T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YERLİ ANADOLU MANDALARINDA VE ESMER SIĞIRLARDA PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE PROLAKTİN GENİ POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk KAPLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Konya, 2010

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YERLİ ANADOLU MANDALARINDA VE ESMER SIĞIRLARDA PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE PROLAKTİN GENİ POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk KAPLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu tez 19/01/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir

Prof. Dr. Saim BOZTEPE
(Danışman)

Prof. Dr. Ayhan ÖZTÜRK
(Üye)

Doç. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU
(Üye)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YERLİ ANADOLU MANDALARINDA VE ESMER SIĞIRLARDA PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE PROLAKTİN GENİ POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Selçuk KAPLAN
Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Saim BOZTEPE
2010, 27

Jüri: Prof. Dr. Saim BOZTEPE
Prof. Dr. Ayhan ÖZTÜRK
Doç. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Bu çalışmada amaç, PCR-RFLP yöntemini kullanarak Yerli Anadolu Mandalarında ve Esmer Sığırlarda prolaktin geni polimorfizmini belirlemektir. Araştırmada hayvan materyalini 45 baş Anadolu Mandası ile 30 baş Esmer sığır oluşturmuştur.

Prolaktin geniyle ilgili Yerli Anadolu mandalarında herhangi bir polimorfizme rastlanılmamıştır. Bununla birlikte Esmer sığırlarda prolaktin geniyle ilgili polimorfizm tespit edilebilmiştir. Esmer sığırlarda A allelinin frekansı 0.82 olarak belirlenirken B allelinin frekansı 0.18 olarak belirlenmiştir. Genotip frekansları ise AA genotipi için 0.63, AB genotipi için 0.37 olarak bulunmuştur. Esmer sığırlarda BB genotipli birey bulunamamıştır.

Anahtar Kelimeler: Yerli Anadolu mandası, Esmer sığır, prolaktin, polimorfizm, PCR-RFLP

ABSTRACT

Masters Thesis

THE DETERMINATION OF PROLACTIN GENE POLYMORPHISM USING PCR-RFLP METHOD WITHIN INDIGENOUS WATER BUFFALO AND BROWN SWISS

Selçuk KAPLAN

Selçuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Saim BOZTEPE

2010, 27

Jury: Prof. Dr. Saim BOZTEPE

Prof. Dr. Ayhan ÖZTÜRK

Assoc. Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

The objective of this research was to determine the prolactin gene polymorphism within Indigenous Anatolian Water Buffalo and Brown Swiss by using Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism. The study material constituted 45 Indigenous Anatolian Water Buffalo and 30 Brown Swiss.

There has not been any polymorphism related to prolactin gene in İndigenous Anatolian Water Buffalo. However, the polymorphism association with prolactin gene could be detected in Brown Swiss. In Brown Swiss, allel frequencies (A, B) were 0.82 and 0.18. The frequencies of AA and AB 0.63, 0.37 respectively. The BB genotype was not found.

Key Words: Indıgenous Water Buffalo, Brown Swiss, prolactin, polymorphism, PCR-RFLP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Zootekni Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Saim BOZTEPE'ye, teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca beni destekleyen, yönlendiren, bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen ve problemler karşısında çözümleyici kimliğiyle devreye giren Arş. Gör. İbrahim AYTEKİN'ne teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tez çalışmamda bilgi ve desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Fulya ÖZDİL, Arş. Gör. Fatma İlHAN, Uzm. Hüseyin BAYIR ve istatistik analizlerinde bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Yrd. Doç. Dr. İsmail KESKİN'e ayrı ayrı teşekkür ediyorum.

Örneklerin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen değerli Konuklar Tarım İşletmesi çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca her zaman yanımda olduklarını hissettiğim sevgili aileme ve sevgili eşim Nuray KAPLAN'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

SİMGELER

RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism - Restriksiyon Uzunluk Parça Polimorfizmi
AFLP	Amplified Fragment Lenght Polymorphism - Çoğaltılmış Uzunluk Parça Polimorfizmi
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA - Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
PCR	Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Quantitative Trait Loci - Kantitatif Özellik Lokusları
STR	Simple Sequence Repeat - Basit Tekrar Dizileri
STS	Sequence Tagged Site; Dizisi Etiketlenmiş Alanlar
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats-Değişken Sayılı Ardarda Tekrarlar
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region - Sekans Özgü Çoğaltılmış Bölge
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi
bç (bp)	Baz çifti
Taq	*Termus Aquaticus*
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Boric asit-EDTA
EDTA	Ethylendinitrilotetraaceticacid
ng	Nanogram
µg	Mikrogram
nm	Nonometre
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
l	Litre
U	Ünite
UV	Ultraviyole
OD	Optic Density
M	Molar
rpm	Rotation per minute-Dakikada döngü sayısı

d	Döngü
s	Saniye
dk	Dakika

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1.	Prolaktin Geninin Şematik Gösterimi ……	3
Şekil 2.2.	Manda ve Sığırlarda Prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin PCR-RFLP band örneği ve *Rsa*I kesim bölgesinin şematik gösterimi ……	8
Şekil 3.1	Jel tepsisine jelin dökülmesi …….	16
Şekil 3.2.	PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi ……	16
Şekil 3.3.	Yatay elektroforez cihazı ……..	17
Şekil 3.4.	Jel dokümantasyon sistemi ……...	18
Şekil 3.5.	RsaI kesimi sonucu genotiplere ait bantlar ……...	19
Şekil 4.1.	Yerli Anadolu Mandaları ve Esmer ırkı Sığırlarda prolaktin geninin ekzon 3 *Rsa* I kesim bölgesi jel görüntüsü ……...	20

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 2.1.	Prolaktin geniyle ilgili günümüze kadar yapılmış çalışmalar ..	4
Çizelge 3.1.	Araştırmada kullanılan tampon çözeltilerin molaritesi / miktarı ve içerikleri ……..	12
Çizelge 3.2.	Prolaktin geninde PCR ile çoğaltılması hedeflenen gen bölgesi, kullanılacak olan primerler, elde edilecek PCR ürünleri ile birlikte genotipleri …….	13
Çizelge 3.3.	PCR reaksiyonunda kullanılan moleküler biyoloji hassasiyetindeki kimyasallar ve miktarları ……..	14
Çizelge 3.4.	Kesim mixi ……...	18
Çizelge 4.1	Esmer Sığırlarda prolaktin ekzon 3 Rsa I kesim bölgesine göre allel ve genotip frekansları ile X^2 testi…….	21

İÇİNDEKİLER

		Sayfa No
1.	GİRİŞ ……...	1
2.	KAYNAK ARAŞTIRMASI ……	3
3.	MATERYAL VE METOT ……..	9
3.1.	Materyal …….	9
3.2.	Metot ……..	9
3.2.1.	Kan örneklerinin alınması ……...	9
3.2.2.	DNA izolasyonu ……..	10
3.2.3.	Genomik DNA miktarının hesaplanması ……	12
3.2.4.	Kullanılan primerlerin seçimi ……..	13
3.2.5.	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) …….	13
3.2.6.	Elektrolit çözeltisi ……	15
3.2.7.	Jelin hazırlanması ve dökülmesi ……..	15
3.2.8.	PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi ……	16
3.2.9.	Jele yüklenen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi ……...	17
3.2.10.	Jelin boyanması ve bantların elde edilmesi …….	17
3.2.11.	Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi …….	18
3.2.12.	Kesilen ürünlerin jele yüklenmesi ……...	18
3.2.13.	Kesim ürünlerinin değerlendirilmesi ve genetik analizler ..	19
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA ……	20
5.	KAYNAKLAR ……	25

1. GİRİŞ

Günümüzde hayvan yetiştirmede moleküler metotların kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Canlılara özgü olan genetik yapının tahmin edilmesine yarayan moleküler metotlara DNA Parmak izi adı verilmektedir. Bu metotlar günümüzde en çok adli tıpta, tıpta teşhis koyucu tanıda, ebeveyn belirlemede, bitki ve hayvan populasyonlarında genetik çeşitlilik ve akrabalığın belirlenmesinde, yabani formların araştırılmasında, evrim çalışmalarında ve gen haritalarının oluşturulması gibi çeşitli alanlarda ve hayvan yetiştirmede kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan moleküler markör sistemleri, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), STS (Sequence Tagged Site; Dizisi Etiketlenmiş Alanlar), STR (Short Tandem Repeats; Basit Dizi Tekrarları) veya mikrosatellit genotipleme ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism; Tek Nükleotid Polimorfizmi) olarak sıralanabilir.

