

Kilis, Halep ve Kıl Keçilerinde Beta-Kazein (CSN2) Genindeki Çeşitliliğin Allel Spesifik PCR, Real-Time PCR ve Sekans Analizi ile Araştırılması

Faruk BOZKAYA^{1*}, Akın YiğİN², Mehmet Osman Atlı³

¹Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

³Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

Geliş Tarihi: 08.02.2019

Kabul Tarihi: 31.05.2019

Özet: Bu çalışmada Kilis, Halep ve Kıl keçilerinde Beta-kazein geninin (CSN2) promotor bölgesi ile 7. eksonunun belirli nükleotitlerindeki farklılıkların allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (AS-PCR), Real-Time PCR ve sekans analizi yöntemleriyle araştırılarak söz konusu keçi populasyonlarının bu açıdan genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla toplam 246 DNA örneği kullanılmıştır. CSN2 geninin promotor bölgesindeki g1311T>C mutasyonu AS-PCR ile, 7. eksonun 404. pozisyonundaki C>T mutasyonunun (CSN2C alleli) varlığı ise Real-Time PCR ve sekans analizi ile incelenmiştir. AS-PCR işlemi sonucunda CSN2 geni promotor bölgesi 1311. nükleotitte T allelinin sıklığı bütün populasyonlarda yüksek bulunmakla birlikte Kıl keçilerinde C allelinin sıklığı (0.0489) Halep (0.0190) ve Kilis (0.0188) keçilerinden daha yüksek bulunmuştur. Bütün populasyonlar değerlendirildiğinde 7. eksonun 404. pozisyonundaki T nükleotitinin (CSN2C alleli) sıklığının (0.824) C nükleotitinden (0.176) daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En yüksek CSN2C alleli sıklığı Kıl keçilerinde (0.8864) en düşük ise Kilis keçilerinde (0.6364) gözlenmiştir. Sonuç olarak Kilis, Halep ve Kıl keçilerinde CSN2 geninin promotor bölgesindeki g1311T>C mutasyonu ile 7. eksonun 404. pozisyonundaki C>T mutasyonu açısından çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çeşitliliğin keçi sütünün bileşimi ve beta kazein içeriğini etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Keçi, Süt, CSN2, Polimorfizm.

Investigation on the polymorphism of Beta-Casein gene (CSN2) in Kilis, Aleppo and Hair Goats by using allele specific PCR, Real-Time PCR and sequence analysis

Abstract: The objective of this study was to investigate the genetic variability of Beta-casein gene (CSN2) with respect to certain nucleotides at the promotor region and exon 7 in Kilis, Aleppo and Hair goats by using allele specific polymerase chain reaction (AS-PCR), real-time PCR and sequencing methods. A total of 246 DNA samples were used. Presence of the mutation at the promotor region (g1311T>C) of CSN2 gene was searched by using AS-PCR, while the polymorphism at the 404th nucleotide of the exon 7 was analysed using Real-Time PCR and sequence analysis. By using AS-PCR frequency of the T allele at the 1311th nucleotide of the promotor region was found to be higher than that of C allele, while the frequency of the C allele was higher in Hair goats (0.0489) than that in Aleppo (0.0190) and Kilis goats (0.0188). When all three populations were considered, frequency of T nucleotide (CSN2C allele) at the 404th nucleotide position of the exon 7 (0.824) was higher than that of C nucleotide (0.176). The highest frequency of the CSN2C allele was found in Hair goats (0.8864) while the lowest frequency of this allele was in Kilis goats (0.6364). The results indicated that polymorphism was present with respect to g1311T>C mutation at the promotor region and at the 404th nucleotide of the exon 7 of the CSN2 gene among Kilis, Aleppo and Hair goats. Further studies are required for determining the effect of these polymorphism on the composition and beta-casein content the milk in these goat populations.

Keywords: Goat, Milk, CSN2, Polymorphism.

Giriş

Beta-Kazein (β -Cn) proteini keçi sütünde en fazla miktarda bulunan proteindir ve keçi sütündeki toplam kazein miktarının %50-58'ini oluşturur (Moatsou ve ark., 2004). Keçilerde ilk defa Roberts ve ark. (1992) tarafından cDNA baz dizisine dayanılarak aminoasit dizilimi ortaya konulan β -Cn proteini 223 aminoasitten oluşur ve protein varyantına göre 23.600- 23.870 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Chianese ve ark., 1993; Neveu ve ark., 2002; Persuy ve ark., 1999; Trujillo ve ark., 2000). Beta-kazein proteinini kodlayan ve yaklaşık 9 kb büyüklüğünde olan CSN2 geni en küçüğü 24

