

**DOĞU ANADOLU KIRMIZISI VE MELEZİ
SIĞIRLARDA PROLAKTİN GENİ
POLİMORFİZMİ**

Zeynep SÖNMEZ

**Yüksek Lisans Tezi
Zootekni Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR
2013
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞU ANADOLU KIRMIZISI VE MELEZİ SIĞIRLARDA
PROLAKTİN GENİ POLİMORFİZMİ**

Zeynep SÖNMEZ

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2013**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

DOĞU ANADOLU KIRMIZISI VE MELEZİ SIĞIRLARDA PROLAKTİN GENİ
POLİMORFİZMİ

Yrd. Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR danışmanlığında, Zeynep SÖNMEZ tarafından hazırlanan bu çalışma 23.../01./2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Zootekni Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ömer Cevdet Bilgin İmza :

Üye : Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Prof. Dr. İhsan EFEÖĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DOĞU ANADOLU KIRMIZISI VE MELEZİ SIĞIRLARDA PROLAKTİN GENİ POLİMORFİZMİ

Zeynep SÖNMEZ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR

Bu araştırmada Türkiye’de gen kaynağı olarak korunan “Doğu Anadolu Kırmızısı” ırkı yerli sığırlar ile Erzurum ve civarında yetiştirilen Doğu Anadolu Kırmızısı Melezi sığırların Prolaktin gen lokusu bakımından genotipik yapılarının incelenmesi, ilgili genler bakımından sürülere ait genotip ve allel frekanslarının dağılımı, gruplar arası ve gruplar içi varyasyonların ortaya konulması amaçlanmıştır. Çalışmada, PCR-RFLP yöntemi kullanılarak yerli Doğu Anadolu Kırmızı ırkının saf ve melezi sığırlarında Prolaktin genine ait 3 farklı ekzon bölgesi incelenmiş ve prolaktin genine ait gen ve genotip frekansları belirlenmiştir. Analizde 1. ekzon bölgesi için HaeIII, 3.ekzon ve 4. ekzon bölgeleri için RsaI restriksiyon enzimleri kullanılmıştır.

PCR-RFLP analizi sonucunda PRL geni 1.ekzon bölgesinde tüm populasyonlar genelinde monomorfik bulunmuştur. PRL geni 3.ekzon bölgesinde AA, AB ve BB genotip frekansları DAK populasyonunda sırasıyla, 0.59, 0.34 ve 0.07, Melez populasyonda sırasıyla 0.49, 0.44. ve 0.07, tüm populasyon genelinde 0.55, 0.38 ve 0.07 olarak bulunurken, 4.ekzon bölgesinde AA, AG ve GG genotip frekansları DAK populasyonunda sırasıyla, 0.01, 0.51 ve 0.48, Melez populasyonda sırasıyla 0.00, 0.92 ve 0.08, tüm populasyon genelinde 0.01, 0.57 ve 0.42 olarak tespit edilmiştir. İncelenen tüm bireyler ele alındığında 3.ekzon bölgesinde A alleli gen frekansı 0.74, 4.ekzon bölgesinde A alleli gen frekansı ise 0.29 olarak bulunmuştur. Prolaktin lokuslarında gözlenen genotip frekanslarının populasyonlar arasındaki dağılımı 3. Ekzon bölgesinde homojen olarak bulunmuştur ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde ($p>0.05$) olduğu gözlenirken, 4.ekzon bölgesinde genotiplerin dağılımının heterojen ($p<0.01$) ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olmadıkları görülmüştür.

DAK populasyonunda 3.ekzon bölgesi için hesaplanan gözlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e) değerlerinden düşük bulunurken, bu değerler 4.ekzon bölgesi için yüksek bulunmuştur. Diğer incelenen Melez populasyonu ve populasyon genelinde gözlenen heterozigotluk oranları beklenen değerlerinden yüksek bulunmuştur. Ekzon 3 ve 4 bölgeleri için DAK populasyonunda hesaplanan F_{IS} değerleri sırasıyla 0.072 ve -0.290 ve melez populasyonda -0.082 ve -0.846 olarak bulunmuş, populasyon genelinde ise -0.010 ve -0.600 olarak hesaplanmıştır. Ekzon 3 ve 4 bölgeleri için F_{IT} değeri -0.006 ve -0.539 olarak tespit edilmiştir. Ekzon 3 ve 4 bölgeleri için F_{ST} değeri 0.003 ve 0.039 olarak tespit edilmiştir. Bu değerlere göre 3.ekzon bölgesinde genetik farklılaşma önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 4.ekzon bölgesi için DAK ve Melez populasyonlar arasında genetik farklılaşmanın önemli ($p<0.05$) düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

2013, 53 sayfa

Anahtar Kelimeler: Prolaktin, Polimorfizm, DAK, PCR-RFLP.

ABSTRACT

MSc THESIS

POLYMORPHISM OF PROLACTIN (PRL) GENE IN THE EAST ANATOLIAN RED CATTLE AND THEIR CROSBREDS

Zeynep SÖNMEZ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor: Assist Prof. Dr. Memiş ÖZDEMİR

In this study, we aimed to investigate the characterization of prolactin gene locus in the native "Eastern Anatolian Red" pure and crossbreed populations reared in Erzurum and nearby and to determine the distribution of genotype and allele frequencies in the herds and variations within and between populations. Using PCR-RFLP method, in the pure and crossbreed animals of native East Anatolian Red Cattle, three different exons of prolactin gene were examined and gene and genotype frequencies were determined. In the analysis of exon 1, we used HaeIII while RsaI restriction enzymes for exon 3 and exon 4.

PCR-RFLP analysis was resulted with monomorphic genotype in exon I for both of the populations. AA, AB and BB genotype frequencies in exon 3 was 0.59, 0.34 and 0.07 for pure EAR, 0.49, 0.44 and 0.07 for crossbreeds and 0.55, 0.38 and 0.07 for the total population respectively. AA, AG and GG genotype frequencies in exon 4 was 0.01, 0.51 and 0.48 for pure EAR, 0.00, 0.92 and 0.08 for crossbreeds and 0.01, 0.57 and 0.42 for the total population respectively. For all the individuals examined A allele gene frequency in exon 3 was 0.74 while 0.29 in exon 4. Distribution of genotype frequencies observed in prolactin locus among the populations was found homogenous in exon3 and the populations were in the H-W equilibrium ($p>0.05$). In exon 4, distribution of genotype frequencies was heterogeneous and the populations were not in the H-W equilibrium ($p<0.01$). Observed heterozygosity (H_o) was lower than expected heterozygosity (H_e) for exon 3 but higher for exon 4 in pure EAR population. In crossbreed population and the total population, observed heterozygosity ratios were higher than expected values.

Calculated F_{IS} values for exon 3 and exon 4 were 0.072 and -0.290 in EAR population, -0.082 and -0.846 in crossbreed population and -0.010 and -0.600 in the total population respectively. F_{IT} values for exon 3 and exon 4 were determined as -0.006 and -0.039, respectively. F_{ST} values 0.003 and 0.039 for exon 3 and exon 4 respectively. According to this values, genetic differentiation in exon 3 was not significant ($p>0.05$) while significant in exon 4 ($p<0.05$) between pure EAR and crossbreed populations.

2013, 53 pages

Keywords: Prolactin, Polymorphism, EAR, PCR-RFLP.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, çalıŐmamı inceleyip yapıcı eleŐtirileri ile yardımcı olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Memiş ÖZDEMİR'e teŐekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim süresince yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ömer Cevdet BİLGİN hocama teŐekkürü bir borç bilirim.

Sadece bu süreçte değil, her koŐulda yanımda olan, hayatımın her aŐamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, aileme teşekkür ederim.

Her koŐulda beni pozitif düşünmeye yönlendiren, manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen isimlerini sayamadığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Zeynep SÖNMEZ

Ocak, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Prolaktin (PRL)	4
1.1.1. PRL hormonunun biyolojik fonksiyonu.....	6
1.1.2. Prolaktin hormonunun meme gelişimi ve laktasyon üzerindeki etkisi.....	7
1.2. Doğu Anadolu Kırmızısı	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Hayvanlardan kan alımı.....	21
3.2.2. Kullanılan çözeltiler	22
3.2.3. Genomik DNA izolasyonu	22
3.2.4. DNA'nın kalitatif tayini	23
3.2.5. DNA'nın kantitatif tayini	23
3.2.6. PCR işlemi.....	24
3.2.7. PCR basamakları	25
3.2.8. Primer dizaynı	27
3.2.9. PCR amplifikasyonu.....	29
3.2.10. PCR ürünlerinin gözlenmesi	30
3.2.11. Restriksiyon enzimleriyle DNA'ların kesimi.....	30
3.2.12. Örneklerin yüklenmesi ve yürütme işlemi	31
3.2.13. İstatistiksel analizler	31

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	37
4.1. DNA'nın Kantitatif Tayini	37
4.2. DNA Sonuçlarının Gözlenmesi.....	38
4.3. PCR-RFLP Sonuçları	38
4.4. Genotip ve Allel Frekanslarının Dağılımı	39
4.5. Populasyonların X^2 bağımsızlık ve Hardy-Weinberg Genetik Denge Testi	41
4.6. Heterozigotluk Oranları ve Fiksasyon İndeksi	42
5. SONUÇ	45
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ	54

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat Derece
A	Adenin Bazı
bç	Baz Çifti (base pair)
BSA	Jelatin Bovin Serum Albümin
C	Sitozin Bazı
cDNA	Komplementer DNA (Complementary DNA)
cm	Santimetre
csn	Kappa-Kazein
dak	Dakika
DAK	Doğu Anadolu Kırmızısı
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosit Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)
EtBr	Etidyum Bromid (Ethydium Bromide)
FASN	Yağ Asit Sentetaz
F _{IS}	Alt Populasyon İçi Fiksasyon İndeksi (Fixation index For Subpopulations)
F _{IT}	Tüm Populasyonlar İçin Fiksasyon İndeksi (Total Fixation index)
F _{ST}	Alt Populasyonlar Arası Fiksasyon İndeksi (Fixation index Among Subpopulation)
g	Gram
G	Guanin Bazı
GAK	Güney Doğu Anadolu kırmızısı
GH	Büyüme Hormonu (Growth Hormone)
Hap	Haplotip
He	Beklenen Heterozigotluk (Expected Heterozygosity)
H-E	Hardy-Weinberg Dengesi (Hardy-WeinbergEquilibrium)
Ho	Gözlenen Heterozigotluk (Observed Heterozygosity)

IU	Uluslararası Birim (International Unit)
Kb	Kilo baz
LD	Genetik Bağlantı (linkaj disequilibrium)
M	Molar
mA	Miliamper
MAS	Markıra Dayalı Seleksiyon (Marker Asisted Selection)
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Msp I	Restriksiyon Endonükleaz Enzimi (Msp I)
NaCl	Sodyum Klorür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information)
Ng	Nanogram
OLR1	Düşük Yoğunluktaki oxidized Lipoprotein Reseptör
OPN	Osteopontin
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PIT-1	Pituitary-Specific Transcription Factor-1
PL	Plasental Laktojen Hormonu
pmol	Pikomol
PRL	Prolaktin
PRLR	Prolaktin Hormonunu Reseptör Geni (Prolactin Hormone Receptor Gene)
QTL	Kantitatif Özellik Lokusları (Quantitative Trait Locus)
RE	Restriksiyon Endonükleaz (Restriction Endonuclease)
rpm	Bir Dakikadaki Rotor Devir Sayısı (Rotor Per Minute)
SCC	Somatik Hücre Sayımı (Somatic Cell Count)
sn	Saniye
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotid Polymorphism)
SSCP	Tek Zincir Yapısal Polimorfizm (Single Stranded Conformation Polymorphism)
T	Timin bazı

TBE	Tris Borate EDTA
Tm	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature = Tm)
Tris	Tris (hydroxymetyl) Aminomethane
UV	Ultra Viyole (Ultra violet)
V	Volt
WAP	Peynir altı süt proteinin
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Doğu Anadolu Kırmızısı	8
Şekil 3.1.PCR basamakları.	27
Şekil 4.1. DNA'nın NanoDrop'da okunan kantitatif sonuçları	37
Şekil 4.2.Tüm Kandan Elde Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel'de Görünümü.....	38
Şekil 4.3. PRL geni 1.ekzon bölgesine ait PCR-RFLP sonucu	38
Şekil 4.4. PRL geni 3.ekzon bölgesine ait PCR-RFLP sonucu	39
Şekil 4.5. PRL geni 4.ekzon bölgesine ait PCR-RFLP sonucu	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada incelenen bölgeler ve uygulanan primerler.....	29
Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve reaksiyonda kullanılan miktarları	29
Çizelge 3.3. İncelenen PRL geni bölgelerine ilişkin PCR döngü koşulları.	30
Çizelge 3.4. Restriksiyon enzimleri, tanıma bölgeleri ve beklenen parça uzunlukları...	31
Çizelge 4.1. Populasyonlara ait genotip ve allel frekansları ile standart hataları.	39
Çizelge 4.2. Genotip Frekansları, Hardy Weinberg Genetik Denge Testi ve X^2 Bağımsızlık Testi ve Sonuçları.....	42
Çizelge 4.3. Populasyonların heterozigotluk oranlarıve fiksasyon indeksleri.....	43

1. GİRİŞ

Günümüzde dünyanın karşı karşıya kaldığı küresel ısınma, iklim değişimleri, nüfus yoğunluğunun artması, doğal alanların tahrip edilmesi, artan sanayileşmeyle birlikte sanayi artıklarının artması gibi çevreden kaynaklanan olumsuz faktörlerden dolayı pek çok hayvan türü yok olmaktadır. Özellikle ekonomik, toplumsal, politik, ekolojik sebeplerle çiftlik hayvanları koruma altına alınmalı ve hayvansal üretimin devamlılığının sağlanması politikaları geliştirilmelidir. Çeşitli verim özellikleri ile yaşamın her anında gereksinim duyulan çiftlik hayvanları yetiştiriciliğinde değişen ekonomik koşullar ve giderek artan küreselleşme hızı ile tüm dünyada, verim özellikleri yönünden çok yönlü ve daha verimli ırklar elde etme yönüne doğru gidilmektedir. Klasik ıslah modellerinde seleksiyon uygulanan hayvanlarda sadece verim özellikleri dikkate alınarak hayvanlar seçilmekte, çevre koşullarına ve hastalıklara dayanıklılık önemsenmemektedir. Böylece birçok tür ve ırk yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmıştır. Oysaki karakterleri etkileyen iyi yönlü ve verimli genleri belirleyip genotipte arzulanan genleri bir araya getirip, genler arası etkileşimlerden istifade ederek üstün fenotipte veya istenen verim yönünde birey oluşturmak, benzer çevre ortamından daha iyi istifade ederek, daha yüksek verim elde etmek için genotipin iyileştirilmesi gerekmektedir (Özdemir 2006; Ağaoğlu 2010).

Evcil hayvanların korunmasında ilk adımı yerli ırkların genetik yapılarının ortaya konulması oluşturmaktadır. Irklar kendilerine özgün bir allelik kombinasyona sahiptirler ve bunun bozulması ve sonradan tekrar oluşturulma imkânsızlığı nedeniyle koruma altına alınmaktadırlar. Koruma altına alınacak gen kaynaklarının tamamının süresiz olarak elde tutulmasındaki imkânsızlıklar ve ekonomik güçlükler, korunmasına öncelik verilecek ırkların genetik yapılarının ve bu ırklar arasındaki genetik ilişkilerin incelenmesini gerektirmektedir.

Günümüzde teknolojinin ve bilimsel gelişmelerin ilerlemesiyle birlikte hayvanlarda verimi etkileyen genetik yapıyı tanımlamada özellikle genetik kaynak olarak kullanılabilen popülasyonların belirlenebilmesi ve tanımlanmasında, koruma

programlarında kolaylık sağlayan moleküler düzeyde markır olarak adlandırdığımız genetik belirteçlerin moleküler düzeyde tanımlanmasını sağlayan çeşitli moleküler genetik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences: Kesilmiş Çoğaltılmış Polimorfik DNA). DAF DNA (Amplification Fingerprinting: Çoğaltılmış DNA Parmak İzi), RAPD (Randomly Amplified Polymorphism: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism: Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), S-SAP (Sequence Specific Amplification Polymorphism), SSR (Microsatellites Or Simple Sequence Repeat: Basit Dizi Tekrarı), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat: Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler), VNTR (Variable Number of Tandem Repeats: Değişken Sayılı Bitişik Tekrarlar), STS (Sequence Tagged Sites: Etiketlenmiş Dizi Bölgesi), SCAR (Sequence Characterized Amplification Region: Baz Dizilimi Belirlenerek Çoğaltılan DNA Bölgeleri), SAMPL (Sequence Amplification Of Microsatellite Polymorphic Loci), EST (Expressed Sequence Tag), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), TRAP (Target Recognition Amplification Polymorphism), IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism), REMAP (RE Transposon-Microsatellite Amplified Polymorphism), MITES (Miniature İnverted Repeat Transposable Elements), Mikroarray, DarT (Diversity Array Technology), SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) Metilasyon-sensitive PC yöntemleridir. (Buckler and Thornsberry 2002). Geliştirilen bu moleküler tekniklerle, populasyonlarda genetik yapının tespiti, marker destekli seleksiyon (MAS) çalışmaları, genetik haritalar, filogenetik analizler, ebeveyn ve cinsiyet tayini, bazı hastalıkların tanısı yapılabilmektedir.

