



## ARAŞTIRMA MAKALESİ

### Türkiye’de bulunan bazı sığır ırklarının OLR1 gen polimorfizminin araştırılması

Gözde Yazıcıtuñç\*, Mehmet Nizamlıoğlu

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kampus, 42075, Konya, Türkiye  
Geliş:18.06.2012, Kabul: 02.09.2012

\*loquace\_@hotmail.com

#### Özet

**Yazıcıtuñç G, Nizamlıoğlu M.** Türkiye’de bulunan bazı sığır ırklarının OLR1 gen polimorfizminin araştırılması. **Eurasian J Vet Sci, 2013, 29, 1, 1-4**

**Amaç:** Sunulan çalışmada farklı sığır ırkları arasındaki OLR1 gen polimorfizmi araştırılmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Türkiye’nin değişik bölgelerinden rastgele seçilmiş Boz Irk (BI), Yerli Kara (YK) ve Güney Anadolu Kırmızısı (GAK) ırklarından alınan 147 kan örneği kullanıldı. Kan örneklerinden standart fenol/kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA’ların OLR1 gen bölgesinin 270 baz çift (bc) lik fragmanı PZR yöntemi ile yükseltendi. PZR işleminden sonra örneklere PstI restriksiyon enzimi ilave edildi ve kesim işleminden sonra jelde bant uzunlukları görüntüldü.

**Bulgular:** Genotipleme yapılan verilerin allel ve genotip frekansları ki-kare ( $\chi^2$ ) testi ile değerlendirildi. Anlamlılık seviyesi 0.05 alındı. HardyWeinberg dengesine göre, BI sığır popülasyonunun HW dengesinden saptığı gözlemlendi. GAK ve YK sığır ırklarının ise HW dengesinde olduğu ve ırkların birbirine benzerlik gösterdiği tespit edildi.

**Öneri:** Süt yağı verimi ve süt yağı oranı üzerine etkisi olan OLR1 genindeki polimorfik bölgenin; diğer sığır ırkları da kullanılarak ve sütün benzer özelliklerine etki ettiği düşünölen farklı polimorfik bölgelerle birlikte çalışılarak daha yarar sağlayabileceği düşünölmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Sığır, OLR1 geni, polimorfizm.

#### Abstract

**Yazıcıtuñç G, Nizamlıoğlu M.** Investigation of OLR1 gene polymorphism of various cattle breeds in Turkey. **Eurasian J Vet Sci, 2013, 29, 1, 1-4**

**Aim:** The objective of this study was investigation of OLR1 gene polymorphism among different cattle breeds in Turkey.

**Materials and Methods:** A total of 147 blood samples were collected from Anatolian Grey (AG), Anatolian Black (AB) and South Anatolian Red (SAR) cattle breeds and DNAs were isolated. PCR-RFLP method was used to determine allele types. Genotype and allele frequencies were calculated after genotyping.

**Results:** Results are evaluated by square test ( $\chi^2$ ). The significance level was taken as 0.05. While AG cattle breed deviated from HW equilibrium, SAR and AB cattle breeds were on the HW equilibrium and they are similar to each other.

**Conclusion:** It is thought that the effect of polymorphic region in OLR1 gene on milk fat and the ratio of milk fat will be more efficient by studying with various polymorphic areas, and by using other cattle races that they have effects on similar characteristics of milk.

**Keywords:** Cattle, OLR1 gene, polymorphism



## Giriş

Sütün bileşiminde bulunan enzim, hormon, vitamin, protein ve peptit yapılı ögeler ve yağ asitleri yaşam döngüsü içinde önemli yere sahiptir. Sütte bulunan süt yağı; yağda eriyen vitaminler ve vücudun enerji ihtiyacı için kaynak oluşturmaktadır. Süt yağı % 5 oranında doymuş yağ içermesine rağmen kronik hastalıklar için olumlu etkinlikleri olan linoleik asit, sfingomyelin, bütirik asit, miristik asit gibi özel bileşenler içerdiğinden önem taşımaktadır. İnsan beslenmesinde önemli yere sahip olan süt ürünleri büyük ölçüde sığırlardan elde edilmektedir. Bu bakımdan hem Dünya'da hem de Türkiye'de sığır yetiştiriciliği hayvancılığın önemli bir kolunu oluşturmaktadır (Ünal ve Besler 2006). Sığır, dünya süt üretiminin neredeyse tamamını, et üretiminin de yaklaşık %25'ini tek başına sağlamaktadır. Besin maddesi yönünden büyük bir paya sahip olan sığır, sığır yetiştiriciliğini önemli hale getirmektedir (Akman ve ark 2011).

