

**KIVIRCIK KOYUNLARINDA  
BETA LAKTOGLOBULİN  
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP  
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**Elif ALMAZ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Zootekni Anabilim Dalı**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Eser Kemal GÜRCAN**

**2013**

**T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KIVIRCIK KOYUNLARINDA  
BETA LAKTOGLOBULİN  
POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP  
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**Elif ALMAZ  
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: DOÇ. DR. ESER KEMAL GÜRCAN**

**TEKİRDAĞ – 2013**

**Her hakkı saklıdır**

Doç. Dr. Eser Kemal GÜRCAN danışmanlığında Elif ALMAZ tarafından hazırlanan “Kıvırcık Koyunlarında Beta Laktoglobulin Polimorfizminin PCR-RFLP yöntemiyle belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı’nda 15.02.2013 tarihinde Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Eser Kemal GÜRCAN

*İmza:*

Üye: Doç. Dr. Fisun KOÇ

*İmza:*

Üye: Yrd. Doç. Dr. Özden ÇOBANOĞLU

*İmza:*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### KIVIRCIK KOYUNLARINDA BETA LAKTOGLOBULİN POLİMORFİZMİNİN PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Elif ALMAZ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Eser Kemal GÜRCAN

Bu tezin amacı yerli koyun ırklarımızdan biri olan saf Kıvırcık koyununda  $\beta$ -laktoglobulin polimorfizminin belirlenmesidir. Bu amaçla yerli koyun ırklarımızdan ve saf olduğu bilinen 48 baş Kıvırcık koyun kullanılmıştır. Çalışma PCR-RFLP tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca araştırmada bu ırk için  $\beta$ -laktoglobulinin iki farklı allele ait ( A ve B) ile üç farklı genotip (AA, AB ve BB) belirlenmiştir. Bu gen lokusuna ilişkin allel gen frekansları ise  $\beta$ -Lg A ve B için 0.468 ve 0.532 olarak hesaplanmıştır. Sürünün, Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğu bulunmuştur. Bu sayede Kıvırcık koyun ırkının bu özellik için genotipik yapısı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kıvırcık, Beta Laktoglobulin, PCR-RFLP

## **ABSTRACT**

Master of Science Thesis

### **DETERMINATION OF BETA LAKTOGLOBULIN POLYMORPHISM USING BY PCR-RFLP IN KIVIRCIK SHEEP**

Elif ALMAZ

Namık Kemal University  
Natural and Applied Science Institute  
Department of Animal Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eser Kemal GÜRCAN

The aim of this study is to determine the genetic polymorphism of the  $\beta$ -laktoglobulin gene in Kıvırcık pure breed. 48 pure breed that is one of native sheep breeds of Turkey was used for this study. The study was carried out by means of PCR-RFLP technics. Also, two genetic variants (A and B) and three genotypes (AA, AB and BB) were determined for this breed. The gene frequencies of  $\beta$ -Lg A and B were calculated as 0.468 and 0.532 in Kıvırcık. The populations of this breed was in equilibrium according to Hardy-Weinberg rule. The genetic structure of this breed was examined in the present study revealed polymorphism at  $\beta$ -laktoglobulin gene locus.

**Key Words:** Kıvırcık, Beta Laktoglobulin, PCR-RFLP

**2013, 29 Pages**

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmam Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (NKUBAP.00.24.YL.11.01).

Tez konusunun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve yazılması aşamalarında yol gösteren ve en büyük desteği veren hocam Doç. Dr. Eser Kemal GÜRÇAN ile Yrd. Doç. Dr. Özden ÇOBANOĞLU ve değerli hocalarım Biyometri ve Genetik A.B.D. Başkanı Prof. Dr. M. İhsan SOYSAL ve Zootekni Bölüm Başkanı Prof. Dr. Muhittin ÖZDER hocama ve labarotuar çalışmalarında çok fazla yardımlarını gördüğüm Lütfiye ŐEN arkadaşıma da teşekkürlerimi sunarım.

Elif ALMAZ

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
<b>1.GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1.Kıvırcık Koyunun Fenotip Özellikleri.....	2
<b>2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....</b>	<b>3</b>
2.1.Çiftlik hayvanlarında süt protein polimorfizmi ilgili çalışmalar.....	3
<b>3. MATERYAL ve METOD.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materyal .....	15
3.2. Metod .....	15
3.2.1.PCR Uygulanmasında Kullanılması Planlanan Döngü.....	16
3.2.2.İstatistik Yöntem.....	19
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>20</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>23</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>26</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>29</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. $\beta$ -Lg tiplendirinin jel üzerindeki sembolik gösterimi.....	17
Şekil 3.2. Seçilen bazı laboratuvar görüntüleri .....	18
Şekil 4.1. PCR ürünlerinin etidyum bromür içeren % 2 lik agoroz jel elektroforez görüntüsü.....	20
Şekil 4.2. UV ışık altında jel üzerinde ortaya çıkan bandlara göre $\beta$ -Lg tiplerinin agoroz jel elektroforez görüntüsü.....	21
Şekil 4.3. Seçilen bazı örneklerin UV ışık altında jel üzerinde ortaya çıkan bandlara göre $\beta$ -Lg tiplerinin agoroz jel elektroforez görüntüsü.....	21



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.Sütün orijinal ve orijinal olmayan bileşenleri .....	4
Çizelge 2.2. Süt protein fraksiyonları.....	5
Çizelge 2.3. Süt proteininin yapı taşı analizi .....	6
Çizelge 2.4. Sığırlarda Beta Laktoglobulin tipleri ile çeşitli verim özellikleri arasındaki ilişkileri inceleyen çeşitli araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar.....	13
Çizelge 3.1. Beta laktoglobulin için PCR Protokolü.....	17
Çizelge 3.2.Restriksiyon Enzim Kesim Reaksiyonu.....	17
Çizelge 4.1. $\beta$ -Laktoglobulin genotiplerinin ve allel gen frekanslarının saf kıvrıcık koyunlarında (n=48) dağılımı.....	22

## 1. GİRİŞ

İnsanoğlunun varlığı doğada bulunan kıt kaynakları en ekonomik biçimde kullanıp artan dünya nüfusuna karşılık elde ettiği gıda kaynaklarının miktarını artırmaya bağlıdır. Bu ise özellikle hayvansal kökenli protein kaynaklarını temin ettiğimiz çiftlik hayvanlarının verim artışına bağlıdır. Ekonomik değeri olan çiftlik hayvanlarının genetik yapılarının bilinmesi ıslah ve yetiştirme açısından çok önemlidir.

İnsanlar çiftlik hayvanlarında daima daha yüksek verim elde etmeyi istemişlerdir. Bu nedenle evciltmeden günümüze seleksiyon ve yetiştirme sistemleri kullanarak birim başa verimi artırmak için çeşitli yöntemler denemişlerdir. Hayvanların ekonomik özellikleri onların fenotipleri olup genotip ve çevre şartlarının etkisi ile belirlenir. Çevre şartları yıllardır yapılan çalışmalar ile optimize edilmiş haldedir. Genotip üzerine de uygun genotipi belirlemek ve bu hayvanları damızlık olarak kullanılması için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Genotipin dışarıdan kolayca belirlenememesi ve ilgili özelliği belirleyen genlerin tam olarak yerlerinin ve etkilerinin bilinmemesi bazı genetik markerlere dayalı olarak seleksiyon yapılmasını gündeme getirmiştir.

Yıllar boyunca hayvanların kan ve süt gibi çeşitli sıvılarda bulunan bazı bileşiklerden yararlanarak hayvanların genetik yapıları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Biyokimyasal çeşitlilik gösteren bu unsurlar kalıtsal olup birkaç gen çifti tarafından belirlenip polimorfik özellik gösterirler. Hayvanlarda gözlenen bu biyokimyasal farklılıkların bilinmesinin yararları sıralanırsa ırkların genetik kökenlerinin saptanması, ırkların birbirleriyle genetik mesafelerin belirlenmesi ve bu özelliklerle çeşitli verim özellikleri arasındaki anlamlı bir ilişki bulunması halinde dolaylı seleksiyon kriteri kullanılarak üstün verime sahip hayvanların seçiminin yapılabilmesidir.

Bu şekilde bazı ıslah programlarında süt proteinlerinin göstermiş olduğu çok çeşitlilikten yararlanarak süt proteinleri işarete dayalı seleksiyon kriteri olarak kullanılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda süt protein varyantları ile çeşitli süt ve peynir özellikleri arasında anlamlı ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle elimizdeki ırklarında süt protein polimorfizmi bakımından genetik yapılarının bilinmesi önemlidir.

Dünya sığır varlığına bakılacak olursa yaklaşık olarak 212 milyon baş süt ineği vardır. Süt ineği sayısı bakımından Rusya 44 milyon baş ile birinci bunu 26 milyon baş ile Hindistan ve 13,9 milyon baş ile Brezilya takip etmektedir. Dünya süt üretiminin 1/3 Avrupa ve kuzey Amerika'da üretilmesine rağmen sadece bu ülkeler süt üretiminin % 60 karşılamaktadır (Demirci 1995). Ülkemizde ise 2008 yılında istatistiklerine göre 10.859.000 sığır varlığı olup bu sayının 2.850.000 yerli, 3.555.000 kültür ve 4.454.000 melez hayvanlardan oluşmaktadır Dünya süt üretiminin % 91 inekten, % 6 mandadan, % 1.5 koyundan, % 1.5 keçiden elde edilmektedir. Ülkemizde ise son hayvan sayımlarına göre 25 milyon baş koyun varlığı olup bu sayının % 3-6 Marmara Bölgesinde bulunmaktadır. Ayrıca Türkiye süt, et ve deri üretiminin % 20.33, % 9.33 ve %51.64 koyundan elde edilmektedir (TÜİK 2008).