Bir lokusa ait allel frekansları, bir populasyondaki bireylerden alınan örneklerden aynı lokusun analiz edilmesiyle tahmin edilebilir. Genellikle bir lokusta bir veya daha fazla allel varsa ve bu allellerden en yaygın olanının frekansı 0.99'dan daha küçük ise o lokus polimorfik olarak kabul etmektedirler. Gen havuzundaki allel frekansı değişiklikleri çok

uzun zaman alabileceği gibi çok kısa sürede de gerçekleşebilir (Gardner *et al.* 1991; Özdemir 2006).

Rekombinant DNA teknolojisinde restriksiyon endonükleazlar adı verilen enzimlerin 1960'lı yılların sonlarında Stewart Linn ve Werner Arber'in *Escherichia coli* bakterisinde faj çoğalması kısıtlanmasına neden olan iki tip enzimi bulmaları ile başlamış ve 1968 yılında DNA nükleotid dizisine bağlanan ilk RE enzimi *HindIII* enziminin keşfi ve teknolojinin ilerlemesi ile günümüzde 250 farklı suştan izole edilmiş, 1200'e yakın RE enzimlerinin kullanılması ve teknolojinin ilerlemesi ile günümüzdeki halini almıştır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri (RE) bakterilerde doğal olarak çok miktarda bulunan enzim türleridir (Bardakçı ve Yenidünya 2010). Bu enzimler DNA molekülünü iç kısımlardan kestikleri için "endonükleaz", aktiviteleri yabancı DNA'da sınırlı kaldığı için "restriksiyon" tanımını almışlardır (Solak vd 2000). RE'ler DNA'nın 4-8 baz çiftlik bölgesini tanıyan spesifik enzimlerdir ve nükleotidler arasındaki fosfodiester bağlarını keserek işlem görmektedirler. RE'ler bir grup olarak tanıma dizisi içinde herhangi bir yeri kesebilir, fakat bir enzim sadece belli iki nükleotid arasında kesim yapabilmektedir. Bazı enzimler "yapışkan uç" üretirken bazıları "küt uç" üretmektedirler. Çoğu RE tanıma bölgesi 5'→3' e doğru üst zincir ve 5'→3' e doğru alt zincirin baz dizisi aynı olduğu palindromik özelliğe sahiptirler (Solak vd2000). RE'ler Tip I, Tip II ve Tip III olmak üzere üç grupta toplanmaktadırlar. Tip I RE'ler DNA'yı tanıdığı bölgeden 1000 baz çiftlik uzaklıkta özgül olmayan yerlerden asimetric olarak kesmektedirler. Tip III RE'ler ise DNA'yı tanıma bölgesinden 24-26 baz çiftlik uzaklıktan keserek 5-7 baz çiftlik asimetric fragmentler oluşturmaktadırlar. Tip I ve Tip III RE'lerinin nükleaz ve metilasyon aktiviteleri aynı gen üzerindedir ve kesim sırasında ATP'ye ihtiyaç duyarlar. Tip II RE'ler kesim sırasında enerjiye ihtiyaç duymazlar ve DNA'yı tanıma bölgesinden keserek 4-8 baz çiftlik küt uç veya yapışkan uç şeklinde palindromik fragmentler oluşturmaktadırlar. Tip II RE'ler bu sahip oldukları özelliklerinden dolayı rekombinant DNA teknolojisine ilişkin uygulamalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Solak vd 2000; Bardakçı ve Yenidünya 2010).

RFLP, çeşitli Restriksiyon endonükleazlar (RE) ile DNA kesimi sonucu oluşan DNA fragmentlerinin büyüklüğü ve sayısını karşılaştırmak esasına dayanır. Genetik mesafe, populasyonun varyasyonu, gen akışı, etkili populasyon büyüklüğü, tarihi biyografi örnekleme, akrabalık testi gibi çalışmalarda uygulama alanlarına sahiptir (Meghen *et al.* 2002).

PCR-RFLP metodu, sığırlarda genetik varyasyonu çalışmak için ucuz, hızlı ve yararlı bir metot olarak görülmektedir. Bu ırklardaki ilgili lokuslar üzerinden genetik varyasyonun araştırılması başarılı yetiştirme stratejilerinin geliştirilmesinde yetiştiricilere yardımcı olabilir.

Bu araştırmada Türkiye’de gen kaynağı olarak korunan “Doğu Anadolu Kırmızısı” ırkı yerli sığırlar ile Erzurum ve civarında yetiştirilen Doğu Anadolu Kırmızısı Melezi sığırların Prolaktin gen lokusu bakımından genotipik yapılarının incelenmesi, ilgili genler bakımından sürülere ait genotip ve allel frekanslarının dağılımı, gruplar arası ve gruplar içi varyasyonların ortaya konulması amaçlanmıştır.

1.1. Prolaktin (PRL)

Prolaktin hormonu beyin ön pitüitari bezi (hipofizin ön lobu) tarafından salgılanan çok fonksiyonlu bir polipeptittir. PRL geni 23. kromozom üzerinde (Camper *et al.* 1984) 10 kb uzunluğunda 5 ekzon ve 4 intron bölgesi içerir (Hallerman *et al.* 1988). 30’u sinyal amino asiti 199 aktif amino asit olmak üzere toplam 229 amino asit sentezler (Wolf *et al.* 1990; Gothard *et al.* 1996, Cao *et al.* 2002).

Prolaktin, hipofiz bezinin ön lobu tarafından salgılanan iç salgı hormonu olmasının yanı sıra bağışıklık hücreleri tarafından da üretilir (Orbach and Shoenfeld 2007). Prolaktin için hedef organ meme bezidir, burada gelişimi ve diferansiasyonu uyarır (Schradin and Pillay, 2004). Kandaki yüksek düzeyleri, overlerde steroid sentezini ve hipofizer gonadotropinlerin sentez ve sekresyonlarını inhibe eder (Truong *et al.* 1984; Ochoa *et al.* 2001). Süt salgısını uyarmasının yanı sıra büyüme üreme, ozmoregülasyon,

immünolojik fonksiyonlar, cinsel bezlerin gonadotropin salgılanması, böbreklerden su, sodyum ve potasyum atılması, laktasyonun başlaması ve devamlılığı aynı zamanda, meme bezi büyümesi ve laktogenezisten sorumludur (Tucker 1974; Collier *et al.* 1984; Horseman *et al.* 1997; Vomachka *et al.* 2000). Erkeklerde fizyolojik dozlarda normal testesteron üretiminin devamlılığına katkıda bulunur, sperm motilitesini ve fertilitiyi etkileme gibi 300'den fazla biyolojik etkiye sahiptir (Horseman *et al.* 1997; Mehmannaavaz and Gorbani, 2012).

Ön hipohiz bezinden salgılanan PRL proteinin 23 kDa ağırlığında olmasına rağmen proteolitik ayrılmalarla 14-, 16-, ve 22-kDa olarak karakterize edilen formlar (Erdmann *et al.* 2007; Bachelot and Binard 2008), dimerizasyon, polimerizasyon, prolaktin-IgG makromoleküler kompleksinin farklı bağlar kurması ile oluşan makroprolaktinler, serin ve threonin rezidüleri arasında oluşan fosforilasyon, nitrojen (N-glycosylation) ya da oksijen (O-glycosylation) bağlanmaları ile türler arasında fukoz, mannoz, ve galaktoz oligosakkaritlerin karbonhidrat rezidülerinin farklılaşması sonucu prolaktin proteinin yapısının değişmesine neden olan glikooksilasyon olayları nedeniyle türlerde farklılaşan çok sayıda prolaktin formları meydana gelmektedir (Brookscl *et al.* 1990; Sinha *et al.* 1995; Chen *et al.* 1998; Gadd *et al.* 2006; Ushizawa *et al.* 2007).

Prolaktin proteinin değişen moleküler formların her biri türlerde farklı fizyolojik, patolojik, fonksiyonel ve hormonal düzenlemelere neden olmaktadır. PRL proteini maymunlar ve insanlarda %97, büyük baş ve küçükbaş hayvanlarda %76, sığanlar ve farelerde %64 oranında homoloji gösterirken genel olarak primatlar arasında %97, primat ve kemirgenler arasında %57 oranında benzerlik göstermektedir (Jonathan *et al.* 1996, 2008; Feysot *et al.* 1998).

Polipeptid yapıda olan prolaktin hormonu özelleşmiş ön hipofiz bezi laktotropi bölgesinden salgılanır. Stricker and Grueter (1928), tavşanlarda süt üretimini tetikleyen pitüitary bezinin etkisini tanımladığını bulduktan sonra koyunlarda ve sığırlarda meme bezini ve laktasyonu uyardığını bildirmişlerdir. İlk keşfedildiğinde ön hipofiz bezinden salındığı bilinmediğinden dolayı bu hormon Riddle *et al.* (1932) tarafından prolaktin

olarak adlandırılmıştır. Başlangıçta süt üretimini başlatan laktasyonun uyarılması ve meme bezlerinin gelişiminden sorumlu olduğu düşünülen prolaktin hormonunun bugün 300'den fazla biyolojik fonksiyonları olduğu bilinmesinin yanı sıra organizmalarda çoklu homeostatik dengenin sağlanmasında da rol oynamaktadır (Freeman *et al.* 2000; Ochoa *et al.* 2001; Soares, 2004; Teilum *et al.* 2005).

1.1.1. PRL hormonunun biyolojik fonksiyonu

PRL hormonunun meme bezlerinin gelişmesi ve laktogenezisi sağlamanın yanı sıra farklı biyolojik fonksiyonları da vardır.

PRL hormonu özellikle kurak ve temiz sularda yaşayan omurgalı hayvanlarda tuz ve elektrolit dengesini düzenler, pek çok balık türünde solungaçların extraselüler yüzeyini artırarak, amfibilerde böbreklerin Na⁺ iyon alınımını azaltarak, memelilerde ter bezinde Na-Cl iyonların atılımını azaltarak su ve elektrolit dengesini düzenler (Josimovich *et al.* 1977; Freeman *et al.* 2000; Adamson *et al.* 2008).

Organizmalarda Büyüme hormonu (GH) ile birlikte vücudun büyümesinde, amfibilerde metamorfoz olayında, epidermisteki tüylerin dökülmesinde, balıklar ve memeli organizmalarda deri melanosit hücrelerinin büyümesini uyarır ve memelilerde keratinosit büyümesini teşvik eder (Girolomoni *et al.* 1993; Freeman *et al.* 2000; Jonathan *et al.* 2008; Ble *et al.* 2010). Kuşlarda adipoz dokuda lipoprotein lipaz enzim aktivitesini düzenler (Freeman *et al.* 2000).

PRL balık, kuş ve memelilerde paternal ve maternal davranışların düzenlenmesi, göç, pregnansi döneminin kontrolü, kuşlarda regürjitasyon beslenmenin kontrolünü sağlar. Memelilerde erkek bireylerde testikular fonksiyonların düzenlenmesi, prostat ve seminal vesiküllerin ağırlığının artmasından sorumludur (Borromeo *et al.* 1997; Freeman *et al.* 2000; Jonathan *et al.* 2008).

Immun sistemde B-lenfosit, T-lenfosit, Timosit hücrelerinden salgılanan PRL hormonu bağışıklık sisteminde görevli T ve B hücrelerinin farklılığını sağlamada ve doğal T hücrelerinin öldürülerek bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde rol oynar (Semprini *et al.* 2009, 2012).

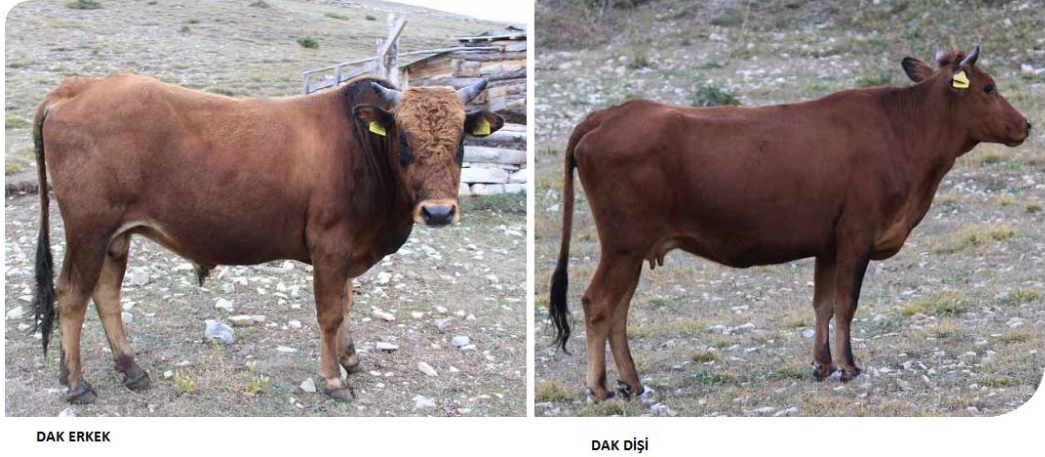
1.1.2. Prolaktin hormonunun meme gelişimi ve laktasyon üzerindeki etkisi

Ön hipofiz bezinden salgılanan prolaktin hormonu, laktasyona başlamadan önce meme hücrelerin bazal membranına taşınarak meme epitel hücreleri içinde bulunan özel prolaktin proteinlerine bağlanır. Daha sonra ekzositol aracılığıyla apikal membran boyunca lobüler alveolar lümene dağıtılır. Laktogenezis 1 olarak adlandırılan bu evre fareler ve diğer memelilerde meme epitelinde sitoplazmik lipit damlalarının morfolojik olarak gözlenmesi ile büyük baş hayvanlarda kanda α -laktalbumin ve Peynir altı süt proteinin (WAP) görülmesi ile başlar (Neville *et al.* 2002). Laktogenezis 1 evresinde PRL/PL hormonlarının yanı sıra, büyüme hormonu, östrojen, progesteron, tiroid hormonları rol oynar (Tucker 2000; Takahashi 2006). Doğuma yakın kolostrum sekresyonuyla meme bezi ikinci bir gelişme göstererek süt salgısına başlar bu evreye laktogenesis 2 fazı denir. Bu faz süt protein genlerinin ekspresyonu, alveol hücreleri arasındaki sıkı bağlantının koparılması, stoplazmik lipit damlalarının hareketi ve alveoler lümeninde kasin misellerinin görülmesi ile karakterize edilir (Martin *et al.* 1980; Hennighausen *et al.* 1997). Meme bezlerinde prolaktin hormonunun 16-kDa formu salgılanır (Clapp 1987; David *et al.* 1997).

Monogastrik türlerde prolaktin salgısının devamlı olması süt sentezinin sürekliliği için şarttır. Erken laktasyon döneminde bulunan türlerde ve tavşanlarda prolaktin sekresyonunun artması süt salınımını azaltırken sığır ve keçi türlerinde prolaktin sekresyonu süt üretimini sınırlandırmaz (Tucker 2000). Hamilelik döneminde salgılanan progesteron ve dopamin benzeri ajan olan bromokriptin salınması ile laktogenez evresi biter (Forsyth and Lee, 1993). PRL, ön hipofiz bezi, beyin, desidua ve miyometriümden salgılanmasının yanı sıra gözyaşı bezi, timus, dalak, dolaşımdaki lenfosit lenfoid hücreleri, kemik iliği, meme epitel hücreleri ve tümörü, deri fibroblast ve ter bezleri,

adipoz dokuların çeşitli bölgelerinden de salgılanmaktadır (Bernichtein *et al.* 2010; Jonathan *et al.* 1996) .

1.2. Doğu Anadolu Kırmızısı



Şekil 1.1. Doğu Anadolu Kırmızısı (Tagem 2009)

Yayılma Alanı: Başta Erzurum, Kars ve Ardahan illeri olmak üzere Doğu ve Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi.

Verim Yönü: Kombine; et, süt ve işgücü.

Genel Tanımı: Küçük yapılı, sert mizaçlı, kemik yapısı sağlam, göğsü dar ve derisi kalındır. Genellikle sağrı dar, keskin, sivri ve düşüktür. Sağrı cidagodan yüksektir. Renk kırmızı ve tonlarındadır. Kulak kenarları, boyun, göğüs, ön bacakların ön yüzleri, tırnakların deriyle birleştiği kısımlar koyudur. Kısa boynuzlu (brahyeric) sığır ırklarındandır. Erkek ve dişiler boynuzludur. Boynuzlar koyu renk tonunda olup öne doğru kıvrım yapmaktadır. Kıl rengi tarçiniden koyu kırmızıya kadar değişmektedir. Göz etrafında, kulak uçlarında boynuz uçlarında ve tırnağın deriyle birleştiği noktada ve boyun bölgesinde koyu renk hâkimdir. Bu koyuluklar ırkın ayırt edici özellikleri olarak kabul edilir. Tırnaklar siyahtır ve sağlamdır. Etinden, sütünden ve gücünden istifade edilebilen kombine verimli bir hayvandır (Yüksel vd 2011).

İrkin Ayırıcı Özellikleri: Küçük cüsseli olmakla birlikte olumsuz çevre şartlarına dayanıklıdır. Kalitesiz yemlerle hayatını sürdürebilir. Engbeli alanlardaki otlakları değerlendirebilir ve hastalıklara karşı direnci yüksektir. Sürü ve analık içgüdüleri gelişmiştir (Tagem 2009; Soysal 2010).

