



## ARAŞTIRMA MAKALESİ

### Acıpayam koyunlarında karbonik anhidraz 1 (CA 1) ve malik enzim (ME)'in nişasta jel elektroforezi ile araştırılması

Ümmühan Özdemir<sup>1\*</sup>, Mehmet Nizamloğlu<sup>2</sup>

#### Özet

**Özdemir Ü, Nizamloğlu M.** Acıpayam koyunlarında karbonik anhidraz 1 (CA 1) ve malik enzim (ME)'in nişasta jel elektroforezi ile araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 2011, 27, 3,139-143

**Amaç:** Acıpayam ırkı koyunların genetik yapılarını belirlemek için iki enzim lokusu; karbonik anhidraz (CA 1) ve malik enzim (ME) nişasta jel elektroforezi ile incelemektir.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırmada "Denizli Acıpayam Devlet Üretim Çiftliği"nden 50 adet koyundan kan alındı. Elde edilen hemolizatlar elektroforez işlemleri uygulanarak incelendi. Her iki enzim için Tris-EDTA-Borat pH:8.6 tamponu kullanıldı. Elektroforez sonrası boyamada CA 1 için MUA, aseton, agar noble, fosfat tamponu pH:6.5 ve ME için NADP, MTT, PMS, DL Malik asit, MgCl<sub>2</sub>, NaOH, Agar Noble, Tris-HCl pH:8.0 tamponu kullanıldı. Bantlar CA 1 için ultraviyole ışıkta, ME için ise uygun ışık ortamında gözlemlendi.

**Bulgular:** CA 1 enzimi lokusları yönünden koyunlarda polimorfizm tespit edilmedi ve bütün numunelerin aynı bantlara sahip homozigot bireyler olduğu görüldü. ME lokusu yönünden populasyon içi polimorfizm gözlemlendi, F, FS ve S bantlarına sahip olduğu, ME lokusunun F ve S allel frekans değerleri arasındaki farkın önemsiz olduğu ( $p>0.05$ ) ve allellerin Hardy-Weinberg dengesinde olduğu belirlendi.

**Öneri:** Bu çalışmayla Acıpayam koyunlarında malik enzim yönünden polimorfizm görülürken, CA 1 yönünden polimorfizm görülmediği belirlenmiş ancak başka enzimler açısından da polimorfizm gösterip göstermediğinin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

#### Abstract

**Ozdemir U, Nizamlioglu M.** Investigation of carbonic anhidrase 1 (CA 1) and malic enzyme (ME) in Acıpayam sheep by using starch gel electrophoresis. *Eurasian J Vet Sci*, 2011, 27, 3, 139-143

**Aim:** For the determination of genetic structure of Acıpayam Sheep, two enzyme loci were studied by using starch gel electrophoresis; carbonic anhidrase 1 (CA 1) and malic enzyme (ME).

**Materials and Methods:** In this study, blood samples were taken from 50 sheeps in "Denizli Acıpayam State Farm". Hemolysates were examined by electrophoresis. Tris-EDTA-Borat pH:8.6 buffers were used for both of the enzymes. In staining after electrophoresis, MUA, acetone, agar noble, phosphate buffer pH:6.5 was used for carbonic anhidrase 1. NADP, MTT, PMS, DL Malic acid, MgCl<sub>2</sub>, NaOH, agar noble, Tris-HCl pH:8.0 buffer was used for malic enzyme. Bands were observed in ultraviolet lamps for CA 1 and appropriate light condition for ME.

**Results:** No polymorphism was observed for the CA 1 enzyme. All sheep were found to be homozygote for the same allele. For ME loci, population were observed polymorphism, having F, FS and S bands, the difference between F and S bands in ME loci were unimportant ( $p>0.05$ ) and alleles were determined in the Hardy-Weinberg equilibrium.

**Conclusion:** In this study, ME polymorphism was observed but no polymorphism was determined for CA 1 locus. It was concluded that it is necessary to investigate other enzymes in terms of polymorphism.