### **1.1. Kıvırcık Koyunun Fenotip Özellikleri**

Kıvırcık koyunu ince uzun kuyruklu yerli ırklarımızdan biridir. Ülkemizin kuzey batı bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır. Özellikle et, yapağı ve süt için yetiştiriciliği yapılan orta yapılı bir ırk olup Marmara bölgesi iklim şartlarında oldukça adapte olmuştur (Elmacı ve ark. 2006).

Son yıllarda melezleme baskısı ile saf olarak bulunması oldukça zor olan bir yerli ırkıdır. Kıvırcık koyun ırkı özellikle et kalitesi yönünden çok değerli yerli koyun ırklarımızdan biri olup özellikle Marmara Bölgesinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemiz içinde önemli bir yeri olan Kıvırcık ırkının bu şekilde süt serum proteini olarak bilinen  $\beta$ -Lg (Beta Laktoglobulin) polimorfizminin PCR-RFLP yöntemiyle analiz edilerek DNA düzeyinde ortaya konması ve bulunan allel gen frekanslarından yararlanarak diğer ırklar ile karşılaştırılması oldukça yararlı olacaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

### 2.1. Çiftlik hayvanlarında süt protein polimorfizmi ilgili çalışmalar

Çiftlik hayvanlarında süt protein polimorfizmi ilgili ilk çalışmalar Smithies, Ashton ve Aschaffenburg tarafından yapılmıştır. Hall isimli araştırmacı ise 1974 yılında bu unsurlar ile bazı ekonomik verim özellikleri arasında anlamlı ilişkiler saptadıktan sonra bu konuda yapılan çalışmalar hızla bir şekilde artmıştır (Gürcan 2001).

Proteinler aminoasitlerden oluşmuş makro moleküllerdir. Doğal proteinlerin yapısında 20 grup aminoasit mevcuttur. Protein molekülünde amino asitler birbirine peptid bağları ile bağlanmıştır. Moleküllerden birinin amino grubu diğerinin karboksil grubuna karboksil grubu da diğerinin amino grubuna bağlanır ve su molekülü açığa çıkarır. Bu tür bağlanmaya peptidleşme denir (Yöney 1970).

Süt canlıların beslemesinde çok önemli bir gıda maddesidir. Sütün yapısında bulunan en önemli bileşik proteindir. İnek sütünde ortalama % 3,5 protein vardır. Protein toplam kuru maddenin % 28'lik bölümünü teşkil eder. Süt proteini saf olmayıp farklı proteinlerin karışımından oluşmuştur. Bu karışımı oluşturan proteinleri sütü asitleştiren pıhtılaşmasını oluşturan bölümüne kazein kısmı, pıhtılaşmayan protein kısmına ise peynir suyu proteini veya serum kısmı denir. Aynı zamanda peynir suyu kısmında ise amonyum sülfat ve magnezyum sülfat çözeltilerinde çöken kısmına laktoalbumin, çökmeyen kısmına ise laktoglobülin olarak adlandırılır (Yöney 1970).

Sütte en fazla bulunan protein kazein proteindir. Bu protein kendi içinde bazı alt fraksiyonlara ayrılır. Bunlar alfa kazein, beta kazein, kappa kazein ve gamma kazein olarak isimlendirilir. Bu tiplerin her biri genetik olarak kalıtsal ve polimorfik olup elektroforetik ve PCR-RFLP gibi moleküler tekniklerle saptanması mümkündür (Üstdal 1980).

Yapılan çeşitli çalışmalarda alfa kazein genotiplerinin frekansının dağılımının sığırlarda coğrafik farklılıklarını belli eden bir kriter olduğu yolunda çeşitli ifadelerde vardır. Coğrafi bölgelere göre sığırların allel gen ve genotip frekanslarında değişiklikler olmaktadır. Bunun nedeni olarak doğal seleksiyon, hastalıklara direnç ve selektif avantaj olduğu düşünülebilir (Gürcan 2001).

Teknik olara süt; yağı emülsiyon halinde, proteini kolleidal ve diğer süt bileşenleri de suda hakiki çözelti şeklinde bulunan polidispers bir karışımdır. Süt bileşenleri sağım sırasında memeden sütle ayrılan maddelerdir. Süt bileşenleri içinde yağ, laktoz, kazein, laktoglobulin ve alfa laktoalbumindir. Bugün süt içinde modern analiz teknikleri ile 200'den fazla çeşitli süt bileşenleri belirlenmiştir (Demirci 1995).

Çizelge 2.1.Sütün orijinal ve orijinal olmayan bileşenleri

<b>Orijinal Bileşenler</b>	<b>Tali Bileşenler</b>	<b>Orijinal Olmayan Bileşenler</b>
Su	Tuz	Antibiyotikler
Laktoz	Sitrik Asit	Herbisitler
Yağ	Fosfolipidler	İnsektisitler
Protein	Sterinler	Radyonükleotidler
	Enzimler	
	Vitaminler	
	Gazlar	

(Kaynak: Demirci, 1995).

Süt bileşenlerine üzerine etkili olan çok sayıda çevresel faktörler vardır. Bu faktörler hayvanın yaşı, ırk, laktasyon sayısı, laktasyon dönemi, hayvan sağlığı, mevsim, sağım sayısıdır. Laktasyon dönemine göre süt bileşimi kolostrum, normal süt ve laktasyonun sonundaki süt olmak üzere üç bölüme ayrılabilir. Yaş faktörü de süt miktarı ve bileşimine etkili olan faktörlerdendir Süt proteini farklı bileşim ve özellikte çok sayıda protein fraksiyonuna sahiptir. Kazein kompleksi süt proteinlerinin ana fraksiyonu olarak bilinir. Kazein asit, maya yardımıyla kolayca ayrılmaktadır. Geri kalan proteinler peynir suyu veya serum proteinleridir. Kazein, pH 4,6 da sütün çöken protein kısmıdır. Peynir suyu veya serum proteinleri içinde yarı doymuş amonyum çözeltisinde çözünen süt proteini laktoalbumin ve yarı doymuş amonyum çözeltisinde erimeyen laktoglobulin süt proteindir. Kazeinin alfa, beta kappa ve gamma olmak üzere farklı fraksiyonları vardır (Demirci 1995).

Çizelge 2.2. Süt protein fraksiyonları

Fraksiyon	Sütte Konsantrasyon (g/Kg)	Toplam Protein %
Toplam Protein	31,8-40,5	100
Toplam Kazein	24,6-31,7	68-87,6
Peynir Suyu Proteini	6,3-8,8	17,4-24,3
Yağ Kürecikleri Proteini	0,4	1,2
Alfa- s1 Kazein	8,3-10	22,9-27,6
Alfa- s2 Kazein	2,6-4,1	7,2-11,3
Beta-Kazein	8,7-10,7	24,0-29,5
Gamma-kazein	0,8-2,7	2,2-7,5
Kappa- kazein	2,7-3,9	7,5-10,8
$\alpha$ -laktobumin	0,98-1,2	2,7-3,3
$\beta$ -laktoglobulin	3,0-3,6	8,3-10
Serum Albumin	0,4	1,2
İmmünoglobulinler	0,7	2,1
Proteaz-peptan	0,8	2,4

(Kaynak: Demirci, 1995).

Serum proteinleri kazeinden daha fazla esansiyel aminoasit ihtiva ederler. Beslenme açısından daha önemlidirler. Kazeinde diğer proteinlere nazaran daha fazla miktarda glutamik asit ve aspartik asit bulunur. Kazein süt proteinlerinin en önemli fraksiyonu olup yaklaşık % 80 ni oluşturur. Ayrıca sütün süt kütesinin % 2,63 oluşturur. Kazein doğada sadece sütte vardır. Bu yüzden kazeinler asit reaksiyonu gösterirler Süt protein oranı artan hücre sayısıyla artmaktadır. Irk, laktasyon sayısı, yaşı, hayvanın hastalığı, mevsim yalnız toplam protein oranını ve kazein üzerine değil aksine her bir protein fraksiyonlarının birbiri ile olan ilişkisi üzerine de etkilidir (Demirci 1995).

Çizelge 2.3. Süt proteininin yapı taşı analizi

<b>Amino asit</b>	<b>Süt Proteini</b>	<b>Kazein</b>	<b>Serum Protein</b>
Histitin	2,9	3,5	2,8
Lisin	8,1	9,1	11,6
Arginin	2,6	4,0	3,2
Aspartik asit	9,6	8,1	12,8
Treonin	5,6	4,5	8,8
Serin	5,8	5,4	5,6
Glutamik asit	24,7	25,6	20,6
Prolin	10	12,6	4,9
Glisin	2,6	1,8	2,5
Alanin	4,6	2,8	6,1
Sistin	1,3	0,3	-
Valin	8,0	6,7	7,8
Metionin	3	2,7	2,1
İzolosin	6,5	5,3	7,3
Lösin	11,3	10,1	12,1
Tirozin	5	6,0	3,0
Fenilalanin	5,6	5,8	4,1
Triptofan	-	-	-

(Kaynak: Demirci, 1995).