RFLP yöntemi günümüzde DNA düzeyinde polimorfizm elde etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler arasında gösterilmektedir. RFLP yöntemi, iki sarmaldan oluşan DNA molekülünün belirli nükleotid sıralarını tanıyarak kesebilen bakteriyel kökenli restriksiyon enzimlerinin (*restriction endonuclease*) bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde alınan sonuçların, laboratuvar şartlarına göre değişkenliğinin az olması ve güvenilir olması yöntemin hayvan yetiştirmede markör olarak kullanımını artırmaktadır.

Kantitatif karakterlerden biri olan süt verimi ve sütün kompozisyonu bir çok faktör tarafından etkilenmektedir. Süt üretimi genetik, sinirsel ve hormonal sistem ve daha sayılabilecek birçok faktörün birlikte çalışması sonucu oluşmaktadır. Süt verimini etkileyen hormonlar arasında prolaktin hormonu önemli bir yere sahiptir. Prolaktin yaklaşık 80 yıl önce saflaştırılmış ve tanımlanmış ilk hipofiz bezi hormonudur.

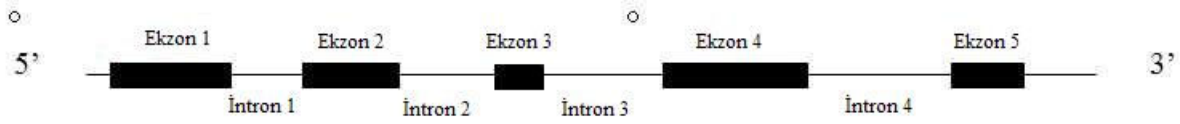
Prolaktin laktasyon ve meme bezleri gelişimi üzerine olan uyarıcı etkilerinden dolayı "pro – laktin" adını almıştır. Prolaktin'in 300'den fazla biyolojik aktivitesi olduğu bilinmektedir. Bu aktiviteler içerisinde su ve elektrolit dengesi, büyüme ve gelişme, bağışıklık ve üreme fonksiyonu gibi bir çok farklı aktivite bulunmaktadır (Gregerson 2006). Prolaktin hormonunun hipofiz bezi dışında nöronlar, prostat, dış amniyon zarı, meme epiteli, endotel hücreleri, deri hücreleri ve bağışıklık hücreleri gibi bir çok farklı yerden salgılandığı tespit edilmiştir (Lastra ve ark. 2002).

Çiftlik hayvanlarında ekonomik özelliklerle ilişkili olan spesifik genleri belirlemek için öncelikli olarak aday genler üzerinde çalışılması gerekmektedir. Süt sığırlarında marköre dayalı seleksiyonda bazı genler süt verimi özellikleriyle ilgili aday genler arasında gösterilmektedir. Prolaktin geni, gerek meme bezleri gelişimi üzerine olan etkileri gerekse laktasyonun başlaması ve devamlılığı üzerine olan etkilerinden dolayı süt verimi özellikleriyle ilgili aday genler arasında ön sıralarda gelmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'de sayıları gittikçe azalan ve bu nedenle gen kaynakları koruma programı kapsamına alınan Yerli Anadolu Mandalarında ve kültür ırkı sığır varlığı içerisinde önemli bir yeri olan Esmer sığırlarda prolaktin geniyle ilgili DNA parmak izlerinin PCR-RFLP metoduyla çıkarılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Prolaktin hipofizin özel hücrelerinden biri olan lactotroph hücrelerinden sentezlenen ve salgılanan bir hormondur. Hipofiz bezlerinde prolaktinin salgı ve sentezinde görevli olan (lactotrorphs yada somatrophs'lar) hipofiz bezinin hücresel populasyonunun % 20 -50'sini oluşturmaktadır. Polipeptid yapısında bir hormon olan prolaktin'in amino asit sayısı canlı türlerine göre az çok değişiklik göstermektedir. Örneğin sıçan ve farelerde prolaktin 197 amino asitten oluşurken insan, koyun, sığır ve domuzda 199 amino asitten oluşmaktadır (Freeman ve ark. 2000).

Prolaktin hormonu; insan genomunun 6. kromozomunda bulunan bir tek gen tarafından şifrelenmiştir. Sığırda ise 23. kromozomda bulunan. prolaktin geni 10 kb büyüklüğünde, 5 ekzon ve 4 introndan oluşmaktadır.(Dybus ve ark. 2005). Şekil 2.1'de prolaktin geninin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.1. Prolaktin Geninin Şematik Gösterimi

Prolaktin geni çiftlik hayvanlarında laktasyonun başlaması ve devamlılığı, sütün protein, laktoz, yağ üretimi ve üreme gibi birçok fonksiyonda görev alır. Bu özelliklerinden dolayı prolaktin geni çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde önemli aday genler arasında gösterilmektedir. Prolaktin geni polimorfizmi ile ilgili olarak çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların önemli bir kısmını RFLP ve SSCP mutasyonları oluşturmaktadır (Dybus ve ark. 2005, Brym ve ark. 2005). Mutasyonlara örnek olarak Mitra ve ark. 'nın (1995) tespit ettiği ekzon 3'teki A-----G noktasal mutasyonu örnek olarak gösterilebilir. Mutasyonun endonüklease *Rsa*I kesim enzimi ile belirlendiği ve protein yapısında herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmektedir. Çizelge 2.1'de prolaktin geniyle ilgili sığırlarda ve mandalarda günümüze kadar yapılan çalışmalar sıralanmış olup, devamında çizelge 2.1 ile ilgili açıklamalara yer verilmiştir.

Çizelge 2.1 Prolaktin geniyle ilgili sığır ve mandalarda bazı çalışmaların listesi

Kaynak	Manda	Sığır	Hayvan Sayısı	Allel Frekansları (%)		GSA
				A	B	
Alıpanah ve ark, 2007		Siyah Alaca	72	0.71	0.29	AB*
Skinkytė ve ark, 2005		Siyah Alaca	52	0.79	0.11	α
Maksymiec ve ark, 2008		Siyah Alaca	720	0.58	0.41	α
Dybus ve ark, 2002		Siyah Alaca	1086	0.86	0.13	α
Udina ve ark, 2001		Siyah Alaca	23	0.80	0.20	α
Dybus ve ark, 2005		Siyah Alaca	242	0.85	0.14	α
Kumari ve ark, 2008		Siyah Alaca	223	0.90	0.10	α
Miceikienė ve ark, 2006		Siyah Alaca	109	0.80	0.20	α
Khatami ve ark, 2005		Siyah Alaca	32	0.98	0.05	α
Dybus ve ark, 2005		Jersey	185	0.30	0.69	α
Kumari ve ark, 2008		Jersey	143	0.55	0.45	α
Skinkytė ve ark, 2005		Litvanya Kırmızı Sığırı	136	0.87	0.13	α
Öztabak ve ark, 2008		Güneydoğu Anadolu Kırmızısı	40	0.74	0.26	α
Miceikienė ve ark, 2006		Litvanya Kırmızı Sığırı	168	0.77	0.23	α
Udina ve ark, 2001		Rus Gorbatov Kırmızı Sığırı	35	0.91	0.8	α
Öztabak ve ark, 2008		Doğu Anadolu Kırmızısı	40	0.56	0.44	α
Mitra ve ark, 1995		Sahiwal	57	0.51	0.49	α
Kumari ve ark, 2008		Sahiwal	13	0.88	0.12	α
Kumari ve ark, 2008		Kankrej	26	0.60	0.40	α
Sacravarty ve ark, 2008		Kankrej	57	0.51	0.49	BB*
Mitra ve ark, 1995		Alman Siyah Alaca	23	0.80	0.20	α
Khatami ve ark, 2005		Alman Siyah Alaca	32	0.61	0.39	α
Ghasemi ve ark, 2009		Montbeliarde	120	0.89	0.11	AA*
Alıpanah ve ark, 2007		Kırmızı alaca	98	0.79	0.21	BB*
Udina ve ark, 2001		Aryshire Sığırı	46	0.85	0.14	α
Khatami ve ark, 2005		Yoroslav	120	0.65	0.35	α
Mitra ve ark, 1995	Murrah		53	0.93	0.07	α
Mitra ve ark, 1995	Nili-Ravi		19	0.84	0.16	α
Ladani ve ark, 2003	Mehsani		44	0.50	0.50	α
Ladani ve ark, 2003	Surti		30	0.48	0.52	α
Ladani ve ark, 2003	Jaffarabadi		23	0.43	0.57	α

GSA : Genotiple süt verimi arasındaki ilişki
* : Genotiple süt verimi arasındaki ilişki önemli
α : Genotiple süt verimi ilişkilendirilmemiş

Mitra ve ark. (1995), sığırlarda ve mandalarda büyüme hormonu ve prolaktin lokusuyla ilgili polimorfizmleri araştırmışlardır. Araştırmacılar, Sahiwal sığırları, Murrah mandaları, Nili-Ravi mandaları, Braunvieh Siyah Alacaları ve Alman Siyah Alacalarında yürüttükleri çalışmada prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda A alleli için frekansları sırasıyla 0.51, 0.93, 0.84, 0.61, ve 0.80 olarak bulmuştur.