<sup>1</sup>İbrahim Hakkı Konyalı İlköğretim Okulu Fen ve Teknoloji Öğretmeni, Meram, 42010, <sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kampus, 42075, Konya, Türkiye  
Geliş: 01.11.2010, Kabul: 28.01.2011  
\*ummu42@hotmail.com

Anahtar kelimeler: Acıpayam koyunu, elektroforez, genetik, polimorfizm

Keywords: Acıpayam sheep, electrophoresis, genetic, polymorphism

## ► Giriş

Göller bölgesi ve Batı Anadolu'nun iç kesimlerinde, et kalitesi iyi olan Dağlıç koyun ırkı yetiştiriciliği önem arz etmektedir. Bu koyun ırkının sütü az, ikizlik oranı düşük, et verimi yetersiz ve canlı ağırlığın önemli bir kısmını yağlı kuyruk oluşturmaktadır. İyi bir koyun ırkından beklenen; et, süt, yapağı verimi ve ikizlik oranının yüksek olmasıdır. Acıpayam Tarım İşletmesi'nde de 1972'li yıllara kadar Dağlıç koyunu yetiştirilmekte idi. Yeni bir tip koyun oluşturmak için melezleme çalışmalarına başlanmış ve ilk adım olarak, Dağlıç anaçlarının İvesi koçlar ile melezleme çalışmaları sonucunda bölgeye adaptasyonu sağlanmıştır. Elde edilen melez anaçlar, süt verimi yüksek, yağlı kuyruklu olmuşlardır. Çalışmanın ikinci aşaması olarak Doğu Friz anaçları x İvesi koçları melezlenmesinden elde edilen, kama biçiminde küçük kuyruklu koçlar, daha önceden elde edilmiş olan yağlı kuyruklu melez anaçlarla çiftleştirilerek Acıpayam koyunu adı verilen yeni bir tip koyun ırkı elde edilmiştir (Kaya 1990). Bu yeni tipin genetik bileşimi  $\frac{1}{4}$  D. Friz +  $\frac{2}{4}$  İvesi +  $\frac{1}{4}$  Dağlıçtır. Acıpayam koyunu; halı tipi yapağı özelliklerine sahip et ve süt verimi yüksek, iri yapılı, dolgun butlu, hızlı gelişen kuzuları, küçük kuyruğu ve az yağı olan bir koyun tipidir. Bu koyun tipi, Dağlıç ırkının yaygın olarak yetiştirildiği bölge koşullarına uyum sağlayabilecek bir yapıya sahiptir (Koçak ve ark 1990).

Hayvan yetiştiriciliğinde önemli gelişmelerden birisi de, pratik yetiştiricilik çalışmalarında biyokimyasal araştırmaların da birlikte düşünülmesidir. Bir popülasyonu oluşturan bireylerin genetik, biyokimyasal ve biyofiziksel yöntemler ile araştırılması, o popülasyonun genetik yapısına ilişkin daha ayrıntılı ve kesin bilgilerin elde edilmesine olanak verir (Asal ve ark 1996). Polimorfik kan özelliklerinden, yetiştirilen hayvanların köken kontrolünde, ırklar arası genetik ilişkilerin ortaya konması ve ırkların genotipik yapılarının saptanmasında etkin bir biçimde yararlanılmaktadır (Stasio 1997). Karbonik Anhidraz (CA 1, 4.2.1.1.) enzimi karbonik asit / bikarbonat tampon sisteminde görevi bulunmaktadır (Bering ve ark 1998). CA 1, memelilerin alyuvar ve bazı dokularında (Agar ve ark 1970, Ordas ve Primitivo 1986, Casati ve ark 1988, Clarke ve ark 1989, Casati ve ark 1990, Bering ve ark 1998, Missohou ve ark 1999), bitkiler ile bazı bakterilerde görülen bir enzimdir (Spiro 1991). Malik enzim (ME, 1.1.1.40.) L-Malatı pruvat ve karbondioksit reverzibl olarak oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyen bir enzimdir (Yaman ve Tucker 1981, Voegelé ve ark 1999). ME'in mitokondrial ve sitoplazmik (soluble) olmak üzere iki formu bilinmektedir (Bhattacharyya ve Saha 1984). ME, bakteri, mantar, bitki, protozoa, omurgasız ve omurgalılarda bulunan bir enzimdir (Manchenko 2003). Omurgalılarda kalp, böbrek, beyin dokuları ile eritrositlerinde malik enzim bulunmaktadır (Baker ve Manwell 1977). Koyunlar için bir genetik markör niteliği taşıyan ME polimorfizmi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır

(Baker ve Manwell 1977, Manwell ve Baker 1977a, Yaman ve Tucker 1981, Bhattacharyya ve Saha 1984). ME, türlerin çoğunda nişasta jel elektroforezinde pH:8.0–8.6 arasında anodal olarak göç eder,  $Mn^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarıyla ile net bir şekilde boyanır (Baker ve Manwell 1977).