Süt proteinin asit veya peynir mayası ile çöktürülmeyen peynir suyu proteini içinde laktoalbuminler bulunur. Peynir suyu proteininden laktoalbuminler doymuş amonyum sülfat ile çöktürülerek ayrılabilirler. Süt proteininde yaklaşık % 12 peynir suyu proteininde % 84 oranında bulunur. Laktoalbumin peynir suyu proteininde % 20-25 oranında bulunur. Eğer sütün protein 1/3 daha fazla laktoalbumin ve iminoglobulin fraksiyonunda oluşmuş ise bu tip sütlere albuminli sütler denir. İnek, koyun ve keçi sütleri kazeinli sütlerdir. İnsan, kısrak, eşek ve köpek sütleri albuminli sütlerdir.  $\beta$ -Lg peynir suyu proteinlerinin % 50-60 oluşturur (Demirci 1995).

Süt proteinlerinin tiplendirilmesi önceleri nişasta jel elektroforezi tekniği kullanılırken günümüzde PCR-RFLP teknikleri ile DNA üzerinden tespit edilmektedir. Elektroforez ismi Yunanca elektron ve Latince *phore* kelimelerinden meydana gelmiştir. Elektroforez büyük molekül iyonların ve yüklü koloidal zerrelere elektriksel alanın etkisi altında hareket ettiklerini ifade eder. Moleküller katoda veya anoda doğru hareket etmeleri elektriksel alandaki yüklerine bağlıdır (Gürcan 2001).

Bir toplumda gen frekansları kuşaktan kuşağa geçişte değişmiyorsa o toplum sözü edilen özellik yönünden dengededir denir. Bu olaya Hardy-Weinberg yasası denir. Denge olan toplumlarda çiftleşmeler rastgeledir. Belli bir özellik için gen frekansının değişimine neden olan dört etken bir yönlü mutasyon olayları, göçler, rastgele genetik kaymalar ve bazı genlere yönelik doğal veya yapay seçimlerdir (Düzgüneş 1963).

Çeşit süt protein tipleri ile verim özellikleri arasında aşağıda açıklanan sebeplerden dolayı bir ilişki olduğu düşünülebilir. **Pleotropy;** iki ayrı karakterin aynı gen tarafından belirlenmesi olayıdır. Bu durumda iki karakter arasında ilişki tamdır. Eğer bir hayvan bu gen açısından homozigot durumunda ise bu özelliği yavruya aynen geçirir. **Linkage (gen bağıllığı);** aynı kromozom üzerindeki genlere bağlı genler ve bu genleri belirlediği karakterler arasındaki ilişkiye gen bağıllığı adı verilir. Böyle genler genellikle birlikte hareket ederler. Bağlılık bazı hallerde verimlilik üzerinde olumlu etki getirir. Bazılarında olumsuz etki yapabilir. **Heterozigotluk;** kan grubu sistemlerdeki heterozigotluk bir yandan yaşama gücünü bir yandan da verim özelliklerini oluşturan etkendir. Verimlerle ilgili özellikler çok sayıda gen çiftince belirlenir(Alpan 1995).

Polimorfik karakterler tek gen yerinde açılım gösteren birkaç gen tarafından belirlenen ve bu genlerin kendi aralarında kodominantlık göstermesi nedeniyle genotipin fenotipe eş değer olduğu karakterlerdir. Bu karakterlerin pleotropik olarak ekonomik verim özellikleriyle ilişkili olması dolaylı seleksiyonu mümkün kılmaktadır. Hayatın erken döneminde polimorfik özelliklerin belirlenmesi generasyon aralığını kısaltarak seleksiyonun verimliliğini artırmaktadır (Doğru 1996).

Son yıllarda genetik polimorfizm çalışmaları yapısal genlerce kodlanan polipeptidler seviyesine indirilmiştir. Yapısal bir gende aşırılık taşımayan bir kodon değişimi oluşursa, translasyon ile üretilen polipeptidde amino asit değişimi ortaya çıkar. Ayrı bireylerden özel bir protein saflaştırılıp dizilimi belirlenirse popülasyondaki genetik varyasyon ortaya konabilir (Devrim ve Kaya 2004).



Özlütürk ve ark. (1998) biyokimyasal polimorfik öğelerinin dolaylı seleksiyon kriteri olabilmesi için belli bazı şartları taşıması gerektiğini ifade etmişlerdir. Kalıtım derecesi yüksek olmalı, çok az sayıda gen tarafından ve erken döneminde tespit edilebilmeli ve ömür boyu değişmeden kalabilmelidir. Böylece generasyon aralığının kısaltılarak seleksiyon verimliliğini arttırılabilir. Artık günümüzde verim özelliğini belirleyen genlerin haritalarının çıkarılması ve bu genlerdeki farklılıkların verim seviyesi ile olan ilişkileri (QTL) analizleri ile belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu eldeki teknolojik alt yapı kullanılan materyalin kayıtlarının varlığına bağlıdır.

Özellikle süt proteinlerinin genetik varyantlarının süt verimi ve kompozisyonuna bilhassa peynir kalitesine etkisi üzerine yapılan çalışmalar ağırlık kazanmıştır (Özbeyaz 1991).

Bazı ıslah programlarında süt proteinlerinin göstermiş olduğu polimorfizminden yararlanarak süt proteinleri işarete dayalı seleksiyon kriteri olarak kullanılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda süt protein varyantları ile çeşitli süt ve peynir özellikleri arasında anlamlı ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle elimizdeki ırkların süt protein polimorfizmi bakımından genetik yapılarının bilinmesi önemlidir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda süt protein tipleri ile süt verim özellikleri arasında müspet ilişkiler olduğu ve bazı formların seçici avantaj sergilediği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuş iken bazı çalışmalarda ise anlamlı ilişkiler görülmemiştir.

Süt insan beslemesinde kullanılan başlıca protein kaynaklarından biridir. Süt proteinin iki ana protein tipi vardır. Bunlar kazein (alfa, beta ve kappa) ve serum (peynir suyu proteini) alfa laktoalbumin ve  $\beta$ -Lg proteindir. Bu süt proteinleri genetik polimorfizm gösterirler ve farklı genetik varyantları vardır. Bu genetik varyantlar sütün fiziksel ve kimyasal özelliklerin yanı sıra süt verimi ve protein ve yağ içeriği bakımından anlamlı farklılık bulan sonuçlar ifade edilmiştir (Baranyi ve ark. 2010).

Moleküler genetik markırlar kullanılarak yapılan seleksiyon, bu markırların her iki cinsiyette yaşamlarının erken dönemlerinde belirlemek mümkün olduğundan ıslah çalışmalarının hızı ve etkinliği artacaktır (Öner ve ark. 2011).

Genetik çeşitliliğin tanımlamanın en sağlıklı yolu DNA düzeyinde yapılan tanımlamadır. Çiftlik hayvanlarında da genetik yapının tanımlanmasında moleküler genetik tanımlama tekniklerinden faydalanılmaktadır. PCR ile DNA çoğaltımına dayalı olan DNA analiz tekniklerinin en önemlileri arasında RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism = Kesilmiş Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi) sayılmaktadır (Binbaş 2006).

Süt proteinlerinden biri olan beta laktoglobulinin  $\beta$ -Lg<sup>A</sup>,  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>C</sup> olmak üzere üç alleli olduğu ve süt proteinleri polimorfizmi ile sütün teknolojik işlem prosesleri bakımından anlamlı farklılıklar olabileceği ifade edilmiştir (Anton ve Ark. 1999).

Son yıllarda benzer konu üzerinde ve farklı türlerde yapılan çalışmalarda ise Elmacı ve ark. (2008) Saanen keçilerinde  $\beta$ -Lg polimorfizmini belirlemiştir. Buna göre PCR ürünlerinin SacII restriksiyon enzimleri ile kesmiş ve S1 ve S2 olarak tanımlanan iki allel ve buna bağlı olarak 3 genotipin (S1S1, S1S2 ve S2S2)varlığını bildirmiştir.

Steliana ve ark. (2008) de Karagül koyun ırkında  $\beta$ -Lg polimorfizmini araştırmışlardır. Çalışmada birçok koyun ırkında olduğu gibi Karagül ırkında da bu proteinin polimorfik olduğunu ve  $\beta$ -lg geni üzerindeki tek bir nükleotidlik değişimin bu polimorfizme neden olduğunu ifade etmişlerdir.

Benzer şekilde Polish merinos koyunlarında da  $\beta$ -Lg BB genotipli koyunların protein içeriği bakımından  $\beta$ -LgAA ve AB tiplerinden daha yüksek olduğu ifade edilmiştir. (Mroczkowski ve ark. 2004).

Araro ve ark. (2010) da on beş farklı yerli Hindistan koyun ırkında toplam 638 baş koyunda (Changthangi, Rampur, Chokla, Magra, Kheri, Marwari, Sonadi, Jalauni, Muzzafarnagri, Jaisalmeri, Chhotanagpuri, Ganjam, Deccani, Mandya ve Garole) yaptıkları bir çalışmada koyunlarında  $\beta$ -Lg polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Koyunlarda A ve B olmak üzere iki allel genin varlığını ve AA, AB ve BB olmak üzere üç farklı genotip belirlemişlerdir. B allel gen frekansını Güney Batı Asya, Doğu ve Orta Avrupa ile Akdeniz kıyısındaki koyun ırklarından daha yüksek frekansta bulmuştur. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg B tipini Hindistan koyun ırklarında daha baskın olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla bu ırklar için sırasıyla 0.387, 0.273, 0.569, 0.193, 0.472, 0.563, 0.499, 0.160, 0.10, 0.425, 0.50, 0.273, 0.531, 0.326, 0.278 ve 0.370 olarak bulmuşlardır.