(ekson 5) en büyüğü 492 (ekson 7) baz çifti uzunluğunda olan 9 eksondan oluşur (Rjinkels, 2002; Roberts ve ark., 1992). Bu güne kadar CSN2 geninde A, A1, B, C, D, E, O ve O1 şeklinde tanımlanan en az sekiz allel bildirilmiştir (Marletta ve ark., 2007). CSN2C alleli 7. eksonun 177. amino asiti olan alanin yerine valin geçmesiyle karakterizedir. Diğer taraftan Cosenza ve ark. (2007) CSN2 geninin promotor bölgesinde keçi sütünde β -Cn proteininin bulunmamasıyla ilişkilendirilen bir T>C mutasyonu tespit etmişlerdir. Cosenza ve ark. (2007) bu durumun söz konusu değişikliğin gen

ifadesini düzenleyici süreçleri etkilemesinden ya da bu mutasyonun β -Cn sentezini engelleyen başka bir mutasyonla bağlantılı olmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüştür. Cosenza ve ark. (2016) daha sonra bu mutasyonun CSN2 geninin 7. eksonunda bulunan ve CSN201 allelini tanımlayan g.8915C>T (7. ekson 166. aminoasit; 373. nükleotit C>T) mutasyonu ile bağlantı halinde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Keçi sütündeki β -Cn düzeyinin peynir kalitesini etkilediği gösterilmiştir (Chianese ve ark., 1993). Bu proteini yüksek düzeyde içeren keçi sütlerinin pıhtılaşma süresi bu proteini düşük düzeyde içeren keçi sütlerine göre (4-7 dakika) daha kısa, teleme sıklığı ise daha yüksektir. Buna bağlı olarak yüksek β -Cn içeriğine sahip sütlerden elde edilen peynir verimi de daha yüksek olmaktadır (Chianese ve ark., 1993). Keçi sütünün insan beslenmesindeki önemi ve keçi sütü proteinlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmin sütün bileşimini ve teknolojik özelliklerini etkilemesi nedeniyle bu genlerdeki polimorfizm yoğun bir şekilde araştırılmıştır (Bozkaya ve ark., 2008, 2013; Caroli ve ark., 2006; Chessa ve ark., 2005; Cosenza ve ark., 2007, 2016).

Normal olarak tanımlanan (A, B, C, D, E gibi) allelerin her biri keçi sütünde 5g/L β -Cn bulunmasına neden olmaktadır (Cosenza ve ark., 2007; Marletta ve ark., 2005). Buna karşın CSN20 ve CSN201 allelleri mRNA şeklinde sırasıyla normal allellerin %5 ve %10'u düzeyinde ifade edilmektedir (Persuy ve ark., 1999). CSN20 veya CSN201 homozigot bireylerin sütlerinde β -Cn bulunmamakta yada çok az miktarda bulunmaktadır (Cunsolo ve ark., 2005; Persuy ve ark., 1999). Diğer taraftan CSN2 genindeki polimorfizm keçilerde süt verimi parametrelerini de etkilemektedir. İtalyada yetiştirilen Sarda keçi ırkında CSN2A allelini homozigot olarak taşıyan keçilerde süt protein içeriği, CSN2C homozigot keçilerden daha yüksek bulunmuş, en düşük protein içeriği ise CSN2C/01 genotipli keçilerde gözlenmiştir (Pazzola ve ark., 2014; Vacca ve ark., 2014).

Türkiye'deki keçi yetiştiriciliğinin toplam hayvansal üretim içerisindeki payı nispeten düşük olsa da son yıllarda keçi sayısında artış gözlenmektedir (TÜİK, 2019). Özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yoğun keçi yetiştiriciliği yapıldığından bu bölgede keçi yetiştiriciliği ekonomik olarak önemlidir. Bu nedenle bölgede yetiştirilen yerli keçi ırklarının kazein genleri yönünden araştırılması yerli keçi gen kaynaklarımızın genetik olarak tanımlanması ve korunması açısından bilimsel veri sağlayacaktır. Türkiye'deki yerli keçi ırklarının biyokimyasal özellikleri yanında (Paksoy ve İriadam, 2012), genetik olarak tanımlanmasına yönelik bazı çalışmalar bulunmaktadır (Bozkaya ve ark., 2008,

2013; Korkmaz-Ağaoğlu ve ark., 2012; Prinzberg ve ark., 2005). Ancak Türkiye'deki yerli keçi ırklarının beta-kazein (β -Cn) proteinini kodlayan CSN2 genindeki çeşitliliğin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı Kilis, Halep ve Kıl keçilerinde CSN2 promotor bölgesi ve C allelini tanımlayan nükleotit polimorfizmi yönünden genetik çeşitliliğin allel spesifik PCR, Real-Time PCR ve sekans analizi yöntemleriyle araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Sunulan çalışma kapsamında Şanlıurfa ilinde yetiştirilen Halep keçilerinden (n=81), Kilis ilinde yetiştirilen Kilis keçilerinden (n=82) ve Siirt ilinde yetiştirilen Kıl keçilerinden (n=83) daha önce başka bir çalışma kapsamında toplanmış olan toplam 246 kan örneği kullanılmıştır (Harran Üniversitesi Hayvan Deneyle Yere Etik Kurul Kararı 2009/07). Örnekler 81 farklı sürüden toplanmıştır. Kan örneklerinden DNA izolasyonu standart fenol-kloroform ekstraksiyonu (Sambrook ve ark., 1989) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı mikro-hacim spektrofotometre yardımıyla (Denovix, Wilmington, USA) 260/ 280 nm dalga boyunda ölçülmüş ve DNA konsantrasyonu 100 ng/ μ l olacak şekilde ayarlanmıştır.

Tablo 1. Allel Spesifik PCR işleminde kullanılan primerler ve baz dizileri (Cosenza ve ark., 2007).