Bu çalışmada, Acıpayam koyunlarında karbonik anhidraz 1 ve malik enzim polimorfizminin araştırılması amaçlanmıştır.

### • Gereç ve Yöntem

TİGEM "Denizli Acıpayam Devlet Üretim Çiftliği"nde yetiştirilen Acıpayam ırkı 50 koyundan hayvan refahına uygun olarak EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Oda sıcaklığında 3000 rpm de 10 dakika sanrifüj sonrası eritrositler distile su ile üç kere yıkanıp, hemolizatlar oluşturuldu ve -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı. Hemolizatlar nişasta jeline (%7) yükledi. Elektroforez ve boyama işlemleri Altunok ve ark (2007), Nizamlioğlu ve ark (2008) ile Yaman ve Tucker (1981)'in bildirdiği şekilde uygulandı. Kullanılan tamponlar ve elektroforez şartları Tablo 1'de, boyama şartları ve boya bileşenleri ise Tablo 2'de verildi. Allel frekans hesaplamaları Hardy-Weinberg denge kanunlarına göre yapılmıştır (Soysal 2000).

### • Bulgular

Yapılan çalışmada, Türkiye'de ekonomik öneme sahip olan koyun ırklarından Acıpayam Koyununun genetik yapısını belirlemek amacıyla karbonik anhidraz (CA 1) ve malik enzim (ME) lokusu nişasta jel elektroforezi tekniği ile araştırıldı.

Tablo 1. Enzimlerin elektroforez şartları.

Enzimler	Elektroforez süresi	Tampon	Gerilim (Voltaj)
CA 1	2 saat	Tris/ EDTA/Borat pH= 8.6	145 V
ME	4 saat	Tris/ EDTA/ Borat pH= 8.6	350 V

### • Karbonik anhidraz 1 enzimi

Örneklerin elektroforetik incelemeleri sonunda CA 1 enzimi, tüm Acıpayam koyunlarında aynı hizada, anodal ve tek bant olarak gözlemlendi (Resim 1). CA 1 enziminin bir allel bakımından homozigot olduğu tespit edildi.

### • Malik enzim

ME, bazı bireylerde homozigot (FF ve SS) anodal tek bant, bazı bireylerde ise heterozigot (FS) anodal tek bant şeklinde gözlemlendi (Resim 2). Acıpayam koyunlarında malik enzim açısından polimorfizm görüldü ve bu lokus açısından popülasyonda çalışılan koyunların hepsi Hardy-Weinberg dengesinde bulundu ( $p>0.05$ ). Elde edilen bant sayıları, fenotipik ve genotipik fre-

Tablo 2. Enzimlerin boya şartları ve boya bileşenleri.

Enzim	Boyama Süresi (dk)	İnkübasyon	Boya Tamponu (50 mL)	Boya Maddeleri*	Bantların Gözlenmesi
CA 1	10 - 20	37 °C	Fosfat Tamponu pH = 6.5	20 mg MUA 2 ml Aseton 200 mg Agar Noble	Ultraviyole lamba
ME	20 - 30	37 °C	Tris-HCl Tamponu pH = 8.0	50 mg DL Malik asit 2.5 mg NADP 5 mg MTT 5 mg PMS 25 mg MgCl.6H <sub>2</sub> O 10 N NaOH 250 mg Agar Noble	Uygun ışık ortamında

\*MUA: 4-methylumbelliferyl acetate, NADP: Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate, MTT: Methythiazol tetrazolium, PMS: Phenazine methosulfate,

kanslar ile Hardy-Weinberg denge kanununa uygunlukları Tablo 3'te belirtildi. Her bir genotip için  $\chi^2$  değeri hesaplanarak toplam  $\chi^2 = 3.206$  olarak tespit edildi.