Yetiştirme Koşulları: Karasal iklimin hüküm sürdüğü, engbeli arazilerde ve ilkel barınakların bulunduğu şartlarda yetiştirilmektedir. Mayıs ayından itibaren meraya ve yaylalara çıkarılır. Genellikle yılın altı ayını merada geçirir. Mera süresince ek yemleme yapılmaksızın köy sürüleri şeklinde yetiştirilir (Tagem 2009; Soysal 2010).

Günümüzde genetik kaynakların korunması kapsamında koruma altında tutulan DAK ırkı sığırlar, 1970'li yıllardan itibaren uygulamaya konulan çevirme melezlemeleri uygulamalarından önemli ölçüde etkilenmiş ve etkilenmeye devam etmektedir. Bölgedeki sayısı ve saflığı hızla azalmış olan sığırların melezlemesinde kullanılan ırkların başında Esmer İsviçre ve kısmen Simmental ırkı gelmektedir. *Bos taurus primigenius*'un alt grubu olan *Bos taurus taurus*'tan köken aldığı belirtilmektedir (Kumlu 2000; Yüksel vd 2000).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lewin *et al.* (1992), sığırlarda PRL geni ekzon 3'de Rsa I enzimiyle A ve B allelik varyantlarını (A→G transisyonu) tanımlamışlar ve bu tespit edilen PRL-Rsa I polimorfizminin süt verimiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Chung *et al.* (1996), PCR-RFLP metodunu kullanarak GH-Alu I ve PRL-Rsa I polimorfik yapılarını inceledikleri çalışmalarında, GH lokusunun süt protein oranı, PRL lokusunun ise süt verimi, yağ oranı ve SNF oranı üzerine önemli derecede etkili olduklarını belirlemişlerdir.

Citek *et al.* (2001), Çek Pied, Siyah Alaca, Alman Siyah Alaca, Çek Kırmızısı, Polonya Kırmızısı ve Alman Kırmızısı ırkları olmak üzere toplam 280 baş hayvan üzerinde yaptıkları çalışmada, PCR-RFLP yöntemiyle elde ettikleri PRL A allel gen frekanslarını ırklara göre sırasıyla; 0.83, 0.90, 0.81, 0.56, 0.87 ve 0.86 olarak bildirirken, allel gen frekanslarının ırklar arasında farklılıklar oluşturduğunu ifade etmişlerdir.

Udina *et al.* (2001), Rus Ayrshire ve Gorbato Kırmızısı sığır ırklarında ekzon 3'de 156 bç'lik çoğalttıkları gen bölgesinde RFLP-Rsa I polimorfizmini belirleme çalışmasında PRL B allel gen frekansını 0.141 ve 0.086 olarak bildirmiştir. Çalışmada PRL B allelinin ırklardaki dağılımının sığır familyasının temsilinde düşünülmesi gerektiği önerilmiştir.

Dybus (2002), 3.intron bölgesinde lokalize olmuş büyüme hormonu geni (GH-MspI) ve 3.ekzonda bulunan prolaktin geni (PRL-RsaI) polimorfizmini belirlemek ve süt verimleriyle ilişkilendirmek amacıyla 1086 baş Siyah-Beyaz Friwsian İrlanda süt inekleri üzerinde PCR-RFLP yöntemini kullanarak yaptığı çalışma sonucunda; PRL A ve PRL B allel frekansları sırasıyla 0.862 ve 0.138, ve genotip frekansları AA, AB ve BB için sırasıyla 0.734, 0.257 ve 0.009 olarak bulunmuştur. AA genotipinde ki hayvanlarda süt verimi yüksek AB genotipindeki hayvanlar da süt verim oranı düşük

bulunmuştur ve heriki genin süt verimi üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu yaptığı çalışmada bildirmiştir.

Ladani *et al.* (2003a), Jaffarabadi, Mehsani ve Surti buffalolarından alınan kan ve semen örneklerinden izole edilen DNA'larda PRL gen polimorfizmini belirlemek amacıyla ekzon 3'de 156 bç'lik DNA dizisi PCR ile çoğaltılıp RFLP/RsaI restriksiyon enzimi ile kesime uğratılması sonucu AA genotipi hiçbir ırkta rastlanmamış, AB ve BB genotipleri Jaffarabadi, Mehsani ve Surti buffalolarında sırasıyla 0.87 ve 0.13; 1.0 ve 0.0; 0.965 ve 0.035, olarak bulunurken, A allel frekansları sırasıyla A; 0.435, 0.5, 0.482 olarak bulunmuş ve sonuçta allel frekanslarının çalışılan tüm ırklarda birbirine yakın olduğu bildirilmiştir.

Ladani *et al.* (2003b), PRL geni 1.ekzon'u 857 bp'lik bölgesi üzerinde Hae III restriksiyon enzimiyle yaptığı genotipleme çalışmasında, Mehsani ve Surti Bufalolarının monomorfik yapıda olduğunu bildirirken, Jaffarabadi bufalosunun kesim bölgesine sahip olduğunu ve diğer bufalo ırklarından ayrıldığını bildirmişlerdir.

Brym *et al.* (2005), 186 baş Siyah-Alaca ırkı sığırın exon 4'ü kapsayan 294 bç'lik PRL geni üzerinde yaptıkları çalışmada PCR-RFLP/Rsa I polimorfizmi (A ve G alleli) belirlemişlerdir. Allel frekanslarını A-0.113 ve G-0.887 olarak tespit ettikleri çalışmada AG genotipli inekler en yüksek süt verimine sahipken, GG genotipli inekler en yüksek yağ oranına sahip olarak bulunmuştur.

Dybus *et al.* (2005), Prolaktin geni ekzon 3 Rsa I polimorfizminin toplam 427 Siyah-Alaca ve Jersey ineklerin süt verimleriyle ilişkilendirildiği çalışmada, genotip ve allel gen frekansları ırklara göre sırasıyla AA-0.711 ve 0.0919, AB-0.285 ve 0.4324, BB-0.004 ve 0.4757, PRL A-0.8533 ve 0.3081, PRL B-0.1467 ve 0.6919 olarak bildirilmiştir. Çalışmada 305 günlük laktasyonda ki süt ineklerinde AA genotipinde ki bireylerin sütlerinde ki yağ oranı diğer genotiplere oranla daha düşük bulunurken, incelenen ırklarda tespit edilen genotiplerle süt verim özellikleri arasında önemli bir

ilişki bulunamamıştır. Irklar arasında genotip ve allel frekansları farklı olarak bildirilmiştir.

Khatami *et al.* (2005), PRL ekzon 3'de RsaI ve GH intron 3'de MspI ve Ekzon 5'deGH/AluI genlerinin polimorfik yapılarının RFLP yöntemi karşılaştırmalı olarak incelendiği Rus Siyah Alaca ve Yaroslav ırklarında yaptıkları çalışmada, GH-Alu I polimorfizmi sütte yağ içeriği ile önemli derecede ilişkili ($p<0.05$) ve LV genotipi en yüksek yağ içeriğine sahip olarak tespit edilirken, PRL Rsa I-BB genotipi sütte yağ içeriği ile negatif yönde ilişkili bulunmuştur.

Zhou *et al.* (2006), 543 baş Beijing Holstein sığırının PRL geni ekzon 3'de PCR-RFLP yöntemiyle elde edilen AA, AB ve BB genotiplerine ait frekansları 0.734, 0.257 ve 0.009 olarak bildirilmiştir. Süt verimi ile işkillendirme analizleri sonucu; 1. laktasyon kayıtlarında AA ve AB genotipli inekler daha yüksek süt, yağ ve protein verimine sahipken 2. laktasyonda AB genotipli bireyler AA genotipli bireylerden ilgili özellikler bakımından üstün bulunmuştur. AA genotipine sahip ineklerin AB genotipine sahip ineklerden 2. ve 3. laktasyonda protein üretiminin daha fazla ($p<0.05$) olduğu bildirilmiştir.

Li *et al.* (2006), memelilerde meme bezlerinin gelişmesini uyaran ve laktasyon boyunca süt üretiminde büyük rol oynayan 5' düzenleyici bölgede bulunan PRL geninin polimorfizmini belirlemek ve süt verimleriyle ilişkilendirmek amacıyla 236 Holstein süt ineğine ait PRL lokusu üzerinde PCR-SSCP yönteminde 304 bç'lik fragmentlerde CC, DD ve CD olmak üzere 3 genotip tespit edilmiş ve 175 T→G mutasyonu ve PCR-RFLP XbaI polimorfik lokusu üzerinde 446. A→G pozisyonunda olmak üzere iki mutasyon belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucu tespit edilen lokuslarla gerçek süt ve yağ verimi, 305-gün düzeltilmiş süt verimi ve protein içeriği ile ilişkili olduğunu ($p<0.05$) bildirmişlerdir.

He *et al.* (2006), 649 baş Çin Holstein süt ineğinde süt verimi ve kalitesini etkileyen PRL geninin PCR-SSCP yöntemi ile üçü promotör bölgesinde, A/C (-767), G/T (-485),

C/A (-247), ve biri intron 1'de olan C/T (427) CHBP1,2,3,4 olarak adlandırdıkları dört PRL gen SNP'ini tespit edilmiş ve bu SNP'lerden promotör bölgede BB genotipindeki CHBP2 SNP'inin, süt verimi ($p<0.01$), sütteki yağ miktarı ($p<0.05$), protein miktarı ($p<0.01$), ve protein yüzdesi ($p<0.05$) üzerinde önemli etkiye sahipken, AA genotipindeki bireylerin sütteki protein yüzdeleri daha yüksek bulunmuştur. Çalışmada, Çin Holstein süt ineklerinde, süt verimini etkileyen CHBP2 prolaktin belirtecinin ıslah programında kullanılabileceği öne sürülmüştür.

Miceikiene *et al.* (2006), Litvanya sütçü sığır ırklarında genetik belirteçlerin dağılımını araştırmak ve süt sığır ırklarının süt performansı özellikleri üzerinde ki α 1-casein, Kappa-casein, Beta-laktoglobulin ve Prolaktin (PRL) belirteçlerinin etkilerini belirlemek için Litvanya sığır ırkından seçilmiş (70 Litvanya Açık Gri, 49 Litvanya Beyaz Sırtlı, 109 Litvanya Siyah-Alaca ve 168 Litvanya Kırmızısı) 396 hayvandan DNA örnekleri alınarak PCR ile çoğaltılıp RFLP tekniği ile PRL geni 156 bp uzunluğunda DNA, RsaI enzimi ile, Beta-Lg geni 247 bp'i Hae III enzimi ile ve 337 bp'lik süt protein Kappa-casein geni HaeIII ve HinfI restrüksiyon enzimleri ile kesimi yapılmış ve PRL A ve B allel frekansları 0.87 ve 0.13, AA, AB ve BB genotip frekansları sırasıyla 0.75, 0.18, 0.17 olarak bulunmuştur. Yapılan analizler sonucu PRL, Kapa-casein, α 1-casein ve Beta-Lg genlerinin süt üretimi üzerindeki etkileri analiz edilmiş ve PRL geninin yüksek oranda sütteki yağ oranı üzerinde (%12.12, $p<0.001$) etkili olduğunu bulmuşlardır. Sonuçta, hayvan ıslahında seleksiyon kriteri olarak genetik belirteçlerin dikkate alınması gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Alipanah *et al.* (2008), 72 Rusya Siyahı ve 98 Rusya Kırmızısı sığır üzerinde PRL-RsaI lokusunu genotipledikleri çalışmalarında, A allelinin frekansını ırklarda sırasıyla 0.71 ve 0.79 olarak bildirirken, ırklar arasında allel gen frekansları bakımından herhangi bir farklılığın olmadığını ancak her iki ırktada tespit edilen genotiplerin süt verimi ve yağ yüzdesi ile önemli derecede ilişkili bulunduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada, PRL-Rsa I geni polimorfizminin, özellikle süt sığırlarında süt üretimini geliştirmek için genetik belirteç olarak ıslah programlarında kullanılmasının önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Kepek (2007), Türkiye’de yetiştirilen dört yerli sığır ırkı (Güney Anadolu Kırmızısı (n= 48), Doğu Anadolu Kırmızısı (n=34), Yerli Kara (42), Bozırk (n=46)) ile damızlık olarak kullanılan Holstein (n=21) örnekleri üzerinde yaptığı çalışmada, süt verimiyle ilgili olduğu düşünülen *PRL* geni A allelinin frekansını ırklarda sırasıyla 0.76, 0.66, 0.56, 0.70 ve 0.86 olarak bildirmiş ve *PRL* geni A allele sahip hayvanların süt veriminin daha yüksek olduğunu tespit etmiştir.

Wojdak *et al.* (2008) 720 Holstein-Friesian ırkı beyaz ve kırmızı varyeteleri üzerinde *PRL/Rsa I* polimorfizmini ve somatik hücre sayısı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 156 bç’lik DNA bölgesini PCR-RFLP yöntemiyle incelemişler ve allel frekanslarını sırasıyla; A 0.58, B 0.42 genotip frekansları; AA-% 18.46, AB-%79.53, BB-% 2.01 olarak bulmuşlar ve somatik hücre skoruyla *PRL* genotipi arasındaki ilişkiyi önemli olarak bildirmişlerdir. Çalışmada, BB genotipindeki bireylerin sütlerindeki SCC oranı yüksek iken AA genotipindeki bireylerin sütlerinde bu oran düşük bulunmuştur. Ayrıca *PRL* geninin günlük süt üretimi ve sütteki yağ oranı üzerinde etkili olduğu bulunmuştur.

Öztabak *et al.* (2008), Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ve Güney Doğu Anadolu Kırmızısı (GAK) 40 baş sığır ırkında Osteopontin (OPN) intron 4, prolaktin (*PRL*) exon 3 ve pituitary-specific transkripsiyon faktor-1 (PIT-1) exon 6 genlerinin allel ve genotip frekanslarını belirleme ve süt verimi ile ilişkilendirme amaçlı yaptıkları çalışmada 156 bç *PRL/RsaI* bölgesi A ve B allel frekansları GAK ve DAK ırklarında sırasıyla, 0.56, 0.44 ve 0.74, 0.26 olarak bulunmuş ve *PRL* B genotipine sahip bireylerde süt verimi daha yüksek olarak bildirilmiştir.

Kumari *et al.* (2008), farklı ırklar (223 Holstein friesian, 143 Jersey, 135 Zebu) üzerinde prolaktin geni polimorfizmini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, PCR-RFLP ile 156 bç’lik dizi *Rsa I* enzimi ile kesime uğratarak AA genotipi (0.55) tüm ırklarda predominant bulunurken, AB ve BB genotip frekansları 0.39 ve 0.06 şeklinde tespit edilmiştir. A ve B allel frekansları ise 0.55 ve 0.45 olarak bulunmuştur. Sonuçta incelenen hayvanlar arasında Yerli sığır ırklarında belirlenen genotip ve allel

frekanslarının, süt verimi ve yağ oranı için ıslah edilen egzotik ırklar arasında benzer nitelikte bulunduğu bildirilmiştir.

Ghasemi *et al.* (2009), 120 adet Montebeliard ineklerinde prolaktin geni polimorfizmi ve süt verimi üzerindeki etkisini belirlemek için 272 bç'lik DNA dizisi Rsa I enzimi ile kestikleri çalışmaları sonucunda, genotip frekanslarını AA 0.81, AB 0.15, BB 0.04 olarak tespit ederken, AA genotipindeki bireylerin süt verimlerinin daha fazla olduğu sonucuna varmışlardır.

Mehmannavaz *et al.* (2009), 1990-2006 yılları arasında doğmuş 268 Holstein boğasında paternal olarak aktarılan genlerin süt, yağ ve protein verimi ile bunların sütteki bulunma yüzdeleri üzerindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, semen örneklerinden DNA izole edilerek 4.ekzonda 294 bç'lik DNA dizisi, PCR-RFLP tekniği kullanılarak RsaI restriksiyon enzimi ile kesime uğratılmış ve allel frekansları: A 0.069 ve G 0.931 olarak bulunmuştur. Allelik farklılığın süt ve protein verimi üzerindeki etkisinin önemli ($p<0.05$) olduğu, PRL geninin süt, yağ ve protein verimleri üzerinde etkili iken ($p<0.01$), sütteki yağ ve protein yüzdeleri üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan araştırmada süt verimi üzerine önemli bir etkiye sahip olan PRL geninin paternal kalıtımda kullanılan İran Holstein boğalarından yavrulara aktarılan genlerin süt verimi üzerinde doğrudan etkili olmadığını, ancak PRL geninin boğalarda konformasyon özellikleri ve semen verimini etkileme ihtimalinin daha sonra yapılacak çalışmalarda göz önünde bulundurulması gerektiğini öne sürmüşlerdir.