Hedef Bölge	Pozisyon (#AJ011018)	Primer Dizisi (5'-3')	Ürün Uzunluğu	Yöntem
Promotor	1292-1311	DF1-TCCATTATAGCTTAAGCAAT	184 bç	AS-PCR
		DF2-TCCATTATAGCTTAAGCAAC		
	1457-1475	R: TGGGATGCACGGAAGTTTT		
Ekson 9	10323-10340	F: GGGGGTGAGATGAAGAGT	360 bç	Internal Kontrol
	10663-10682	R: AATGACTGGTTAGGAATAG		

DF1, DF2: Allel spesifik primerler; F: Forward; R: Reverse; bç: baz çifti

CSN2 Geninin Hedef Bölgeleri ve Kullanılan Primerler: İncelenen bölgelerdeki nükleotit pozisyonları ve primerlerin bağlanma bölgelerinin tanımlanmasında Gen Bankası #AJ011018 baz dizisi esas alınmıştır. Söz konusu baz dizisi 10786 bç büyüklüğündedir ve CSN2 geninin promotor bölgesi ile 1.-9. eksonları ile intron bölgelerini içermektedir.

Tablo 2. Real-Time PCR işleminde kullanılan primerler ve hibridizasyon problemlerinin baz dizileri (Sztankoova ve ark., 2008).

Primerler ve Problar	Baz Dizisi (5'-3')	Ürün Uzunluğu
Primerler	BCN F CTTTCTCCAACCGTCATGTTT	241 bç
	BCN R GAACCATTCATTATTGATTTTTTGT	
Problar	Anchor CSN2 CCCTTTCTCAGCCCAAAGTCTGCCTGT-FL	-
	Sensor C Red CCCCAGAAAGCAGTGCCCC ¹	-

BCN F, BCN R; Primer isimleri; bç: baz çifti 1Nokta mutasyonun olduğu nükleotit (C) büyük punto ile ve kalın yazılmıştır.

AS-PCR: CSN2 geninin promotor bölgesinin 1311. nükleotidindeki T>C polimorfizmi Cosenza ve ark. (2007) tarafından bildirilen primerlerin modifiye şekilleri kullanılarak AS-PCR işlemi ile incelenmiştir. AS-PCR işleminde kullanılan primerler ile internal kontrol olarak kullanılan primerlerin baz dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

AS-PCR işleminde her bir örnek için iki reaksiyon karışımı oluşturulmuştur. Bu karışımların birinde Promotor bölgesini çoğaltmak için kullanılan DF1+R diğerinde ise DF2+R ve Ekson 9 F+R primerleri kullanılmıştır. Internal kontrol olarak her bir örnek için aynı reaksiyon karışımına CSN2 ekson 9 bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerler de eklenmiştir (Tablo 1). Reaksiyon karışımı 100 ng genomik DNA, her bir primerden 10 pmol (0.4 µM), 1.25 U Taq-DNA polimeraz, her bir dNTP'den 200 µM, 2 mM MgCl₂, ve 2.5 µl 10 X reaksiyon tampon solüsyonu içerecek şekilde 25 µl olarak hazırlanmıştır. PCR işlemindeki ısıl işlemler Cosenza ve ark. (2007) tarafından bildirildiği şekilde 95 °C 5 dakika ilk denatürasyonun ardından 35 döngü 95 °C 30 saniye, 58 °C 30 saniye ve 72 °C 1 dakika olacak şekilde uygulanmıştır.

AS-PCR işleminin sonucunda elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforez işlemi ile ayrılmış ve ethidium bromid ile boyanarak ultraviyole ışığı ile görünür hale getirilmiştir. Bu yöntemde kullanılan primer çiftlerinden biri ile ürün veren örnekler homozigot her ikisi ile ürün veren örnekler ise heterozigot olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 3. CSN2 geni promotor bölgesi 1311. nükleotidde (AJ011018) gözlenen genotip ve allel frekansları.

Populasyon	n	Genotip Frekansları			Allel Frekansları		χ ² -Testi
		TT	TC	CC	T	C	
Halep	81	78 (0.9620)	3 (0.0380)	0 (0)	0.9810	0.0190	P>0.05
Kilis	82	80 (0.9750)	1 (0.0125)	1 (0.0125)	0.9812	0.0188	P<0.001
Kil	83	76 (0.9150)	6 (0.0722)	1 (0.0128)	0.9511	0.0489	P<0.05
Toplam	246	234 (0.9512)	10 (0.0408)	2 (0.0080)	0.9716	0.0284	P>0.05

Real-Time PCR ile Ekson 7'nin İncelenmesi: CSN2 geni 7. ekson ve 7. intronun bir bölümünü içine alan 266 bç uzunluğundaki bir bölge Sztankoova ve ark. (2008) tarafından bildirilen primerler ve yöntem ile çoğaltılmıştır. Bu eksonun 404. nükleotidindeki (AJ011018 kayıt numaralı baz dizisinin 8946. nükleotiti) T>C polimorfizminin varlığı floresan boya ile işaretlenmiş olan özel problemler yardımıyla incelenmiştir. Bu işlemler için kullanılan primerler ve problemlere ilişkin bilgiler Tablo 2'de sunulmuştur.