### ► Tartışma

Bu çalışmada, Acıpayam koyunlarında karbonik anhidraz ve malik enzim polimorfizmi nişasta jel elektro-

Schoonebeker, Mergelland, Friesian ve Black Blaze koyun ırklarında (Buis ve Tucker 1983), Ankara keçilerinde (Altunok ve ark 2007), Andalusian Black ve Andalusian White keçi ırklarında (Rodero ve ark 1997) anodal tek bant ve monomorfik olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Sunulan çalışmada da, CA 1 enzimi anodal tek bant ve monomorfik olarak tespit edilmiştir. Böylece CA 1 enziminin Acıpayam koyunlarında bir allel tarafından determine edildiği ve enzimde polimorfizm olmadığı belirlenmiş ve literatürlerle benzer bulunmuştur. Buna karşın Casati ve ark (1988) ise dört İtalyan koyun ırkında (Bergamasca, Biellese, Lamon ve Varesina), Rodero ve ark (1990) beş farklı İspanyol Merinosunda, Ordas ve Primitivo (1983) Churra ve Manchega koyun ırklarında, Morera ve ark (1983) İspanyol Merinos koyun ırklarında, Missohou ve ark (1999) Batı Afrika koyun ırklarında (Djallonke, Fulani ve Touabire) karbonik anhidraz enziminin polimorfizm gösterdiğini belirlemişlerdir.

Tablo 3. Malik enzim için genotipik frekanslar ve  $\chi^2$  testi sonuçları.

n=50	Fenotipik frekans			Gen frekansı		
	FF	FS	SS	p	q	$\Sigma \chi^2$
Gözlenen	30	14	6	0.74	0.26	
Beklenen	27.38	19.24	3.38			
$\chi^2$ *	0.164*	1.712*	1.330*			3.206

\* Yates düzeltmesi uygulanmıştır.

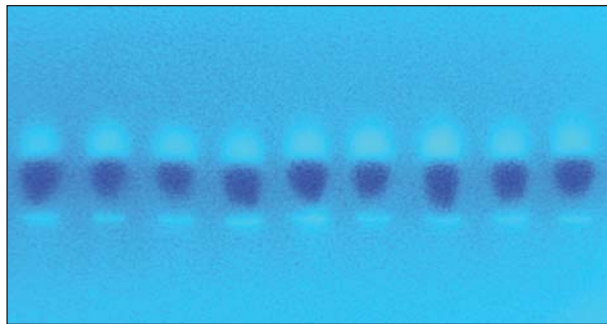
forez tekniği kullanılarak araştırıldı.

#### • Karbonik anhidraz 1 enzimi

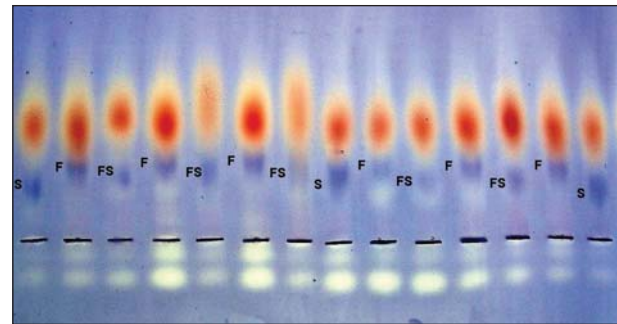
Elektroforetik çalışmalarda CA 1 enzimi, Akkaraman, İvesi, Konya Merinosu, Hasmer, Hasiv ve Hasak koyunlarında (Nizamhoğlu ve ark 2008), Merinos, Border Leicester, Dorset Horn ve Corriedale koyun ırklarında (Agar ve ark 1970), Sarda (Casati ve ark 1990), Namaqua (Clarke ve ark 1989), Lacha (Ordas ve Primitivo 1986), Merinos ve Poll Dorset koyun ırklarında (Manwell ve Baker 1977b), Drente, Veluwe, Kempen,

#### • Malik enzim

Finnish Landrace, Finnish Landrace X Merinos, Mergelland koyunlarında nişasta jeliyle yapılan çalışmalarda, malik enzimin anodal tek bant halinde F, S ve FS zonları şeklinde bulunduğu ve iki kodominant allel tarafından kontrol edildiği ifade edilmektedir (Yaman ve Tucker 1981). Manwell ve Baker (1977b) Avustralya Merinoslarında, Baker ve Manwell (1977) Merinos ve Merinos melezi koyunlarda, Manwell ve Baker (1977a) Barbary koyun ve keçilerinde, Tucker



Resim 1. CA 1 enziminin nişasta jel elektroforezi sonrası gözlenen bantları.