Rorie *et al.* (2009), yoğunlukla Holstein (239) olmak üzere Ayrshire (6), Guernsey(2), Brown Swiss (1) ve bazı melez sığırlar (52) dahil olarak toplam 300 laktasyon evresindeki sığırlarda Mastitise duyarlılığı belirleme ve süt üretimi için potansiyel genetik belirteç olarak kullanılan Prolaktin gen polimorfizmini belirlemek ve verimle ilişkilendirmek amacıyla 6 ay boyunca laktasyondaki hayvanların sayıları, laktasyon evreleri, yaşları, süt üretim miktarları ve aylık somatik hücre miktarları kaydedilerek incelenmiştir. 294 bç'lik DNA dizisi PCR ile çoğaltılıp RsaI enzimi ile kesime uğratılmış ve allel frekansları; G-0.880, A-0.120 genotip frekansları; GG-0.776, GA-

0.207, AA-0.017 olarak bulunmuştur. SCC varyasyonu AA genotipinde GG genotipine göre daha yüksek bulunmasına rağmen Mastitis insidansı genotipler arasında ($p=0.284$) benzer bulunmuştur. Günlük süt üretimlerinde GG genotipindeki sığırlarda süt miktarı ($p=0.002$) ve protein oranı ($p=0.002$) GA genotipindeki hayvanlara kıyasla daha yüksek oranda bulunurken, sütteki yağ oranını ($p=0.225$) etkilemediği gözlenmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, prolaktin genotipinin, Mastitis üzerinde etkili olmasa da, sütü sığırlarda süt verimini ve kalitesini etkilediği için seçilmesinin önemli olduğunu ortaya koymuşlardır.

Schennink *et al.* (2009), Alman Holstein-Friesian populasyonlarında prolaktin geni polimorfizmini belirlemek ve bu genlerin süt verimleri, sütteki yağ oranı üzerine etkilerini araştırmak için 1905 hayvandan alınan kan ve semen örneklerinden alınan DNA örnekleri DNA dizi analizi tekniği ile araştırılmış ve tespit edilen PRL 8398G>A polimorfizminin sütteki yağ oranı üzerinde etkili olduğunu, fakat süt verimi üzerinde etkisinin önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Starnes *et al.* (2009), 40 Angus buzağısı üzerinde PRL geni polimorfizminin buzağılarda mizaç özelliği ve dışkılarında ki parazit yumurtalarının sayıları üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, homozigot sitozin (CC; $n=3$), heterozigot (CT; $n=25$), ve homozigot timin (TT; $n=12$) haplotipleri belirlenmiş ve CC haplotipinde ki buzağuların mizaç özelliklerinin daha sakin ($p<0.01$), ve dışkılarında ki parazit yumurtalarının diğer fenotipteki bireylere göre daha fazla olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Yaptıkları araştırmadaki bulgulara göre Angus buzağularında internal parazitler ile doğal enfeksiyona yatkınlık oranının prolaktin geni ile ilişkili olabileceği sonucuna varmışlardır.

Kaplan ve Boztepe (2010), prolaktin geni polimorfizmini belirlemek amacıyla 45 baş Anadolu Manda'sı ve 30 baş İsviçre Esmeri olmak üzere toplam 75 hayvandan alınan DNA örnekleri 156 bç'lik DNA dizisi halinde PCR ile amplifiye edilip RsaI enzimi ile kesilmiştir. 3.exon PRL-RsaI polimorfizmi Anadolu Manda'sında monomorfik

bulunurken, İsviçre Esmeri sığırlarda allel gen frekansları A-0.82, B-0.18, genotip frekansları AA 0.63, AB 0.37, BB 0.00 olarak tespit edilmiştir.

Madnalwar *et al.* (2010), 50 baş Pandharpuri Bufalolarında 1.ekzondaki prolaktin genini PCR-RFLP yöntemi ile genotiplendirme amaçlı yaptıkları çalışmada 857 bç'lik DNA dizisi Hae III enzimi ile kesime uğratılmış ve restrüksiyon bölgesinin bulunmaması nedeniyle PRL polimorfizmine rastlayamadıkları belirtilmiştir.

Sharifi *et al.* (2010), 84 Najdi inekleri üzerinde yaptıkları çalışmada, PCR-RFLP tekniği ile prolaktin lokusu Rsa I enzimi ile kesime uğratarak genotip frekanslarının 0.2857 AA, 0.5714 AB, 0.1429 BB ve A ve B allel frekanslarının sırasıyla 0.571 ve 0.429 olduğunu bildirmişlerdir.

Tabar *et al.* (2010), İran'da yetiştirilen 85 Buffalo üzerinde PRL geni polimorfizmi belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, PCR-RFLP tekniği ile 156 lik DNA dizisi RsaI enzimi ile kesime uğratılmış, çalışma sonucunda tüm örneklerin monomorfik ve AA genotipli olduğunu bildirmişlerdir.

Lü *et al.* (2010), süt sığırlarında laktasyon sürecini etkileyen Prolaktin (PRL) geninin tek nükleotid polimorfizmi (SNPs) belirlemek için SSCP yöntemi, DNA dizi analizleri ve bu SNP'lerin süt üretimi üzerindeki etkilerini araştırmak için 471 Çin Holstein sığırı DNA'sı ile yapılan analizlerde ikisi promotor (-1043A[G and-402A[G), intron (+2723C[T) ve diğeri 4.exon bölgesinde (+8398G[A) olmak üzere toplam 4 SNP tespit edilmiş istatistiksel analizler sonucu promotor bölgesindeki SNP'ler ile süt verimleri arasındaki ilişki önemli bulunmuş; P1-GG genotipindeki hayvanlar da süt üretimi ($p<0.01$) yüksek iken P1-AA genotipindeki hayvanlarda sütteki yağ oranının yüksek olduğu ($p<0.01$) ve haplotip analizinde promotor bölgesindeki iki SNPs Hap(AG) süt üretimi ($p<0.01$) ve Hap(AA)'nın sütteki yağ oranı ($p<0.01$) üzerinde etkisinin çok önemli olduğu tespit edilmiş ve Holstein ve diğer süt ırklarında PRL geni üzerinde allel değişimlerinin ve birbirleriyle ilişkili lokuslardaki allel kombinasyonlarının (haplotip ilişkilendirme) dikkatli değerlendirilmesi gerektiğinin üzerinde durmuşlardır.

Sang *et al.* (2011), 123 Holstein boğası üzerinde prolaktin genlerinin polimorfizmlerini inceledikleri çalışmalarında, tespit ettikleri polimorfizmin sperm kalitesi üzerindeki etkisinin önemli olmadığını bildirmişlerdir.

Sodhi *et al.* (2011), Hindistan yerli inek ırklarında (*Bos indicus*) yetiştirme amacına göre, deri rengi ve buldukları agroklimatik bölgelere göre seçtikleri 936 yerli Hindistan sığırı üzerinde prolaktin geni polimorfizmini belirlemek amacıyla 156 bç'lik DNA dizisi amplifiye edilmiş ve RsaI enzimi ile kesime uğratılmıştır. Çalışmada genotip frekansları; AB 0.58, AA 0.22, BB 0.20 ve gen frekansları A-0.52, B- 0.48 olarak bulunmuştur. PRL-RsaI varyantları ile düzenleyici bölgedeki polimorfizmleri ve bağlantılarının Hint sığır ırklarında genotip-fenotip ilişkilendirme çalışmalarında büyük önem taşıdığı ortaya konmuştur.

Vikas *et al.* (2012), Frieswal süt ineklerinde prolaktin gen polimorfizmini belirlemek ve süt verimi ile ilişkilendirmek amacıyla 54 Frieswal sığırında 156 bç'lik DNA dizisi PCR ile çoğaltılıp RFLP tekniği uygulanarak RsaI enzimi ile kesime uğratılmış, yapılan analizler sonucu allel frekansları A 0.630, B 0.370 olarak ve genotip frekansları AA-0.315, AB 0.629 ve BB 0.056 olarak bulunmuş ve populasyon frekanslarının genetik dengede olmadıkları gözlenmiştir. BB genotipindeki hayvanların laktasyon süreleri daha uzun iken AB genotipindekilerin laktasyon verimleri daha yüksek olduğu görülmüş ve PRL geninin Frieswal sığırlarında süt özelliklerinin genetik seleksiyonu için kullanılabilir önemli bir belirteç olduğu sonucuna varmışlardır.

Verma *et al.* (2012), Hindistan Murrah bufalolarında 3.ekzondaki prolaktin geninin plimorfizmini belirlemek amacıyla 150 baş Murrah Buffalo'sundan alınan DNA örnekleri 156 bç'lik fragmentler halinde PCR ile çoğaltılıp RsaI enzimi ile kesime uğratarak genotip frekansları AA 0.93 ve AB 0.07, allel frekansları arasındaki polimorfizm oranı düşük bulunmuştur.

Alfonso *et al.* (2012), süt üretimi ve verimi üzerinde etkili olan PRL geninin polimorfizmini belirlemek ve süt verimi ile ilişkilendirmek için 417 Amerikan Swiss

ırkı süt sığırından alınan DNA örnekleri PCR-RFLP yöntemi ile analiz edilip RsaI enzimi ile kesime uğratılması sonucu allel frekansları; A-0.88 ve B-0.12 ve AA, AB ve BB genotip frekansları sırasıyla 0.776, 0.174 ve 0.026 olarak bulunurken, bulunan genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg yasasına uymadığı ($p<0.05$) belirtilmiştir. Yapılan analizler sonucu AA genotipindeki hayvanlarda laktasyon boyunca süt üretiminin AB ve BB ($p<0.05$) genotipindeki hayvanlardan yüksek olduğu, en düşük süt veriminin BB genotipine sahip hayvanlarda rastlandığı bulunmuş ve prolaktin polimorfizminin çalışılan ırk için ıslah amaçlı kullanılacak hayvanların seçiminde önemli bir etken olduğu belirtilmiştir.

Boleckova *et al.* (2012), 505 Çek-Fleckvieh sığırında prolaktin geninin (PRL) süt verimi üzerindeki etkilerini bulma, allel ve genotip frekanslarını belirlemek için yaptıkları PCR-RFLP analizi sonucu PRL geninin her iki polimorfik formunun süt verimi ($p<0.05$), sütteki yağ ($p<0.01$) ve protein oranı ($p<0.05$) ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda PRL geninin incelenen ırkın ıslah amaçlı programlarında kullanılabileceği önerilmiştir.

Ishaq *et al.* (2012), Nili-Ravi Bufalosu (100), Sahiwal (100) ve Achai (100) süt sığırlarında prolaktin gen polimorfizmini tespit etmek için, 294 bç'lik DNA dizisi PCR ile çoğaltılıp RsaI restrüksiyon enzimi ile kesime uğratılmıştır. Çalışmada tespit edilen AA, AG ve GG genotip frekansları sırasıyla; Nili-Ravi Buffalo'sunda %72, % 18 ve % 10, Sahiwal ırkında %44, %34 ve %22, Achai sığırlarında %22, %44, % 34 olarak bildirilmiştir. A ve G allel frekansları Nili, Sahiwal ve Achai ırklarında sırasıyla 0.0-1, 0.19-0.81, 0.44-0.56 olarak bildirilmiş ve Achai ırkında allel frekanslarının dağılımı Hardy-Weinberg yasasına uyarken ($p>0.05$), Sahiwal sığırlarında allel frekansları dağılımı bu kurala uymadığı analizler sonucu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmada G alleleline sahip hayvanlarda süt verimi her iki süt sığırı ırkında yüksek bulunmuştur.

Akyüz vd (2012), kappa-casein, büyüme hormonu ve prolaktin geni polimorfizmini ve ırklar arasındaki genetik farklılıkları belirlemek için Türkiye'de yetiştirilen Boz ırk (43), Doğu Anadolu Kırmızısı (44), Yerli Kara (44), Güneydoğu Anadolu kırmızısı (40),

Esmer İsviçre (44) ve Holstein (44) ırkından toplam 259 sığırın PCR-RFLP tekniği ile 156 bç'lik bölgede PRL-RsaI polimorfizmini incelemişlerdir. PRL geni allel frekansları ırklar için sırasıyla A;0.762,0.698,0.585,0.763, 0.175, 0.733, 0.861, 0.227 B; 0.238, 0.302, 0.415, 0.237, 0.267, 0.139 olarak bulunmuştur. Populasyonlar arasındaki genetik kaymanın ölçüsü olan F_{ST} değeri 0.053 olarak bulunup istatistiki olarak ırklar arasındaki genetik farklılaşma oranının çok önemli ($p<0.001$) olduğu hesaplanmıştır. Çalışmada PRL geni polimorfizminin yerli ırkların ıslah programında kullanılabileceği vurgulanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde ve bazı çevre köylerde yetiştirilen "Doğu Anadolu Kırmızısı" (DAK) ırkı 72 baş yerli sığır ile Bölgede yetiştirilen 48 baş DAK Melezi sığır hayvan materyali olarak kullanıldı. Çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuar'ında gerçekleştirildi.

3.1.1. Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmada; NanoDrop (Thermo scientific), Buzdolabı (Arçelik), Elektroforez Sistemi (Biogen, Apelex, France, SN 280800), Hassas Terazi (Shimadzu), Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad), Mikrodalga Fırın (Blueline), Otomatik Termocycle Sistem (Bioner), Saf Su Cihazı (Ateks), Santrifüj (Kubota), Spektrofotometre (Shimadzu), Vorteks (Yellow Line) ve muhtelif cam malzemeler kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hayvanlardan kan alımı

Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve bazı çevre köylerde yetiştirilen DAK ve DAK melezi sığırlara ait kan örnekleri toplanıp 10 ml'lik K3 EDTA (Etilen DiaminTetra-Asetik Asit)'lı vakumlu tüplere konarak kan örneklerinin EDTA ile karışması için tüpler alt üst edilmiş ve çalışma ortamına getirilene kadar +4°C buz kalıplarında korunmuştur. Kan alma işleminde sterilizasyona azami derecede dikkat edilmiş ve tüplerin birbiri ile karıştırılmaması için hayvanın numarası, ırkı ve ait olduğu bölge tüp üzerindeki etikete kaydedilmiştir.

3.2.2. Kullanılan çözeltiler

- 1.5xRetik Salin Çözeltisi
- 2.Liziz Çözeltisi
- 3.STE Çözeltisi
- 4.Proteinaz K
- 5.Fenol
- 6.Fenol/Kloroform
- 7.TE Çözeltisi
8. RNaz
9. Amonyum asetat
10. İzopropanol
11. Etanol

3.2.3. Genomik DNA izolasyonu

Tüm kandan DNA'nın eldesi Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda Purgene DNA kiti (Gentra Systems, Minnesota, USA) kullanılarak prosedürüne uygun şekilde aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapıldı;

- 1- Her örnek için 2 set tüp hazırlandı. Tüplerin üzerine etiketle numara verildi.
- 2- Tüplerin üzerine 900 µl RBC solüsyonu eklendi ve üzerlerine 300 µl kan eklenerek tüpler alt- üst edildi.
- 3- 13.000g de 2 dak. santrifüj edilerek süpernatant bir pipet vasıtasıyla tüp dibinde 5-10 µl kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Tam homojenizasyonun sağlanması için süpernatant son hızda vortekslendi.
- 4- Homojenat üzerine 300 µl Cell lysis ve 100 µl Protein Precipitation eklenip vortekslendikten sonra 13.000 rpm de 2 dak. Santrifüjlendi.
- 5- 2.tüp hazırlanıp üzerlerine 300 µl izopropanol eklenip 1.tüpteki süpernatant 2.tüpe eklenerek tüpler alt üst edildi (DNA bu aşamada çıplak gözle görülebildi).

- 6- DNA'lı tüp 13 000 rpm'de 2 dak. santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- 7- Dipte kalan DNA'nın üzerine 300 µl 1.2 M NaCl çözeltisi eklendi ve vortekslendi.
- 8- Vorteksin ardından 750 µl %96'lık Etanol eklendi.
- 9- 13.000 rpm'de 2 dak. santrifüjlendi.
- 10- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve üzerine 1000 µl %70'lik etanol eklendi.
- 11- 13 000 rpm'de 2 dak. santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- 12- Tüplerde kalan alkol, 140°C'de steril edilmiş pamuklu eküvyon uçları ile dikkatlice emdirilerek uzaklaştırıldı.
- 13- Alkolden arındırılan DNA'lı tüpün içine 300-500 µl ddH₂O veya TE eklendi ve DNA'nın çözünmesi sağlandı.
- 14- Örnekler spektrofotometrik ölçüm anına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. DNA'nın kalitatif tayini

Elde edilen DNA'lar %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntülenmesi sağlandı. Bunun için 0,24 g agaroz, 30 ml 1XTBE tamponu içerisine konularak mikrodalga fırın içerisinde 500 Watt'da 2 dakika tutularak eritildikten sonra eriyik içerisine 6 µl EtBr ilave edildi. Biraz soğutulan karışım daha sonra hazırlanan taraklı jel kabine hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatlice dökülerek polimerizasyon için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletilmeye alındı. Tarağı alınan jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi, kuyucuklarına 2 µl jel yükleme buffer ile 5 µl DNA karışımı otomatik pipetler aracılığı ile dikkatlice yüklenerek 110 volt'ta 15 dakika süreyle yürütüldü. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı ultraviyole (UV) ışığı altında gözlemlendi.

3.2.5. DNA'nın kantitatif tayini

Ekstrakte edilmiş DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) spektrofotometrede okuma yapılarak belirlenmiştir. Bu aşamada DNA konsantrasyonu düşük bulunan örneklerde, istenilen değer yakalanana kadar kan örneklerinden DNA elde etme işlemleri tekrarlanmıştır.

3.2.6. PCR işlemi

Bilindiği gibi PCR laboratuvar şartlarında hedef DNA ya da RNA dizilerinin otomatik termocycle sistemi ile çoğaltılması işlemidir.