Real-Time PCR için kullanılan Reaksiyon karışımı 100 ng genomik DNA, her bir primerden (BCN F ve BCN R) 20 pmol, 0.5 U Taq polimeraz, her bir dNTP'den 200 µM, 2.5 mM MgCl₂, ve 2.5 µl 10X Reaksiyon Buffer içerecek şekilde 25 µl olarak hazırlanmıştır. PCR işlemi Sztankoova ve ark. (2008) tarafından bildirildiği şekilde 94 °C 2 dakika ilk denatürasyonun ardından 30 döngü 94 °C 45 saniye, 56 °C 60 saniye ve 73 °C 75 saniye olacak şekilde uygulanmıştır.

Elde edilen PCR ürünlerinden 10 µl başka bir tüpe aktarıldıktan sonra her bir probdan (Anchor CSN2 ve Sensor C Red) 1.6 µM olacak şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım Real-Time PCR cihazına (Rotorgene Q, Qiagen, USA) yüklenerek erime eğrisi analizi yapılmıştır. Bu işlem için önce 3 dakika 95 °C'lik bir uygulamadan sonra 2 dakika 40 °C'lik bir sıcaklık uygulanmıştır. Daha sonra sıcaklık 95 °C'ye çıkıncaya kadar saniyede 0.1 °C arttırılmıştır. Hedef bölgeye bağlanmış olan problemlerin zincirden ayrılması ortaya çıkan ışığın yoğunluğu şeklinde gözlenmiştir. Bu analizde homozigot örneklerde tek, heterozigot örneklerde ise iki ışık piki beklenmektedir.

Sekans analizi: CSN2 geni 7. Eksonun ilgili bölgesi PCR işlemiyle çoğaltıldıktan sonra sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizine 54 örnek dahil edilmiştir. Sekans analizi için kullanılan PCR işlemi 20 µl hacminde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı 0.5 µM primer (CSN2 F), 10 µl sekans master mix (BigDye Cycle Sequencing kit ver. 3.1, Applied Biosystems, Foster City, USA) ve 3 µl PCR ürünü olacak şekilde hazırlanmıştır. Sekans analizi PCR işleminde 95 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonundan sonra 95 °C 30 saniye, 52 °C 30 saniye ve 72 °C 20 saniye 35 döngü olarak uygulanmıştır. Sekans işleminde kullanılacak ürün spin kolon saflaştırma yöntemiyle diğer reaksiyon bileşenlerinden temizlenmiştir. PCR ürünlerinin baz dizileri ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems) otomatik sekans analiz cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen baz dizisi görüntüleri BioEdit (Hall, 1999) programı yardımıyla görüntülenmiş ve incelenmiştir.

Tablo 4. Ekson 7. 404. nükleotidde gözlenen genotip ve allel frekansları.

Populasyon	n	Genotip Frekansları			Allel Frekansları		χ ² -Testi
		TT	TC	CC	T	C	
Halep	21	15 (0.7143)	6 (0.2857)	0 (0)	0.8571	0.1429	P>0.05
Kilis	11	4 (0.3636)	6 (0.5454)	1 (0.0910)	0.6364	0.3636	P>0.05
Kil	22	17 (0.7727)	5 (0.2273)	0 (0)	0.8864	0.1136	P>0.05
Toplam	54	36 (0.667)	17 (0.315)	1 (0.0185)	0.824	0.176	P>0.05

Verilerin analizi: Gözlenen allel ve genotip frekansları doğrudan sayım ile belirlenmiştir. Gözlenen genotip frekanslarının beklenen genotip frekanslarıyla uyumlu olup olmadığı Ki-kare tesiti ile analiz edilmiştir.

Tablo 5. Bazı keçi popülasyonlarında CSN2 genindeki allellerin frekansları.

Popülasyon	n	Allel frekansları						
		A*	B	C	D	E	O	O1
Saanen ¹	76	0.507	-	0.493	-	-	-	0.0
Camosciata ¹	112	0.317	-	0.638	-	-	-	0.0
Jonica ¹	70	0.207	-	0.700	-	-	-	0.093
Maltese ¹	58	0.129	-	0.819	-	-	-	0.052
Orobica ¹	81	0.025	-	0.975	-	-	-	0.0
Valessana ²	83	1.000	-	-	-	-	-	0.0
Maltese ²	70	0.964	-	-	-	-	-	0.036
Jonica ²	110	0.964	-	-	-	-	-	0.036
Frisa ³	70	0.200	-	0.721	-	0.079	-	0.0
Orobica ³	66	0.008	-	0.992	-	0.0	-	0.0
Verzasca ³	67	0.254	-	0.746	-	0.0	-	0.0
Camosciata ³	88	0.341	-	0.659	-	0.0	-	0.0
WHS ⁴	125	0.316	-	0.684	-	-	-	-
BHS ⁴	105	0.430	-	0.570	-	-	-	-
Banat's White ⁵	73	0.270	-	0.730	-	-	-	-
Carpatina ⁵	82	0.490	-	0.510	-	-	-	-
Sarda ⁶	935	0.375	-	0.597	-	-	-	0.028

¹Chessa ve ark. (2005); ²Sacchi ve ark. (2005); ³Caroli ve ark. (2006); ⁴Sztankoova ve ark. (2008); ⁵Kusza ve ark. (2016); ⁶Vacca ve ark. (2014)