Chung ve ark. (1996), Siyah Alaca sığırlarda prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda A alleli için frekansı 0.73 olarak bulmuşlardır. Bununla birlikte AA genotipli hayvanların AB ve BB genotipli hayvanlardan daha fazla süt verimine ve süt yağı yüzdesine sahip olduklarını belirtmiştir.

Udina ve ark. (2001), Rus Gorbatov Kırmızı sığırı, Rus Ayrshire sığırı ve Siyah Alaca sığırlar üzerinde prolaktin ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesi ile ilgili yaptıkları çalışmada A allelinin frekansını Rus Gorbatov Kırmızı, Rus Ayrshire ve Siyah Alaca sığırları için sırasıyla 0.91, 0.85 ve 0.80 olarak bildirmiştir.

Dybus (2002), 1086 baş Siyah Alaca sığırda prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesi ile ilgili çalışmada A allelinin frekansını 0.86 olarak bulmuştur. Bununla birlikte AA genotipli hayvanların sütlerinin AB genotipli hayvanlarının sütlerine nazaran daha fazla protein içerdiğini bildirmiştir.

Ladani ve ark. (2003), Jaffarabadi, Mehsani ve Surti mandalarında yaptığı çalışmada prolaktin ekzon 3 *Rsa*I kesimi sonucunda AA, AB ve BB genotipleri için sırasıyla 156, 156, 82, 74 bç ve 74 ,82 bç'lik kesim ürünü elde edileceğini bildirmiş olup, söz konusu manda ırklarında AA genotipini tespit edememişlerdir. Mehsani mandalarında ise sadece AB genotipini tespit edebilmiştir. Jaffarabadi, Mehsani ve Surti mandalarında A alleli için frekanslar sırasıyla 0.50, 0.48 ve 0.43, olarak bildirilmiştir.

Dybus ve ark. (2005), Siyah Alaca ve Jersey sığırlarında, prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda Siyah Alaca ve Jersey sığırlarında A allelinin frekansını sırasıyla 0.85 ve 0.30 olarak bildirmişlerdir.

Khatami ve ark. (2005), Rus ve Alman Siyah Alaca ve Yoroslav sığırlarında süt verimi üzerine prolaktin ve büyüme hormonu genine bağlı polimorfizmlerin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, Rus ve Alman Siyah Alaca ile Yoroslav sığırlarında

prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda A alleli için frekansları sırasıyla 0.95, 0.61, 0.65 olarak bulmuştur.

Skinkytė ve ark. (2005), Litvanya Siyah ve Kırmızı Alacalarından oluşan sürüde prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda Litvanya Siyah ve Kırmızı Alacaları için A allelinin frekansını sırasıyla 0.79 ve 0.87 olarak bildirmiştir.

Miceikienė ve ark. (2006), 109 baş Litvanya Siyah Alacası , 49 baş Litvanya Ak Sırtlı sığırı, 70 baş Litvanya Açık Gri sığırı ve 168 baş Litvanya Kırmızı sığır ırklarından olmak üzere toplamda 396 süt sığırında sığır genetik markörleriyle performans özellikleri arasındaki ilişkileri araştırmıştır. Araştırmacılar bu çalışmada prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda Litvanya Siyah Alacası, Litvanya Ak Sırtlı sığırı, Litvanya Açık Gri sığırı ve Litvanya Kırmızı sığır ırklarında A alleli için frekansları sırasıyla 0.80, 0.97, 0.95, 0.77 olarak bildirmiştir.

Kumari ve ark. (2008), farklı sığır ırklarında prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda Siyah Alaca, Jersey, Sahiwal ve Kankrej sığırlarında A alleli için frekansları sırasıyla 0.90, 0.55, 0.88, ve 0.60 olarak bildirmiştir.

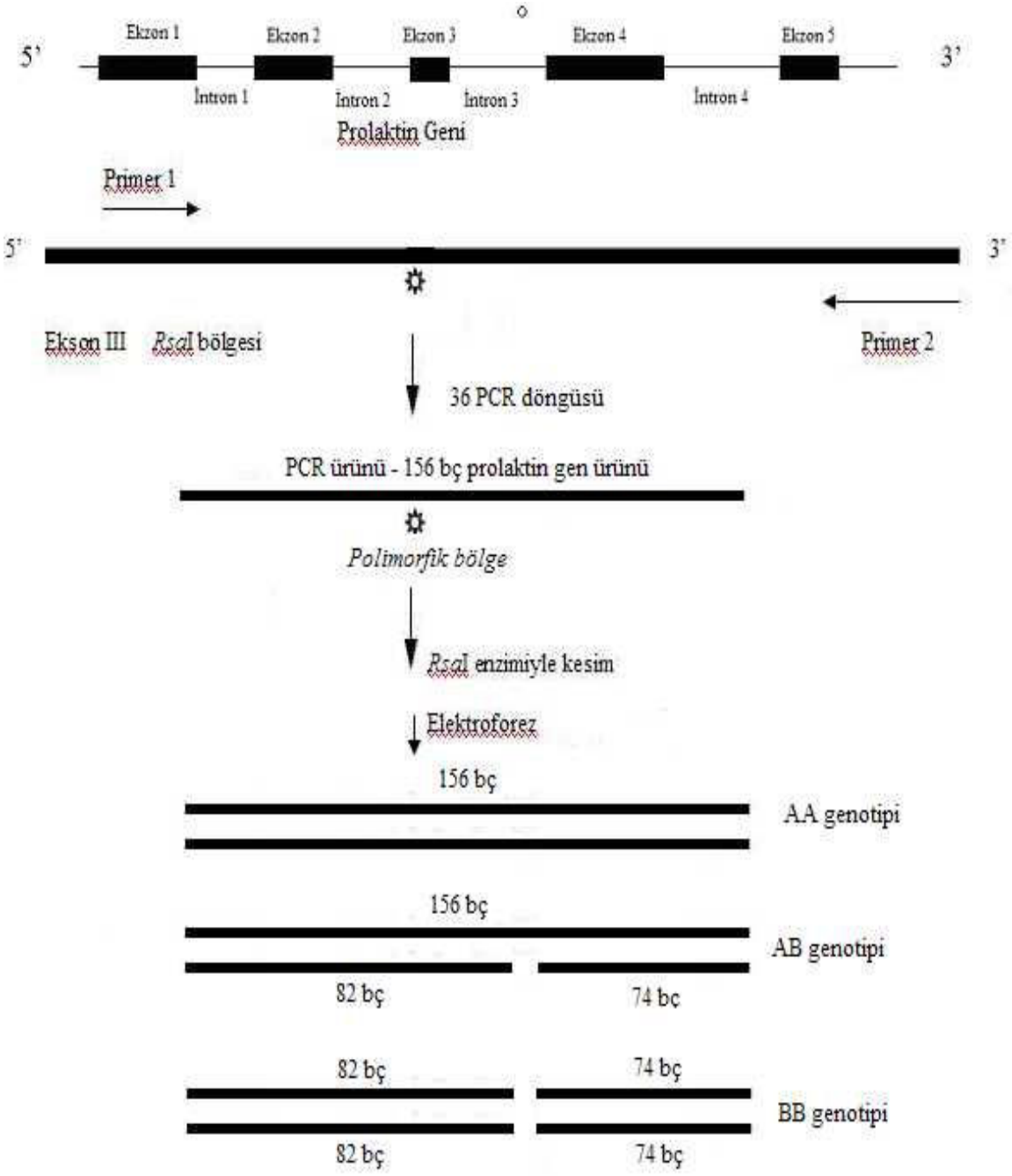
Alipanah ve ark. 'ları (2007), Rus Kırmızı ve Siyah Alaca Sığırlarında yaptıkları çalışmada, prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda AA, AB ve BB genotiplerini tespit etmişlerdir. PRL- *Rsa*I allel frekansları Siyah Alaca ve Rus Kırmızı Alacalarında A alleli için sırasıyla 0.71 ve 0.79 olarak bulmuşlardır. AA, AB ve BB genotiplerinin frekanslarını ise Siyah Alacalarda sırasıyla 0.500, 0.413 ve 0.087 olarak Kırmızı Alacalarda ise 0.598, 0.392 ve 0.01 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, Siyah Alaca sığırlarda, AB genotipini taşıyan hayvanların AA ve BB genotipini taşıyan hayvanlardan sırasıyla 356.57 ve 761.17 kg daha fazla süt verimine sahip olduklarını belirtmiştir. Çalışmalarında Siyah Alacalarda sütün yağ ve protein verimi bakımından genotipler arasında herhangi bir farklılık görülmediğini, ancak yağ yüzdesi bakımından BB genotipli hayvanların AA ve AB genotipli hayvanlardan daha fazla % yağa sahip olduklarını ifade etmişlerdir. Kırmızı Alacalarda ise, BB genotipini taşıyan hayvanların AA ve AB genotipini taşıyan hayvanlardan sırasıyla 681.62 ve 906.63 kg daha fazla süt verimine sahip olduklarını belirtmiştir. Ayrıca BB genotipli hayvanların AA ve AB genotipli hayvanlara kıyasla daha fazla yağ ve protein verimine sahip olduklarını, yağ