Çelik ve Özdemir (2006) 'da İvesi ve Morkaraman koyunlarında  $\beta$ -Laktoglobulin varyantları ile süt bileşimi ve pıhtı oluşum süresi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışma sonucunda  $\beta$ -Lg BB varyantlı sütleri peynir yapımı için selektif avantajlı olarak değerlendirmişlerdir.

Elmacı ve ark. (2006) da üç farklı yerli ırkta (Kıvırcık, Gökçeada ve Sakız) yaptıkları bir çalışmada koyunlarında  $\beta$ -Lg polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmada hayvan materyali olarak toplam 108 baş hayvan kullanmışlardır. Hayvan sayısının ırklara göre dağılımı ise 29 Kıvırcık, 38 Gökçeada ve 41 Sakız koyunu olmuştur. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.7759 ve 0.2241 olarak Kıvırcık koyunlarında, 0.9756 ve 0.0244 Sakız koyunlarında ve 0.7632 ve 0.2368 olarak Gökçeada ırkında bulmuşlardır. Populasyonu Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Elmacı ve ark. (2007) de yapılan bir çalışmada Karacabey Merinosu koyunlarında  $\beta$ -Lg polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmada hayvan materyali olarak 43 baş hayvan kullanmışlardır. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.7791 ve 0.2209 olarak bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Michalova ve Krupuva (2009) da Slovak koyun ırklarında  $\beta$ -Lg polimorfizmi ile süt verim özellikleri ve süt bileşenleri arasındaki ilişkileri araştırmışlardır. Bunun için iki farklı (Czigaia ve Valachian) yerli Slovak sütçü koyun ırkında çalışmışlardır. Çalışmada toplam 131 baş koyun kullanmışlardır. Hayvanlardan toplanan süt örneklerinde süt verimi yanında protein, yağ, laktoz ve somatik hücre sayısı gibi çeşitli süt bileşenlerini de analiz etmişlerdir. İki ırk arasında süt verim ve bileşenleri bakımından önemli farklılık bulunmamıştır. Süt verimi ve laktoz bakımından  $\beta$ -Lg genotipleri bakımından anlamlı farklılıklar görülmüştür ( $P < 0.05$ ). Yapılan çalışmada  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.52 ve 0.48 olarak Valachian ve 0.60 ve 0.40 olarak Czigaia ırkında bulmuşlardır. Populasyonların Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Anton ve ark. (2005) Macar Merinos ve İngiliz sütçü koyunlarında  $\beta$ -Lg genotipleri ile süt bileşenleri ve somatik hücre sayısı arasındaki olası ilişkileri araştırmışlardır. En yüksek ve anlamlı süt verimi ve süt bileşenlerini  $\beta$ -Lg AB genotipli hayvanlarda gözlemişlerdir.

İvesi koyunlarında ise  $\beta$ -Lg AA genotiplilerin somatik hücre sayısını diğer genotiplere göre daha yüksek bulmuşlardır.

Çine Çaparı koyunlarında süt verim özellikleri ile  $\beta$ -Lg genotipleri arasındaki olası ilişkiler üç farklı sürüde araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada Çine Çaparı koyunlarında  $\beta$ -Lg polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada hayvan materyali olarak süt verim denetimleri 40 baş hayvanda ve  $\beta$ -Lg genotipleme ise 128 baş koyunda yapılmıştır. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.3047 ve 0.6953 olarak bulmuşlardır. Bir sürü hariç diğer iki sürünün Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade edilmiştir. Günlük ortalama süt verimi, laktasyon süresi ve laktasyon süt verimi için en küçük kareler ortalaması sırasıyla 0.521 kg, 159.5 gün ve 81.78 kg olarak tespit edilmiştir. Koyunların yaşı ve doğum tipi ele alınan özellikler için anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır.  $\beta$ -Lg (AA, AB ve BB) genotipleri arasında ise laktasyon süresi ve laktasyon süt verimi bakımından anlamlı fark varken günlük ortalama süt verimi için ise anlamlı bir fark görülmemiştir (Erdoğan 2009).

Baranyi ve ark. (2010) de yapılan bir çalışmada Macaristan İvesi ve Racka koyunlarında  $\beta$ -Lg polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmada hayvan materyali olarak 350 baş hayvan kullanmışlardır. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.4796 ve 0.5204 İvesi ve 0.5764 ve 0.4236 Racka ırkında bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Anton ve ark. (1999) da dört farklı sütçü koyun ırkında (İvesi, Sütçü İngiliz, Tsigai ve Lacaune) yaptıkları bir çalışmada koyunlarında  $\beta$ -Lg polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla dört ırk için 0.3478, 0.6857, 0.5650 ve 0.4730 bulmuşlardır.

Elmacı ve ark. (2008) de yapılan bir çalışmada Saanen keçilerinde  $\beta$ -Lg geninin 7. ekzonu ile 3. flankin bölgesi arasındaki polimorfizmini PCR-RFLP yöntemi ile araştırmışlardır. PCR ürünlerini *Sac* II enzimi ile kesmişlerdir. Çalışmada hayvan materyali olarak 28 baş hayvan kullanmışlardır. Sonuç olarak S1 ve S2 allel gen frekanslarını sırasıyla 0.64 ve 0.36 olarak bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Dayiođlu ve Doğru (1997) de Esmer, Siyah Alaca ve Sarı Alaca sığırının laktasyon özellikleri ile  $\beta$ -Lg fenotipleri arasındaki ilişkiler araştırmışlardır. Esmerlerde  $\beta$ -Lg AA genotiplilerin süt yağı bakımından diğer genotiplilerden selektif avantajlı bulmuşlardır. Siyah Alacalarda  $\beta$ -Lg B alleleline sahip olan hayvanların ve Sarı Alacalarda ise  $\beta$ -Lg AB tipliler diğer genotiplere göre incelenen verim özellikleri ( gerçek süt verimi, 305 günlük süt verimi, günlük süt verimi, laktasyon uzunluğu, gerçek yağ verimi, 305 günlük yağ verimi, % yağ oranı) bakımından selektif avantajlı bulunmuştur.

Şekerden ve ark (1999) da Simental ineklerde kan ve süt protein polimorfizmi ile çeşitli verim özellikleri arasındaki ilişkileri araştırmışlardır. Çalışmada transferrin tipleri ile sadece kontrol sağımı ve günlük verimleri arasındaki ilişkiler istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Buna karşın ele alınan özellikler ile süt protein genetik varyantları arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ( $P>0.05$ ).

Öner ve ark. (2011) de Bursa'da yetiştirilen İsviçre Esmeri ve Siyah Alaca sığırlarda  $\beta$ -Lg ve Büyüme hormonu gen polimorfizmini araştırmışlardır. Esmer sığırlarda  $\beta$ -Lg A ve  $\beta$ -Lg-B allel gen frekansları sırasıyla 0.3430 ve 0.6570 olarak bulmuşlardır. Siyah Alacalarda ise aynı allel gen frekansları sırasıyla 0.5480 ve 0.4520 olarak bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Benzer şekilde sığırlar üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda süt protein tipleri ile süt verim özellikleri arasında anlamlı ilişkiler olduğu ve bazı formların seçici avantaj sergilediği çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuş iken bazı çalışmalarda ise anlamlı ilişkiler görülmemiştir. Bu çalışma sonuçlarından bazıları çizelge 2.4. de toplu olarak sunulmuştur. Mandalar üzerine yapılan bir çalışmada ise 110 başlık Murrah mandalarında çalışma yapılmış ve  $\beta$ -Lg gen lokusu bakımından polimorfizm gözlenmemiştir (Meignanalakshmi ve Nainar 2009).