*A= Araştırmaya dahil edilmemiş olan diğer alleller de bu grupta verilmiştir,

- = Araştırmaya dahil edilmemiş;

WHS: White Shorthaired Goats;

BHS: Brown Shorthaired Goats;

Bulgular

CSN2 geninin promotor bölgesindeki hedef bölgenin, AS-PCR ile çoğaltılması ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

AS-PCR işlemi sonucunda CSN2 geni promotor bölgesi 1311. nükleotitte tespit edilen genotip ve allel frekansları Tablo 3'te sunulmuştur. Bütün popülasyonlarda T allelinin sıklığı oldukça yüksek bulunmakla birlikte Kıl keçilerinde C allelinin sıklığı (0.0489) Halep (0.0190) ve Kilis (0.0188)

keçilerinden daha yüksek bulunmuştur. Halep keçilerinde CC genotipi gözlenmemiştir.

Ekson 7'nin 404. nükleotitindeki polimorfizmin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-Time PCR işlemi ve hibridizasyon problemleri ile gerçekleştirilen erime analizinin sonuçları Şekil 2'te gösterilmiştir. Kullanılan primerler ve PCR yöntemi ile yapılan analizde allellerin birbirlerinden yeterince ayrılmadığı görülmüştür. Bu nedenle söz konusu bölgenin incelenmesi amacıyla sekans analizi kullanılmıştır. Sekans analizi sonucunda tespit edilen genotip ve allel frekansları Tablo 4'te sunulmuştur. Bütün popülasyonlarda T nükleotidinin (CSN2C allel) sıklığının C nükleotidinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. En yüksek CSN2C alleli sıklığı Kıl keçilerinde (0.8864) en düşük ise Kilis keçilerinde (0.6364) gözlenmiştir.

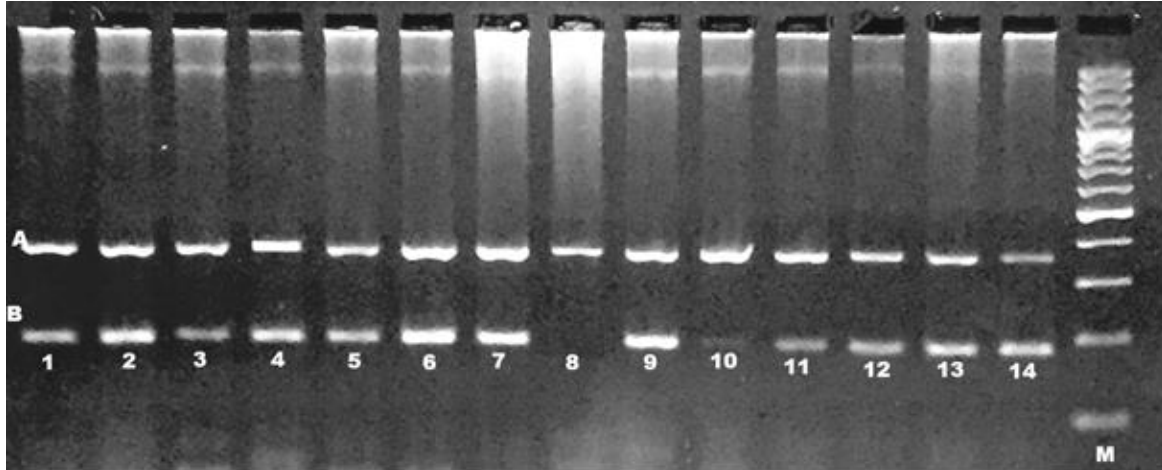
Sekans analizi sonucunda ayrıca 7. intronun 45. nükleotitinde T>C polimorfizmi tespit edilmiştir. Sekans analizi ile incelenen bütün örneklerde 7. eksonun 404. nükleotit pozisyonundaki T nükleotidinin 7. intronun 45. nükleotit pozisyonundaki T nükleotitiyle haplotip oluşturduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde 7. eksonun 404. nükleotit pozisyonundaki C nükleotidinin 7. intronun 45. nükleotit pozisyonundaki T nükleotitiyle haplotip oluşturduğu tespit edilmiştir. Sekans analizi ile incelenen hiç bir örnekte 7. eksonun 373. nükleotitinde CSN201allelini tanımlayan C>T polimorfizmi tespit edilmemiştir.

