

بررسی پلی مورفیسم ژن *PEPCK-C* مرغان بومی

منطقه سیستان و بلوچستان

جلال عمرانی بیدی^۱، مسعود علی پناه^{۲*}، آدم ترکمن زهی^۳، سید ابوالفضل حسینی^۴،
محمد رضا نصیری^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام دانشگاه زابل

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه زابل

۳- دانشیار گروه زیست شناسی دانشگاه سیستان و بلوچستان

۴- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم سبزوار

۵- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alipanah.masoud@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۳ - تاریخ پذیرش:)

چکیده

ژن *PEPCK* باعث کد شدن آنزیم فسفوانول پیروات کربوکسی کیناز می شود که نقش کلیدی در چرخه گلیکونئوژنز دارد. دو نوع متفاوت از ژن *PEPCK* وجود دارد: میتو کندریایی *PEPCK-M* و سیتوزولی *PEPCK-C*. در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه از ۲ توده نژادی به نام خزک و دشتیاری در منطقه سیستان و بلوچستان مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA از فولیکول انتهایی پر، با استفاده از جفت آغازگرهای F1R1، F2R2، F3R3، F4R4 به ترتیب قطعاتی با طول-های ۸۰۰ bp، ۱۰۰۰ bp، ۱۰۸۰ bp و ۱۰۰۰ bp تولید شد. این قطعات از پروموتور تا اگزون شماره ۳ ژن *PEPCK-C* را پوشش دادند. فراوانی آللی و ژنوتیپی برای دو جمعیت توسط نرم افزار Popgene آنالیز و تعیین گردید. مطالعه هاپلوتیپ نشان داد که در این دو توده جمعیتی سه هاپلوتیپ B، C و D به ترتیب دارای فراوانی ۰/۱۴، ۰/۸۴ و ۰/۰۲ برای مرغان خزک و ۰/۰۲، ۰/۹۰ و ۰/۰۸ برای مرغان دشتیاری بود.

مقدمه

توده های نژادی مرغ بومی منطقه سیستان و بلوچستان شامل دو توده نژادی خزک و دشتیاری است که مرغان خزک دارای تیپ تخمگذار می باشند و بیشتر در شمال استان در منطقه سیستان نگهداری می شوند و مرغان دشتیاری که شبیه به نژادهای بومی طیور جنوب آسیا و از تیپ گوشتی می باشند، بیشتر در مناطق جنوبی استان و سواحل دریای عمان نگهداری می شوند. میزان تخم مرغ تولیدی مرغان خزک و دشتیاری به ترتیب ۱۳۰ و ۷۰ عدد در سال می باشد. قابلیت جوجه درآوری این دو توده نژادی بین ۷۰ تا ۸۰ درصد می باشد (۱).

واژه های کلیدی

پلی مورفیسم،
ژن فسفوانول پیروات-
کربوکسی کیناز،
مرغان بومی سیستان و
بلوچستان،
خزک،
دشتیاری