Çizelge 2.4. Sığırlarda  $\beta$ -Lg tipleri ile çeşitli verim özellikleri arasındaki ilişkileri inceleyen çeşitli araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar

Araştırmacı	İrk	Sonuç
Mclean,D.M. ve ark. (1984)	Frizyan Jersey	Sütçü sığırların ıslahında süt protein genotiplerinde bir seleksiyon kriteri olarak değerlendirilmesi önerilmiştir.
Cornberg, G.ve ark.(1964)	Siyah Alaca	$\beta$ -Lg A genotipini taşıyan sığırların diğer genotiplilere göre daha fazla süt verimine sahip oldukları bildirilmiştir.
Meyer, H. (1967)	Siyah Alaca	$\beta$ -Lg genotipleri ile süt ve yağ verimi arasında önemli bir ilişki bulunmamıştır.
Samarineanu, M. ve ark. (1984)	Romanya Esmer	$\beta$ -Lg AA tipinde olan hayvanların süt verimini ve yağ verimini BB ve AB tipli olanlara göre daha yüksek bulunmuştur.
Rensburg,L ve ark. (1990)	Holştayn Ayrshire	Süt ineklerinin genotiplerinin süt verimi için yapılan ilerlemede süt verim performanslarını artırmada eklemeli bir seleksiyon kriteri olarak süt protein tiplerinin kullanılması önerilmiştir.
Kriventsov, Yu. M.; Prozonov, A. A.(1975)	Kholmogor	$\beta$ -Lg lokusunun yağ içeriği ile önemli bir ilişki bulunmamışken süt ve yağ verimleri ile anlamlı ilişkiler bulunmuştur. BB genotipli hayvanların en yüksek süt verimine sahip olduğu bildirilmiştir.
Wegner, W. ve ark. (1973)	Siyah Alaca	Verim özellikleri ile genotipler arasındaki ilişki önemsiz bulunmuştur.
Macha,J. ve ark. (1973)	Çek Alaca	Sütçülük özelliği olarak sadece protein yüzdesinin Alfa Kazein BC tiplilerde yüksek olduğu bulunmuştur. Diğer sütçülük özellikleri ile lokuslar arasında böyle bir ilişki saptanmamıştır.
Janicki, C. (1977)	Polonya Kırmızı Beyaz Alçak Ova sığırlarında	$\beta$ -Lg AA, AB ve BB genotipleri arasında söt, yağ y Özdesi, söt yağ üretimi ve söt üretimi arasında farklılık bulunmamıştır.
Munro ,G,L. (1978)	Jersey	$\beta$ -Lg tipleri ile süt protein yüzdesi arasında anlamlı ilişkiler bulunmuştur.
Ng- Kwai-Hang, K.F. ve ark. (1986)	Siyah Alaca	Alfa Kazein BB, Beta Kazein A <sub>1</sub> B, Kappa Kazein BB ve $\beta$ -Lg BB genotiplerinin selektif avantajlı olduğunu bildirmiştir.
Meyer,F. ve ark. (1990)	Siyah Alaca	$\beta$ -Lg AA, BB tipli olanların süt verimini AB tipli olanlardan istatistik olarak üstün bulunmuştur. Aynı ilişki Alfa Kazein,

		Kappa Kazein ve Beta Kazein arasında bulunmamıştır.
Khaertdinov,R.A.(1990)	Kholmogor Ayrshire	Hayvanlarda seleksiyon yaparken, süt protein polimorfizminde dikkate alınması gerektiğini önerilmiştir.
NG-Kwai-Hang.K.F.ve ark. (1990)	Siyah Alaca	Süt protein miktarı için yapılacak seleksiyonda genetik varyantlarında dikkate alınması gerektiği bildirilmiştir.

Kaynak: (Gürcan, 2001)

Çok sayıda araştırmacı hayvanlarda çeşitli biyokimyasal polimorfik öğeler ile verim özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Bazı yapılan çalışmalarda anlamlı ilişkiler bulunmuşken bazı yapılan çalışmalarda ise istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Bu konuda araştırmacılar arasında tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bu nedenle bu özelliklerin dolaylı seleksiyon kriteri olarak kullanılması hayvanların üstün genotiplilerin seçiminde büyük kolaylık sağlayacaktır. Bu tip özelliklerin üstün genotipe sahip hayvanların seçiminde seleksiyon indekslerinde yer alması ve bu tip çalışmalara devam edilmesi çoğu araştırmacının birleştiği ortak görüştür.

Tekrar önemle vurgulamak gerekirse Kıvırcık koyun ırkı yerli koyun ırklarımızdan biri olup özellikle Marmara Bölgesinde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemiz içinde önemli bir yeri olan Kıvırcık ırkının bu şekilde süt serum proteini olarak bilinen  $\beta$ -Lg polimorfizminin PCR-RFLP yöntemiyle analiz edilerek DNA düzeyinde ortaya konması ve bulunan allel gen frekanslarından yararlanarak diğer ırklar ile karşılaştırılması oldukça yararlı olacaktır.

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Çalışmanın hayvan materyalini Kırklareli ilinde koruma altında saf olarak yetiştiriciliği yapılan 16 erkek ve 32 dişi olmak üzere 1-2 yaşlı saf kıvrıcık koyunları oluşturmuştur. Araştırmada saf kıvrıcık sürüsünden toplam 48 baş hayvandan alınan kan örneklerinden yararlanılarak önce DNA izolasyonu yapılmıştır. Polimorfik bir yapı gösteren  $\beta$ -Lg polimorfizminin PCR-RFLP yöntemi kullanılarak DNA düzeyinde hayvanların genotiplenmesi yapılmıştır. Koyunlarda polimorfik bir özellik gösteren  $\beta$ -laktoglobulin süt serum proteinlerinden biri olup  $\beta$ -laktoglobulin proteini kodlayan genler 3. kromozom üzerinde bulunur. Genomik DNA üzerinde PCR-RFLP teknikleri kullanılarak  $\beta$ -Lg varyantları belirlenmiştir.  $\beta$ -Lg geninin 2 ekzon bölgesi 120 bp uzunluğundaki PCR ürünleri *Rsa*I restriksiyon enzimi ile kesilerek olası A ve B olarak tanımlanan iki allel ve üç genotip (AA, AB ve BB) varlığı araştırılmıştır. DNA izolasyonu için tüm kanda fenol/kloroform yöntemine göre aşağıda belirtilen protokole göre izole edilmiştir. Elde edilen DNA ların saflık ve miktarı spektrofotometrik olarak nanodrop cihazı ile yapılmıştır.

#### 3.2. Metod

Tüm kandan Fenol/Kloroform yöntemiyle aşağıdaki sırayla DNA izolasyon protokolü uygulanmıştır.

- 1- 1,5 ml eppendorf tüpe 750  $\mu$ l kan örneği konulur.
- 2- Üzerine 750  $\mu$ l TE ilave edilip 13.000 RPM de 1 dk santrifüj edilir.  
Üst (süpernatant) kısım atılır.
- 1 ml olacak şekilde TE eklenir(vortexle iyice homojenize edilir).
- Bu işlem 3 tur yapılır. Renk açılana kadar devam edilir.
- Son yıkamadan sonra üst faz uzaklaştırılır.
- 3-Pellet üzerine 80  $\mu$ l SDS, 90  $\mu$ l 1 M NaCl, 30  $\mu$ l Proteinaz-K ilave edilir.  
Son hacim TE konularak 500  $\mu$ l ye tamamlanır.
- 4-Örnek 56 °C de 2 saat inkübe edilir(10-15 dk da vortexlenir).
- 5- 2 saat sonra örneğin üstüne 500  $\mu$ l fenol-kloroform konulur (250  $\mu$ l fenol, 250  $\mu$ l kloroform).
- 6- 5.000 rpm de 2 dk santrifüj edilir.
- 7- Üstte kalan DNA içeren kısım yeni tüpe aktarılır.



- 8-Çökmesi için % 99 etil alkol 1.5 µl ye tamamlanacak şekilde ilave edilir.
- 9-DNA gözleninceye kadar alt üst edilir.
- 10- DNA santrifüj edilip çöktürüldükten sonra alkol tamamen uzaklaştırılır.  
500 µl % 70 lik Etil Alkol ilave edilir.Vortexlenip 12.000 rpm de 1 dk santrifüj edilir ve süpernatant atılır.
- 11- Santrifüj edilerek DNA çöktürülür alkol uzaklaştırılır ve tamamen kuruma sağlanır.
- 12- 200- 500 µl TE tamponunda çözülür.60°C de 10 dk bekletilir.

β-Ig geninin çoğaltılması için PCR uygulaması Feligini ve ark. (1998) ve tarafından önerilen ve nükleotid diziliş aşağıda verilen primerlerden yararlanılmıştır.

F- 5'...CAACTCAAGGTCCCTCTCCA...3'

R- 5'...CTTCAGCTCCTCCACGTACA...3'

Jel Elektroforez; PCR ürünleri görüntülemek için Etidyum Bromür içeren % 1,5 Agoroz jel elektroforez ile hedef bölgenin çoğalıp çoğalmadığı 90-100 V 45-60 dak yürütülerek DNA Ladder gibi standartlar yardımıyla hedef bölgenin çoğalıp çoğalmadığı kontrol edilmiştir.

Enzim kesim reaksiyonu enzimin (*Rsa I*) kesim ısısına bağlı olarak (37°C) 4 saat süreyle kesim yapıldıktan sonra % 3 Agoroz jel elektroforez 90-100 V 45-60 dakika yürütülmüştür.

Genomik DNA nın yükseltgenmesinde toplam miktarı 30 µl olacak şekilde yapılan PCR reaksiyonunda; kan örneklerinden izole edilen genomik DNA dan 50-75 ng, ileri ve geri olmak üzere her bir primerden 100-500 nM, her bir dNTP den 200 µM, 10x PCR tampon çözeltisinden (buffer) 2.5 µL (1X), MgCl<sub>2</sub> den 1.5 mM ve Taq DNA polimeraz enziminden de 1.25 U (ünite) kullanılmıştır.

### 3.2.1. PCR uygulamasında kullanılması planlanan döngü

Termal Cycluser de PCR için ısı devri ise PCR protokolüne göre genel olarak, 95°C de 5 dakika DNA zincirinin ön ayrıştırılmasından sonra 35 defa tekrarlanacak şekilde 95°C de 45 s (saniye), ayrıştırma; daha sonra kullanılan primerlerin ortamda bulunan hedef DNA zinciri ile birleşmesi için 60°C de 45 s annealing (birleştirme) reaksiyonları takiben, yine 45 s, 72°C de Taq polimeraz enzimi ile hedef bölgenin yükseltgenmesi ve en son aşamada 7 dakika 72°C de nihai yükseltgenme, gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Beta laktoglobulin için PCR Protokolu

İçerik	Hacim	Son Konsantrasyon
10X Taq buffer	3.0 µL	1X
50mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL	1.5 mM
10 mM dNTP mix	0.6 µL	200 µM
Taq DNAPolimeraz	0.4 µL	1.25 ünit
Primer 1	0,6 µL	100 nM-500 nM
Primer 2	0,6 µL	100 nM-500 nM
Distile su	21.3 µL	
DNA	2 µL	
Toplam Hacim	30 µL	

Elde edilen PCR ürünleri etidyum bromür içeren % 2 lik agoroz jel elektroforezi ile istenen bölgenin çoğalıp çoğalmadığı kontrol edilmiştir.