Tartışma

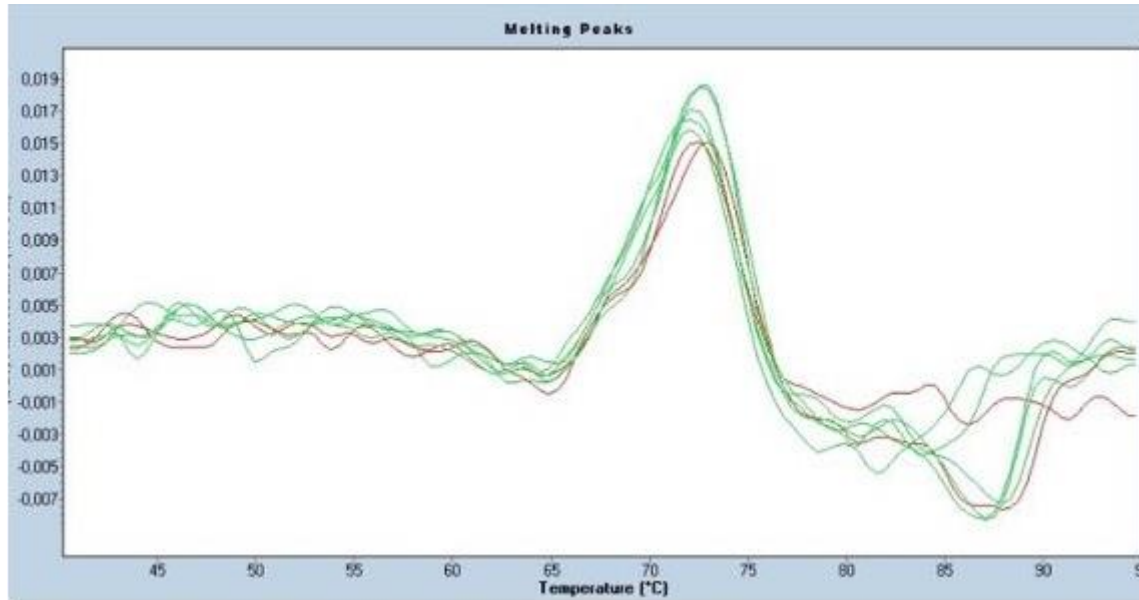
Keçilerde kazein proteinlerini kodlayan genlerde büyük bir varyasyon bulunmaktadır. Bu varyasyon tek aminoasit değişikliğine yada stop kodon oluşmasına yol açabildiği gibi bulunduğu yerden sonraki amino asit dizilimini tamamen değiştiren (çerçeve mutasyonu) tek nükleotit delesyonu (silinme) şeklinde de olabilmektedir (Cosenza ve ark., 2007; Persuy ve ark., 1999). Bazı alleller ise daha büyük DNA parçalarını içeren eklenme veya silinme mutasyonları ile karakterizedir (Ramunno ve ark., 2000, 2001). Keçilerde CSN2 genindeki mutasyonların belirlenmesinde mutasyonun yeri ve durumuna göre tek iplik yapısal polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) (Caroli ve ark., 2006; Chessa ve ark., 2005), PCR ürünlerinin restriksiyon enzimi kesim bölgesi polimorfizmi (PCR-RFLP) (Cosenza ve ark., 2005), AS-PCR (Balteanu ve ark., 2015; Cosenza ve ark., 2007), hibridizasyon problemleri yada TaqMan problemlerinin kullanıldığı real-time PCR yöntemi (Kusza ve ark., 2016; Sztankoova ve ark., 2008) ve sekans analizi (Singh ve ark., 2015) yöntemleri kullanılmıştır.

Sunulan çalışmada CSN2 geninin promotor bölgesindeki g1311T>C baz değişiminin belirlenmesi

amacıyla Cosenza ve ark. (2007) tarafından bildirilen



Şekil 1. CSN2 geni promotor bölgesinden elde edilen AS-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. A Sırası İnternal Kontrol (9. Eksonun çoğaltılması ile elde edilen PCR ürünleri). B) Yedi adet örneğe ait AS- PCR ürünleri. 1-2, 3-4, 5-6, 11-12, 13-14 heterozigot (TC) , 7-8, 9-10, homozigot TT örnekler; M: Standart (100 bç merdiven).



Şekil 2. Ekson 7 404. nükleotiddeki polimorfizmin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-Time PCR işleminin sonucu.

AS-PCR yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada Cosenza ve ark. (2007) tarafından bildirilen primer çiftinin kullanıldığı ön denemelerde, incelenen bütün bireylerde hedef bölgenin her iki primer setiyle de çoğaltıldığı gözlenmiştir. Bu nedenle kullanılan primerlerin spesifitesini arttırmak amacıyla ilgili primerlerin (DF1 ve DF2) 3' ucundaki nükleotidten bir önceki nükleotit değiştirilmiştir. Bu işlem farklı allellerin daha spesifik olarak tanınmasını sağlamaktadır (Liu ve ark., 2012).

Sunulan çalışmada CSN2 geninin promotor bölgesindeki 1311. nükleotidde C allelinin sıklığının oldukça düşük (%2.84) olduğu gözlenmiştir. Bu allelin sıklığının İtalya'da yetiştirilen keçi popülasyonlarında genel olarak %8.00-8.37 olarak

bildirilmiştir (Cosenza ve ark., 2007, 2016). Bu değer sunulan çalışmada bulunan değerden oldukça yüksektir. Bu farklılık incelenen popülasyonların farklı olmasından kaynaklanabilir.

Sunulan çalışmada CSN2 C allelini tanımlayan g8940C>T mutasyonunun belirlenmesi amacıyla Sztankoova ve ark. (2008) tarafından bildirilen Real-Time PCR işlemiyle hibridizasyon problemleri kullanılmıştır. Keçilerde süt proteinlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmin tespit edilmesi amacıyla hibridizasyon problemleri ya da TaqMan problemleriyle birlikte Real-Time PCR işlemi başka araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır (Feligini ve ark., 2005; Kyseľová ve ark., 2012).