1984 yılında İnsan Genom Projesi (Brown 2002) ve 1990'lı yıllarda Sığır Genom Haritalama çalışmaları başlatılmıştır. Son yıllarda da çiftlik hayvanlarında ekonomik olarak önemli özellikleri belirleyen genlerin tanınmasına yönelik olarak pek çok çalışma yapıldığı görülmüştür. Gerek sığırlarda gerekse koyun, keçi gibi diğer çiftlik hayvanlarında, ekonomik olarak önemli olduğu tespit edilmiş lokusların belirlenmesine ve hayvanların bu özellikleri bakımından genotiplerinin analizine olanak sağlayacak özgün moleküler yöntemlerin geliştirilmesine araştırmacılar tarafından fazlaca yer verilmiştir (Elmacı ve ark 2007). Farklı markör sistemlerinin kullanılması ile sığır, koyun, keçi gibi evcil çiftlik hayvanlarında yapılan genetik haritalama ve kodlayan kromozom bölgelerinin tespiti (QTL) haritalama çalışmaları kolaylık kazanmıştır (Kiraz ve ark 2007).

QTL belirleme çalışmalarının temeli, özel genetik markörler ile fenotipler arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. Çiftlik hayvanlarında, markör-QTL bağlantı çalışmaları genellikle popülasyonlar içinde yürütülür ve polimorfik olan markör bölgelerinin varlığını gerektirir (Primrose 2006, Weller 2009). QTL belirleme çalışmaları Georges ve ark (1995) tarafından sütçü sığırlarda yapılan çalışmalar ile başlamış ve yaygınlaşmıştır.

Sığır aort endotel hücrelerinde tanımlanan OLR1, düşük dansiteli lipoproteini bağlayan ve indirgeyen bir majör protein olarak bilinmektedir. OLR1'in genomik DNA dizisine bakıldığında, 4. ekzonda (kodlayıcı bölge) 2 SNP (single nucleotide polymorphism), 4. intronda (kodlayıcı olmayan bölge) 5 SNP ve 3'UTR (untranslated region) bölgesinde de 1 SNP belirlenmiştir. Haplotip analizlerinde 3'UTR bölgesindeki C (sitozin) allelinin; süt yağı verimi ve yüzdesini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Ancak 4. ekzondaki SNP'lerin bu değerlere etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Khatib ve ark 2006). Sığırlardaki OLR1 geni, süt bileşim özellikleriyle ilişkisinin olduğu düşünülerek aday gen olarak seçilmiştir (Khatib ve ark 2007).

Bu çalışmada; Türkiye'de bulunan ve yerli genetik kaynaklarından olan Güney Anadolu Kırmızı, Yerli Kara, Boz Irk sığır

ırklarında, süt yağı miktarı ve süt yağı verimi üzerinde etkili olan OLR1 geni 3'UTR bölgesinde 10141 - 10680 nükleotidleri arasındaki polimorfik yapının PZR-RFLP yöntemi kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Sığır ırklarından, EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden standart fenol/kloroform yöntemiyle DNA izolasyonu yapıldı (Sambrook ve ark 1989). Ardından Touchdown PZR yöntemi (Don 1991) kullanılarak, izolasyonu yapılmış örneklerden PZR ürünleri elde edildi. Kullanılan primerler; AAGCGA-ATCTATTGAGAGC (forward) ve ACTTCTCTGAAGTCCTGCA (reverse) dizilimindedir (Khatib ve ark 2006). PZR işleminden sonra elde edilen PZR ürünlerini değerlendirmek amacıyla % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Yürütme sonunda jelin UV ışık altında fotoğrafı çekilerek değerlendirilmiştir. Jel görüntülerinden sonra PZR ürünlerinde restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizm analizi için restriksiyon kesimi yapıldı. Enzim-buffer-su karışımları hazırlanıp PZR örneklerinin üzerine eklendi ve 37 °C'de bir gece (yaklaşık 17-18 saat) bekletildi. Bu sürenin bitiminden sonra yine %2'lik agaroz jelle elde edilen enzim kesim ürünleri yüklendi. Her bir örneğin yanına enzimle kesilmemiş PZR ürününden aynı jelde, aynı örneğin yanına farkı daha iyi gözlemlenebilmek için yüklendi. Yürütme sonunda UV ışığı altında fotoğrafı çekilip değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi TFPGA, version 1.3.8 programı ile (Miller 1997) yapıldı. Hardy-Weinberg dengesi tam olasılık testi ile değerlendirildi.