yüzdesi bakımından ise AA ve AB genotipli hayvanların BB genotiplilerden daha fazla yağ yüzdesine sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Öztabak ve ark. (2008), Doğu Anadolu Kırmızısı ve Güneydoğu Anadolu Kırmızısı sığır ırklarında prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda allel frekanslarını A alleli için sırasıyla 0.56 ve 0.74 olarak bildirmiştir. Avrupa süt sığırı ırklarında genellikle A allelinin frekansının yüksek olduğu sığırların daha yüksek süt verimine sahip olduklarını, dolayısıyla Doğu Anadolu Kırmızısı ve Güneydoğu Anadolu Kırmızısı sığır ırklarında da süt veriminin yüksek olabileceği sonucuna varmışlardır.

Sacravarty ve ark. (2008), 57 baş Kankrej sığırlarında prolaktin ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde A alleli için frekansı 0.51 olarak bulmuştur

Maksymiec ve ark. (2008), süt sığırlarında prolaktin geni polimorfizmi ve somatik hücre sayısını araştırdıkları çalışmalarında A allelinin frekansını 0.582 olarak, AA, AB ve BB genotiplerinin frekanslarını ise sırasıyla 0.185, 0.020 ve 0.795 olarak belirlemişlerdir. BB genotipine sahip ineklerin AA ve AB genotiplerine kıyasla daha fazla somatik hücre, daha fazla yağ yüzdesi ve daha düşük süt verimine sahip olduklarını ve prolaktin geni ile somatik hücre arasındaki çok önemli bulunan ilişki nedeniyle, meme sağlığının tespit edilmesinde prolaktin geninin markör olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Şekil 2.2'de manda ve sığırlarda prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin PCR-RFLP band örneği ve *Rsa*I kesim bölgesinin şematik gösterimi verilmiştir (Ladani ve ark. 2003).



Şekil 2.2. Manda ve Sığırlarda Prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin PCR-RFLP band örneği ve *Rsa*I kesim bölgesinin şematik gösterimi (Ladani ve ark. 2003).

Ghasemi ve ark. (2009), 120 baş Montbeliarde sığırında prolaktin geni ekzon 3 bölgesinin *Rsa*I enzimi ile kesimi sonucunda allel frekansının A alleli için 0.89 olduğunu ve ayrıca AA genotipli hayvanların AB ve BB genotipli hayvanlardan sırasıyla 1005 ve 970 kg daha fazla süt verimine sahip olduğunu bildirmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırmada hayvan materyalini 45 baş Anadolu Mandası ile 30 baş Esmer sığır oluşturmuştur. 45 baş Anadolu Mandası'nın 18'i Amasya, 12'si Sivas, 7'si Afyon ve 8'i de Konya illerinden, 30 baş Esmer sığır ise TİGEM'e bağlı Konuklar Tarım İşletmesi'nden temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1.Kan örneklerinin alınması

DNA izolasyonu amacıyla sığırların boyun toplardamarından (*Vena jugularis*) EDTA'lı vakumlu kan alma tüpleri ve kanül kullanılarak alınan kan örnekleri soğuk zincirde korunarak (+4^{o}C) Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Hayvancılık Biyoteknoloji Laboratuvarına en kısa sürede getirilmiş ve DNA izolasyonu işlemi tamamlanana kadar derin dondurucuda –20^{o}C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Miller ve ark. (1988) tarafından bildirilen tuzla çöktürme metoduna göre yapılmış ve aşağıdaki gibi optimize edilmiştir.

1. -20 ºC'de muhafaza edilen kan örnekleri çözülene kadar oda sıcaklığında (24-25 ºC) bekletilmiştir.

2. Her bir kan örneğinden 500 µl alınarak 1.5 ml'lik ependorf tüp içine konulmuştur.

3. Örneklerin üzerine 1.000 µl Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi (Çizelge 3.1) ilave edilmiş ve kısa bir süre vorteksle iyice karıştırarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

4. Bekletme süresinin sonunda örnekler 3000 rpm (manda), 5000 rpm'de (sığır) de 10 dk santrifüj edilmiştir.

5. Ependorf tüplerin üst kısmında toplanan sıvı kısım (süpernatant) dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Dipte kalan peletlerin (hücre kısmı) rengi gözlenerek, peletlerin rengi beyaz olana kadar Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi ile tekrar (en fazla 3 defa) muamele edilmiştir.

6. Peletlerin üzerine 1.000 µl Fizyolojik Tampon Çözeltisi (Çizelge 3.1) eklenmiş ve kısa bir süre karıştırılmıştır.

7. Örnekler 5000 rpm' de 10 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda sıvı kısım dikkatli bir şekilde tekrar uzaklaştırılmıştır.

8. Peletlerin üzerine 500 µl Lisis TE Tampon Çözeltisi (Çizelge 3.1) eklenmiş ve peletlerin iyice çözünmesi sağlanmıştır.

9. Çözülen peletlerin üzerine 100 µl SDS (%10 luk) solusyonu ve 3 µl proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek hafifçe karıştırılmış ve 65 ºC'de 1.5 saat su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince her 15 dakikada bir hafifçe karıştırılmıştır.

10. İnkübasyondan çıkarılan örneklerin üzerine 250 µl 6M NaCl Çözeltisi (Çizelge 3.1) eklenmiş ve 15 dk vorteksle iyice karıştırılmıştır.

11. Örnekler 12.000 rpm' de 10 dk santrifüj edilmiştir.

12. Santrifüj sonunda üstte kalan ve DNA moleküllerini içeren sıvı kısım yeni bir ependorf tüp içine koyulmuştur.

13. Örnekler 12.000 rpm' de 10 dk tekrar santrifüj edilmiş ve yine üstte kalan sıvı kısım 2ml'lik ependorf tüp içine alınmıştır.

14. Örnekler üzerine örnek hacminin iki katı hacimde (yaklaşık 1.000 µl) % 99.9' luk saf etil alkolden (-20 ºC'de saklanan) ilave edilmiş ve 15 dk buzda bekletilmiştir.

15. Etil alkol ilave edildikten sonra ependorf tüpü DNA iplikçikleri kümeleşinceye kadar 4–5 kez hafifçe karıştırılmıştır.

16. Kümeleşen DNA iplikçiklerinin tüpün dibine çökmesi için tüp 11.500 rpm' de 7 dk santrifüj edilmiştir.

17. Santrifüj sonunda etil alkol uzaklaştırılarak tüpün dibine çökmüş olan DNA peletlerinin üzerine 1.000 µl %70'lik etil alkol ilava edilerek 10.000 rpm' de 2 dk santrifüj edilmiştir.

18. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde yer alan alkol uzaklaştırılmıştır.

19. Tüp içindeki alkolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak amacıyla örnekler, çeker ocak içinde kurumaya bırakılmıştır.

20. Tamamen kuruyan örnekler üzerine 100 µl TE Tampon Çözeltisi (Çizelge 3.1) ilave edilmiş olup, DNA peletlerinin çözülmesi için bir gece buzdolabında +4 ºC'de bekletilmiştir.