PCR reaksiyonunun gerçekleşebilmesi için gerekli madde ve içerikler ve PCR şartları aşağıda belirtilen maddelere göre olmalıdır (Şahin vd 2000).

Gerekli maddeler

1. Kalıp DNA: Saflaştırılan DNA, amplifiye edilecek DNA parçalarına kalıp görevi yapar. Bu kalıp DNA için A260/A280 oranının 1,5'den yüksek olması istenir. Bu kalıp DNA molekülleri amaca göre cDNA, genomik DNA, genom kitaplıkları halinde olabilir.
2. Primerler: Kullanılacak primerler yalnızca amplifiye edilecek bölgeye spesifik olmalıdır. Derişimleri 0,1-0,5 mM arasında değişebilir. Bundan daha büyük derişimlere sahip primerlerin kullanılması hatalı dizilimlere sebep olabilir ve ayrıca kalıntıyı artırır. Tipik primerler yaklaşık %50 G+C bileşimine sahip 18-28 baz uzunluğunda Tm sıcaklıkları birbirine yakın olmalıdır.
3. dNTP: Stok deoksiribonükleotidler (dNTP= dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) nötral değilse pH 7'de nötralize edilmelidir ve -20°C'de saklanmalıdır. dNTP'lerin dördü de aynı derişimde kullanılmalıdır ve önerilen derişim 1,0 mM'dır. Optimal dNTP konsantrasyonu; MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon şartlarına, primerlerin konsantrasyonuna, çoğaltılacak ürünün boyuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır.
4. Taq DNA Polimeraz: *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Değişik türleri vardır. Enzim 5'→3'ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Yani sentezin yönü 5' ucundan 3' ucuna olup, primerlerin serbest 3' OH ucuna ortamdaki

dNTP'lerin nükleofilik etki yapımlarıyla fosfodiester bağlarının katalizi ve böylece DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanarak PCR sentezinin gerçekleşmesini sağlar (Şahin vd 2000). 3'→5'ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Önerilen miktar; 100 µl'lik bir hacim için 1-5 ünedir. Bununla beraber amplifikasyon bölgesine göre bu miktar değişebilir. Yüksek konsantrasyonlar da enzim kullanımı spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına, düşük konsantrasyonda ise yetersiz ürün oluşumuna sebep olabilir.

5. Mg⁺² Derişimi: Mg⁺²derişimi, primer yapışmasını, hem kalıp hem de PCR ürününün ayrışma ısılarını, primer-dimer kalıntılarının oluşumunu ve enzimin aktivitesini etkiler. Mg⁺² derişimi dNTP derişiminden fazla olmalıdır. Önerilen derişim 0,5-2,5 mM'dır.

6. PCR tamponu: PCR için uygun tampon 10-50 mM arasında değişen Tris-HCl'dir. Tamponun pH'sı ise 8,3-8,8 arasında değişir. Bu tampona 50 mM kadar KCl çözeltisi eklenmesi primer yapışmasını kolaylaştırır. Ancak 50 mM'ın üzerindeki KCl ve NaCl çözeltilerinin eklenmesi Taq DNA Polimeraz aktivitesini düşürür. %10 ve daha az derişimdeki Dimetilsülfoksit (DMSO) derişimi de yararlıdır. Jelatin, bovin serum albümin (BSA), Tween-20 ve Laureth-12 gibi iyonik olmayan maddelerin enzim kararlığına etkisi vardır, fakat mutlak zorunlu değildir.

3.2.7. PCR basamakları

Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü 3 basamakta gerçekleşir:

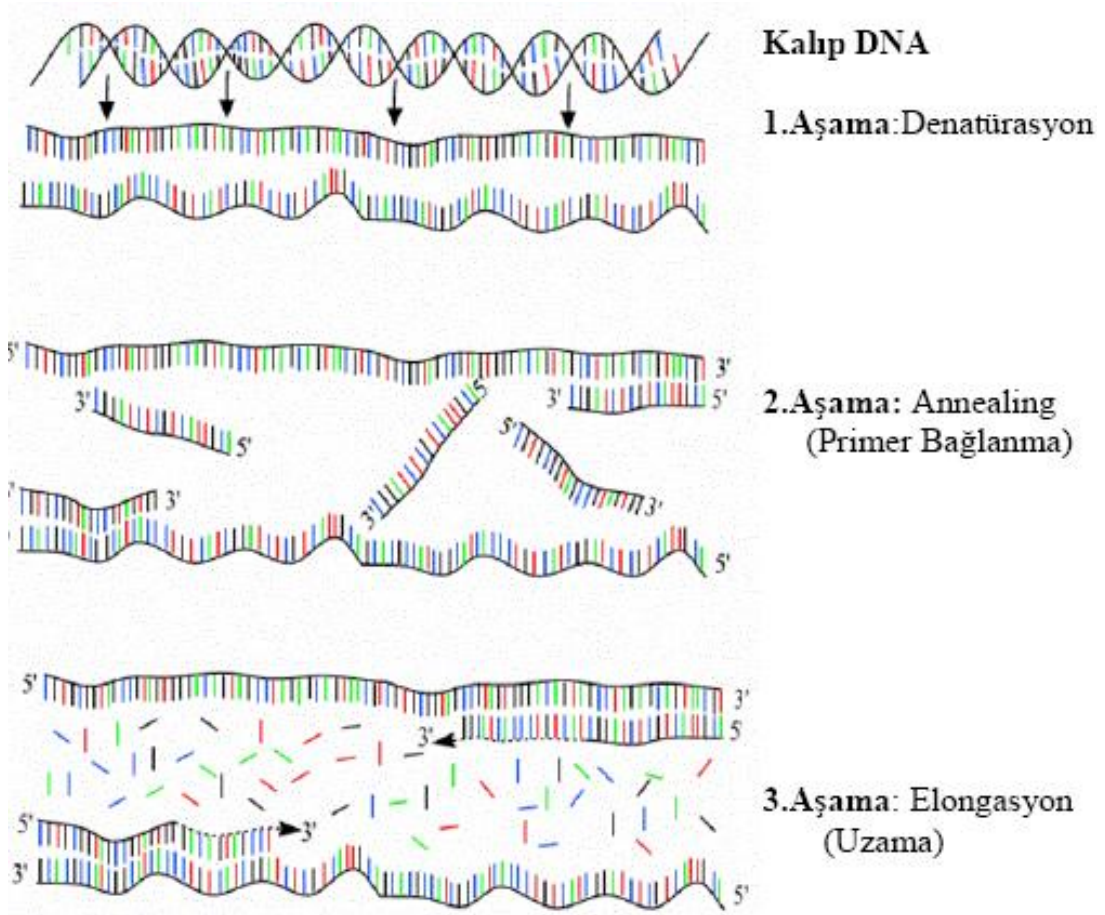
1. Denatürasyon: DNA molekülünün çift zincirli yapısının yüksek ısı yardımıyla birbirinden ayrılır(denatürasyon).Çoğunlukla 94°C-97°C arasında 15-60 sn süresince uygulanır. G+C zengin dizilerde daha yüksek ısıda olabilir. İlk denatürasyon tek döngü olarak 5-15 dakika olarak uygulanır (Genç 2007).

2. Annealing (Primer Bağlanma): Denatürasyonu takiben daha düşük ısılarda oligonükleotid primerler, ayrılmış olan tek zincirli DNA üzerinde kendilerine özgül bölgelere bağlanırlar. Bu olay çoğunlukla 47°C-60°C arasında 30-60 sn'de gerçekleşir

(Genç 2007). Primer yapışması için gerekli sıcaklık (T_m) hesaplanırken, A ve T için 2°C , G ve C için 4°C alınır. Ancak gerçek T_m sıcaklığı bunun birkaç $^\circ\text{C}$ altındadır. T_m sıcaklığı $55-72^\circ\text{C}$ arasında değişir. Primerin yapışması için geçen süre ise primerin baz içeriğine bağlı olup bir kaç saniye sürer. Sıcaklığın artırılması yapışmış olan primerlerin ayrışmasına neden olabilir (Şahin vd 2000).

3. Elongasyon (Uzama): Zincir uzaması $5' \rightarrow 3'$ yönünde olup, uzama hızı 35-100 nükleotid/saniyedir. Uzama zamanı; hedef dizinin derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. En uygun sıcaklık 72°C 'de 1 dakikadır. 1 dakikada yaklaşık 2 kb'a kadar uzama sağlanabilir.

Döngü sayısı, başlangıçta kalıp olarak kullanılan DNA konsantrasyonuna bağlıdır. Tek DNA sarmalı ile başlandığında en fazla 40 döngü, çok DNA sarmalı ile başlandığında ise ideal döngü sayısı 30 olmalıdır. PCR'in bu üç basamağının her tekrarında DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkar. Oluşan ürün; ilk koyulan DNA miktarı ve döngü sayısına bağlıdır.



Şekil 3.1. PCR basamakları (Anonim 2012).

3.2.8. Primer dizaynı

Primerler literatürler doğrultusunda ilgili genin polimorfik bulunan kısmını kapsayacak şekilde ve ilgili gen bölgelerinin NCBI-GenBank'da mevcut DNA dizilimlerine dayanarak dizayn edilmiştir. Primer seçimi için internet vasıtasıyla aşağıdaki işlemler yapılarak ilgili gen bölgeleri için uygun primerler düzenlemiştir.

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web> sayfası açılır. “Enter” tuşuna basılarak “search” kısmında “nucleotide” tuşu seçilir ve daha sonra araştırılan bölge ismi girilerek “go” tuşlanır. Aranılan bölge dizisi, ilgili makalelerden taranarak bölgenin baz dizilimi elde edilir. Dah sonra “fasta” kısmı ekrana getirilip “display” tuşuna basılır ve bölgenin birbirini ardına sıralı baz dizilimi kopyalanır.

2. http://www-genome.wi.prl.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi web sayfasına girilerek kopyalanan baz dizilimi, sayfanın başındaki kutuya yapıştırılır. İstenen uzunlukta PCR ürünü baz uzunluğu ve primerin özellikleri girilerek “pick primers” tuşuna basılır. Seçilen primerler ekrana gelir. Daha sonra seçilen primerlerin sadece istenilen bölgeye spesifik olup olmadığını kontrol etmek için takip eden Blast'lama işlemi yapılır.

3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> web sayfası açılır ve “blast” tuşuna basılır. “nucleotide blast” içinde “Standard- nucleotide-nucleotide-BLAST (blastn)” tuşuna basılır. Seçilen primer kutu içine yapıştırılır. “choose database” kısmına nr (nonredundant/genel) tuşu seçilir. Önce “BLAST” tuşuna, daha sonra da “format” tuşuna basılır. Açılan sayfada homolojilerin olup olmadığı incelenir. Eğer homoloji varsa programın verdiği primere yakın bölgeden yeniden seçim yapılarak, blastlama ile homolojinin olup olmadığı anlaşılır. Yapılan bu işlemler sonucunda araştırılan gen bölgeleri için seçilen primer çiftlerinin başka homolojileri olmadığına rahat bir şekilde kullanılabilecektir.

Örnek: PRL geni 1.ekzon bölgesi için Primerler:

CCCTAGGGGAGACCTTTGATCACCTGAGTTTTTGAAGAAAGGATTTGGAACATGTCCAGGTGAA
CTTAATAAGGG**GGATCAAG**TAGATGTGCCCCAGTTAGATATCTGAAATCTGTTCCCATAGCTGGA
TTATCTGGCTCCAGAGACTATCAGAGCAGTGACTGAAGCTACGACCATGTAGAGCAGGACAGAC
AGGCATGAAAGGATTACTAGGGAAAGTTTGGTATATCTTTTGAGGTCC**GGCC**ATTCTGAGAAA
CTCTAATAGAAAACGAGGAAGGTAATCTAATTCCTCTCCAGACTCTTAACACTCAAGCTGAA
TGTTGACTTTTTCCATAGAAAAACAACTTCAGCTCAACAAGGAAAGATCATGAGTGGGGAGGA
TAAATGTATGATTGACAACATGGATCT**TGCTTGGCAGCTCTCCACTTCC**

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Strand on template	Length	Start	Stop	Tm	GC%
Forward primer	CCCTAGGGGAGACCTTTGATCACC	Plus	24	1	24	57.71	58.33%
Reverse primer	GGAAGTGGAGAGCTGCCAAGCA	Minus	22	432	411	59.09	59.09%
Internal oligo		Plus					
Product length	432						

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada incelenen bölgeler ve uygulanan primerler

Bölge	Primerler	Baz dizilimi (5' → 3')	Kaynak
1.ekzon bölgesi	İleri (F) primer	CCCTAGGGGAGACCTTTGATCACC	Primer dizayn edildi
	Geri (R) primer	GGAAGTGGAGAGCTGCCAAGCA	
3. ekzon bölgesi	İleri (F) primer	TTCATGAAGCTGCTCACCTG	Primer dizayn edildi
	Geri (R) primer	TTGATTCTTGGGTTGCTGCG	
4.ekzon bölgesi	İleri (F) primer	CATGGTGAC-CTGCATCCTC	Brym <i>et al.</i> (2005)
	Geri (R) primer	ACCCTCATGCCTCTCACATC	

3.2.9. PCR amplifikasyonu

PCR amplifikasyonları aynı şartlar altında farklı zamanlarda uygulandı. Çizelge 3.2'de PCR bileşenleri ve kullanılan miktarları, Çizelge 3.3'de incelenen PRL geni bölgeleri ve bölgeler için PCR döngü koşulları görülmektedir.

Çizelge 3.2. PCR bileşenleri ve reaksiyonda kullanılan miktarları

PCR Bileşeni	Konsantrasyon/Hacim
PCR Tamponu (pH:8.5)	5.0 µl (10X)
Primer F	10 pmol/µl
Primer R	10 pmol/µl
MgCl ₂	1.5 mM, 1.2 µl
Taq	0.5-1.0 U
dNTP	0.25 mM, 2.5 µl
Steril distile su	Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanır
Genomik DNA	50-100 ng

Çizelge 3.3. İncelenen PRL geni bölgelerine ilişkin PCR döngü koşulları.

Aşamalar	1.ekzon	3.ekzon	4.ekzon	Döngü sayısı
1	94°C'de 5 dak.	94°C'de 5 dak.	94°C'de 3 dak.	1 döngü
2	94°C'de 45 sn. 58°C'de 45 sn. 72°C'de 45 sn.	94°C'de 30 sn. 61°C'de 48 sn. 72°C'de 40 sn.	94°C'de 30 sn. 58°C'de 40 sn. 72°C'de 30 sn.	30 döngü
3	72°C'de 5 dak.	72°C'de 5 dak.	72°C'de 10 dak.	1 döngü

3.2.10. PCR ürünlerinin gözlenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için %2'lik agaroz jelde her bir PCR ürünü yürütülmelidir. Bunun için 50 ml'lik 1XTBE tamponu içerisinde 1 g agaroz, mikrodalga fırında 500 Watt'da 2 dakika eritilmiştir. İçerisine 6 µl EtBr ilave edilen eriyiğin biraz soğuması beklenmiş ve hazırlanan taraklı jel kabinine hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice dökülerek oda sıcaklığında 8-10 dakika polimerize olmaya bırakılmıştır. Tarakları çıkartılarak jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirilmiş ve kuyucuklara 7 µl PCR ürünü ve 2 µl jel yükleme tamponu otomatik pipetler aracılığı ile yüklenerek 80 Volt'da 15 dakika yürütülmüştür. Daha sonra dikkatlice çıkartılan jeldeki bantların varlığı UV ışığı ile gözlenmiştir. Amplifikasyonu gerçekleşen ürünlerin bir sonraki işleme kadar -20°C'de korunmuştur. Amplifikasyonu gerçekleşmeyen örnekler için PCR işlemi gerçekleşinceye kadar tekrar edilmiştir.

3.2.11. Restriksiyon enzimleriyle DNA'ların kesimi

Amplifikasyonu gerçekleşen her bir örnekten yaklaşık 8-10 µl'lik kısım 0,2 ml'lik steril ependorf tüplere konularak, üzerine 2-5 U ilgili bölge için restriksiyon enzimi, 2-5 µl RE tamponu, 5 µl ddH₂O ilave edilmiş ve sonra üzeri 10-15 µl mineral oil ile kapatılmıştır. Daha sonra etüve yerleştirilerek 37°C'de 12 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan Restriksiyon enzimleri, tanıma bölgeleri ve beklenen bant uzunlukları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Restriksiyon enzimleri, tanıma bölgeleri ve beklenen parça uzunlukları.

Bölge	RE	PCR ürünü (bç)	Tanıma Bölgesi (5'→3')	Genotip ve Bant Büyüklüğü (bç)
Ekzon 1	HaeIII	432	GG [^] CC	AA=432 BB=243,189 AB=432, 243, 189
Ekzon 3	RsaI	210	GT [^] AC	AA=210 BB=120, 90 AB=210, 120, 90
Ekzon 4	RsaI	294	GT [^] AC	GG=294 AA=162,132 AG=294, 162, 132

3.2.12. Örneklerin yüklenmesi ve yürütme işlemi

RE'ler ile DNA'ların kesim işlemleri tamamlandıktan sonra, sonucu gözlemlemek için; %2,5-3'lük agaroz jel hazırlanmıştır. Etüvden çıkarılan restriksiyon kesimi uygulanmış örneklerin her birine 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve mineral oilden arındırılması için otomatik pipet yardımıyla parafilm üzerinde tüm ürün gezdirildi. Daha önce hazırlanmış agaroz jel 1XTBE tamponuyla dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi ve kuyucuklarına sırasıyla tüm ürünlerin ayrı ayrı yüklenmeleri sağlandı. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 55 Volt'ta 2 saat süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirilen jel alınarak UV ışığı altında incelendi ve fotoğrafı alındı.