Sztankoova ve ark. (2008) erime analizinde C allelinin 55 °C'de A allelinin ise 65 °C'de erime gösterdiğini bildirmiştir. Ancak sunulan çalışmada yapılan ön denemelerde erime analizinde yaklaşık 72 °C de erime (ışık piki) gözlenmiştir. Ayrıca, hedef bölge PCR işlemiyle çoğaltılabildiği halde kullanılan hibridizasyon problemleriyle yapılan erime analizinde farklı alleller birbirinden ayıramamıştır (Şekil 3). Bu durum sunulan çalışmada kullanılan Real-Time PCR cihazı ve uygulanan melting curve analizinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle sunulan çalışmada hedef bölge sekans analizi ile de incelenmiştir. Polimorfizm tespitinde güçlü bir yöntem olan sekans analizi ekson 7'deki polimorfizmin belirlenmesinde çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (Balteanu ve ark., 2015; Singh ve ark., 2015).

Sunulan çalışmada 54 bireye ait DNA örneği sekans analizi amacıyla kullanılmıştır. CSN2 C allelinin (7. Eksonun 404. nükleotit pozisyonundaki T nükleotiti) sıklığı %82.4, diğer allellerin (C nükleotiti) sıklığı ise %17.6 olarak bulunmuştur (Tablo 4). Sunulan çalışmada elde edilen bulgularla uyumlu olarak daha önce yapılmış olan araştırmalarda da CSN2 C allelinin sıklığı incelenen populasyonların çoğunda diğer allellerden daha yüksek bulunmuştur (Tablo 5). Sunulan çalışmadan farklı olarak İtalya'da yetiştirilen Saanen ırkı keçilerde C nükleotitinin sıklığı T nükleotitinden daha düşük bulunmuştur (Chessa ve ark., 2005).

Sonuç

İncelenen populasyonlarda CSN2 geni promotör bölgesinin g1311T>C mutasyonunun düşük oranda bulunduğu, CSN2 geni 7. Eksonunun 404. nükleotitindeki C allelini tanımlayan g8940C>T polimorfizminin ise yaygın olarak bulunduğu görülmüştür. İncelenen populasyonlarda CSN2 geni promotör bölgesinin g1311T>C mutasyonunun 7. Eksonun 373. nükleotitindeki O allelini tanımlayan g.8915C>T mutasyonu ile bağlantılı olup olmadığının belirlenmesi ve 7. eksondaki henüz bilinmeyen başka mutasyonların varlığının araştırılması için 7. eksonun tamamının sekans analizi ile incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca tespit edilen varyantların çalışmaya dahil edilen keçi populasyonlarında süt verimi sütün protein ve özellikle β-Cn miktarını etkileyip etkilemediğinin belirlenmesi için daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Harran üniversitesi bilimsel araştırmalar projeleri koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No.15116/2017).

Kaynaklar

- Balteanu VA, Pascal C, Vlaic A, 2015: Genetic polymorphisms of As1-Casein (CSN1S1) and B-casein (CSN2) genes in carpathian goat breed. *Lucrări Ştiinţifice - Seria Zootehnie*, 63, 193-198.
- Bozkaya F, Mundan D, Karabulut O, Yertürk M, Gurler S, Aral F, 2008: An investigation on the distribution of O and D alleles of the CSN1S2 gene in goat populations raised in south eastern region of Turkey. *Small Ruminant Res*, 78, 193-196.
- Bozkaya F, Gürler Ş, Yertürk M, 2013: Genetic variability of CSN1S1 gene in goat populations raised in Southeastern Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19, 147-152.
- Caroli A, Jann O, Budelli E, Bolla P, Jager S, Erhardt G, 2001: Genetic polymorphism of k-casein (CSN3) in different breeds and characterization at DNA level. *Anim Genet*, 32, 226-230.
- Caroli A, Chiatti F, Chessa C, Rignanese D, Bolla P, Pagnacco G, 2006: Focusing on the goat casein complex. *J Dairy Sci*, 89, 3178-3187.
- Chessa S, Budelli E, Chiatti F, Cito AM, Bolla P, Caroli A, 2005: Predominance of β-Casein (CSN2) C allele in goat breeds reared in Italy. *J Dairy Sci*, 88, 1878-1881.
- Chianese L, Garro G, Nicolai MA, Mauriello R, Ferrani P, Pizzano R, Cappuccio LP, Addeo F, Ramunno L, Rando A, Rubino R, 1993: The nature of β-casein heterogeneity in caprine milk. *Lait*, 73,533-547.
- Cosenza G, Paciullo A, Gallo D, Di Bernardino D, Ramunno L, 2005: A Sspl PCR-RFLP detecting a silent allele at the goat CSN2 locus. *J Dairy Res*, 72, 456-459.
- Cosenza G, Paciullo A, Colimono L, Mancus A, Di Bernardino D, Ramunno L, 2007: An SNP in the goat CSN2 promotör region is associated with the absence of β-casein in milk. *Anim Genet*, 38, 655-658.
- Cosenza G, Iannaccone M, Pico BA, Ramunno L, Capparelli R, 2016: The SNP g.1311T>C associated with the absence of β-casein in goat milk influences CSN2 promotör activity. *Anim Genet*, 47,615-617.
- Cunsolo V, Galliano F, Muccilli V, Saletti R, Marletta D, Bordonaro S, Foti S, 2005: Detection and characterization by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry of a goat β-casein associated with a CSN2 nullallele. *Rapid Commun Mass Sp*,19, 2943-2949.
- Feligini M, Frati S, Cubric CV, Brambilla A, Parma P, Curik I, Enne G, 2005: Caprine αs1-casein polymorphism: characterization of A, B, E and F variants by means of various biochemical and molecular techniques. *Food Technol Biotech*, 43,123-132.
- Hall TA, 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series*, 41,95-98.
- Korkmaz AÖ, Çınar KB, Akyüz B, Elmaz Ö, Özçelik MM, Saatçi M, Ertuğrul O, 2012: Identification of β-lactoglobulin gene SacII polymorphism in Honamli, Hair and Saanen goat breeds reared in Burdur vicinity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 385-388.