ژن فسفوانول‌پیرووات کربوکسی‌کیناز (*PEPCK*)، کدکننده آنزیمی با همین نام درون سلول‌های اکثر موجودات می‌باشد که دو شکل متفاوت از این ژن در دو مکان متفاوت از ژنوم وجود دارد، که یکی ژن نوع سیتوزولی (*PEPCK-C*)^۱ و دیگری نوع میتوکندریایی (*PEPCK-M*)^۲ می‌باشد. آنزیم *PEPCK* یک آنزیم کلیدی در چرخه نوسازی گلوکز (گلیکونئوژنز) بوده که با استفاده از یک مولکول *GTP* و تبدیل آن به *GDP* و دکربوکسیلاسیون-اگزالواستات، این ماده را به فسفوانول‌پیرووات تبدیل می‌کند و همچنین باعث فسفوریلاسیون اسیدهای کربوکسیلیک نظیر گلیکولات و تیوگلیکولات می‌شود (۲). جداسازی پروتئین‌های تولید شده به وسیله این ۲ ژن نشان از تفاوت در اندازه، مسئولیت و خواص فیزیکی و ایمونوشیمیایی آن‌ها دارد (۳). ژن *PEPCK-C* دارای طول ۸ kb بوده که دارای ۸ اگزون می‌باشد. مشخص شده است که طول mRNA برای ژن *PEPCK-C* حدود ۲/۸ kb و برای ژن *PEPCK-M* ۳/۴ kb می‌باشد (۵ و ۴). همچنین آنزیم *PEPCK-C* دارای یک محتوای غنی از پرولین و تریپتوفان می‌باشد. موقعیت ۴۶۰- تا ۷۳ این ژن شامل عوامل تنظیمی است که به *cAMP*، هورمون‌های گلیکوکورتیکوئید، تیروئید و انسولین پاسخ داده و نسخه‌برداری ژن مربوطه را تنظیم می‌کند (۶). ناحیه ۵' غیرترجمه‌ای ژن ۲۶۴ bp و توالی غیرترجمه‌ای ۳' ژن ۶۴۹ bp طول دارند و یک ناحیه غنی از A+U در انتهای ۳' از mRNA ژن *PEPCK-C* جوجه وجود دارد (۷). وجود توالی CCAAT در پروموتور ژن باعث افزایش اتصال پروتئین‌های نسخه‌برداری می‌گردد. توالی CCAAT همچنین عامل اتصال پروتئین در وضعیت‌های چندگانه تغذیه‌ای، رشدی و تنظیم هورمونی می‌باشد. هورمون‌هایی نظیر تیروئید و گلوکوکورتیکوئید باعث افزایش اتصال RNA پلیمراز II به پروموتور ژن و افزایش اتصال پروتئین به توالی CCAAT می‌شوند (۸). پارسا‌نژاد و همکاران (۲۰۰۲) وجود ۱۹ چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) را در توالی به طول ۳۷۹۲ bp (۲۰۶۹ - ۱۷۲۳-) از ژن *PEPCK-C* مشخص کرد که ۱۰ SNP در ناحیه پروموتور، ۸ SNP در ناحیه ایترون و یک

جهش در اگزون شماره ۱ قرار داشتند. همچنین پارسا‌نژاد و همکاران (۲۰۰۳) با استفاده از تکنیک RFLP ۶ ژنوتیپ CC، BC، BB، AC، AB، AA برای این محدوده (۳۷۹۲ bp) از ژن تعیین کردند که ژنوتیپ AA بیشترین تاثیر را بر روی سن اولین تخمگذاری و ژنوتیپ BB بر روی وزن تخم مرغ داشته و ژنوتیپ‌های AA و AB باعث بیشترین مصرف خوراک در طیور نژاد لگهورن بودند. در مطالعه امام قلی بیگلی و همکاران (۲۰۱۰) در مرغان بومی یزد پلی مورفیسم مشاهده نگردید. با توجه به اقدامات اخیر برای حفظ و نگهداری توده‌های نژادی بومی از جمله توده‌های خزک و دشتیاری در کشور و همچنین تاثیر این ژن بر روی تولید تخم مرغ و سایر صفات فیزیولوژیک، این تحقیق با هدف بررسی پلی مورفیسم ژن *PEPCK-C* در این دو توده نژادی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه از مرغان بومی منطقه سیستان و بلوچستان مرغان خزک و دشتیاری بطور تصادفی از گله موجود در پژوهشکده دام‌های خاص دانشگاه زابل انتخاب شدند. این مرغان در پژوهشکده دام‌های خاص نگهداری می‌شوند. DNA با غلظت مناسب از ناحیه فولیکول انتهایی پر با استفاده از کیت دیاتوم استخراج گردید (۲۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر). غلظت ژل آگارز برای الکتروفورز DNA استخراجی ۱٪ بوده و DNA استخراجی بدون شکستگی و آلودگی بود. تکنیک استفاده شده در این تحقیق مبتنی بر PCR-RFLP بود. پس از مرحله استخراج، DNA با استفاده از جفت آغازگرها (۹) از پروموتور تا اگزون شماره ۳ ژن *PEPCK-C* تکثیر شد. مشخصات این آغازگرها در جدول ۱ آمده است. برای تکثیر نواحی مورد نظر در ژن *PEPCK* از برنامه‌ریزی حرارتی که در جدول ۲ آمده است، استفاده شد.