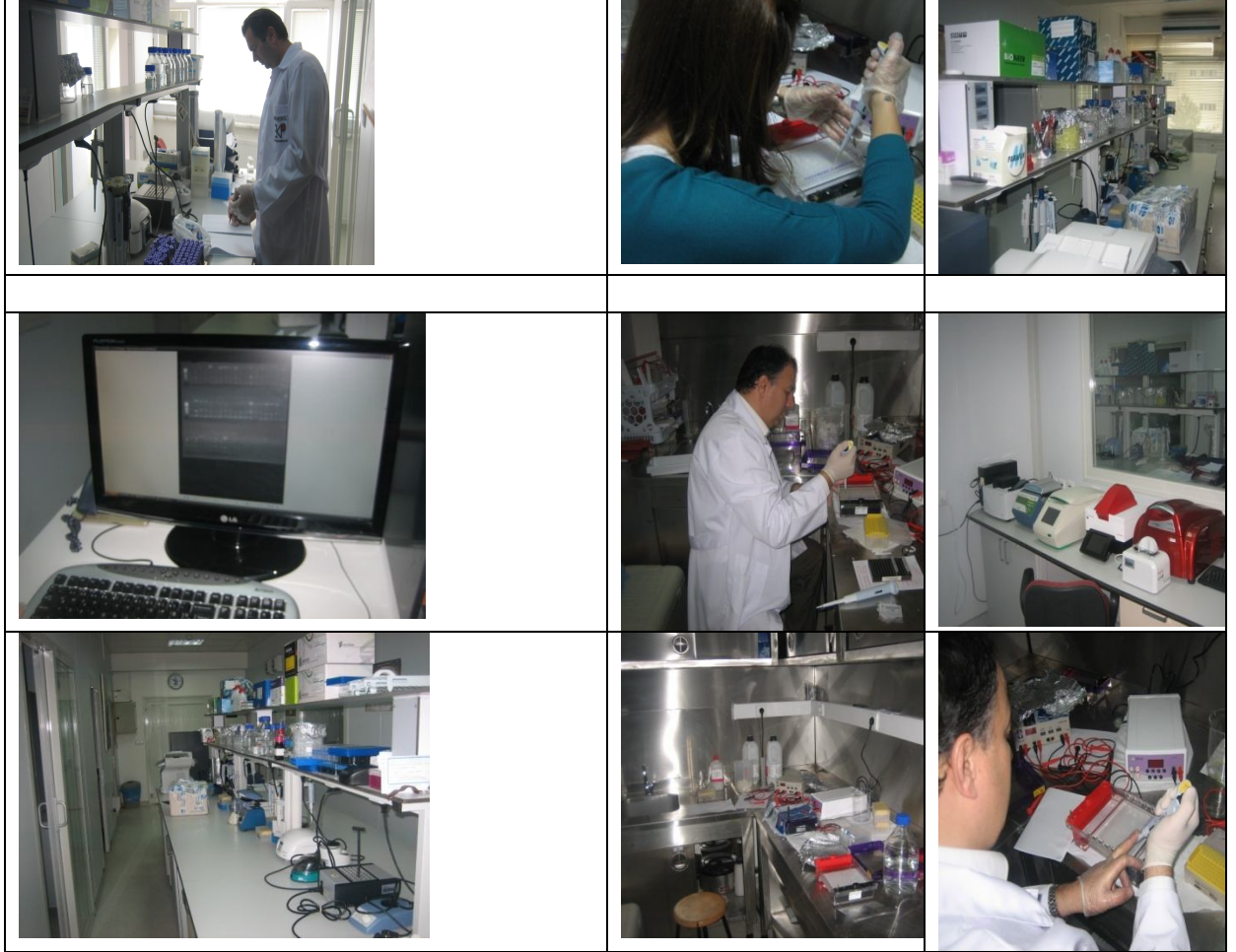
Sonra elde edilen ürünler 37 °C 3 saat süreyle 1 U *RsaI* restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Kesim işleminden sonra oluşan DNA parçacıkları % 3 agoroz jelde yürütülecek ve UV ışık altında jel üzerinde ortaya çıkan bandlara göre β-Lg tiplendirmesi yapılmıştır.

103 bç	----	----	
66 bç		----	----
37 bç		----	----
17 bç	----		
	BB	AB	AA

Şekil 3.1. β-Lg tiplendirinin jel üzerindeki sembolik gösterimi.

Çizelge 3.2. Restriksiyon Enzim Kesim Reaksiyonu

İçerik	Hacim
PCR Ürünü	5.0 µL
Enzim Buffer ( <i>NE4</i> )	2.0 µL
Restriksiyon Enzimi ( <i>Rsa I</i> )	1.0 µL
Distile Su	12.0 µL
Toplam Hacim	20 µL



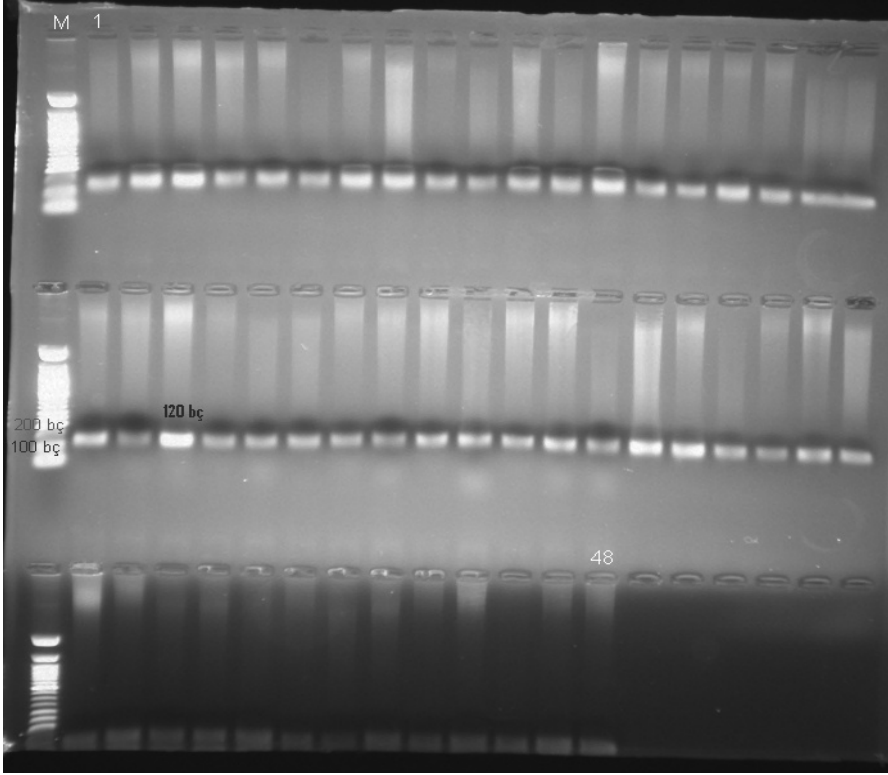
Şekil 3.2. Seçilen bazı laboratuvar görüntüleri

### **3.2.2. İstatistik Yöntem**

Gen frekanslarının belirlenmesi ise direk gen sayım metoduna göre hesaplanıp ilgili allel gen frekanslarının Hardy – Weinberg kuramına göre populasyonun genetik dengede olup olmadığı ki kare analizi ile test edilmiştir (Soysal 1993).

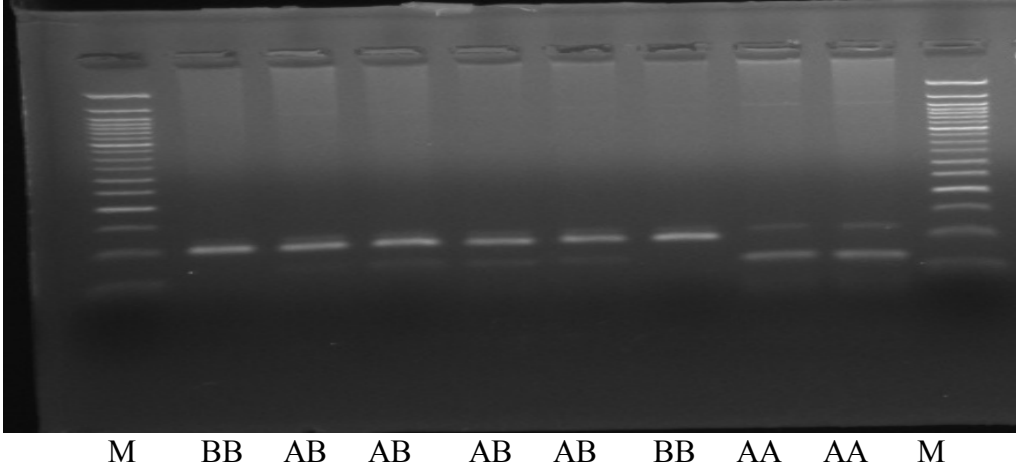
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan araştırma sonucunda toplanan 48 hayvandan izole edilen DNA'ların 120 bç yükseltgenmesi beklenen PCR ürünlerini gösterimi Şekil 4.1. de verilmiŐtir. Şekil 4.2. de ise uygun restriksiyon enzimi ile kesim yapıldıktan sonra elde edilen bantların jel görüntüleri verilmiŐtir.