- Kusza S, Ilie DE, Sauer M, Nagy K, Patras I, Gavojdian D, 2016: Genetic polymorphism of CSN2 gene in Banat White and Carpat in a goats. *Acta Biochim Pol*, 63,577-580.
- Kysel'ová J, Rychtářová J, Sztankóová Z, Czerneková V, 201: Simultaneous identification of CSN3 and LGB genotypes in cattle by high-resolution melting curve analysis. *Livestock Sci*, 145, 275-279.
- Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, Xiurong Z, Hanzhong W, Hua W, 2012: An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, 8, 34.
- Marletta D, Bordonaro A, Guastella AM, D'Urso G 2005: Genetic polymorphism of calcium sensitive caseins in Sicilian Girgentana and Argentatadell'Etna goat breeds. *J Anim Breed Genet*,121, 52-56.
- Marletta D, Criscione A, Bordonaro S, Guastella AM, D'Urso G, 2007: Casein polymorphism in goat's milk. *Lait*, 87, 491-504.
- Moatsou G, Samolada M, Panagiotou P, Anifantakis E, 2004: Casein fraction of bulk milks from different caprine breeds. *Food Chem*, 87, 75-81.
- Neveu C, Molle D, Moreno J, Martin P, Leonil J, 2002: Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: Genetic variants and phosphorylations. *J Protein Chem*, 21, 557-567.
- Paksoy N, İriadam M, 2012: Kilis keçilerinde serum selenyum düzeylerinin araştırılması. *Harran Univ Vet Fak Derg*, 1, 6-8.
- Pazzola M, Dettori ML, Pira E, Noce A, Paschino P, Vacca GM, 2014: Effect of polymorphisms at the casein gene cluster on milk renneting properties of the Sarda goat. *Small Ruminant Res*, 117, 124-130.
- Persuy MA, Printz C, Medrano JF, Mercier JC, 1999: A single nucleotide deletion resulting in a premature stop codon is associated with marked reduction of transcripts from a goat β -casein null allele. *Anim Genet*, 30, 444-451.
- Prinzenberg EM, Gutscher K, Chessa S, Caroli A, Erhardt G, 2005: Caprine K-casein (CSN3) polymorphism: new developments in molecular knowledge. *J Dairy Sci*, 88, 1490-1498.
- Ramunno L, Cosenza G, Pappalardo M, Pastore N, Gallo D, Digregorio P, Masina P, 2000: Identification of the goat CSN1S1 F allele by means of PCR-RFLP method. *Anim Genet*, 31, 342-343.
- Ramunno L, Longobardi E, Pappalardo M, Rando A, Digregorio P, Cosenza G, Mariani P, Pastore N, Masina P, 2001: An allele associated with a non-detectable amount of α_2 casein in goat milk. *Anim Genet*, 32, 19-26.
- Rijnkels M, 2002: Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol*, 7, 327-345.
- Roberts B, Di Tullio P, Vitale J, Hehir K, Gordon K, 1992: Cloning of the goat β -casein-encoding gene and expression in transgenic mice. *Genetics*, 121, 255-62.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989: Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sacchi P, Chessa S, Budelli E, Bolla P, Ceriotti G, Soglia D, Caroli A 2005: Casein haplotype structure in five Italian goat breeds. *J Dairy Sci*, 88, 1561-1568.
- Singh LV, Jayakumar S, Sharma A, Gupta SK, Dixit SP, Gupta N, Gupta SC, 2015: Comparative screening of single nucleotide polymorphisms in β -casein and κ -casein gene in different live stock breeds of India. *Metagene*, 4, 85-91.
- Sztankóová Z, Kysel'ová J, Kott T, Kottová, E, 2008: Technical Note: Detection of the C allele of β -Casein (CSN2) in Czech dairy goat breeds using LightCycler analysis. *J Dairy Sci*, 91, 4053-4057.
- Trujillo AJ, Casals I, Guamis B, 2000: Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electro sprayionization-mass spectrometry. *J Dairy Sci*, 83, 11-19.
- TÜİK, 2019: Türkiye İstatistik Kurumu, Temel İstatistikler, Hayvansal Üretim. <http://tuik.gov.tr/UstMenu.do?metod=temelist>, Erişim Tarihi;04.02.2019.
- Vacca GM, Dettori ML, Piras G, Manca F, Paschino P, Pazzola M, 2014: Goat casein genotypes are associated with milk production traits in the Sarda breed. *Anim Genet*, 45, 723-731.

*Yazışma Adresi: Faruk BOZKAYA

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı. Eyyübiye, ŞANLIURFA

e-mail: farukbozkaya@yahoo.com