¹ Cytosolic Phosphoenolpyruvat Carboxykinase

² Mitochondrial Phosphoenilpyruvat Carboxykinase

جدول ۱- مشخصات جفت آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه
F1R1 F R	5'CTGGGACCACCAGCAAGTACTG3' 5' GCCTGTGCAGTCGGTGTGTGA 3'	۸۰۰
F2R2 F R	5'GCTGGGACTGAATGGAAGAGGAG3' 5'CTGTTGAGTCGGATGGGTGTCAG3'	۱۰۰۰
F3R3 F R	5' CACCATCAGCTGAAAGGGAGCC3' 5'GTTGGGTTCGTTGGGAGAGACAAC3'	۱۰۰۰
F4R4 F R	5'GTCTCTCCCAACGAACCCAACATG3' 5 'CCTCTTCTGACATCCAGCGACC3'	۱۰۸۰

جدول ۲- برنامه دمایی مورد استفاده برای آغازگرهای مختلف

آغازگر	دمای واسرشته سازی اولیه/زمان	دمای واسرشته سازی ثانویه/زمان	دمای اتصال/زمان	دمای تکثیر/زمان	دمای تکثیر نهایی/زمان
F1R1	۵/۹۵°C دقیقه	۶۰/۹۴°C	۸۰/۶۰°C	۹۰/۷۲°C ثانیه	۸/۷۲°C دقیقه
F2R2			۸۰/۶۱°C		
F3R3, F4R4			۸۰/۵۸°C		

نتایج

نتایج هضم با آنزیم‌های برشی نشان داد که برای قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای F1R1، F3R3 و F4R4 هیچ جایگاه برشی برای آنزیم *BstE II* وجود نداشت و قطعات با طول‌های اولیه خود وجود داشتند، ولی برای جفت آغازگر F2R2، آنزیم *BstE II* تعدادی از محصولات را به قطعات ۳۰۰ bp و ۷۰۰ bp برش داده بود که قطعات با طول ۱۰۰۰ bp، آل A و قطعات با طول ۳۰۰ bp و ۷۰۰ bp، آل B نامگذاری شده و ژنوتیپ‌ها به شرح جدول ۳ تعیین گردید.

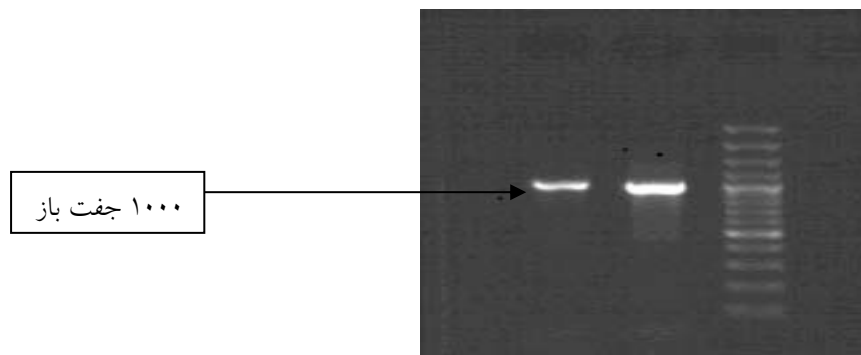
برای قطعات تکثیر شده توسط جفت آغازگرهای F1R1، F2R2 و F3R3 هیچ جایگاه برشی برای آنزیم *Aci I* وجود نداشت و قطعات با طول‌های اولیه خود وجود داشتند ولی برای قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگر F4R4، آنزیم *Aci I* تعدادی از محصولات را به قطعات ۵۴۰ bp برش داده بود که قطعات با طول ۱۰۸۰ bp، آل A و قطعات با طول ۵۴۰ bp، آل B نامگذاری شده و ژنوتیپ‌ها به شرح جدول ۴ تعیین گردید.

با توجه به جدول ۴ فراوانی ژنوتیپ AA برای جفت آغازگر F2R2 (در مورد ژنوتیپ‌های *Aci I*) در توده نژادی خزرک کمتر از