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan tampon çözeltilerin molaritesi / miktarı ve içerikleri

Tampon Çözeltisi	Molarite/Miktar	İçerik
Eritrosit Lisis Tampon Çözeltisi	0,32 M	Sukroz
	10 mM	EDTA
	5 mM	$MgCl_2$
Fizyolojik Tampon Çözeltisi	75 mM	NaCl
	25 mM	EDTA
Lisis TE Tampon Çözeltisi	500 mM	Tris-HCI
	20 mM	EDTA
	10 mM	NaCI
TE Tampon Çözeltisi	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
6M NaCl Çözeltisi	5.64 g 10 ml'ye tamamlanır	NaCI Deiyonize bd H_2O

3.2.3. Genomik DNA miktarının hesaplanması

İzole edilen DNA'nın miktarı ve saflığı spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. DNA'nın ışığı absorbe etme miktarına Optik Density (OD) denilmektedir. 1 OD yoğunlukta 50µg/ml DNA olduğu kabul edilmektedir. DNA'da bulunan bütün bazlar 260 nm'de ultraviyole ışığını absorbe etmektedirler. Bu nedenle spektrofotometre ile DNA miktarının hesaplanması 260 nm dalga boyunda yapılmaktadır. 260 nm'de elde edilen değerler örnekte bulunan nükleik asit konsantrasyonunun miktarının belirlenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte ayrıca spektrofotometre cihazında elde edilen DNA'da bulunan nükleik asitlerin saflığını belirlemek için 260 nm ve 280 nm'deki OD'ler (OD_{260}/OD_{280}) ölçülmektedir. OD_{260}/OD_{280} değerlerinin 1.8-2.0 arasında olması istenmektedir (Seğmen 2005, Arıca ve ark. 2006).

Çalışmada 100µl steril 1X TE tampon çözeltisinde çözülen DNA'ların konsantrasyonları 260 ve 280 nm dalga boylarında (OD_{260}/OD_{280}) NanoDrop spektrofotometre ile okunmuş ve konsantrasyonları steril saf su ile 50 ng/µl olacak şekilde eşitlenmiştir. Bu örnekler eşit miktarlarda % 1'lik agaroz jelinde (1X TE

tamponunda) yürütülerek konsantrasyonlarının eşitliği gözle de gözlenmiş ve DNA'ların parçalanmamış olduğu belirlenmiştir.

3.2.4. Kullanılan primerlerin seçimi

Çalışmada kullanılan primerler çizelge 3.2'de verilmiş olup, çeşitli araştırmacılar (Mitra ve ark. 1995, Ladani ve ark. 2003, Skinkyte ve ark. 2005, Öztabak, 2008 ve Alipanah ve ark. 2007) tarafından farklı türlerde daha önce kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de prolaktin geninde PCR ile çoğaltılması hedeflenen gen bölgesi, kullanılacak olan primerler ve elde edilecek PCR ürünleri ile genotipleri verilmektedir.

Çizelge 3.2 Prolaktin geninde PCR ile çoğaltılması hedeflenen gen bölgesi, kullanılacak olan primerler ve elde edilecek PCR ürünleri ile genotipleri

Gen ve Gen Bölgesi	Primerler	Enzim	PCR Ürünü	Genotipler
Prolaktin **Ekzon 3**	Forward 5'– CGA GTC CTT ATG AGC TTG ATT CTT -3' Reverse 5' – GCC TTC CAG AAG TCG TTT GTT TTC -3'	*Rsa*I	156 bç	AA: 156 AB: 156+82+74 BB: 82+74

3.2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR protokolü Mitra ve ark. (1995), Ladani ve ark. (2003), Skinkyte ve ark. (2005), Öztabak ve ark. (2008), Alipanah ve ark. (2007) ve Dybus ve ark.'nın (2005) bildirişlerine uygun olarak laboratuvar şartlarında optimize edilerek gerçekleştirilmiştir.

PCR tüplerine (0.2 ml'lik) DNA izolasyonu sonucunda elde edilen her biri 50 ng/µl olacak şekilde eşitlenen DNA örneklerinden birer µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Çizelge 3.3'de PCR reaksiyonunda kullanılan moleküler biyoloji hassasiyetindeki kimyasallar ve miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonunda kullanılan moleküler biyoloji hassasiyetindeki kimyasallar ve miktarları

1X'lik PCR reaksiyon karışımı	Miktar (µl)
Steril distile su	9.48
10x Buffer (+KCl) (1X)	1.5
$MgCl_2$(1.5 mM)	0.9
$dNTP_s$ (0.25 mM)	1.5
Forward Primer (0.27 uM)	0.27
Reverse Primer (0.27 uM)	0.27
Taq Polimeraz (0.4 U)	0.08

Reaksiyonlar toplam 1µl DNA + 14µl karışım olacak şekilde 15µl hacimde ince çeperli *RNase* ve *DNase*-free PCR tüplerinde yapılmıştır. PCR uygulamaları Techne TC-512 Gradient Thermal Cycler marka cihazda yürütülmüştür. PCR programı cihazın kapak sıcaklığı 102^{o}C ve blok sıcaklığı 94^{o}C olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu uygulamanın amacı PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemektir. Her bir 0.2 ml'lik PCR tüpüne 1 µl DNA ilave edilerek karıştırılmış ve cihaza yerleştirek 94^{o}C'de 2 dk ön ısıtmaya (hot start) tabi tutulmuştur. Daha sonra, yukarıda reaksiyon içeriği verilen karışımdan ön ısıtmaya tabi tutulan PCR tüplerine 14µl ilave edilmiş ve toplamda 15µl karışım elde edilmiştir.

Amplifikasyonlarda; 2 dk'da 94^{o}C'de ön ısıtmadan sonra 3 aşamada gerçekleşen PCR programında reaksiyonlar, ayrılma (denatürasyon) aşamasında sıcaklık 94^{o}C'de 45 s, bağlanma/yapışma (annealing) aşamasında 60^{o}C'de 45 s ve uzama/sentez aşamasında ise 72^{o}C'de 1dk'dan meydana gelen toplam 35 döngü uygulanmış ve son olarak tüpler 72^{o}C'de 5 dk olarak bekletilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kısa bir süre santrifüj edildikten sonra 5 µl'si hedeflenen gen bölgesinin uygun çoğaltılıp çoğaltılmadığının kontrolünde kullanılmıştır.

3.2.6.Elektrolit çözeltisi

Elektroforez tankının içine konulacak elektrolit sıvısı olarak genellikle TAE (Tris-Acetate-EDTA) ve TBE (Tris-Boric asit-EDTA) çözeltileri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, TBE elektroforezde tampon çözelti olarak kullanılmıştır. Öncelikle 108 g Tris base, 55.5 g Borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA 1 litre distile suda çözdürülerek 10X yoğunlukta pH 8.0 olan TBE stok solüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra 10X'lik ana stoktan 100 ml alınıp üzerine 900 ml distile suda çözdürülerek 1X yoğunlukta TBE çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Bu tampon hem elektroforez tankına konulacak çözelti olarak hem de agaroz jel yapmak için kullanılacak çözelti olarak kullanılmıştır.

3.2.7. Jelin hazırlanması ve dökülmesi

PCR işlemlerinin tamamlanmasından sonra çoğaltılan DNA örneklerinin elektroforetik ayrımı için agaroz jel Prona Agarose (Nu Micropor) kullanılmıştır. PCR ürünleri %3'lük agaroz jelinde yürütülmüştür.

Jelin hazırlanması sırasında agaroz, erlen mayerde 1X TBE tampon çözeltisi içinde yüksek sıcaklıkta 300–305^{o}C'de bir mikrodalga fırın içinde 2–3 dk kaynatılarak eritilmiştir. Kaynama esnasında yaklaşık 10–20 s'de bir çözelti sallamak suretiyle şeffaf bir görünüm kazanıncaya kadar karıştırılmıştır.