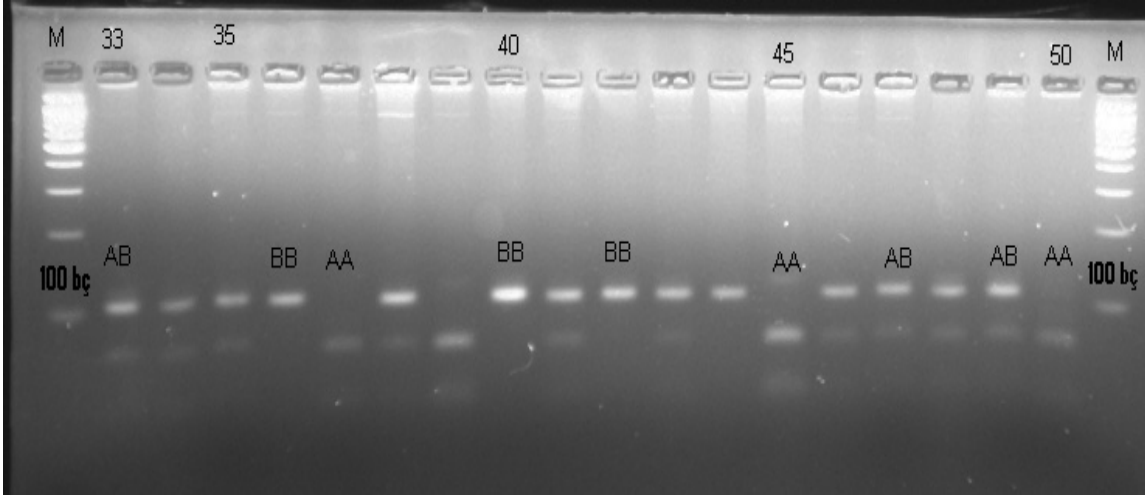


Şekil 4.1. PCR ürünlerinin etidyum bromür içeren % 2 lik agoroz jel elektroforez görüntüsü

Enzim kesiminden sonra elde edilen bantlara yapılan genotipleme sonucunda 13 tane  $\beta$ -Lg AA, 19 tane  $\beta$ -Lg AB ve 16 tane  $\beta$ -Lg BB genotipleri görülmüştür.



Şekil 4.2. Seçilen bazı örneklerin UV ışık altında jel üzerinde ortaya çıkan bantlara göre  $\beta$ -Lg tiplerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.3. Seçilen bazı örneklerin UV ışık altında jel üzerinde ortaya çıkan bantlara göre  $\beta$ -Lg tiplerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.1.  $\beta$ -Laktoglobulin genotiplerinin ve allel gen frekanslarının saf Kıvırcık koyunlarında (n=48) dağılımı

	$\beta$ -Lg Genotipleri			$\beta$ -Lg Gen frekansları		Genetik Denge Testi
	AA	AB	BB	A	B	
Gözlenen	13	19	16	0.468	0.532	$X^2$ 2.09
% Frekans	27	40	33			( $P>0.05$ )
Beklenen	11	24	13			

Çizelge 4.1. de gösterildiği gibi  $\beta$ -Lg AA,  $\beta$ -Lg AB ve  $\beta$ -Lg BB genotiplerinin gözlenen genotip sayıları sırasıyla 13, 19 ve 16 olmuştur. Buna karşın beklenen  $\beta$ -Lg AA,  $\beta$ -Lg AB ve  $\beta$ -Lg BB genotip frekansları ise sırasıyla 11, 24 ve 13 olarak bulunmuştur. İlgili allel gen frekansları ise  $\beta$ -Lg A ve  $\beta$ -Lg B allelleri için 0.468 ve 0.532 olarak bulunmuştur. Populasyonun genetik denge analizinde ise Hardy-Weinberg yasasına uyduğu yapılan ki kare analizinde görülmüştür. Buna göre ki kare değeri 2.09 olup bu değer cetvel değerinden düşüktür ( $P>0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada kullanılan Kıvırcık koyunlarının  $\beta$ -Lg proteini bakımından genetik yapısını belirlemek için yapılan bu çalışmada ilgili allel gen frekansları ise  $\beta$ -Lg A ve  $\beta$ -Lg B allelleri için 0.468 ve 0.532 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda populasyonun genetik dengede olduğu yapılan ki kare analizinde görülmüştür. Buna göre ki kare değeri 2.09 olup bu değer cetvel değerinden (3.84) düşüktür ( $P>0.05$ ).

Bu sonuçlar diğer araştırmalarda farklı ırklar için bulunan ilgili allel gen frekansları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca diğer çalışmalarda genetik varyantlar ile çeşitli özellikler arasındaki olası ilişkiler bulunmuştur.

Araro ve ark. (2010) da on beş farklı yerli Hindistan koyun ırkında (Changthangi, Rampur, Chokla, Magra, Kheri, Marwari, Sonadi, Jalauni, Muzzafarnagri, Jaisalmeri, Chhotanagpuri, Ganjam, Deccani, Mandya ve Garole) yaptıkları bir çalışmada  $\beta$ -Lg B tipini Hindistan koyun ırklarında dominant olduğunu ifade etmiştir. Ayrıca  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla bu ırklar için sırasıyla 0.387, 0.273, 0.569, 0.193, 0.472, 0.563, 0.499, 0.160, 0.10, 0.425, 0.50, 0.273, 0.531, 0.326, 0.278 ve 0.370 olarak bulmuşlardır.

Çelik ve Özdemir (2006) 'da İvesi ve Morkaraman koyunlarında  $\beta$ -Lg BB varyantlı sütleri peynir yapımı için selektif avantajlı olarak değerlendirmişlerdir.

Elmacı ve ark. (2006) da üç farklı yerli ırkta (Kıvırcık, Gökçeada ve Sakız) yaptıkları bir çalışmada koyunlarında  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.7759 ve 0.2241 olarak Kıvırcık koyunlarında, 0.9756 ve 0.0244 Sakız koyunlarında ve 0.7632 ve 0.2368 olarak Gökçeada ırkında bulmuşlardır. Populasyonu Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Elmacı ve ark. (2007) de Karacabey Merinosu koyunlarında  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.7791 ve 0.2209 olarak bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Michalova ve Krupuva (2009) da iki farklı (Czigaia ve Valachian) yerli Slovak sütçü koyun ırkında çalışmışlardır. İki ırk arasında süt verim ve bileşenleri bakımından önemli farklılık bulunmamıştır. Süt verimi ve laktoz bakımından  $\beta$ -Lg genotipleri bakımından anlamlı farklılıklar görülmüştür ( $P<0.05$ ). Yapılan çalışmada  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını



sırasıyla 0.52 ve 0.48 olarak Valachian ve 0.60 ve 0.40 olarak Czigaia ırkında bulmuşlardır. Populasyonların Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Anton ve ark (2005) Macar Merinos ve İngiliz sütçü koyunlarında  $\beta$ -Lg genotipleri ile süt bileşenleri ve somatik hücre sayısı arasındaki olası ilişkileri araştırmışlardır. En yüksek ve anlamlı süt verimi ve süt bileşenlerini  $\beta$ -Lg AB genotipli hayvanlarda gözlemişlerdir. İvesi koyunlarında ise  $\beta$ -Lg AA genotiplilerin somatik hücre sayısını diğer genotiplere göre daha yüksek bulmuşlardır.

Çine Çaparı koyunlarında süt verim özellikleri ile  $\beta$ -Lg genotipleri arasındaki olası ilişkiler üç farklı sürüde araştırılmıştır. Sonuç olarak  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.3047 ve 0.6953 olarak bulmuşlardır. Bir sürü hariç diğer iki sürünün Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade edilmiştir. Günlük ortalama süt verimi, laktasyon süresi ve laktasyon süt verimi için en küçük kareler ortalaması sırasıyla 0.521 kg, 159.5 gün ve 81.78 kg olarak tespit edilmiştir. Koyunların yaşı ve doğum tipi ele alınan özellikler için anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır.  $\beta$ -Lg (AA, AB ve BB) genotipleri arasında ise laktasyon süresi ve laktasyon süt verimi bakımından anlamlı fark varken günlük ortalama süt verimi için ise anlamlı bir fark görülmemiştir (Erdoğan 2009).

Baranyi ve ark. (2010) de yapılan bir çalışmada Macaristan İvesi ve Racka koyunlarında  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> ve  $\beta$ -Lg<sup>B</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla 0.4796 ve 0.5204 İvesi ve 0.5764 ve 0.4236 Racka ırkında bulmuşlardır. Populasyonun Hardy-Weinberg yasasına göre genetik dengede olduğunu ifade etmişlerdir.

Anton ve ark. (1999) da dört farklı sütçü koyun ırkında (İvesi, Sütçü İngiliz, Tsigaia ve Lacaune) yaptıkları bir çalışmada koyunlarında  $\beta$ -Lg<sup>A</sup> allel gen frekanslarını sırasıyla dört ırk için 0.3478, 0.6857, 0.5650 ve 0.4730 bulmuşlardır.