## Bulgular

Tablo 1. Güney Anadolu Kırmızı, Yerli Kara ve Boz Irk sığır ırklarında gözlenen genotipler

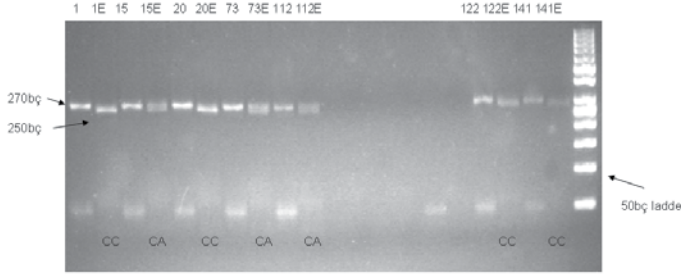
	Gözlenen Genotipler		
	CC	CA	AA
GAK	46	3	0
YK	42	6	0
BI	27	3	2
Toplam	115	12	2

OLR1 geni 3'UTR C8232A polimorfizminin belirlenmesi amacıyla yükseltgenmiş PZR ürünü, PstI (*Providencia stuartii-1*) restriksiyon enzimiyle kesilmiş ve agaroz jel elektroforezinde parça büyüklüklerine göre ayrıştırılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılan ve UV ışık altında çekilen jel fotoğraflarında üç farklı bant profili gözlenmiştir. Bunlardan ilki, kesme işleminin gerçekleşmediği 270 bp uzunluğundaki bant, ikincisi kesme işleminin gerçekleştiği 250 bp uzunluğundaki bant, üçüncüsü ise 250 bp ve 270 bp uzunluğunda iki ayrı bantın gözlenmesidir.

Değerlendirme sonucunda, OLR1 geni için 270 bp ve 250 bp büyüklüğünde bantlar gözlenmiştir. Genotipleme yapılırken sadece 270 bp büyüklüğünde bant görüldüğünde AA homozigot; 250 bp büyüklüğündeki bantla, 270 bp büyüklüğündeki bantlar birlikte görüldüğünde CA heterozigot ve sadece 250 bp büyüklüğündeki



bant görüldüğünde ise CC homozygot şeklinde genotiplendirilmesi değerlendirilmiştir. On sekiz örneğin (2 GAK, 1 YK, 15 BI), farklı PZR kondisyon ve profillerinde bantlar gözlemlenememiştir. Bu yüzden bu 18 örnek istatistiki değerlendirmeye alınmamış ve geriye kalan 129 örnekle istatistiksel analizler yapılmıştır.



Resim 1. OLR1 geninde 10141 - 10680 nükleotidleri arasındaki gen bölgesinin PZR ürününün, PstI restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası, agaroz jel fotoğrafı. (son kuyucuk DNA markerını (50 bç) göstermektedir). 1, 20, 122, 141 nolu örnekler CC; 15, 73, 112 nolu örnekler CA genotipini göstermektedir (her örneğin yanına negatif kontrolü konularak, bantların daha kolay ayrt edilebilmesi sağlanmıştır).