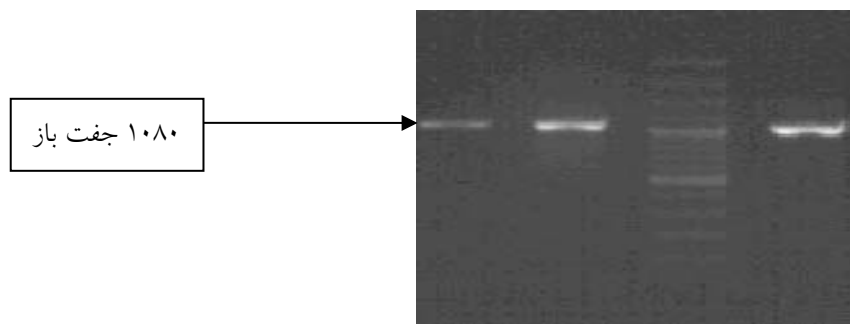
اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۲٪ و نشانگر اندازه ۱۰۰ bp (*Fermentas*) مشخص شد. دو آنزیم برشی مورد استفاده برای هضم محصولات PCR عبارت بودند از الف - آنزیم *BstE II (Eco91 I)* با جایگاه برشی ۵'GGTNACC3'، پروتکل هضم آنزیمی شامل استفاده از ۲ واحد آنزیم (۰/۲ میکرولیتر) برای هر نمونه از محصولات PCR، ۲ μl بافر ۱۰x، ۱۶ μl آب مقطر و ۳ μl از محصول PCR (به علت غلظت بالای محصولات) برای هر واکنش آنزیمی و ب - آنزیم *Aci I* با جایگاه برشی ۵'AATGTT3'، پروتکل هضم آنزیمی شامل استفاده از ۱ واحد آنزیم (۰/۱ میکرولیتر) برای هر نمونه از محصولات PCR، ۲ μl بافر ۱۰x، ۱۶ μl آب مقطر و ۵ μl از محصول PCR (به علت غلظت بالای محصولات) برای هر واکنش آنزیمی در نظر گرفته شد. سپس تمامی نمونه‌های حاوی آنزیم به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوبه شدند و پس از اتمام زمان هضم آنزیمی برای بررسی قطعات برشی از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. برای تعیین فراوانی‌های الی و ژنوتیپی از نرم‌افزار POPGENE استفاده شد.

مرغان دشتیاری دارای فراوانی بیشتر بود، فراوانی آلل A نیز در نژاد خزک بیشتر بود. با توجه به اینکه مطالعات مختلف نشان داده است که یک نشانگر می تواند به تنهایی مورد بررسی قرار گیرد ولی اثر اقتصادی آن وقتی مورد توجه است که در یک ساختار هاپلوئیدی (یعنی ترکیب چند آلل) در سویه مورد مطالعه بکار برده شود. لذا ما این دو نشانگر (SNP) را در ساختار هاپلوئیدی نیز بررسی کردیم (جدول ۵).

نژاد دیگر بود، ضمن اینکه از این نظر نژاد دشتیاری بیشترین فراوانی را نشان داد. نکته جالب این بود که در هیچ یک از دو توده نژادی ژنوتیپ BB مشاهده نشد. فراوانی آلل های A به ترتیب در مرغان دشتیاری و خزک بیشتر بود. فراوانی آلل B در خزک نسبت به دشتیاری از فراوانی بیشتری برخوردار بود. در این مطالعه مشاهده گردید که ژنوتیپ های *BstE* II همچون ژنوتیپ های *Aci* I از سه ژنوتیپ ممکن تنها دو ژنوتیپ مشاهده گردید و همچنین فراوانی ژنوتیپ AA در نژاد خزک نسبت به



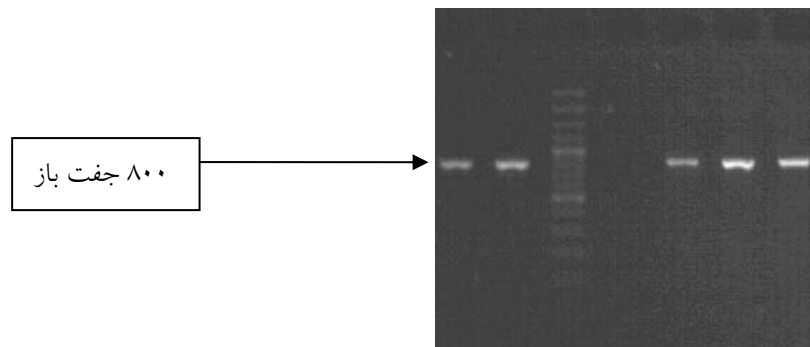
شکل ۱- محصولات PCR (قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی) تکثیر شده توسط جفت آغازگر F2R2 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