Resim 2. ME'nin nişasta jel elektroforezi sonrası gözlenen bantları.



ve Clarke (1980) *Ovis aries*, *Ovis musimon*, *Ovis dalli* ve *Ovis canadensis* türlerinde malik enzim bantlarını anodal, orijine farklı uzaklıklarda F, S ve FS zonları halinde tek bant ve polimorfik olarak tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada da, Acıpayam koyun ırkında anodal ve tek bant şeklinde orijine farklı mesafelerde F, S ve FS bantları olarak yer alan ME'de polimorfizm görülmüş ve literatürlere benzer bulunmuştur. Buna karşın Manwell ve Baker (1977b) ise Poll Dorset koyunlarının monomorfik olduğunu belirtmişlerdir. Koyun çalışmalarının yanı sıra keçilerde yapılan çalışmalarda, Menrad ve ark (2002) Pashmina ve Bakerwali keçilerinde, Deza ve ark (2000) Santa Maria, Colon ve Ischilin Keçilerinde, Rasero ve ark (1989) iki İtalyan keçi popülasyonunda A, B ve C şeklinde üç tür bant olduğunu ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar, Yaman ve Tucker (1981), Baker ve Manwell (1977), Manwell ve Baker (1977a), Manwell ve Baker (1977b) ve Tucker ve Clarke (1980)'ın F, S ve FS zonları halinde ve polimorfik olarak tespit ettikleri malik enzim bulguları ile benzerlik gösterdi ve yapılan istatistik hesaplamaları sonucunda gözlenen ve beklenen değerler Hardy-Weinberg dengesi altında uyumlu olduğu tespit edildi. Sonuç olarak Acıpayam koyunlarında CA1 lokusunun monomorfik, ME lokusunun ise polimorfik olduğu belirlenmiştir.

#### ► Öneriler

Bu çalışmayla Acıpayam koyunlarının genetik yapısında malik enzim yönünden polimorfizm görülürken, CA 1 yönünden polimorfizm görülmediği belirlenmiş ancak başka enzimler açısından da polimorfizm gösterip göstermediğinin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

#### ► Teşekkür

Materyallerin temininde katkılarından dolayı TİGEM Acıpayam Tarım İşletmesi yönetici ve çalışanlarına teşekkürlerimizi sunarız. Bu makale yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

#### ► Kaynaklar

- Arbeiter K, Winding M, 1977. Zur behandlung der Lactatio Agar NS, Robert J, Vans JV, 1970. Breed differences in sheep erythrocyte carbonic anhydrase activity. *Comp Biochem Physiol*, 35, 639-646.
- Altunok V, Nizamlioğlu M, Bulut Z, 2007. Ankara keçilerinin genetik yapılarının nişasta jel elektroforezi yöntemiyle araştırılması. *Vet Bil Derg*, 21, 67-72.
- Asal S, Dellal G, Kocabaş Ş, 1996. Haemoglobin and aryl-esterase types in Akkaraman and Anatolian merino breeds of sheep. *Türk J Vet Anim Sci*, 20, 215-217.
- Baker CM, Manwell C, 1977. Heterozygosity of the Sheep: polymorphism of "Malic Enzyme" isocitrate dehidrogenase (NADP+), Catalase and esterase. *Aust J Biol Sci*, 30, 127-140.
- Bering CL, Kuhns JF, Rowlet R, 1998. Purification of bovine carbonic anhydrase by affinity chromatography. *J Chem Educ*, 75, 1021-1024.
- Bhattacharyya SP, Saha N, 1984. Mitochondrial malic en-

zyme polymorphism among different ethnic groups in Singapore. *Hum Hered*, 34, 393-395.