Eriyen jel tepsi içine dökülmeden önce DNA örneklerinin yükleneceği kuyucukların oluşması için çok dişli bir tarak tepsi üzerindeki yuvasına yerleştirilmiştir. Daha sonra soğutulan eriyik jel kalıbında ve tarakların bulunduğu bölgelerde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek tepsiye dökülmüştür. Jel donduktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılarak elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Daha sonra jelin üst kısmını kapatacak kadar hazırlanan TBE elektrolit çözeltisinden dökülmüştür. Şekil 3.1'deki resimde jel tepsisine jelin dökülmesi gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Jel tepsisine jelin dökülmesi

3.2.8. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi

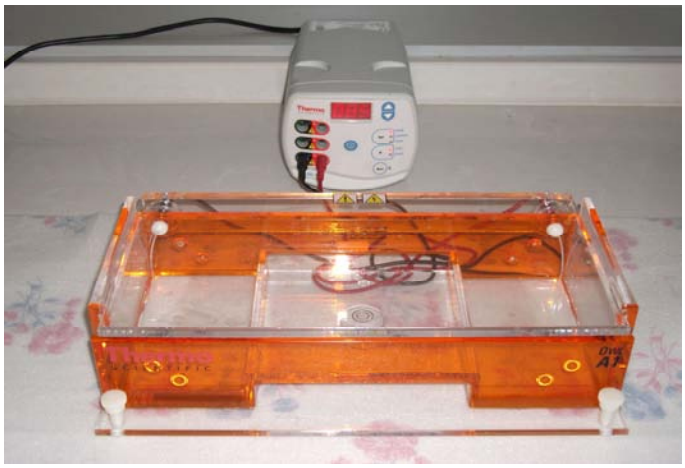
PCR cihazı ile çoğaltılan DNA örneklerinin jelde yürütülebilmesi, takibi ve elektrolit çözeltisi ile karışmasının önlenmesi amacıyla Loading Dye (Yükleme boyası) adı verilen yükleme çözeltisi hazırlanmıştır. Elektroforez uygulanacak olan her bir PCR ürününden 5µl alınıp yeni tüplerde hazır bulunan her biri 2µl 6X yükleme çözeltisi ile mikro pipet ucu yardımıyla karıştırılmıştır. Daha sonra karışım jelde hazır bulunan kuyucuklara yüklenmiştir. Şekil 3.2'deki resimde PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi görülmektedir.



Şekil 3.2. PCR ürünlerinin jel kuyularına yüklenmesi

3.2.9. Jele yüklenen PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi

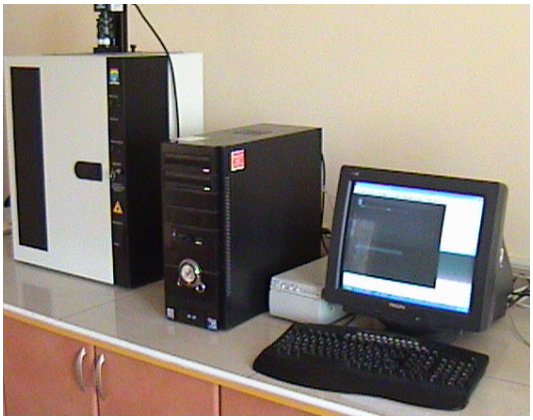
Jel kuyucuklarına yüklenen PCR ürünlerini elektrik akımı olan ortamda birbirlerinden ayırmak için yatay elektroforez cihazında 75V'da 2.5-3 saat (ara sıra) kontrol edilerek yürütülmüştür. Kontrolün sebebi, jelin bitiş noktasına kadar PCR ürünlerinin yürümesini engellemektir. Şekil 3.3'deki resimde yatay elektroforez cihazı görülmektedir.



Şekil 3.3. Yatay elektroforez cihazı

3.2.10. Jelin boyanması ve bantların elde edilmesi

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için jel elektroforezden çıkarılmıştır. DNA'ların UV ışığı altında gözlemlenebilmesi için jel 0.5µg/ml Ethidium Bromür çözeltisinin içinde 15–25 dk bekletilerek ethidium bromürün jele nüfus etmesi sağlanmıştır. Daha sonra, jel çözelti içerisinden alınarak, RFLP bantlarına ilişkin fotoğraflar jel dokümantasyon sisteminde transilüminatör yardımı ile 254 nm dalga boyundaki UV ışığı altında elde edilmiş ve veriler elektronik ortamda saklanmıştır. Şekil 3.4'deki resimde jel dokümantasyon sistemi verilmiştir.



Şekil 3.4. Jel dokümantasyon sistemi

3.2.11. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi

PCR ürünleri UV (ultraviyole) ışığı altında görüntülendikten sonra enzim kesimine geçilmiştir. Kesim enzimi olarak *Rsa*I kesim enzimi kullanılmıştır. Enzim kesimi için kalan 10 µl'lik PCR ürününe hazırlanan kesim karışımından 10 µl ilave edilerek toplamda 20 µl'lik karışım hazırlanmış elde edilen karışım etüv cihazında 37 ^{o}C'de gece boyu kesime bırakılmıştır. Hazırlanan kesim mix'inin içeriği çizelge 3.4 'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Kesim mixi

*Rsa*I kesimi	Alınan Miktar (ul)	Son Konsantrasyon
PCR ürünü	10	
Buffer Tango(10X)	2	1x
*Rsa*I (10 U/ul)	0,5	5 U
bdH2O	7,5	
TOPLAM	20	

3.2.12. Kesilen ürünlerin jele yüklenmesi

Gece boyu bekletilen kesim ürünleri için % 3'lük Prona Agarose (Nu Mıcropor) jel hazırlanmıştır. 20 µl'lik kesim ürününe 3µl 6X yükleme çözeltisi ilave edilerek elde edilen karışım jel kuyularına yüklenmiştir. RFLP bantlarının jelde molekül

büyüklüklerine göre yürüdükleri bant aralığını (baz çifti) tespit edebilmek için standart olarak *DNA Moleculer Weight Marker* (100 bp *Ladder, Fermantas*) kullanılmıştır. DNA örnekleri jele yüklenirken 100 bp ladder mixinden de 3 µl alınıp jele yüklenmiştir.

3.2.13. Kesim ürünlerinin değerlendirilmesi ve genetik analizler

RFLP bantlarına ilişkin fotoğraflar jel dokümantasyon sisteminde elde edildikten sonra jel resimlerinin yüksek çözünürlükte fotoğrafı çekilmiş ve değerlendirmeler bunlar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.5'de RFLP bantlarının değerlendirilmesinde kodominant bantların değerlendirilmesi aşağıdaki gibi yapılmıştır.

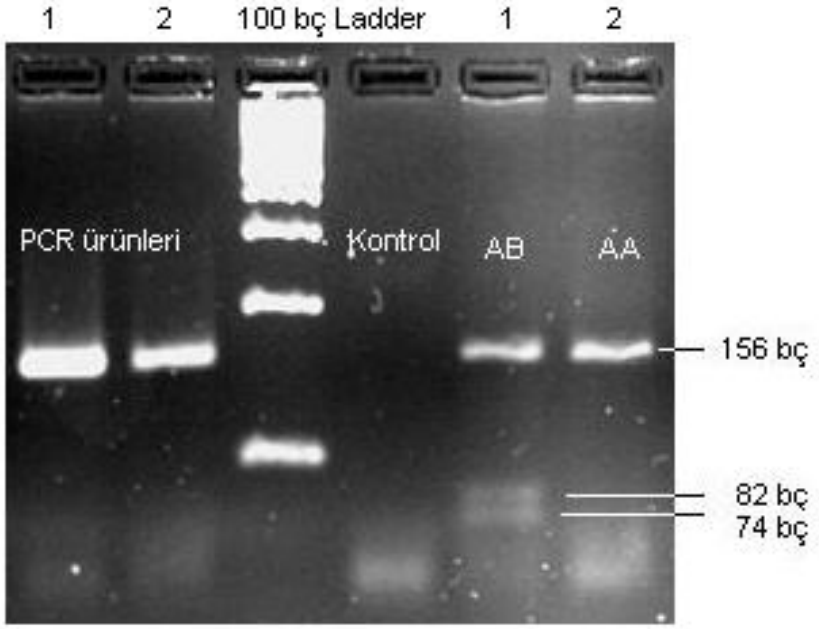
Ladder (bç)	AA	AB	BB
156	___	___	
82		___	___
74		___	___