3.2.13. İstatistiksel analizler

DAK ve melezi sığır populasyonlardaki genotip ve allel sayıları jel fotoğraflarına bakılarak saptandı. Genotip frekansları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$f(AA)=p^2= \Sigma(AA)/N$$

$$f(Aa)=2pq= \Sigma(Aa)/N$$

$$f(aa) =q^2 = \Sigma(aa)/N$$

Eşitlikteki,

N: İncelenen toplam birey sayısını göstermektedir.

Populasyonların genotip frekanslarına göre allel frekansları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$f(A)=p=(2n_{AA}+n_{AB})/2N$$

$$f(B)=q=(2n_{BB}+n_{AB})/2N$$

$p+q=1$ eşitliğine göre

Eşitliklerde,

$f(A)=p=A$ allelinin frekansını,

$f(B)=q=B$ allelinin frekansını

N: İncelenen toplam birey sayısını göstermektedir.

Gen frekanslarının standart hataları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\text{St. hata}=\sqrt{q(1-q)/2 \times N}$$

Burada;

q =Verilen bir allel genin frekansını

N = İncelenen toplam birey sayısını göstermektedir.

Bir populasyondaki genetik çeşitliliği ölçmek için gözlenen ve beklenen heterozigotluklar karşılaştırılır (Marson *et al.* 2005). İncelenen DAK ve Melez sığırların genetik çeşitlilik (genetic variability) ortalamasını bulmak için gözlenen heterozigotluk düzeyleri ve beklenen heterozigotluk düzeyi aşağıdaki eşitliklere göre hesaplandı.

$$H_{o1}=\sum_{i \neq j}^n \frac{N_{1ij}}{N}$$

Eşitlikteki,

N_{ij} : 1. bölgedeki heterozigot bireylerin sayısı,

N : İncelenen toplam birey sayısıdır.

$$H_{e1} = 1 - \sum_{i=1}^n P_{1i}^2$$

Eşitlikteki;

P_{1i} : 1.bölgedeki allel frekansı,

n : 1. bölgedeki allellerin sayısıdır.

Populasyonların Hardy-Weinberg prensibine göre genetik denge analizi;

Hardy-Weinberg prensibi bazı basit varsayımlar altında bir populasyondaki genotip ve allel frekanslarının ne olacağını gösterir. Bu varsayımlar gerçek populasyonların karşılaştığı birçok karmaşık durumun bulunmadığı ideal bir populasyonu belirlemektedir. Bütün genotipler eşit hayatta kalma oranına ve üreme başarısına sahiptir. Yani hiç bir seçim yoktur. Yeni allel oluşturacak ya da mevcut bir alleli diğerine dönüştürecek mutasyonlar bulunmaz. Populasyonun içine veya içinden dışına hiçbir göç yoktur. Populasyon sınırsız bir genişliğe sahiptir. Bir başka deyişle, bu populasyon örnekleme hatalarının ve diğer rastgele etkilerin gözardı edilebileceği kadar büyük bir populasyondur. Populasyondaki bireyler rastgele eşleşirler.

Hardy-Weinberg kanununa göre yukarıdaki varsayımlara uygun populasyon aşağıdaki özelliklere sahiptir:

Bir populasyondaki allel frekansları nesilden nesile değişmez; diğer bir deyişle populasyon evrimleşmez.

Bir nesil süren rastgele eşleşmenin ardından genotip frekansları, allel frekanslarından tahmin edilebilir.

Hardy-Weinberg kanununu test edilirken öncelikle gözlenen genotip frekansları hesaplanmalıdır. Daha sonra genotip frekanslarından allel frekansları hesaplanır. Son olarak hesaplanan allel frekansları kullanılarak genotip frekansları tahmin edilir. Hardy-Weinberg kanununa göre genotip frekanslarının; $p^2+2pq+q^2=1$ denklemine uyması beklenir. Aksi takdirde varsayımlardan biri veya bir kaç bu popülasyon için geçersizdir (Klug and Cummings 2003).

Hardy-Weinberg denge eşitliği için genotiplerin beklenen değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$E(AA)=p^2n$$

$$E(Aa)=2pqn$$

$$E(aa)=q^2n$$

Eşitlikte,

p: A allelinin frekansı

q: B allelinin frekansı

n: İncelenen birey sayısını göstermektedir.

Genetikte gözlenen sapmaları değerlendirmek önemlidir. Gözlenen değerler ile beklenen değerler arasında gerçek bir fark olmadığı kabul edilerek “sıfır hipotezi” kurulur (Öztürk, 2008).

Bu hipotezi test etmek için istatistiksel analizler kullanılır. Buna dayanarak sıfır hipotezi ya reddedilir ya da reddedilmez. Eğer reddedilmişse beklenen orandan sapma sadece şansa bağlanmaz. Dolayısıyla istatistiksel analizler, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Sıfır hipotezinin uyum iyiliğine karar vermek için geliştirilen en basit istatistiksel testlerden biri Ki-kare (χ^2) analizidir. Bu sebeple

gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için aşağıdaki eşitlikteki Ki-kare istatistik analiz yöntemi kullanılmıştır.

Ki-kare analizi eşitliği;

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(G_i - B_i)^2}{B_i} \dots$$

Eşitlikteki,

G_i : i genotipin gözlenen değerini,

B_i : i genotipin beklenen değerini göstermektedir.

Wright (1965)'in F-istatistiği kullanılarak üç türlü kendilenme (fiksasyon indeksi) tahmin edilmiştir. Bunlar sırası ile F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} değerleri olup, aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır.

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S} = 1 - \frac{H_I}{H_S}, \quad F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T} = 1 - \frac{H_I}{H_T}, \quad F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} = 1 - \frac{H_S}{H_T}$$

F_{IS} eşitliğinde populasyon içi fikstasyon indeksi (F_{IS}) tahmin edilir. Yani, populasyon içerisindeki gerçek heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg dengesinde ki sapmanın oranını verir (Koban 2008) ve -1, +1 arasında değer alır. (- değer; heterozigot fazlalığını, + değer; heterozigot azlığını belirtir)

F_{IT} toplam tür içindeki HW dengesinden sapmanın ölçütüdür. F_{ST} de ırklar arasındaki genetik farklılaşmanın ölçütüdür. F_{ST} , 0 ile 1 arasında bir değer alır. F_{IT} formülünde populasyonların tamamındaki toplam fikstasyon indeksi (F_{IT}) tahmin edilmektedir. Yani, populasyonların tamamındaki toplam gözlenen heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg prensibine göre olması gereken miktardan sapma olup olmadığını göstermektedir.

F_{ST} eşitliğinde populasyonlar arasındaki allel yoğunluğu farklılığından dolayı meydana gelen fiksasyon indeksindeki azalma tahmin edilmektedir. Aynı zamanda populasyonlar arasındaki farklılığıda belirtmektedir.

Yukarıdaki eşitliklerde kullanılan H_I , H_T , H_S değerleri Nei (1987)'ye göre şu şekilde hesaplanmıştır.

$H_I = \sum H_{Oj}/s$, burada H_{Oj} = j populasyonunda gözlenen heterozigotluk oranı, s = populasyon sayısıdır.

$H_T = 1 - \sum x_i^2$, burada x_i^2 = bütün populasyonlar göz önüne alındığında i. allelin ortalama frekansıdır.

$H_S = \sum H_{ej}/s$, burada H_{ej} = j populasyonunda beklenen heterozigotluk orandır (Nei ve Kumar, 2000).

İncelenen DAK ve Melez sığırların PRL lokusu allel gen ve genotip frekansları, genotip frekanslarına ait H-W genetik denge testi, populasyonlar içi (F_{IS}) ve populasyonlar arası (F_{ST}) genetik farklılık değerlerinin istatistiksel analizi için, GenAlEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012) paket programı kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. DNA'nın Kantitatif Tayini

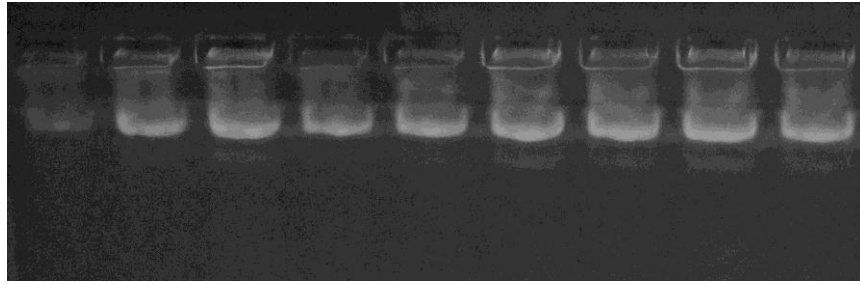
Ekstrakte edilmiş DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.) spektrofotometrede okuma yapılarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.
	Default	26.10.2010	15:34	30,58			0,612		0,393	1,55
	Default	26.10.2010	15:36	-1,75			-0,035		-0,013	2,60
dak1	Default	26.10.2010	15:38	63,28			1,266		0,671	1,89
dak1	Default	26.10.2010	15:39	69,63			1,393		0,767	1,82
dak2	Default	26.10.2010	15:39	72,04			1,441		0,806	1,79
3	Default	26.10.2010	15:40	51,33			1,027		0,585	1,75
4	Default	26.10.2010	15:40	47,15			0,943		0,516	1,83
5	Default	26.10.2010	15:41	53,96			1,079		0,596	1,81
6	Default	26.10.2010	15:41	75,95			1,519		0,854	1,78
7	Default	26.10.2010	15:42	457,36			9,147		5,349	1,71
7	Default	26.10.2010	15:42	470,86			9,417		5,569	1,69
8	Default	26.10.2010	15:43	43,77			0,875		0,469	1,87
7t	Default	26.10.2010	15:43	51,48			1,030		0,587	1,76
9	Default	26.10.2010	15:44	41,43			0,829		0,436	1,90
10	Default	26.10.2010	15:44	239,35			4,787		2,684	1,78
10	Default	26.10.2010	15:44	151,41			3,028		1,683	1,80
11	Default	26.10.2010	15:45	61,79			1,236		0,729	1,70
12	Default	26.10.2010	15:46	65,94			1,319		0,747	1,77
13	Default	26.10.2010	15:46	757,62			15,152		8,478	1,79
13	Default	26.10.2010	15:47	693,87			13,877		7,748	1,79
14	Default	26.10.2010	15:47	63,47			1,269		0,695	1,83
15	Default	26.10.2010	15:48	72,57			1,451		0,767	1,89
16	Default	26.10.2010	15:48	82,12			1,642		0,888	1,85
17	Default	26.10.2010	15:49	472,17			9,443		5,393	1,75
17	Default	26.10.2010	15:49	504,35			10,087		5,640	1,79
18	Default	26.10.2010	15:49	83,57			1,671		0,927	1,80
19	Default	26.10.2010	15:50	499,65			9,993		5,602	1,78
20	Default	26.10.2010	15:51	573,59			11,472		6,406	1,79
20	Default	26.10.2010	15:51	552,49			11,050		6,125	1,80
21	Default	26.10.2010	15:51	58,38			1,168		0,642	1,82
22	Default	26.10.2010	15:52	69,58			1,392		0,721	1,93
23	Default	26.10.2010	15:52	246,92			4,938		2,690	1,84
24	Default	26.10.2010	15:53	164,76			3,295		1,843	1,79
24	Default	26.10.2010	15:53	135,95			2,719		1,482	1,83
25	Default	26.10.2010	15:54	777,79			15,556		8,502	1,83
25	Default	26.10.2010	15:54	781,90			15,638		8,593	1,82
26	Default	26.10.2010	15:54	904,93			18,099		9,972	1,81
26	Default	26.10.2010	15:55	383,51			7,670		4,268	1,80
27	Default	26.10.2010	15:55	75,66			1,513		0,824	1,84
28	Default	26.10.2010	15:56	253,60			5,072		2,786	1,82
28	Default	26.10.2010	15:56	274,00			5,480		2,968	1,85

Şekil 4.1. DNA'nın NanoDrop'da okunan kantitatif sonuçları

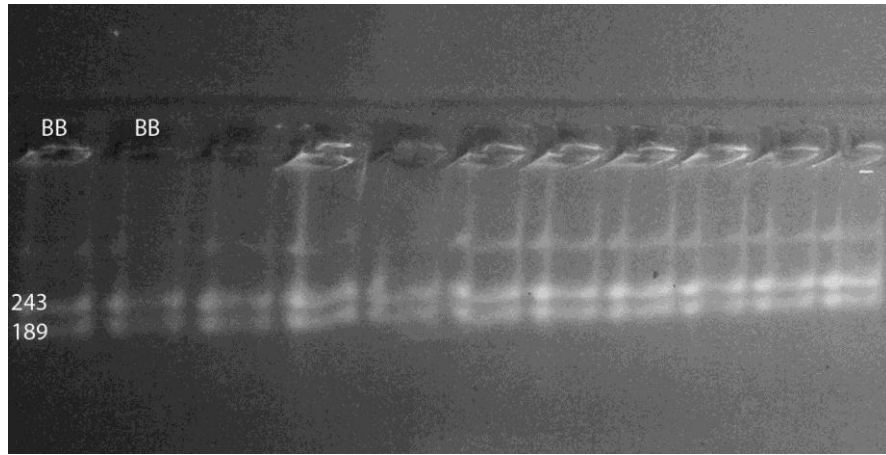
4.2. DNA Sonuçlarının Gözlenmesi

Tüm kandan elde edilen genomik DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bantlarının görüntülenmesi sağlanmıştır.

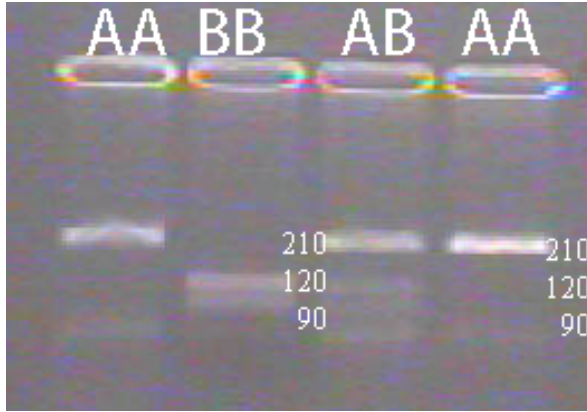


Şekil 4.2. Tüm Kandan Elde Edilen Genomik DNA'nın Agaroz Jel'de Görünümü

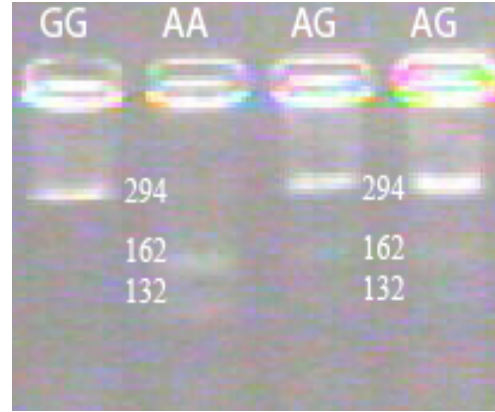
4.3. PCR-RFLP Sonuçları



Şekil 4.3. PRL geni 1.ekzon bölgesine ait PCR-RFLP sonucu (Tüm örnekler monomorfik ve BB (243:189 bç) genotipinde)



Şekil 4.4. PRL geni 3.ekzon bölgesine ait PCR-RFLP sonucu (AA:210 bç; BB:120, 90 bç; AB:210, 120, 90 bç)



Şekil 4.5. PRL geni 4.ekzon bölgesine ait PCR-RFLP sonucu (GG:294bç; AA:162 132 bç; AG:294, 162, 132 bç)

4.4. Genotip ve Allel Frekanslarının Dağılımı

Tüm populasyon genelinde monomorfik bulunan ekzon 1 bölgesine ait veriler aşağıda verilen çizelgelerde gösterilmemiştir. Ekzon 3 ve ekzon 4 bölgeleri için genotip ve allel frekansları Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Populasyonlara ait genotip ve allel frekansları ile standart hataları.