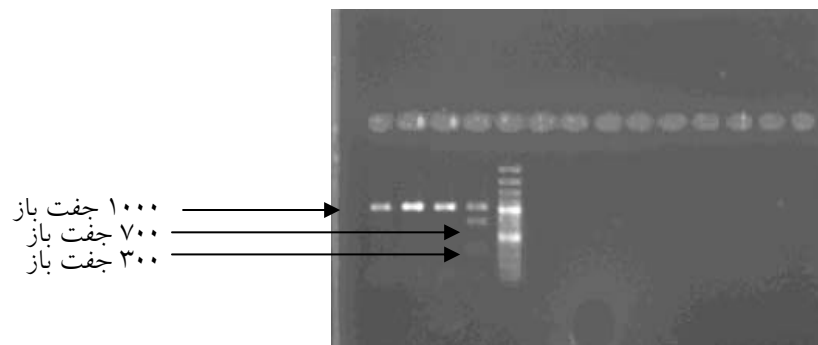
شکل ۲- محصولات PCR (قطعه ۱۰۸۰ جفت بازی) تکثیر شده توسط جفت آغازگر F4R4 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



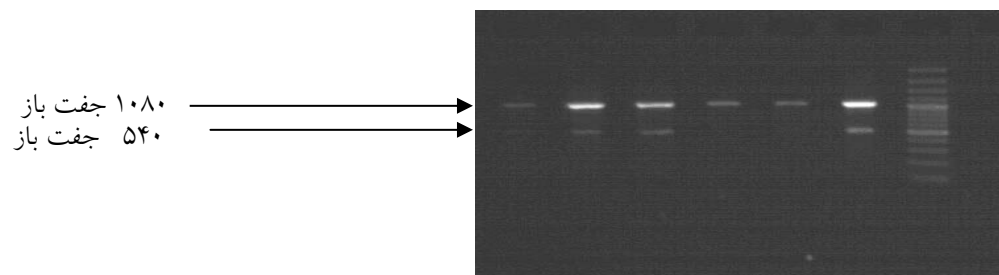
شکل ۳- محصولات PCR (قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی) تکثیر شده توسط جفت آغازگر F3R3 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



شکل ۴- محصولات PCR (قطعه ۸۰۰ جفت بازی) تکثیر شده توسط جفت آغازگر F1R1 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد



شکل ۵- هضم آنزیمی قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی (تولید شده با جفت آغازگر F2R2) با آنزیم *BstE II* بر روی ژل آگارز ۳ درصد در ژنوتیپ-های مطالعه شده



شکل ۶- هضم آنزیمی قطعه ۱۰۸۰ جفت بازی (تولید شده با جفت آغازگر F4R4) با آنزیم *Aci I* بر روی ژل آگارز ۳ درصد در ژنوتیپ‌های مختلف

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن *PEPCK* هضم شده با آنزیم *BstE II*

فراوانی آللی				فراوانی ژنوتیپی		ژنوتیپ
B		A		دشتیاری	خزک	
دشتیاری	خزک	دشتیاری	خزک			
۰/۰۸	۰/۰۲	۰/۹۲	۰/۹۸	۰/۸۴	۰/۹۶	AA
				۰/۱۶	۰/۰۴	AB
				۰/۰۰	۰/۰۰	BB

جدول ۴- فراوانی ژنوتیپی و آللی ژن *PEPCK* هضم شده با آنزیم *Aci I*

فراوانی ژنوتیپی		فراوانی آللی		ژنوتیپ
خزک	دشتیاری	A		
		خزک	دشتیاری	
۰/۷۲	۰/۹۶	۰/۸۶	۰/۹۸	AA
۰/۲۸	۰/۰۴			AB
۰/۰۰	۰/۰۰			BB
		B		
		خزک	دشتیاری	
		۰/۱۴	۰/۰۲	

۱۰۰ قطعه از توده مرغان خزک و دشتیاری برای RFLP جایگاه *Aci I* و RFLP در جایگاه *BstE II* تعیین ژنوتیپ شدند. فقدان یا حضور جایگاه برشی در دو جایگاه سه دسته هاپلوتیپی را نشان داد: هاپلوتیپ B (*Aci I*+ *BstE II*-)، C (*Aci I*- *BstE II*-) و D (*Aci I*- *BstE II*+) چهارمین هاپلوتیپ A که در آن برای هر دو آنزیم جایگاه برشی دارد (*Aci I*+ *BstE II*+) در این دو توده مشاهده نگردید (جدول ۵). همان گونه که در جدول ۶ مشاهده

می گردد، از ۹ ژنوتیپ مختلف تنها چهار ژنوتیپ در دو توده نژادی (سه ژنوتیپ برای هر یک از توده مرغان خزک و دشتیاری) مشاهده گردید. در هر دو توده نژادی، فراوانی ژنوتیپی CC بالاترین مقدار بود، به همین ترتیب فراوانی آلل C بیشترین مقدار را در این مرغان نشان داد. ولی فراوانی ژنهای B و D با یکدیگر متفاوت بود (جدول ۵).