Şekil 3.5. *Rsa*I kesimi sonucunda genotiplere ait bantlar

Şekil 3.5' deki gibi skorlaması yapılan genotipler ile bir veri matrisi oluşturulmuş ve genotip frekansları ile allel frekansları gibi istatistik değerler, PopGene Version 1.32 (Yeh ve ark. 1997) istatistik analiz programında analiz edilmiştir. Elde edilen değerlerin Hardy –Weinberg dengesinde olup olmadığının belirlenmesinde χ^2 testi kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çiftlik hayvanlarında süt verimiyle ilgili aday genler arasında gösterilen prolaktin geninin ekzon 3 *Rsa* I kesim bölgesinde Yerli Anadolu Mandaları ve Esmer ırkı Sığırlarda yapılmış çalışmayla ilgili jel görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Yerli Anadolu Mandaları ve Esmer ırkı Sığırlarda prolaktin geninin ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesi jel görüntüsü (%3'lük Nu Micropor Agoroz)

Şekil 4.1'dan görüldüğü üzere 100 bç'lik markörün sol tarafında PCR ürünleri sağ tarafında ise kesim ürünleri görülmektedir. AA (156 bç) ile AB genotipli bireylerin (156.82.74 bç) genotiplendirilmesi Şekil 3.5'deki gibi yapılmıştır. *Rsa*I enzimiyle kesim sonrası Yerli Anadolu Mandalarında sadece AA genotipli bireyler tespit edilirken Esmer Sığırlarda AA ve AB genotipli bireyler tespit edilmiştir. Bununla birlikte BB genotipli bireyler (82, 74 bç) her iki türde de tespit

edilememiştir. Çizelge 4.1'de populasyonun dengede olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan χ^2 testi gösterilmektedir. χ^2 testinde Yates düzeltmesi yapılmıştır (Düzgüneş ve ark. 1983).

Çizelge 4.1'de Esmer Sığırlarda prolaktin ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesine göre allel ve genotip frekansları ile χ^2 testi

Lokus PRL(*Rsa*I)	Sayı	Genotipler			Allel Frekansları		Genotip Frekansları			$(\chi^2)^1$
		AA	AB	BB	A	B	AA	AB	BB	
Gözlenen	30	19	11	0	0.82	0.18	0.63	0.37	0.00	1.356293 Öd
Beklenen	30	20.172	8.856	0.972			0.67	0.30	0.03	0.557 Öd

[1] χ^2 testi, PRL (Prolaktin), Öd (Önemli değil, $P > 0.05$)

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere Esmer sığırlarda A allelinin frekansı 0.82 olarak belirlenirken B allelinin frekansı 0.18 olarak belirlenmiştir. Genotip frekansları ise AA genotipi için 0.63, AB genotipi için 0.37 ve BB genotipi için 0.00 olarak bulunmuştur. χ^2 testi sonucu Esmer Sığır populasyonunun dengede olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.

Süt sığırlarında genetik markörlere dayalı seleksiyonda, süt verimi özellikleriyle ilişkili bazı genler potansiyel aday genler arasında gösterilmektedir. Birçok aday gen arasında prolaktin geni, gerek meme bezi gelişimindeki önemli rolü gerekse laktasyonun başlaması ve devamlılığı üzerine olan etkilerinden dolayı önemli bir yere sahiptir.

Prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde çeşitli hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda Esmer sığırlarda konuyla ilgili kaynağa rastlanamamıştır. Dünya'da sütçü karakteriyle ön plana çıkan Siyah Alaca sığırlarda konuyla ilgili yapılmış olan çalışmalara bakıldığında, A alleliyle ilgili en yüksek frekansın 0.98 olarak Khatami ve ark. (2005) tarafından bildirildiği; A alleliyle ilgili en düşük frekansın ise 0.58 olarak Maksymiec ve ark. (2008) tarafından bildirildiği görülmektedir. Bununla birlikte Alipanah ve ark.(2007) Siyah Alaca sığırlarında AB genotipine sahip bireylerin AA genotipine ve BB genotipine sahip bireylerden daha yüksek süt verimine sahip olduklarını bildirmiştir.

Yerli Anadolu Mandalarında prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde polimorfizme rastlanamamıştır. Diğer bir ifadeyle bu bölge dikkate alındığında monomorfik bir durumla karşılaşılmıştır. Konuyla ilgili farklı manda ırklarında yapılan çalışmalar incelendiğinde, Mitra ve ark.'nın (1995) Murrah ve Nili-Ravi manda ırklarında prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesiyle ilgili yaptıkları çalışmalarda A alleli ile ilgili frekansları sırasıyla 0.93 ve 0.84 olarak buldukları görülmektedir. Ladani ve ark.'nın (2003) Mehsani, Surti ve Jafarabadi ırkı mandalarda prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde yürüttükleri bir başka çalışmada ise, araştırmacıların ilgili manda ırklarında A alleli ile ilgili frekansları sırasıyla 0.50, 0.48 ve 0.43, olarak bulmuşlardır. Bu araştırmada daha öncede belirtildiği gibi 45 Yerli Anadolu Mandası'nda prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanamamıştır. Bu sonuca benzer bir sonuç Mitra ve ark. (1995) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde Murrah, Nili-Ravi ve Mısır mandaları üzerinde yürüttükleri çalışmalarda Murrah ve Nili-Ravi mandalarında mutasyona rastlarken, Mısır mandalarında herhangi bir mutasyona rastlamamışlardır. Bu durumun sonucu olarak araştırmacılar, prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde belirlenen mutasyonların manda türlerine göre değişiklik gösterebileceğini ve bazı manda türlerinde belirlenemeyebileceği sonucuna varmışlardır. Yerli Anadolu mandalarında prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanamamasının bu durumun bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte Türkiye'de sığırlara kıyasla manda yetiştiriciliği lokal bir yetiştirme şekli olarak devam etmektedir. Bunun bir sonucu olarak manda populasyonlarında akrabalı yetiştirmenin artmasının da *Rsa*I kesim bölgesinde herhangi bir mutasyona rastlanılamamasının nedenleri arasında olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada 30 Esmer ırkı Sığırın 11'inde prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesi ile ilgili mutasyona rastlanmıştır. Prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I enzimiyle kesim sonrasında Esmer sığırlarda A ve B allellerinin frekansları sırasıyla 0.82 ve 0.18 olarak bulunmuştur. Çizelge 2.1'deki çalışmaların tümü dikkate alındığında, sığırlarda A ve B allellerinin ortalama frekansları sırasıyla 0.73 ve 0.27 olarak bulunmuş olup, bu çalışmada A ve B allelleri ile ilgili bulunan frekans değerleriyle (0.82 ve 0.18) benzerlik göstermektedir. Genotipik frekanslar ise AA genotipi için 0.63, AB genotipi için 0.37 ve BB genotipi için 0.00 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada görüldüğü üzere Esmer

sığırlarda BB genotipli sığır tespit edilememiştir. Gerek bu çalışmada gerekse Çizelge 2.1'de farklı araştırmacıların buldukları sonuçlar değerlendirildiğinde manda ve sığır türlerinde B allelinin ve dolayısıyla BB genotipinin nispi frekansının oldukça düşük olduğu gözlenmektedir. Bu sonuca örnek olarak Udina ve ark.'nın (2001) Gorbatov Kırmızı sığırı ve Ayrshire sığırlarında prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde yaptıkları çalışma gösterilebilir. Araştırmacılar her iki sığır ırkında da BB genotipini tespit edememişler ve BB genotipinin sığır ırklarında giderek kaybolmasının nedenini, sürekli verimi arttırmaya yönelik uygulanan seleksiyon, yetiştirme ve sığırların ait olduğu orjinden kaynaklandığı görüşünü belirtmişlerdir. Nitekim *Bubalus bubalis* ve *Bos taarus* türlerinde B allelinin frekansının ortalama olarak 0.20'yi geçmemesi bu görüşü desteklemektedir. Ayrıca araştırmacılar prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesinde ortaya çıkan polimorfizmin manda (*Bubalus bubalis*), hörgüçlü sığır (*Bos indicus*) ve sığır (*Bos taarus*) da tespit edildiği için çok eski bir polimorfizm olduğunu ve bir milyon yıllık bir geçmişe sahip olduğunu bildirmektedirler.

İnsan genom projesinin hayata geçirilmesiyle büyük bir ivme yakalayan moleküler genetiğin geldiği nokta tartışmasız çok önemlidir. Günümüzde bir çok alanda kullanım imkanı olan moleküler genetik yöntemlerinin, canlılar arasındaki farklılıkları belirleme, gen haritalarının oluşturulması, genetik polimorfizmlerin belirlenmesi ve çeşitli özellikler üzerinde etkisi olduğu düşünülen aday genlerin belirlenebilmesi gibi bir çok fonksiyonu bulunmaktadır.