Popl.	Ekzon 3						Ekzon 4					
	Genotip			Allel Frekansı			Genotip			Allel Frekansı		
	AA	AB	BB	A	B	St. hata	AA	AG	GG	A	G	St. Hata
DAK	0.59	0.34	0.07	0.76	0.24	0.036	0.01	0.51	0.48	0.27	0.73	0.039
Melez	0.49	0.44	0.07	0.71	0.29	0.048	0.00	0.92	0.08	0.46	0.54	0.010
Genel	0.55	0.38	0.07	0.74	0.26	0.029	0.01	0.57	0.42	0.26	0.74	0.037

Ekzon 3 bölgesinde tespit edilen AA, AB ve BB genotip frekansları DAK ve Melez populasyonlarda sırasıyla, 0.59-0.49, 0.34-0.44, 0.07-0.07 olarak bulunmuştur. Ekzon 3 bölgesi genelinde incelenen tüm bireylerde AA genotipinin frekansı 0.55, AB genotipinin frekansı 0.38 ve BB genotipinin frekansı 0.07 olarak bulunmuştur. Ekzon 4 bölgesi AA, AG ve GG genotip frekansları DAK ve Melezlerinde sırasıyla 0.01-0.00,

0.51-0.92, 0.48-0.08 olarak bulunmuş ve populasyon genelinde genotip frekansları 4. ekzon bölgesi için AA genotip frekansı 0.01, AG genotip frekansı 0.57 ve GG genotip frekansı 0.42 olarak tespit edilmiştir. Irklar arası dağılımda 3.ekzon bölgesinin en yüksek genotip frekansı DAK ırkında BB genotipi olup değeri 0.59 iken 4.ekzon bölgesinin en sık görülen genotip frekansı DAK melezlerinde görülen AG genotipi olup değeri 0.92'dir. En düşük genotip frekansı ekzon 3 için BB genotipi olup DAK ırkında genotip frekansı 0.07 iken melez grupta 0.067 olarak ve tüm populasyon genelinde 0.069 oranında bulunmuştur. Ekzon 4 bölgesi için en düşük genotip frekansı AA olup DAK ırkında genotip frekansı 0.013'tür ve Melez grupta AA genotipine rastlanılmamıştır.

Ekzon 3'te bulunan A allelinin frekansı DAK ırkında 0.76, B allelinin frekansı 0.24, Melez grubunda A alleli 0.71 ve B alleli 0.29 olarak bulunmuş, populasyon genelinde A allel frekansı 0.74, B allel frekansı 0.26 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada A allelinin frekansı B allelinin frekansından yüksek bulunmuştur. 3. ekzonda bulunan PRL geni polimorfizmini belirlemek için farklı ırklarla daha önce yapılan çalışmalarda Alipanah *et al.* (2008) Rusya Siyah Alaca ve Kırmızı süt sığır ırklarında, Wojdak *et al.*(2008) Holstein-friesian süt ineklerinde, Sharifi *et al.* (2010) Najdi sığırlarında, Rorie *et al.* (2009) Holstein Friesian, Jersey ve Zebu sığırlarında, Miceikienė *et al.* (2006) Lithuanian sığır ırkında, Vikas *et al.* (2012) Frieswal süt ineklerinde, Verma *et al.* (2012) Hindistan Murrah bufalolarında, Sodhi *et al.* (2011) Hindistan yerli inek ırklarında (Bos indicus), Alfonso *et al.* (2012) American Swiss ırkında, Citek *et al.* (2001), Siyah Alaca ve çalışmasında kullandığı diğer Alaca türlerinde Çek, Polonya, Alman kırmızısı süt ırklarında, Boleckova *et al.* (2012) Çek Fleckvieh sığırında, Kaplan ve Boztepe (2010), Anadolu Mandası ve İsviçre Esmeri ırklarında, Ghasemi *et al.* (2009) Montebeliard ineklerinde, Udina *et al.* (2001) Rus Ayrshire ve Gorbatov Kırmızısı ırklarda, Dybus *et al.* (2005), Siyah-Beyaz Alaca ve Jersey ırklarında, Dybus (2002), Siyah-Beyaz Friwsian İrlanda süt ineklerinde yapılan çalışma dahil olmak üzere PRL polimorfizmini belirlemek için yapmış olan çalışmaların tümünde A allel frekansı yüksek B allel frekansı düşük oranda bulunmuştur ve bulgularımız ile uyum içinde olduğu görülmüştür.

4. Ekzon'da bulunan 294 bç'lik bölgede A allelinin frekansı DAK ırkında 0.27, G allelinin frekansı 0.73, melez grubunda ise sırasıyla 0.46 ve 0.54 olarak bulunmuştur. Populasyon genelinde A allel frekansı 0.26, G allel frekansı 0.74 olarak tespit edilmiş ve populasyon genelinde A allelinin frekansı G allelinin frekansından düşük olarak bulunmuştur. PRL geni 4.ekzon bölgesinde yapılan polimorfizm çalışmalarında (Mehmannavaz *et al.* 2009; Ishaq *et al.* 2012; Rorie *et al.* 2009; Brym *et al.* 2005; Lü *et al.* 2010 ve Schennink *et al.* 2009) incelenen çeşitli ırklarda A allel frekansını düşük ve G allel frekansını yüksek olarak bildirilmektedir ve çalışma sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir.

1.ekzonda bulunan 432 bç'lik bölge, tüm populasyon genelinde monomorfik ve BB genotipi şeklinde görülmüştür. PRL polimorfizmini belirleme çalışmalarında Madnalwar *et al.* (2010) Pandharpuri Buffalolarında polimorfizme rastlamamış, Tabar *et al.* (2010) İran'da yetiştirilen boğalar üzerinde yaptıkları çalışmada bütün örnekleri monomorfik AA genotipinde bulmuşlardır. Ladani *et al.* (2003b), Mehsani ve Surti Bufalolarının monomorfik yapıda olduğunu bildirirken, Jaffarabadi bufalosunun kesim bölgesine sahip olduğunu ve diğer bufalo ırklarından ayrıldığını bildirmişlerdir.

DAK ırkı 3.ekzon bölgesinde PRL geni polimorfizmini belirlemek için daha önce yapılan çalışmalarda (Kepenek 2007; Öztapak *et al.* 2008; Akyüz vd 2011) A allel frekansı yüksek, B allel frekansı düşük olarak bildirilmiş ve sonuçların bulgularımız ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

4.5. Populasyonların X^2 bağımsızlık ve Hardy-Weinberg Genetik Denge Testi

Tespit edilen genotip frekansları, genetik denge testi ve X^2 bağımsızlık testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Yapılan Hardy-Weinberg genetik denge testine göre 3.ekzon bölgesinin populasyon genelinde genotip frekansları dağılımının dengeli ($p>0.05$) olduğu gözlemlendi. Çizelge (4.2). DAK'larda PRL geni için daha önce yapılan diğer üç çalışmada, Kepenek (2007), Öztapak *et al.* (2008), Akyüz vd (2011), populasyonların Hardy-Weinberg kuralına göre dengede olduğunu bildirmişlerdir.

4.ekzon bölgesinde DAK ve Melez gruplarda genotip frekansları dağılımının Hardy-Weinberg dengesine uymadığı, DAK ırkında bu dağılımın önemli ($p<0.05$), melez grubunda ise çok önemli ($p<0.01$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Bağımsızlık testi sonuçlarına göre 3.ekzon bölgesinde genotiplerin ırklara dağılımı homojen iken ($p>0.05$), 4.ekzon bölgesinde dağılım heterojen ($p<0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Genotip Frekansları, Hardy Weinberg Genetik Denge Testi ve X^2 Bağımsızlık Testi ve Sonuçları.

Populasyon	N	Gözlenen			Beklenen			H-W	X^2_b
		AA	AB	BB	AA	AB	BB	X^2	
Ekzon 3									
DAK	71	42	24	5	41	26	4	0.38	1.35
Melez	45	22	20	3	23	18	4	0.30	
Ekzon 4									
DAK	65	1	33	31	5	25	35	5.48*	6.93**
Melez	12	0	11	1	2	6	4	8.59**	

* $p<0.05$,** $p<0.01$, X^2_b :bağımsızlık testi.

4.6. Heterozigotluk Oranları ve Fiksasyon İndeksi

Populasyonların heterozigotluk oranı ve fiksasyon indeksi değerleri, gözlenen ve beklenen heterozigotluklara göre hesaplanarak Çizelge 4.3'de gösterildi.

Çizelge 4.3. Populasyonların heterozigotluk oranları ve fiksasyon indeksleri

Populasyon	Ekzon 3				Ekzon 4			
	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}	Ho	He	F _{IS}	F _{ST}
DAK	0.338	0.364	0.072	0,003	0.508	0.393*	-0.290	0.039*
Melez	0.444	0.411	-0.082		0.917	0.497*	-0.846	
Genel	0.423	0.379	-0.010		0.681	0.454	-0.600	
F_{IT}	-0.006				-0.539			

*p<0.05, Genel F_{IT}=-0.272.

DAK populasyonda 3.ekzonda ortalama gözlenen heterozigotluk değerlerinin beklenen heterozigotluk değerlerinden düşük, 4.ekzon bölgesinde ise ortalama gözlenen heterozigotluk düzeyi beklenen heterozigotluk oranından yüksek olarak bulunmuştur. Melez populasyonda gözlenen heterozigotluk değerleri her iki bölge için de beklenen heterozigotluk oranlarından yüksek olarak tespit edilmiştir. Populasyon genelinde 3.ekzon bölgesi için gözlenen heterozigotluk değeri (Ho) 0.423, beklenen heterozigotluk değeri (He) 0.379, 4.ekzon bölgesi için gözlenen heterozigotluk (Ho) 0.681 ve beklenen heterozigotluk değeri (He) 0.454 olarak hesaplanmıştır.

3.ekzon bölgesi için populasyon içerisindeki gözlenen heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg dengesindeki sapmanın oranını veren Populasyon içi fiksasyon indeksi (F_{IS}) değeri; DAK populasyonda 0.072, melez populasyonda -0.082 ve tüm populasyonda -0.010 olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre populasyon genelinde heterozigotluk düzeyinin yüksek olduğu görülmektedir.

4.ekzon bölgesi için F_{IS} değerleri, DAK populasyonda -0.290, melez populasyonda -0.846 ve populasyon genelinde -0.600 olarak bulunmuştur. Bulunan bu negatif değerlere göre populasyon içinde heterozigotluk oranı yüksektir.

Populasyonların tamamındaki toplam gözlenen heterozigotluk düzeyinin Hardy-Weinberg prensibine göre olması gereken miktardan sapma olup olmadığını ölçen F_{IT} değeri 3.ekzon bölgesinde -0.006, 4.ekzon bölgesinde -0.539 ve populasyon genelinde

-0.272 olarak hesaplandı. Bu değerlere göre 3.ekzon bölgesinde bulunan heterozigotluk oranı değerinin sıfıra yakın ve negatif olması nedeniyle yüksek, 4.ekzon bölgesinde değerin 1'e yakın olması nedeniyle heterozigotluk oranının düşük olduğu yani 4.ekzon bölgesinin allel frekansları arasında nisbi de olsa sapma olduğu anlaşılmıştır. Populasyon genelinde F_{IT} değeri (-0.272) gözlenen heterozigotluk düzeyi sapma oranının istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) olduğu tespit edilmiştir.

Irklar arasındaki genetik farklılaşmanın bir lt olan F_{ST} değeri populasyon genelinde 3.ekzon bölgesi için 0.003, 4.ekzon bölgesi için 0.039 olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre 3.ekzon bölgesinde genetik farklılaşma önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 4.ekzon bölgesi için DAK ve Melez populasyonlar arasında genetik farklılaşmanın önemli ($p<0.05$) düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

5. SONUÇ

Hayvanlarda çeşitli verim özellikleri bakımından başarılı bir ıslah çalışması yapılabilmesi, öncelikle genetik yapılarının iyi bir şekilde ortaya konması ile mümkün olabilir. Genetik yapının belirlenmesi çalışmalarında son yıllarda doğrudan DNA üzerinde yapılan teknikler ile önemli mesafeler katedilmiştir. Günümüzde araştırmacıların çoğunun amacı; ülkelerine ait ırkların hem ıslahı, hem de yerli gen kaynağı olarak korunmasına yardımcı olmak üzere moleküler düzeyde yeni teknikleri kullanmak ve DNA seviyesinde yapılan çalışmalarla çeşitli ırklara ait genetik yapı hakkında detaylı sonuçlar ortaya koymaktır.

Polimorfizmler, mutasyonlardan farklı olarak organizmada işlev bozukluğuna yol açmamaktadırlar ve bir patolojiye sebep olmamaktadırlar. Sığır genomunda polimorfizmler yüksek boyutta olduğundan, bu polimorfik yapıların boyutları ve niteliklerinin doğru ve detaylı olarak yetiştiricilik açısından öncelikle saptanması gerekmektedir.

PCR-RFLP analizi sonucunda PRL geni 1.ekzon bölgesinde tüm populasyonlar genelinde monomorfik bulunmuştur. PRL geni 3.ekzon bölgesinde AA, AB ve BB genotip frekansları DAK populasyonunda sırasıyla, 0.59, 0.34 ve 0.07, Melez populasyonda sırasıyla 0.49, 0.44. ve 0.07, tüm populasyon genelinde 0.55, 0.38 ve 0.07 olarak bulunurken, 4.ekzon bölgesinde AA, AG ve GG genotip frekansları DAK populasyonunda sırasıyla, 0.01, 0.51 ve 0.48, Melez populasyonda sırasıyla 0.00, 0.92 ve 0.08, tüm populasyon genelinde 0.01, 0.57 ve 0.42 olarak tespit edilmiştir. İncelenen tüm bireyler ele alındığında 3.ekzon bölgesinde A alleli gen frekansı 0.74, 4.ekzon bölgesinde A alleli gen frekansı ise 0.29 olarak bulunmuştur. Prolaktin lokuslarında gözlenen genotip frekanslarının populasyonlar arasındaki dağılımı 3. Ekzon bölgesinde homojen olarak bulunmuştur ve populasyonların Hardy-Weinberg dengesinde ($p>0.05$) olduğu gözlenirken, 4.ekzon bölgesinde populasyonların dengede olmadıkları görülmüştür. Genotiplerin ırklara dağılımı 3.ekzon bölgesinde homojen iken ($p>0.05$), 4.ekzon bölgesinde dağılım heterojen ($p<0.01$) bulunmuştur.

DAK populusyonunda 3.ekzon bölgesi için hesaplanan gözlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e) değerlerinden düşük bulunurken, bu değerler 4.ekzon bölgesi için yüksek bulunmuştur. Diğer incelenen Melez populusyonu ve populusyon genelinde gözlenen heterozigotluk oranları beklenen değerlerinden yüksek bulunmuştur. Ekzon 3 ve 4 bölgeleri için DAK populusyonunda hesaplanan F_{IS} değerleri sırasıyla 0.072 ve -0.290, melez populusyonda -0.082 ve -0.846 olarak bulunmuş, populusyon genelinde -0.01 ve -0.600 olarak hesaplanmıştır. Ekzon 3 ve 4 bölgeleri için F_{IT} değeri -0.006 ve -0.539 olarak tespit edilmiştir. Ekzon 3 ve 4 bölgeleri için F_{ST} değeri 0.003 ve 0.039 olarak tespit edilmiştir. Bu değerlere göre 3.ekzon bölgesinde genetik farklılaşma önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 4.ekzon bölgesi için DAK ve Melez populusyonlar arasında genetik farklılaşmanın önemli ($p<0.05$) düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, bölgede mevcut DAK populusyonlardaki prolaktin polimorfizminin boyutlarını ortaya koymasından yeterli sayılabilir ve yerli gen kaynaklarının korunmasında genetik varyasyondan yararlanma imkânlarına öncülük edebilir. Ancak, sonraki araştırmalarda, prolaktin geninin polimorfik yapılarının hayvanların çeşitli verim yönlerinde ıslah amacıyla kullanılabilir çalışmaları yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adamson, A. D., Friedrichsen, S., Semprini, S., Harper, C. V., Mullins, J. J., White, M. R. H., Davi, J. R. E., 2008. Human prolactin gene promoter regulation by estrogen: convergence with tumor necrosis factor-signaling . *Endocrinology* 149(2):687–694
- Ağaoğlu, K.Ö., 2010. Türkiye'deki bazı yerli keçi ırklarında mikrosatellit polimorfizminin belirlenmesi . Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı Doktora Tezi , Ankara
- Akyüz, B., Ağaoğlu, K.Ö., Ertuğrul, O., 2012. Genetic polymorphism of kappa-casein, growth hormone and prolactin genes in Turkish native cattle breeds. *International Journal of Dairy Technology* , 65 (1)
- Alfonso, E., Rojas, R., Herrera, J.G., Ortega, M.E., Lemus, C., Ruiz, J., Pinto, R. Gomez, H., 2012. Polymorphism of the prolactin gene (PRL) and its relationship with milk production in American Swiss cattle . *African Journal of Biotechnology*, 11 (29) : 7338-7343.
- Alipanah, M., Kalashnikova, L.A. and Rodionov, G.V., 2008. Kappa-casein and PRL-RsaI genotypic frequencies in two russian cattle breeds. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6 (6) : 813-815.
- Bachelot, A. and Binart, N., 2008. Reproductive role of prolactin. *Society for Reproduction and Fertility*, Doi: 10.1530/REP-06-0299
- Bardakçı, F. ve Yenidünya, F.A., 2010. Nükleik Asit Analiz Teknikleri. Moleküler biyoloji teknikleri I, ed : Yıldırım , A. , Bardakçı , F. , Karataş , M. ,Tanyolaç , B. , Nobel yayınevi , Ankara , (14) : 521/522
- Bernichtein, S., Touraine, P., Goffin, V., 2010. New concepts in prolactin biology. *Journal of Endocrinology*, Doi:10.1677/Joe-10-0069 0022–0795/10/0206–001
- Boleckova, J., Matejickova, J., Stipkova, M., Kyselova, J., Barton, L., 2012 . The association of five polymorphisms with milk production traits in Czech Fleckvieh cattle . *Institute of Animal Science*, 57 (2) : 45–53
- Borromeo,V., Berrini, A., Bramani, S., Sironi, G., Finazz, M. and Secchi, C., 1997. Plasma levels of GH and PRL and concentrations in the fluids of bovine ovarian cysts and follicles . *Elsevier Science Theriogenology*, 49 ; 1377-1378
- Brookscl, K.B., Aphale, P., Andjohnsongc, K.B., 1990 . Phosphorylated variant of bovine prolactin. *Molecular Cell Endocrinology*, 71 : 117–123
- Brym, P., Kaminski, S. and Wojcik, E., 2005. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. *Journal of Applied Genetics*, 45 (2) : 179-185.
- Buckler , E. S. , and Thornsberry , J. M. , 2002. “Plant molecular diversity and applications to genomics . *Current Opinion in Plant Biology* , 5 (2) : 107-111
- Camper, S.A., Luck, Y.W., Yao, R.P., Ychik, R.G., Goodwin, R.H., Lyons and Rottman , F.M., 1984 . Characterization of the bovine PRL-Rsa I gene. *DNA. Liebert publishers*, 3 (3) : 237-249.
- Cao, X., Wang, Q., Yan, J.B., Yang, F.K., Huang, S.Z. and Zeng, Y.T., 2002. Molecular cloning and analysis of bovine prolactin full-long genomic as well as cDNA sequences. *Yi. Chuan Xue. Bao.*29(9):768-773.