- Buis RC, Tucker EM, 1983. Relationship between rare breeds of sheep in the Netherlands as based on blood-typing. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 14, 17-26.
- Casati MZ, Gandini GC, Leone P, Rognoni G, 1988. Genetic relationship among four sheep breeds of the Italian alpine ark. *J Anim Breed Genet*, 105, 135-142.
- Casati MZ, Gandini GC, Leone P, 1990. Genetic variation and distances of five Italian native sheep breeds. *Anim Genet*, 21, 87-92.
- Clarke SW, Tucker EM, Osterhoff AR, 1989. Blood groups and biochemical polymorphism in the Namaqua sheep breed. *Anim Genet*, 20, 279-286.
- Deza C, Perez GT, Gardenal CN, Varela L, Villar M, Rubiales S, Barioglio C, 2000. Protein polymorphism in native goats from central Argentina. *Small Rum Res*, 35, 195-201.
- Kaya F, 1990. Acıpayam koyunu. *Hayvansal Üretim Dergisi*, 33, 91-92.
- Koçak Ç, Kaymakçı M, Demirören E, 1990. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesince yetiştirilen koyun tipleri. *Hayvansal Üretim Dergisi*, 33, 23-32.
- Manchenko GP, 2003. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, Second Edition, CRC Pres LLC, Florida, USA.
- Manwell C, Baker CMA, 1977a. *Ammotragus lervia*; Barbary sheep or Barbary goat. *Comp Biochem Physiol*, 58, 267-271.
- Manwell C, Baker CMA, 1977b. Genetic distance between the Australian merino and Poll Dorset sheep. *Genet Res*, 29, 239-253.
- Menrad M, Stier CH, Gelderman H, Gall CF, 2002. A study on the Changthangi Pashmina and the Bakerwali goat breeds in Kashmir I. Analysis of blood protein polymorphisms and genetic variability within and between the populations. *Small Rum Res*, 43, 3-14.
- Missohou A, Nguyen TC, Sow R, Gueye A, 1999. Blood polymorphism in West African breeds of sheep. *Trop Anim Health Pro*, 31, 175-179.
- Morera L, Barbancho M, Rodero A, 1983. Genetic polymorphism in Spanish merino sheep. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 14, 77-82.
- Nizamlioğlu M, Altunok V, Togan İ, Ergüven A, Kurtoğlu F, Tekin ME, Ergin A, Düzgün H, 2008. Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'ndeki yerli ve yabancı koyun ırklarında biyokimyasal polimorfizm ile bazı verim özellikleri arasındaki ilişkilerin araştırılması. *Vet Bil Derg*, 24, 41-47.
- Ordas JG, Primitivo F, 1983. A new allele at the red cell carbonic anhydrase locus in sheep. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 14, 233-234.
- Ordas JG, Primitivo FS, 1986. Genetic variation in blood proteins within and between Spanish dairy sheep breeds. *Anim Genet*, 17, 255-266.
- Rasero R, Stasio D, Giaccone P, Facello C, 1989. Malic enzyme polymorphism in goat. *Anim Genet*, 20, 80.
- Rodero A, Haba MR, Llanes D, Moreno A, 1990. Evolution of a population of Spanish merino with genetic marker. *Arch Zootec*, 39, 187-196.
- Rodero E, Haba MR, Rodero A, 1997. Genetic study of Andalusia's ovine and caprine breeds. *Anim Breed Genet*,

- 114, 143-161.
- Soysal Mİ, 2000. Genetik, Geliştirilmiş ve yenilenmiş 3. Baskı, TŪ Tekirdađ Ziraat Fakóltesi Yayın No 74, Ders notu 135.
- Spiro TG, 1991. Zinc Enzymes, Krieger Published Company, Florida, USA.
- Stasio DL, 1997. Biochemical Genetics, in: The Genetics of Sheep, Eds; Piper L, Ruvinsky A, CAB International, UK Press Cambridge, USA.
- Tucker EM, Clarke SW, 1980. Comparative aspects of biochemical polymorphism in the blood of caprinae species and their hybrids. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 11, 163-183.
- Voegele RT, Mitsch MJ, Finan TM, 1999. Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *Biochim Biophys Acta*, 1432, 275-285.
- Yaman K, Tucker EM, 1981. "Malic enzyme" polymorphism in sheep erythrocytes. *Anim Blood Grps Biochem Genet*, 12, 215-218.