Yaptığımız çalışmada ise ilgili gen frekansları:  $\beta$ -Lg A ve  $\beta$ -Lg B allelleri için 0,468 ve 0,532 olmuşken Karacabey Merinosu, Kıvırcık ve Sakız koyununda ilgili A ve B allel gen frekansları sırasıyla 0.7791, 0.2209; 0.7759, 0.2241 ve 0.9756, 0.0244 olarak bulunmuştur (Elmacı ve ark. 2012).

Önemle vurgulamak gerekirse Kıvırcık ırkının bu şekilde  $\beta$ -Lg polimorfizminin PCR-RFLP yöntemiyle analiz edilerek DNA düzeyinde ortaya konulmasına çalışılmıştır. Aynı zamanda çok sayıda araştırmacı hayvanlarda önceleri çeşitli biyokimyasal polimorfik ve sonraları moleküler markerler ile verim özellikleri arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. Bazı yapılan çalışmalarda anlamlı ilişkiler bulunmuşken bazı yapılan çalışmalarda ise istenen seviyede istatistiki olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Bu konuda araştırmacılar arasında tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bu nedenle bu özelliklerin dolaylı seleksiyon kriteri olarak kullanılması hayvanların üstün genotiplilerin seçiminde büyük kolaylık sağlayacaktır. Özellikle moleküler markerların kullanılması çok erken yaşta ve çok güvenli olarak belirlenmesi ve tek cinsiyette görülen özellikler içinde kullanılması Bu tip özelliklerin üstün genotipe sahip hayvanların seçiminde seleksiyon indekslerinde yer alması ve bu tip çalışmalara devam edilmesi çoğu araştırmacının birleştiği ortak görüştür.

## 6. KAYNAKLAR

- Alpan O (1995). Sığır Yetiştiriciliği ve Besiciliği. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Zootečni ABD Yayın No.3, Ankara.
- Anton I, Zsolnai A, Fesus L, Kukovics S, Molnar A (1999). Survey of  $\beta$ -Laktoglobulin and Alfa S1 – Casein Polymorphism in Hungarian Dairy Sheep Breeds and Crosses on DNA Level. Arch. Tierzucht, 42: 387-392.
- Anton I, Zsolnai A, Fesus L (2005).  $\beta$ -Laktoglobulin and Alfa S1 Casein Polymorphism in Hungarian Sheep Breeds and Crosses on DNA Level. Vratna dolina, 2005,63-67.
- Arora R, Bhatia S, Mishra BP, Sharma R, Pandey AK, Prakash B, Jain A (2010). Genetic Polymorphism of the  $\beta$ -Laktoglobulin Gene in Native Sheep from India. Biochem Genet 48:303-311.
- Baranyi M, Kerekes A, Hiripi L, Bozse Z (2010). Preliminary Data on Beta Laktoglobulin Genetic polymorphisms in Hungarian Awassi and Racka Sheep. Romanian Academy, DAGENE-2010.
- Binbaş P (2006). Çine Çaparı Koyunlarda Genetik Çeşitliliğin RAPD Yöntemi İle Belirlenmesi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Çelik Ş, Özdemir S (2006). B-Laktoglobulin Variants in Awassi and Morkaraman Sheep and their Association with the Composition and Rennet Clotting Time of the Milk. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30: 539-544.
- Demirci M (1995). Süt Teknolojisine Giriş. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayın No:105, Ders Notu No: 68, Tekirdağ.
- Devrim A, Kaya N (2004). Genetik Polimorfizm ve Mikrosatellitler. Kafkas Univ. Vet. Fak. Der. 10 (2):215-220.
- Dayıoğlu H, Doğru Ü (1997). Esmer, Siyah Alaca ve Sarı Alaca Sığır Sütlerinde Belirlenen Beta Laktoglobulin Fenotipleriyle Laktasyon Özellikleri Arasındaki İlişkiler. Atatürk Üniversitesi Zir. Fak. Der. 28, (2):170-180.
- Doğru Ü, Tüzemen N (1996). Esmer, Siyah Alaca, Sarı Alaca ve Doğu Anadolu Kırmızısı Sığır Irklarının Transferrin Polimorfizmi Bakımından Genetik Yapısı. Hayvancılık 96 Ulusal Kongresi 18–20 Eylül 1996.İzmir.
- Düzgüneş O (1963). Hayvan Islahında Kalıtım Derecesi. Atatürk Üniversitesi, Yayın No:30 Erzurum.
- Elmacı C, Öner Y, Balcıoğlu, MS (2006). Genetic Polymorphism of  $\beta$ -Laktoglobulin Gene in Native Turkish Sheep Breeds. Biochemical Genetics, Vol. 44, Nos. 7/8, August 2006. Journal of Applied Animal Research, 32:2, 145-148.

- Elmacı C, Öner Y, Koyuncu M (2008). Saanen Keçilerinde  $\beta$ -laktoglobulin Genotiplerinin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi. *Hayvansal Üretim* 49(1): 1-4,2008.
- Elmacı C, Öner Y, Balcıoğlu, MS (2012).  $\beta$ -Laktoglobulin Gene Types in Karacabey Merino Sheep Breeds Using PCR-RFLP. *Journal of Applied Animal Research*, 32:2, 145-148.
- Erdoğan F (2009). Yerli Gen Kaynağı Çine Çaparı Koyunlarının Süt Verim Özellikleri ve Beta Laktoglobulin Gen Polimorfizmi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Feligini M, Parma P, Aleandri R, Greppi GF, Enne G (1998). PCR-RFLP test for direct determination of  $\beta$ -lactoglobulin genotype in sheep. *Animal Genetics*, 29, 473-474.
- Gürcan EK (2001). Siyah Alaca Süt Sığırlarında Çeşitli Süt ve Kan Proteinleri Polimorfizmi ve Bu Özelliklerle Bazı Verim Özellikleri Arasındaki İlişkiler. *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.*
- Meignanalakshmi S, Nainar A (2009). PCR-RFLP Analysis of Beta Lactoglobulin Gene in Murrah Buffaloes. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences* 5 (5) 194-197.
- Míchalova A, Krupuva Z (2009). Influence of  $\beta$ -Laktoglobulin Genotypes on Composition of Milk and Milk Production Traits of the Slovak Ovine Breeds. *Acta Fytotechnica et Zootechnica Mimoriadne Cislo 2009.*
- Mroczkowski S, Korman K, Erhardt G, Piwczynski D, Borys B (2004). Sheep Milk Protein Polymorphism and its Effect on Milk Performance of Polish Merino. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 47 Special Issue 114-121.
- Özbeyaz C, Bayraktar M, Alpan O, Akcan A (1991). Jerseylerde Süt Protein Polimorfizmi ve İlk Laktasyon Süt Verimiyle İlişkisi. *Lalahan Hay. Arş. Ens. Der.* 31 (3-4):27-33.
- Öner Y, Pullu M, Akın O, Elmacı C (2011). Bursa Bölgesinde Yetiştirilen İsviçre Esmeri ve Siyah Alaca Irkı Sığırlarda Beta Laktoglobulin ve Büyüme Hormonu Gen Polimorfizmlerinin HaeIII ve MspI Restriksiyon Enzimleri Lullanılarak İncelenmesi. *Kafkas Univ Vet Fak Der* 17(3):371-376.
- Özlütürk A, Doğru Ü, Dayıoğlu H(1998). Doğu Anadolu Kırmızısı Sığır Irkının Transferrin Polimorfizmi Bakımından Genetik Yapısı ve Bazı Verim Özellikleri ile ilişkisi. *Doğu Anadolu Tarım Kongresi* 14-18 Eylül 1998, Erzurum.
- Steliana K, Adina MM, Anca G, Marieta C (2008). Genotyping of  $\beta$ -Laktoglobulin Gene in Karakul Sheep Breed. *Lucrari stiintifice Zootehnie și Biotehnologii vol* 41(1) 2008.
- Soysal Mİ (1992). Biometrinin Temel Prensipleri. *Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Yayınları* No. 95, 155s Tekirdağ.

- Şekerden Ö, Doğrul F, Erdem H (1999). Türkiye’de Simental İneklerde Kan ve Süt Protein Polimorfizmi ve Bunların Muhtelif Verim Özelliklerine Etkileri, Tr.J. of Veterinary and Animal Sciences 23 1,87-93.
- Üstdal M (1980). Türkiye’deki Bazı Yerli Sığır Irklarında Hemoglobin, Transferrin ve Süt Proteinlerinin Biyokimyasal Polimorfizmi Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Cilt 27, No:1-2,1980.
- Yöneş A (1970). Süt ve Mamülleri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınlar:. 421 Ders Kitabı: 148, Ankara.
- TÜİK (2008). Türkiye İstatistik Kurumu 2008 Verileri. [www:tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr)

## **ÖZGEÇMİŞ**

13.07.1984 tarihinde İstanbul İli Beyoğlu İlçesi'nde doğdu. İlköğrenimimi Örnektepe İlk Öğretim Okulu ve Kaptanpaşa Ortaokulunda, Ortaöğrenimimi Mecidiyeköy Lisesi'nde tamamladı. 2003 Yılında başladığım Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümünden 2008 yılında mezun oldu. 2010 Eylül ayında Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootečni Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladı.