

Saanen Keçilerinde β -laktoglobulin Genotiplerinin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi

Cengiz Elmacı*, Yasemin Öner, Mehmet Koyuncu

Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Bursa

*e-posta: elmaci@uludag.edu.tr; Tel: + 90 (224) 294 1554; Fax: + 90 (224) 442 8152

Özet

Bu çalışmada toplam 28 Saanen keçisinde β -laktoglobulin geninin 7.ekzonu ile 3' flanking bölgesi arasındaki polimorfizm PCR-RFLP yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. PCR ürünlerinin *SacII* restriksiyon enzimleri ile kesimi S1 ve S2 olarak tanımlanan iki allel ile üç genotipin (S1S1, S1S2, and S2S2) varlığını ortaya koymuştur. β -lg lokusundaki allel frekansları S1 ve S2 allelleri için 0.64 ve 0.36 olarak hesaplanmıştır. Çalışılan popülasyonda Hardy-Weinberg dengesinden sapma gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: β -laktoglobulin, keçi, polimorfizm.

Determination of β -lactoglobulin Genotype Using by PCR - RFLP in Saanen Goats

Abstract

With the present work the polymorphism in exon 7 to the 3' flanking region of β -lactoglobulin gene in a 28 Saanen goats were investigated using by PCR-RFLP. Digestion of PCR product with *SacII* restriction enzyme revealed two alleles namely S1 and S2 and three genotypes (S1S1, S1S2, and S2S2) in investigated populations. The allele frequencies of S1 and S2 at β -lg locus were 0.64 and 0.36. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was not detected in studied populations.

Key words: β -lactoglobulin, goat, polymorphism.

Giriş

Aschaffenburg ve Drewry (1955)'nin sığırlarda β -laktoglobulin (β -lg) polimorfizmine yönelik ilk çalışmasından sonra süt proteinleri polimorfizmine yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bunun sonucu olarak da hayvan yetiştiriciliğinde ve süt endüstrisinde bu konu giderek önem kazanmış ve özellikle de süt proteinleri polimorfizmi ile verim özellikleri, süt kompozisyonu ve kalitesi arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmaya yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Marziali ve Ng-Kwai-Hang, 1986; Pagnacco ve Caroli, 1987; Ng-Kwai-Hang ve ark., 1990; Baranyi ve ark., 1993).

β -lg ruminant sütlerinde bulunan en önemli süt serum proteinidir. Bugüne kadar sığırlarda ve koyunlarda gerek protein gerekse DNA düzeyinde β -lg polimorfizmine yönelik bir çok çalışma yapılmış ve bu lokusun polimorfik olduğu belirlenerek çeşitli allellerinin varlığı saptanmıştır (Eigel ve ark., 1984; Gaye ve ark., 1986; Erhardt, 1989; Oner ve Elmacı, 2006; Elmacı ve ark., 2006). Bu çalışmalara paralel olarak keçilerle protein düzeyinde yapılan araştırmalarda β -lg lokusunda A ve B olmak üzere iki allelin varlığı belirlenmiştir (Moioli ve ark., 1998). Bununla birlikte DNA düzeyinde, amino asit değişimiyle sonuçlanan bir varyant tanımlanmamıştır.

Son yıllarda, İspanyol ve Fransız keçi ırklarıyla DNA düzeyinde yapılan çalışmalarda β -lg geninin 7.ekzonunun ve proksimal promotor bölgesinin polimorfik olduğu gösterilmiştir (Pena ve ark., 2000; Yahyaoui ve ark., 2000)

Türkiye'de keçilerde β -lg polimorfizmine yönelik çalışmalar yapılmış, ancak bu çalışmalarda polimorfizmin varlığı protein düzeyinde araştırılmıştır. Özdil ve Asal (2002), Türkyılmaz (2003) ve Gürcan (2005) çeşitli keçi popülasyonlarıyla yaptıkları çalışmalarında β -lg lokusunda protein düzeyinde β -lg^A ve β -lg^B olmak üzere iki allel bulunduğunu bildirmişlerdir. Türkiye çeşitli keçi popülasyonlarında DNA düzeyinde polimorfizmi saptamaya yönelik bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Bu nedenle sunulan bu çalışmada keçilerde β -lg geninin 7.ekzonu ile 3' flanking bölgesi arasındaki olası polimorfizmi PCR-RFLP yöntemiyle belirlemek üzere yürütülen bir projenin elde edilen ilk verilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

DNA izolasyonu ve β -lg geninin çoğaltılması

U.Ü. Ziraat Fakültesi ve Veteriner Fakültesi işletmelerinden olmak üzere iki farklı sürüden toplam olarak 28 adet Saanen keçisinden alınan kanlardan izole

edilen DNA molekülleri araştırma materyali olarak kullanılmıştır. DNA izolasyonu ticari olarak satılan DNA izolasyon kitleri (Fermentas, K0512) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların miktar ve saflıkları % 0.8'lik agaroz jel elektroforezi ve Biofotometre (BioPhotometer, Eppendorf) ile belirlenmiştir.

β -Ig geninin çoğaltılmasında içinde 50–100 ng genomik DNA, 12.5 μ l 2X PCR Master Mix (Fermentas, K0171) ve her primerden 0.5 μ M olan toplam 25 μ l reaksiyon karışımı kullanılmıştır. PCR uygulamasıyla ilgili gen bölgesinin çoğaltılmasında Pena ve ark. (2000) tarafından önerilen ve nükleotid dizilişi aşağıda verilen primerlerden yararlanılmıştır;

Forward 5'-CGGGAGCCTTGGCCCTCTGG-3'

Reverse 5'-CCTTTGTCGAGTTGGGTGT-3'

PCR uygulamasında kullanılan döngü aşağıdaki şekilde programlanmıştır;

95°C 5 dakika

95°C 30 saniye

65°C 1 dakika

72°C 90 saniye

72°C 5 dakika

} 35 kez

Elde edilen PCR ürünlerine etidyum bromür içeren % 2'lik agaroz jel elektroforezi uygulanarak ilgili bölgenin çoğalıp çoğalmadığı kontrol edilmiştir.

Restriksiyon enzimi ile kesim

Elde edilen PCR ürünleri 37°C'de 2 saat süreyle 10 U *Sac*II restriksiyon enzimi (RE) ile kesilmiştir. Kesim sonucu oluşan fragmentler % 3'lük agaroz jelde analiz edilmiş ve UV ışığı altında gözlemlenmiştir. Bireylerin β -Ig lokusu bakımından genotipleri de jel üzerinde ortaya çıkan band modellerine göre saptanmıştır.

İstatistik analiz

β -Ig lokusunda bulunan allel genlerin frekanslarının tahmin edilmesinde gen sayma yöntemi kullanılmıştır. Populasyonun Hardy-Weinberg denge kontrolü ve tüm hesaplamalar PopGene32 paket programında yapılmıştır (Yeh ve ark., 2000).

Sonuçlar ve Tartışma

Türkiye'de çeşitli keçi populasyonlarında β -Ig polimorfizmine yönelik sınırlı sayıda ve protein düzeyinde yapılan araştırmalarda β -Ig lokusunun polimorfik olduğu ve bu lokusta iki allel bulunduğu saptanmış (Çizelge 1), Saanen keçilerinde β -Ig^A allelinin diğer keçi populasyonlarında ise β -Ig^B allelinin predominant olduğu gözlenmiştir.

β -Ig lokusundaki polimorfizmin DNA düzeyinde araştırıldığı bu çalışmada β -Ig geninin 7.ekzonu ile 3' flanking bölgesinden 426 bp'lik bölge başarılı bir şekilde çoğaltılmış ve tek nükleotid polimorfizminden kaynaklanan ve PCR-RFLP yöntemi ile belirlenebilen iki allel (S1 ve S2) ve bu durumda olası 3 genotip (S1S1, S1S2 ve S2S2) saptanmıştır. Bu iki allel +4601. pozisyondaki tek nükleotid polimorfizminden kaynaklanan ve RE ile kesim sonucu belirlenebilen allellerdir. RE ile kesim sonucu jel üzerinde gözlenen fragment büyüklükleri birbirlerinden farklı olmuş ve bireyler β -Ig lokusu bakımından bu farklılık temelinde genotiplendirilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2'nin incelenmesi ile de görülebileceği gibi çalışılan populasyonda heterozigot genotipli (S1S2) bireyler ile S1S1 homozigot genotipli bireyler eşit miktarlarda bulunurken, S2 alleli frekansının düşüklüğüne bağlı olarak en az S2S2 homozigot genotipli bireyler saptanmıştır. Ele alınan populasyonda gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farklılık önemli olmadığından populasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 1. Türkiye'de çeşitli keçi populasyonlarında yapılan çalışmalar ve β -Ig allel frekansları