جدول ۵- فراوانی هاپلوتیپی *PEPCK-C*

فراوانی هاپلوتیپی		RFLP alleles		هاپلوتیپ
خزک	دشتیاری	<i>Aci I</i>	<i>BstE II</i>	
۰/۱۴	۰/۰۲	+	-	B
۰/۸۴	۰/۹۰	-	-	C
۰/۰۲	۰/۰۸	-	+	D

جدول ۶- فراوانی هاپلوتیپ - ژنوتیپ *PEPCK-C*

توده نژادی	هاپلوتیپ - ژنوتیپ	فراوانی مشاهده شده
خزک	CC	۰/۷۲
	CD	۰/۰
	BC	۰/۲۴
	BD	۰/۰۴
دشتیاری	CC	۰/۸۰
	CD	۰/۱۶
	BC	۰/۰۴
	BD	۰/۰

بحث

پارسا نژاد و همکاران (۲۰۰۲) ۳۷۹۲ جفت باز شامل ۱۷۲۳ جفت باز در ناحیه پروموتور و ۱۵۷۸ جفت باز در ناحیه اینترون و ۴۹۵ جفت باز در ناحیه اگزون ۱ تا ۳ را مورد بررسی قرار دادند و ۱۹ SNP یا یک SNP به ازاء هر ۲۰۰ جفت باز شناسائی کردند که تنها دو تا از SNP توسط آنزیم‌های برشی قابل شناسائی بودند. ده SNP در ناحیه پروموتور، هشت SNP در ناحیه اینترون و تنها یک SNP در ناحیه اگزون وجود داشت. در تحقیق حاضر چهار جفت آغازگر فاصله پروموتور تا اگزون ۳، ژن *PEPCK* را تحت پوشش قرار داده بود، و دو آنزیم برشی برای شناسائی SNP های احتمالی در دو توده نژادی مورد بررسی قرار گرفت تا در صورت وجود جایگاه شناسائی برای این دو آنزیم برشی آن‌ها شناسائی شوند. همچون سایر گزارشات قبلی که روی مرغان سویه لگهورن صورت گرفته، در تحقیق ما نیز سایت برشی برای آنزیم *Aci I* تنها در قطعه تکثیر شده توسط جفت آغازگر *F4R4* وجود داشت و برای آنزیم *BstE II* نیز یک سایت برشی در قطعه تکثیر شده توسط *F2R2* وجود داشت. در تحقیق امام قلی بیگلی و همکاران (۲۰۱۰) برای مرغان بومی یزد، هیچ سایت برشی برای آنزیم *Aci I* مشاهده نگردید.

نتایج تحقیق ما سه هاپلوتیپ و چهار ژنوتیپ - هاپلوتیپ را نشان داد. در گزارش پارسا نژاد و همکاران (۲۰۰۲) هاپلوتیپ *D (+BstE II - Aci I)* مشاهده نشده بود، اما در تحقیق حاضر هاپلوتیپ *A (+BstE II - Aci I)* مشاهده نشد. گزارش شده است که دو هاپلوتیپ *A* و *C* نماینده دو شاخه متفاوت از درخت ژنتیکی هستند و بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم دارند (پارسا نژاد و همکاران ۲۰۰۲). در این تحقیق هاپلوتیپ *A* مشاهده نگردید و بجای آن هاپلوتیپ *D* وجود داشت. این نتایج نشان می‌دهد که برای این جایگاه‌ها توده مرغان بومی خزک و دشتیاری دارای تنوع کمتری می‌باشند. ضمن اینکه هاپلوتیپ *B* در مرغان خزک بیشترین فراوانی را داشت و هاپلوتیپ *D* که قبلاً گزارش نشده بود در مرغان دشتیاری فراوانی بالاتری داشت. با توجه به این که در گزارش مربوط به هاپلوتیپ‌های ژن *PEPCK-C* در مرغان لگهورن سفید (۹) فراوانی سه هاپلوتیپ *A*، *B* و *C* به ترتیب