Moleküler genetikte yaşanan bu hızlı gelişmelere rağmen çiftlik hayvanlarıyla ilgili verim, üreme, adaptasyon ve hastalıklara karşı direnç konularıyla ilgili moleküler anlamda hala çok az şey bilinmektedir. Çiftlik hayvanlarında moleküler yöntemlerin kullanılması sonucu elde edilen ilerleme insan genomuyla ilgili moleküler genetikte yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen ilerlemenin oldukça gerisindedir. Bununla birlikte sürekli nüfusu artan insanoğlunun hayvansal protein ihtiyacının karşılanabilmesi için çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde moleküler yöntemlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır. Bu durumda çiftlik hayvanlarında verim, üreme, adaptasyon ve hastalıklara karşı direnç gibi özellikler üzerine etkili olan aday genlerin hızla belirlenmesi ve hayvan yetiştiriciliğinde marköre dayalı seleksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Süt sığırlarında uygulanan seleksiyonlarda birinci amaç süt verimi ve kompozisyonunu iyileştirmektir. Süt Sığırlarında marköre dayalı seleksiyonlarda prolaktin geni süt verim özellikleriyle ilişkisi olduğu düşünülen önemli aday genler arasında yer almaktadır. Prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesi ile yapılan araştırma sonuçları değerlendirildiğinde Alipanah ve ark. (2007), Ghasemi ve ark. (2009) ve Sacravarty ve ark. (2008) gibi bazı araştırmacılar, çalışmaları sonucu elde ettikleri genotiplerle prolaktin geni ekzon 3 *Rsa*I kesim bölgesi arasında önemli ilişkiler olduğunu göstermektedirler. Ancak herhangi bir özellik üzerinde etkisi olduğu düşünülen aday genle ilgili doğru bir karar verebilmek için gen ve gene bağlı bulunan genotiplerin ilgili özellik bakımından ilişkilendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte Çizelge 2.1'den görüleceği üzere verimlerle genotipler arasındaki ilişkileri gösteren çalışmalar tüm araştırmalar içinde küçük bir yere sahiptir. Bu nedenle bu tür çalışmaların arttırılması gerekmektedir. Diğer bir ifadeyle, verim özellikleri ile genotipler arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan çalışmalarda (Alipanah ve ark. 2007, Ghasemi ve ark. 2009 ve Sacravarty ve ark. 2008) Siyah Alacalarda AB genotipinin (Alipanah ve ark. 2007), Montbeliarde sığırlarında AA genotipinin (Ghasemi ve ark. 2009) ve Kankrej sığırlarında BB genotipinin tercih edilmesi yönünde görüş bildirmektedirler. Buradan yola çıkarak üzerinde çalışılan Esmer sığırlarda, süt verim özellikleriyle önemli ilişkisi olduğu araştırma sonuçlarınca ortaya konulan prolaktin geniyle ilgili somut sonuçların alınabilmesi ve daha doğru karar verilmesi için verimlerle genotipler arasındaki ilişkileri ortaya koyan çalışmaların artırılması gerekmektedir.

5. KAYNAKLAR

Arıca, Ş. Ç., Akçapınar, H., Budak., F. A., Ünal, N., ve Atasoy, F. 2006. Bafra (SakızxKarayaka, G1) Koyunlarının RAPD-PCR Yöntemi ile Moleküler Genetik Analizi. TÜBİTAK, Proje No: TBAG-1964 (100T111).

Alipanah, M., Kalashnikova, L., Rodionov, G. 2007. Association of prolactin gene variants with milk production traits in Russian Red Pied cattle. Iranian J. of Bıotech., 5: 3.

Brym., P, Kaminski, S, Wojcik, E, 2005. Nucleotide sequence polymorphism within ekzon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. J Appl. Genet., 45: 179-185.

Chung, E. R., Rhim, T. J., and Han, S. K. 1996. Associations between PCR-RFLP markers of growth hormone and prolactin genes and production traits in dairy cattle. Korean J. of Anim. Sci., 38: 4.

Dybus, A. 2002. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. Anim. Sci. Pap. Rep., 20: 203-212.

Dybus, A., Grzesıak, W., Kamıenıeckı, H., Szatkowska, I., Sobek, Z., Błaszczyk, P., Czernıawska-Piątkowska, E., Zych, S. and Muszyńska, M. 2005. Association of genetic variants of bovine *prolactin* with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle . Arch. Tierz., Dummerstorf 48: 149-156 .

Düzgüneş, O., Kesici, T. ve Gürbüz, F. 1983. İstatistik Metodları. Ankara Üni. Zir. Fak. Yay. No: 229.

Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A. and Nagy, G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev., 80: 1523–1631.

Ghasemi, N., Zadehrahmani, M., Rahimi, G., and Hafezian, S. H. 2009. Associations between prolactin gene polymorphism and milk production in montebeliard cows. Int. J. of Genet. Molec. Bio., 1: 048-051.

Gregerson, K. A. 2006. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. Erişim: http://books.google.com.tr/books. Erişim Tarihi: 14.12.2009

Khatami, S. R., Lazebny, O. Y., Maksimenko, V. F., and Sulimova, G. E. 2005. Association of DNA polymorphisms of the growth hormone and prolactin genes with milk productivity in Yaroslavl and Black-and-White Cattle. Russian J.of Genet., 41: 167-173.

Kumari, A. R., Singh, K. M., Soni, K. J., Patel, R. K., Chauhan, J. B., and Rao, K. S. 2008. Genotyping of the polymorphism within ekzon 3 of prolactin gene in various dairy breeds by PCR RFLP (Brief report). Arch. Tierz. Dummerstorf, 51: 298-299.

Maksymiec, K. W., Kmic, M., and Strzalaka, J. 2008. Prolactin gene polymorphizms and somatic cell count in dairy cattle. J. Anim. Vet. Adv, 7: 35-40.

Miceikienė, I., Pečiulaitienė, N., Baltrėnaitė., L., Skinkytė., R., and Indriulytė, R. 2006. Association of cattle genetic markers with performance traits. Biologija, 1: 24-29.

Miller, S. A., Dukes, D. D. and Polesk, H. F. 1988. A simple salting out procedurefor extracting DNA from human nucleated cells. Nucleid Acids Resarch., 16: 1215.

Mitra, A., Schlee, P., Balakrıshnan, C. R., and Pırchner, F. 1995. Polymorphisms at growt-hormone and prolactin loci in Indian cattle and buffalo. J. Anim. Breed. Genet. 112: 71-74.

Ladani, D. D., Pipalia, D. L., Brahmkshtri, B. P., Rank, D. N., Joshi, C. G., Vataliya, P. H. and Solanki, J. V. 2003. Prolactın genotypıng of indıan buffalo breeds using Pcr-Rflp. Buffalo J. 2 : 203-208.

Lastra, O. V., Jara, L. J., Espinoza L. R. 2002. Prolactin and Autoimmunity. Autoimmunity Reviews, 1: 360–364.

Öztabak., K., Un, C., Tesyafe, D., Akıs, I., and Mengi, A. 2008. Genetic polymorphisms of osteopontin (OPN), prolactin (PRL) and pituitary-specific transcript factor-1 (PIT-1) in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. Acta Agric. Scand Section, 58: 109-112.

Sacravarty, G., Vadodaria, V. P., Joshi, C.G., Brahmksthri, B.P., Shah, R.R., and Solanki, J.V. 2008. Prolactin gene polymorphism and its association with economic traits in Kankrej Cattle. IJDS, 61: 4.

Seğmen, H. 2005. İdyopatik Jeneralize Epilepsilerde Genetiğin Yeri ve Scn1a Geninde D188v Mutasyonu. T.C. Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği Nöroloji Uzmanlık Tezi: İstanbul

Skinkytė, R., Zwierzchowski, L., Riaubaitė, L., Baltrėnaitė, L., and Miceikienė, I. 2005. Distrıbutıon of allele frequencıes important to milk productıon traits in Lithuanian Black & White and Lithuanian Red Cattle. Veter. Ir Zootechnıka, 31: 53.

Udina, I. G., Turkova, S. O., Kotsyuchenko, M. V., Labedeva, L. A., and Sulimova, G. E. 2001. Polymorphism of bovine prolactin gene: microsatellites, PCR–RFLP.Russ. J. of Genet., 37: 407-411.

Yeh, F.C., Rongcai, Y., Boyle, T,, Ye, Z., Xiyan, J. M., 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. molecular biology and biotechnology centre. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. Erişim:http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm. Erişim Tarihi: 17.11.2009