İrk/Populasyon	n	β -Ig ^A	β -Ig ^B	Kaynak
Kıl keçisi/Ermenek	140	0.029	0.971	Özdil ve Asal, 2002
Saanan	78	0.994	0.006	Türkyılmaz, 2003
Ankara keçisi/Kazan	48	0.083	0.917	Gürcan, 2005
Ankara keçisi/Eldivan	55	0.036	0.964	Gürcan, 2005
Kıl keçisi/Antalya	69	0.116	0.884	Gürcan, 2005

Çizelge 2. 426 bp uzunluğundaki fragmentin SacII restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu elde edilen genotipler, fragment büyüklükleri ve allel gen frekansları

Genotip	Fragment Büyüklüğü(bp)	n	Genotip frekans	Allel frekansı	χ^2
PCR ürünü (kesilmemiş)	426				
S1S1	349 ve 77	12 (11.46)*	0.43 (0.41)*	S1=0.64	0.203 ^{ÖD}
S1S2	426, 349 ve 77	12 (13.09)*	0.43 (0.46)*	S2=0.36	
S2S2	426	4 (3.45)*	0.14 (0.13)*		

* Parantez içindeki rakamlar Hardy-Weinberg dengesine göre beklenen değerleri göstermektedir. ÖD= önemli değil

Keçilerde β -lg geninin bu çalışmada ele alınan bölgesiyle yapılan diğer çalışma sonuçları da bu araştırmada bulunanlarla benzerlik göstermektedir. Fransız ve İspanyol keçileriyle yapılan bir araştırmada S1 ve S2 olmak üzere iki allel tespit edilmiş ve S1 allelinin frekansı bu çalışmada olduğu gibi S2 allelinden yüksek bulunmuştur (Pena ve ark., 2000). Kumar ve ark. (2006) çeşitli keçi ırklarıyla yaptıkları araştırmalarında, β -lg geninin bu çalışmada ele alınan gen bölgesinde, yine iki allel saptamışlar ancak S2 alleli frekansının S1'den daha fazla olduğunu ve S2 alleli frekansının % 47-100 arasında değiştiğini göstermişlerdir. Bu çalışmaların dışında keçilerde β -lg geninin başka bölgelerinde de çeşitli polimorfik bölgeler olduğu bildirilmiştir. Graziano ve ark. (2003) ve Ballester ve ark. (2005) çeşitli keçi populasyonlarında β -lg geninin proximal promotor bölgesinde ve 1., 2., 3. ve 6. exonlarında da polimorfik noktaların bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmayla üzerinde durulan keçi populasyonunda β -lg lokusunda genetik polimorfizm olduğu anlaşılmıştır. Süt proteinleri ile özellikle de β -lg tipleri ile süt üretimi, süt kompozisyonu ve çeşitli verim özellikleri arasında bazı ilişkilerin bulunması bu gibi polimorfizmlerden seleksiyonda yararlanma olanağını gündeme getirmektedir. Örneğin Hindistan yerli keçilerinden olan Jamunapari ve Barbari keçilerinde β -lg genotiplerinin 90.gün süt üretimi üzerine etkileri olduğu bildirilmektedir (Kumar ve ark., 2006). Dolayısıyla da özellikle yerli keçi populasyonlarımızın çeşitli süt proteinleri bakımından genotiplerinin belirlenmesi ve bu tiplerin çeşitli verimler üzerine olan etkilerinin de araştırılması gerekmektedir. Aynı zamanda β -lg geninin proksimal promotor bölgesi gibi diğer bölgelerindeki polimorfizmler üzerinde de durulmalı ve bu bölgelerin karakterizasyonları da yapılmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenen Z-2006/37 nolu projeden hazırlanmıştır.