OLR1 geni 3'UTR C8232A polimorfizmi için yapılan genotiplemede; 115 hayvanda (%89.15) CC genotipi, 12 hayvanda (%9.3) CA genotipi ve 2 (%1.55) hayvanda ise AA genotipi bulundu. GAK, YK ve BI sığır ırklarında CC genotipi sırasıyla %93.88, %87.5 ve %84.38, CA genotipi sırasıyla %6.12, %12.5 ve %9.38, AA genotipi ise sırasıyla %0, %0 ve %6.25 olarak bulundu. AA genotipi referans alınarak yapılan istatistiksel hesaplamada heterozygot CA genotipinin GAK, YK ve BI sığır ırkları arasındaki dağılımlarında istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $\chi^2= 8.61$ ). Bu farklılığın sebebinin ortaya konması için Çizelge 3.1'deki veriler kullanıldığında; AA genotipinin BI'da 2 (%6.55) hayvanda, GAK ve YK'da ise mevcut olmadığı görülmektedir.

## Tartışma

Sunulan çalışmada, Türkiye'de bulunan Güney Anadolu Kırmızı, Yerli Kara, Boz Irk sığır ırklarının süt yağı ve süt verimi üzerinde etkili olan OLR1 (oxidized low - density lipoprotein receptor 1) geni 3'UTR bölgesinde 10141 - 10680 nükleotidleri arasındaki polimorfik yapının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) - Restriksiyon Enzimleri Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi kullanılarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu bölgedeki C allelinin; süt yağı verimi ve yüzdesini önemli ölçüde etkilediği bilinmektedir. OLR1 geninin 8232. pozisyonunda bir polimorfizm varsa restriksiyon enzimi bu bölgeyi tanımamakta ve kesme işle-

mi gerçekleşmemektedir. Başka bir deyişle OLR1 geninin 8232. pozisyonunda, adenin (A) nükleotidi varsa enzim buraya yerleşememekte ve hedeflenen bölgeyi kesmemektedir.

Khatib ve ark (2006) OLR1 geni 3'UTR polimorfizmini incelemeleri sonucunda AA genotipli bireyler; CC ve CA genotipli bireylerle karşılaştırıldığında AA genotipli bireylerde OLR1 ekspresyonunun azaldığını görmüşlerdir. Bu durumun A allelinin varlığıyla ilgili olabileceği gibi, yakınlardaki fonksiyonel bir SNP'nin varlığıyla da bağlantılı olabileceğini belirtmişlerdir. Holştayn ırkında C allelinin frekansını %54, Guernsey ırkında %87 ve Bison Bison, İsviçre Holştayn ile Jersey ırklarında %100 olarak bulmuşlardır. Sunulan çalışmada ise C allelinin frekansı; Güney Anadolu Kırmızısı ırkında %97, Yerli Kara ırkında %94 ve Boz Irk'ta ise %89 olarak hesaplanmıştır. Yerli sığır ırklarımız için bulunan C alleli frekansı, bu çalışmada kullanılan C alleli frekansı ile yakınlık göstermektedir. Khatib ve ark (2007) OLR1 C8232A polimorfizminde C allelinin sıklığını İsviçre Holştayn ırkında %95 olarak saptamışlardır. UW (The University of Wisconsin)'in kaynak popülasyonunda ise C alleli Holştayn ırkı için %64 olarak verilmiştir. Bu iki ırktan İsviçre Holştayn ırkı daha yüksek süt yağı yüzdesine sahip olduğu için iki ırk arasındaki farklılığın sebebinin C alleli frekansı olduğunu ifade etmişlerdir. Komisarek ve ark (2009) OLR1 geni 3'UTR bölgesiyle ilgili benzer çalışmada, C allelinin frekansını %57 ve A allelinin frekansını %43 bulmuşlardır. AA genotipindeki bireylerde süt yağı yüzdesinin az olması, düşük OLR1 gen ekspresyonu ve plazma ox-LDL konsantrasyonunun yeterince az olmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Sunulan çalışmada ise Tablo 2'deki verilere bakıldığında CC genotipinin, AA genotipinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle en yüksek süt yağı miktarının sırasıyla GAK, YK ve BI şeklinde olabileceği düşünülmektedir. Schennink ve ark (2009) OLR1 geni C8232A polimorfizminde C alleli frekansını %71 bulmuşlar ve Khatib ve ark (2006)'nın çalışma raporları ile uyum içinde olduğunu belirtmişlerdir. Hardy-Weinberg dengesine göre değerlendirildiğinde, BI sığır popülasyonunun dengede olmadığı görülmektedir. Bunun nedeninin ise, Boz Irk'ın genel özelliklerine bakıldığında, diğer iki ırktan farklı olarak, dağlık bölgelerdeki orman içlerinde ve engebeli arazilerde yaşamaları ve bu arazi yapısından dolayı bu bölgelerde küçük gruplar halinde buldukları için, akrabalık oranının yüksek oluşundan dolayı, HW dengesi için gerekli şartlardan biri sağlanamamaktadır. Bu durum da BI sığır popülasyonunun HW dengesinden sapmasına sebep olmaktadır. Sunulan çalışma, önceden yapılan (Khatib ve ark 2006, Khatib ve ark 2007, Komisarek ve ark 2009, Schennink ve ark 2009) OLR1 geni C223A polimorfizmi araştır-