۰/۲۹، ۰/۱۷ و ۰/۵۴ بود. می‌توان گفت در این نژاد میزان جهش ایجاد شده احتمالاً در اثر فشار انتخاب برای تولید تخم مرغ بیشتر بوده است به نحوی که فراوانی ژن وحشی *C* به ۰/۵۴ تقلیل یافته است در حالی که در نژادهای بومی خزک و دشتیاری اولاً میزان فراوانی ژن وحشی *C* کمتر دچار تغییر بوده است (به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۹۰ برای مرغان خزک و دشتیاری)، ثانیاً هاپلوتیپ *A* (که در آن برای هر دو جایگاه جهش رخ داده است) در دو جمعیت مرغان مشاهده نگردید و بجای آن هاپلوتیپ *D* مشاهده گردید. از نظر توزیع ژنوتیپی نیز برای سه آلل هاپلوتیپ ۹ ژنوتیپ مورد انتظار است، اما تنها چهار ژنوتیپ مشاهده گردید. البته با این تذکر که در هر جمعیت تنها سه نوع ژنوتیپ مشاهده گردید. در مطالعه روی مرغان لگهورن تعداد شش ژنوتیپ از نه ژنوتیپ ممکن مشاهده شده بود، با توجه به این نظریه که احتمالاً آلل اولیه *B* بوده است و سایر آلل‌ها از جهش ایجاد شده‌اند. در مورد این دو توده نژادی با توجه به فراوانی بالای آلل *C* کمی دشوار است که این نظریه را بپذیریم.

مطالعات بیشتری راجع به اثر آلل‌ها و ژنوتیپ‌های هاپلوتیپ مورد مطالعه روی صفات تولیدی در مرغان خزک و دشتیاری باید صورت گیرد تا دلیل این تنوع کم مشخص گردد.

منابع

۱. ربانی، ف (۱۳۷۸) بررسی تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای ریزماهورای در جمعیت توده نژادی خزک و دشتیاری منطقه سیستان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه زابل.
2. David EA, Fraces AE, Sohcli AC, Yoshitake S and Vern LS (1990). Mammalian and avian liver Phosphoenolpyruvat Carboxykinase. The journal of biological chemistry. 265: 7377-7384.
3. Yaccov H, Yoo-Warren H and Hanson RW (1984). The gene encoding the cytosolic form of the phosphoenolpyruvat carboxykinase from the chicken. The journal of biological chemistry. 259: 15609-15614.
4. Yaccov H, Morris SM and Hanson RW (1984). Induction by cAMP of the mRNA encoding the cytosolic form of phosphoenolpyruvat carboxykinase from the chicken. The journal of biological chemistry. 259: 15603-15608.

5. Sato A, Takahashi H, Konishi K, Susuki T and Kochi H (1997). Nucleotide sequence of the promoter region of chicken Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Journal of Biochemistry*. 121: 711-716.
6. Hanson RW (1997). Regulation of phosphoenolpyruvat carboxykinase gene expression. *Annual Review Biochemistry*. 66: 581-611.
7. Janathan S, Cook S, Welden L and Garcia-Ruiz JP (1986). Nucleotid sequence of the mRNA encoding the Cytosolic form of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from the chicken. *The Proceedings of the Naional Academy of Sciences*. 83: 7583-7587.
8. Jurado LA, Song S, Roesler WJ and Park EA (2002). Conserved Amino Acids within CCAAT Enhancer-binding proteins regulate Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene experssion. *Journal of biological chemistry*. 277: 27606-27612.
9. Parsanejad R, Torkamanzehi A, Zadworny D and Kuhnlein U (2002). Genetic variability of the Cytosolic Phosphoenolpyruvat Carboxykinase gene in white leghorn chickens. *Poultry science*, 81: 1668-1670.
10. Parsanejad R, Torkamanzehi A, Zadworny D and Kuhnlein U (2003). Alleles of Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (*PEPCK*) trait association and interaction with mitochondrial *PEPCK* in a strain of Leghorn chickens. *Poultry Science*, 82: 1708-1715.
11. Emamgoli begli H, Zerehdaran S, Hassani S, Abbasi MA and Khan Ahmadi A (2010). Polymorphism in prolactin and *PEPCK-C* genes and its association with economic traits in native fowl of Yazd province. *Iranian journal of biotechnology*. 8: 172-177.