Kaynaklar

- Aschaffenburg, R., Drewry J. 1955. Occurrence of different β -lactoglobulins in cow's milk. *Nature*. 176:218-219.
- Ballester, M., Sanchez, A., Folch, J.M. 2005. Polymorphisms in goat β -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research*. 72:379-384.
- Baranyi, M., Bozse, Z.S., Buchberger, J., Krause, I. 1993. Genetic polymorphism of milk proteins in Hungarian spotted and Hungarian grey cattle: a possible new genetic variants of β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*. 76:630-636.
- Eigel, W.N., Butler, J.E., Ernstrom, C.A., Farrell, H.M., Harwalkar, V.R., Jenness, R., Whitney, R.M. 1984. Nomenclature of proteins of cows milk: 5th revision. *Journal of Dairy Science*. 67:1599-1631.
- Elmaci, C., Oner, Y., Balcioglu, M.S. 2006. Genetic polymorphisms of β -Lactoglobulin gene in Native Turkish sheep breeds. *Biochemical Genetics*. 44:379-384.
- Erhardt, G. 1989. Evidence for a third allele at the β -lactoglobulin (β -Lg) locus of sheep and its occurrence in different breeds. *Animal Genetics*. 20:197-207.
- Gaye, P., Hue-Delhaie, D., Mercier, J.C., Soulier, S., Vilotte, J.L., Furet, J.P. 1986. Ovine β -lactoglobulin messenger RNA: nucleotide sequence and mRNA levels during functional differentiation of the mammary gland. *Biochimie*. 68: 1097-1107.
- Graziano, M., D'Andrea, M., Angiolillo, A., Lagonigro, R., Pilla, F. 2003. A new polymorphism in goat β -lactoglobulin promoter region. *Italian Journal of Animal Science*. 2:67-70.

- Gürcan, N. 2005. Çeşitli Tiftik ve Kıl keçisi popülasyonlarında β -laktoglobulin polimorfizmi. Yüksek Lisans Tezi, A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kumar, A., Rout, P.K., Roy, R. 2006. Polymorphism of at the β -lactoglobulin gene in Indian goats and its effect on milk yield. *Journal of Applied Genetics*. 47:49-53.
- Marziali, A.S., Ng-Kwai-Hang, K.F. 1986. Effects of milk composition and genetic polymorphism on cheese composition. *Journal of Dairy Science*. 69:2533-2542.
- Moioli, B., Pilla, F., Tripaldi, C. 1998. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*. 27:185-195.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., Monardes, H.G., Hayes, J.F. 1990. Association between genetic polymorphisms of milk proteins and production traits during three lactations. *Journal of Dairy Science*. 73: 3414-3420.
- Oner, Y., Elmacı, C. 2006. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. *International Journal of Dairy Technology*. 59(3):180-182.
- Özdil, F., Asal, S. 2002. β -Laktoglobulin polimorfizmi. III. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 14-16 Ekim 2002, Ankara.
- Pagnacco, G., Caroli, A. 1987. Effect of casein and β -lactoglobulin genotypes on renneting properties of milks. *Journal of Dairy Research*. 54: 479-485.
- Pena, R.N., Sanchez, A., Folch, J.M. 2000. Characterization of genetic polymorphism in goat β -lactoglobulin gene. *Journal of Dairy Research*. 67:217-224.
- Türkyılmaz, O. 2003. Yüksek süt verimli Saanen keçilerinde süt protein polimorfizmi. Doktora Tezi, U.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Yahyaoui, M.H., Pena, R.N., Sanchez, A., Folch, J.M. 2000. Rapid communication: polymorphism in the goat β -lactoglobulin proximal promoter region. *Journal of Animal Sciences*. 78:1100-1101.
- Yeh, F., Yang, R.C., Boyle, T. 2000. Popgene(v.1.32), Microsoft Windows-based freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/Pop32.exe>.