesh, A. (2006). Association of leptin polymorphism with production, reproduction and plasma glucose level in Iranian Holstein cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(5), 627-631. DOI: 10.5713/ajas.2006.627
- Nobari, K., Shokoufe, G., Mohammaddad, R. N., Mojtaba, T., & Eisa, J. (2010). Relationship between leptin gene polymorphism with economical traits in Iranian Sistani and Brown Swiss cows. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 9(22), 2807-2810. DOI: 10.3923/javaa.2010.2807.2810
- Öner, Y., Onur, Y., Hayrettin, O., Nezih, A., Gulnaz, Y. M., & Abdulkadir, K. (2017). Associations between GH, PRL, STAT5A, OPN, Pit-1, LEP and FGF2 genes polymorphisms and fertility in Holstein Friesian heifers. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 23(4), 527-534. DOI: 10.9775/kvfd.2016.17192
- Pervaiz, Z., Turi, N. A., Khaliq, I., Rabbani, M. A., & Malik, S. A. (2011). Methodology: a modified method for high-quality DNA extraction for molecular analysis in cereal plants. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1669-1673. DOI: 10.4238/vol10-3gmr1346
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009(4):pdb.ip66.
- Sedykh, T. A., Kalashnikova, L. A., Gusev, I. V., Pavlova, I. Y., Gizatullin, R. S., & Dolmatova, I. Y. (2016). Influence of TG5 and LEP gene polymorphism on quantitative and qualitative meat composition in beef calves. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 30(2), 41-48. DOI: 10.33899/ijvs.2016.121382
- Trakovická, A., Nina, M., & Radovan, K. (2013). Genetic polymorphism of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4), 783-787.
- Van Eenennaam, A. (2006). Marker-assisted selection in beef cattle. Retrieved from [https://www.agrireseau.net/bovinsboucherie/documents/Marker\\_Assisted\\_Selection\\_in\\_Beef\\_Cattle.pdf](https://www.agrireseau.net/bovinsboucherie/documents/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf)
- Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E., & Thomas, M. G. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*, 85(4), 891-900. DOI: 10.2527/jas.2006-512