Tablo 2. OLR1 3'UTR C8232A genotipik, allelik frekans, gözlenen, beklenen heterozigot değerleri.

	Genotipik Frekans				Allelik Frekans		Heterozigot %	
	CC	CA	AA	EP1	C	A	Gözlenen H0	Beklenen HE
GAK	0.95	0.06	0.0009	0.83	0.97	0.03	6.12	5.94
YK	0.92	0.12	0.004	0.65	0.94	0.06	12.5	11.73
BI	0.77	0.19	0.012	0.003*	0.89	0.11	9.38	19.48

EP1: Exact probability (Haldene 1954), \*p<0.05



malarını destekler niteliktedir.

### Öneriler

Süt yağı verimi ve süt yağı oranı üzerine etkisi olan OLR1 genindeki polimorfik bölgenin; diğer sığır ırkları da kullanılarak ve sütün benzer özelliklerine etki ettiği düşünülen farklı polimorfik bölgelerle birlikte çalışılarak daha yarar sağlayabileceği düşünülmektedir.

### Teşekkür

Araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 10202006). Bu makale yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

### Kaynaklar

- Akman N, Özkütük K, Kumlu S, Yener SM, 2011. Türkiye’de sığır yetiştiriciliği ve sığır yetiştiriciliğinin geleceği. Erişim tarihi: 12.05.2011.
- Brown TA, 2002. Genomes 2. Garland Sci, Wiley-Liss, USA.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS, 1991. Touch-down PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res*, 19, 4008.
- Elmacı C, Öner Y 2007. Et sığırcılığında moleküler genetik yaklaşımlar. *Hayvansal Üretim*, 48, 45-48.
- Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, Sargeant LS, Sorensen A, Steele MR, Zhao X, Womack JE, Hoeschele I, 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, 139, 907-920.

- Haldene JBS, 1954. An exact test for randomness of mating. Department of Biometry. University College, London, UK.
- Khatib H, Leonard D, Schutzkus V, Luo W, Chang YM, 2006. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein Dairy Cattle. *J Dairy Sci*, 89, 1753-1760.
- Khatib H, Rosa GJM, Weigel K, Schiavini F, Santus E, Bagnato A, 2007. Additional support for an association between OLR1 and milk fat traits in cattle. *Anim Genet*, 38, 308-310.
- Kiraz S, Ekinci MS, Özköse E, Akyol İ, 2007. Genetik polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan moleküler teknikler. 5. Ulusal Zootehni Bilim Kongresi. Yüzüncü Yıl Üni. 5-8 Eylül 2007, Van, Türkiye.
- Komisarek J, Dorynek Z, 2009. Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet*, 50, 125-132.
- Miller MP, 1997. Tools for population genetic analyses. *TFFGA*, 1, 3.
- Primrose SB, Twyman RM, 2006. Principles of gene manipulation and genomics, 7th edition, Malden, Blackwell, USA.
- Schennink A, Bovenhuis H, Leon-Kloosterziel K.M, Arendonk M, Visker W 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Anim Genet*, 40, 909-916.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Erişim tarihi: 25.08.2011.
- Ünal RN, Besler H, 2006. Beslenmede sütün önemi, *Sinem Matbası*, Türkiye, pp:1-46.
- Weller JI, 2009. *Quantitative trait loci analysis in animals*, Modular Texts, Cambridge, USA.