- Chen, T.J., Kuo, C.B., Tsai, K.F., Liu, J.W., Chen, D.Y., and Walker, A.M., 1998. Development of recombinant human prolactin receptor antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology* , 139: 609-616
- 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 Journal of Animal Science* , 38 (4) : 321-336.
- Citek, J., Rehout, V. and Neubauerova, V., 2001. Allele frequency at PRL (prolactin) and LGB (lactoglobulin beta) genes in Red cattle breeds from Central Europe and in other breeds. *Czech Journal Animal Science* , 46 (10):433-438.
- Clapp, C., 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat : characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* , 121: 2055–2064,
- Collier, R.J., McNamara, J.P., Wallace, C.R. and Dehoff, M.H., 1984. A review on endocrine regulation of metabolism during lactation, *Journal of Animal Science.*, 59: 495-510.
- David, J.F. and Knight, C.H., 1997. Interactions of prolactin and growth hormone (GH) in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival . *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* , 2 (1) : 1083-3021/97/0100-0041,12.50.
- Dybus, A., 2002. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle . *Animal Science*, 20 (4) : 203-212
- Dybus, A., Grzesiak, W., Kamieniecki, H., Szatkowski, I., Sobek, Z., Blaszczyk, P., Czerniawska, P., E., Zych, S. and Muszynska, M., 2005. Association of genetic variants of bovine prolactin with milk production traits of Black-and-White and Jersey cattle. *Archives of Animal Breed*, 48 (2): 149-156
- Erdmann, S., Ricken, A., Merkwitz, C., Struman, I., Castino, R., Hummitzsch, K., Gaunitz, F., Isidoro, C., Martia , J. and Borowski, K.S., 2007. The expression of prolactin and its cathepsin D-mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle . *Physiol Endocrinology Metab*, Doi: 10.1152/ajpendo.00280.
- Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptors: actions signaltransduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinology Reviews* 19.225 –68.
- Forsyth, I.A. and Le, P.D., 1993. Bromocriptine treatment of periparturient goats: Long-term suppression of prolactin and lack of effect on lactation. *Journal of Dairy Research*, 60:307–317.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A. and Nagy, G., 2000 . Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological reviews*, 80,(4), 307-317
- Gadd, S.L., Clevenger, C.V., 2006. Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Molecular Endocrinology*, 20 : 2734–2746.
- Gardner, E.J., Simmons, M.J., and Snustad, D P., 1991. Population and evolutionary genetics: Principles of genetics . 8th, Edt. John Wiley and Sons, Inc. United States.
- Genç, Ş., 2007. Polimeraz Zincir Reaksiyonu IV. ARLAB hücresel, moleküler ve analitik teknikler kursu, 13-14 Kasım 2007, İzmir.

- Ghasemi, N., Zadehrahmani, M., Rahimi, G., Hafezian, S.H., 2009. Associations between prolactin gene polymorphism and milk production in montebeliard cows. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 1 (3) : 048-051,
- Girolomoni, G., Phillips, J.T., Bergstresser, P.R., 1993. Prolactin stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Journal Invest Dermatology*, 101: 275–279
- Gothard, L.Q., Hibbard, J.C., Seyfred, M.A., 1996. Estrogen mediated induction of rat prolactin gene transcription requires the formation of a chromatin loop between the distal enhancer and proximal promoter regions. *Molecular Endocrinology* , 10:185-195.
- Hallerman, E.M., Nave, A. and Kashi, Y., 1987. Restriction fragment length polymorphisms in dairy and beef cattle at the growth hormone and PRL-Rsa I loci. *Animal Genetics* , 18 : 213-222.
- He, F., Sun, D., Yu, Y., Wang, Y., Zhang, Y., 2006. Association between SNPs within prolactin gene and milk performance traits in Holstein dairy cattle. *Asian-Aust Journal Animal Science* , 19(10) 1384-1389.
- Hennighausen, L., Robinson, G.W., Wagner, K. and Liu, X., 1997. Prolactin signaling in mammary gland development. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, (12), 7567–7569
- Horseman, N.D., Zhao, W., Rodriguez, E.M. , Tanaka, M., Nakashima, K., Engle, S.J., Smith, F., Markoff, E., and Dorshkind, K., 1997. Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *The Embo Journal* , Doi:10.1093/emboj/16.23.6926
- Ishaq, R., Suleman, M., Riaz, N.M., Yousaf, M., Shah, A., Ghaffoor, A., 2012. Prolactin gene polymorphism in Nili-Ravi buffaloes in relation to Sahiwal and Achai cattle. *International Journal of Dairy Technology*, Doi: 10.1111/j.1471-0307.2012.00875.x
- Jonathan, N.B., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, R.W., 1996. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 17:639 – 669
- Jonathan, N.B., Pensee, C.R. and LaPensee, E.W., 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans. *Endocrine Reviews* , 29 (1) :1–41
- Josimovich, J.B., Merisko, K., Boccella, L., 1977. Amniotic prolactin control over amniotic and fetal extracellular fluid water and electrolytes in the rhesus monkey. *Endocrinology* , 100:564 –570
- Kaplan, S., Boztepe, S., 2010. The determination of prolactin gene polymorphism using PCR-RFLP method within indigenous Anatolian Water Buffalo and Brown Swiss, 2nd International Symposium on Sustainable Development, 8-9 2010, Sarajevo, 168-173.
- Karsi, A., Li, P., Kim, S., Rex, A., 2000 . Dunham performance traits-linked DNA markers and marker-assisted selection, Conference, p 8, San Diego.
- Kepenek, E.Ş., 2007. Polymorphism of Prolactin (Prl), Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT-1) and Bovine Solute Carrier Family 35 Member 3 (Slc35a3) genes in native cattle breeds and its implication for Turkish cattle breeding. A master Thesis, Biological Science Department, Middle East Technical University, Ankara

- Khatami, S.R., Lazebny, O.E., 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 Journal of Genetics* , 41 (2) :167-173
- Klug, W.S. and Cummings, M.R., (Çeviri Editörü: Prof. Dr. Cihan Öner), 2003. *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık.
- Koban, E., Togan, İ., Berkman, C ., Özkan, E., Dinç, H., 2008. Populasyon genomiği 1-çalıştı. Odtü Biyoloji Bölümü Türkhaygen-1 projesi www.turkhaygen.gov.tr/pop_genom-I-calistay
- Kumari, A.R., Singh, K.M., Soni, K.J., Patel, R.K., Chauhan, J.B., Sambasiva, R.K., 2008. Genotyping of the polymorphism within exon 3 of prolactin gene in various dairy breeds by PCR RFLP. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 51(3):298-299
- Kumari, R. , 2004. Study of prolactin gene polymorphism using PCR-RFLP and SSCP in different buffalo breeds of Gujarat Department of Animal Genetics and Breeding College of Veterinary Science , Anand-388001
- Kumlu, S., 2000. Damızlık ve kasaplık sığır yetiştirme. Türkiye Damızlık Sığır Yetiştiricileri Merkez Birliği Yayınları , 20 (3): 30, Ankara.
- Küfrevioğlu, İ., Şahin, F., Pirim, İ., Çiftci, M., Polat, M.F., Oral, B., Özmen, İ. and Adıgüzel, A., 2000. Atatürk üniversitesi, biyoteknoloji uygulama ve araştırma merkezi, II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, 15-20 Mayıs 2000.
- Ladani, D.D., Pipalia, D.L., Brahmkshtri, B.P., Rank, D.N., Joshi, C.G., Vataliya, P.H. and Solanki, J.V., 2003a. Prolactin genotyping of indian buffalo breeds using PCR-RFLP. *Buffalo Journal*, 19 (2): 203-208
- Ladani, D.D., Pipalia, D.L., Brahmkshtri, B.P., Rank, D.N., Joshi, C.G., Vataliya, P.H. and Solanki, J.V., 2003b. PCR-RFLP polymorphism at prolactin locus in buffaloes. *Buffalo Journal*, 2 : 237-242.
- Lewin, H.A., Scmitt, K., Hubert, R., Vanerik, M. J. and Arnheim, N., 1992. *Genomics*, 13: 44-48.
- Li, J.T. Wang, A.H., Chen, P., Li, H.B., Zhang, C.S. and Du, L.X., 2006. Relationship between the polymorphisms of 5' regulation region of prolactin gene and milk traits in Chinese Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 19 (4): 459-462.
- Lü, A., Hu, X., Chen, H., Jiang, J., Zhang, C., Xu, H., Gao, X., 2010. Single nucleotide polymorphisms in bovine PRL gene and their associations with milk production traits in Chinese Holsteins. *Molecular. Biology. Reproductive*, Xuzhou , China 37: 547–551.
- Madnalwar, V.S. , Sawane, M.P. , Pawar, V.D., Patil, P.A., Fernandis, A.P. and Bannalikar, A.S., 2010. Genotyping The Prolactin Gene In Pandharpuri Buffaloes by PCR-RFLP. Department of Animal Genetics and Breeding, Parel Mumbai- 400 012 India. 29 (.2)
- Martin, R.H., Glass, M.R., Chapman, C., Wilson, G D. and Woods, K.L., 1980. Human alphalactalbumin and hormonal factors in pregnancy and lactation. *Clinical. Endocrinology*, 13:223–230
- Meghen, C., Machugh, D.E. and Bradley, D.G., 2002. Genetic characterization and West African cattle. web adresi : www.fao.org/docrep/t1300t/genetic%20characterization.html.

- Mehmannavaz, Y. and Gorbani, A., 2012. Genetic Polymorphisms of Some Bovine Lactogenic Hormones Agricultural and Biological Sciences Milk Production Advanced Genetic Traits, Cellular Mechanism, Animal Management and Health, ISBN 978-953-51-0766-8,
- Mehmannavaz, Y., Amirinia, C., Bonyadi, M., Torshizi, R.V., 2009. Effects of bovine prolactin gene polymorphism within exon 4 on milk related traits and genetic trends in Iranian Holstein bulls. *African Journal of Biotechnology* , 8 (19) :. 4797-4801
- Miceikiene, I., Peciulaitiene, N., Baltreinaite, I., Skinkyte, R. and Indriulyte, R. , 2006. Association of cattle genetic markers with performance traits. *Biologija*, 1:24-29.
- Nei, M. and Kumar, S., 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, ISBN-13: 978-0195135855
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. 1st Edn. , Columbia University Press, New York, USA.
- Neville, M.C., McFadden, T.B. and Forsyth, I., 2002. Hormonal regulation of mammary differensiation and milk secretion journal of mammary gland biology and neoplasia, 7(1) : 1083-3021.
- Ochoa, A., Oca, P.M., Rivera, J.C., Duenas, Z., Nava, G., Escalera, G.M. and Clapp, C., 2001. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, June 2001, . 42 (7).
- Orbach, H. and Shoefeld, Y., 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Reviews*, 2007. 537-542
- Özdemir, M., 2006. Türkiye yerli sığır ırklarında mitokondriyal DNA polimorfik yapılarının PCR-RFLP ve DNA dizi analizi yöntemleri ile incelenmesi. Doktora tezi, Atatürk Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Öztabak, K., Ün, C., Tesfaye, D., Akis, I., 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 Agriculturae Scand Section A*, 58: 109112 ISSN 0906-4702 Taylor ve Francis
- Öztürk, F., 2008. Populasyon Genetiği ve Hardy-Weinberg Dengesi (web: <http://80.251.40.59/science.ankara.edu.tr/ozturk/Dersler/ist432/Ders9/PopGen.pdf>)
- Peakall, R. and Smouse, P.E., 2012. GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Riddle, O., Bates, R.W. and Dykshorn, S.W., 1932. The preparation, identification and assay of prolactin a hormone of anterior pituitary. *American Journal of Physiology*, 105: 191–216,
- Robert, P.C. and Henry, G.F., 1974. Properties of a Prolactin Receptor from the Rabbit Mammary Gland, *Biochemical. Journal*, 140, 301-311
- Rorie, R.W. Howland, E.M. and Lester, T.D.E, 2009. Evaluation of a Polymorphism in the Prolactin Gene as a Potential Genetic Marker for Mastitis Susceptibility and Milk Production. Arkansas, Department of Animal Science <http://arkansasagnews.uark.edu/1356.htm>
- Sang, L., Du, Q.Z., Yang, W.C., Tang, K.Q., Yu, J.N., Hua, G.H., Zhang, X.X, Yang, L. G., 2011. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha,

- inhibin bata A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls. *Animal Reproductive Science*, 126 (3-4) : 151-6.
- Schennink, A., Bovenhuis, H., Kloosterziel, K.M.L., Arendonk, J.A.M. and Visker, W., 2009. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk fat composition. Wageningen University, Stichting International Foundation for Animal Genetics, 40, 909-916
- Schradin, C. and Pillay, N., 2004. The striped mouse (*Rhabdomys pumilio*) from the succulent karoo, South Africa: a territorial group-living solitary forager with communal breeding and helpers at the nest. *Journal of Comparative Psychology*, 118, 37-47
- Semprini, S., Friedrichsen, S., Harper, C.V., McNeilly, J.R., Adamson, A.D., Spiller, D.G., Kotelevtseva, N., Brooker, G., Brownstein, D.G., McNeilly, A. S. , White , M.R., Davis, J.R., Mullins, J.J., 2009. Real-time visualization of human prolactin alternate promoter usage in vivo using a double-transgenic rat model. *Molecular Endocrinology*, 23: 529-538
- Semprini, S., McNamara, A.V., Awais, R., Featherstone, K., Harper, C.V., McNeilly, J. R., Patist, A., Rossi, A.G., Dransfield, I., McNeilly, A.S., Davis, J. R. E., White, M.R.H., Mullins, J.J., 2012. Peritonitis activates transcription of the human prolactin locus in myeloid cells in a humanized transgenic rat model. *Endocrinology*, Doi: 10.1210/en.2011-1926.
- Sharifi, S., Roshanfekar, H., Khatami, S.R. and Mirzadeh, K.H., 2010. Prolactin Genotyping of Najdi Cattle Breed Using PCR-RFLP, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9 (2), 281-283
- Sinha, Y.N., 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, 16 : 354-369
- Soares, M.J., 2004. The prolactin and growth hormone families: Pregnancy-specific hormones /cytokines at the maternal-fetal interface. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 51: (2) Doi:10.1186/1477-7827-2-51.
- Sodhi, M., Mukesh, M., Mishra, B.P., Parvesh, K., Joshi, B.K., 2011. Analysis of genetic variation at the prolactin-RsaI (PRL-RsaI) locus in Indian native cattle breeds (*Bos indicus*). *Biochemical Genetics*, 49 (1-2): 39-45.
- Soysal, M.İ. , 2010. Türkiye yerli evcil hayvan genetik kaynakları. N.K.Ü. Ziraat Fak. Zootekni Bölümü. Tekirdağ.
- Starnes, A.R., Brown, A.H., Johnson, Z.B., Powell, J.G., Reynolds, J.L., Reiter, S.T., Looper, M.L. and Rosenkrans, C.F., 2009. Relationships between prolactin promoter polymorphisms and angus calf temperament scores and fecal egg counts Arkansas. Agricultural Experiment Station Division of Agriculture, ISSN: 1941-1685
- Şahin, F., Çiftçi, M. ve Pirim, İ., 2000. Atatürk üniversitesi, biyoteknoloji uygulama ve araştırma merkezi II. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Kursu, 15-20 Mayıs: 18-26.
- Tabar, Y.S., Fayazi, J., Roshanfekar, H., Mirzadeh, K. and Sadr, A.S., 2010. Investigation of prolactin polymorphism in buffalo population of Khuzestan Iran by PCR-RFLP. *Journal of Animal and Veterinary*, 9 (2) : 284-286
- Tagem, 2009. Türkiye Evcil Hayvan Genetik Kaynakları, Tanıtım kataloğu, Ankara (web: http://www.tagem.gov.tr/yayin%5Ctagem_ehgk_katalog).

- Takahashi, T., 2006. Biology of the prolactin family in bovine placenta. I. Bovine placental lactogen expression, structure and proposed roles. *Animal Science Journal*, 77: (10) 17 doi: 10. 1111/j.1740-0929.2006.00314.x
- Teilum, K., Hoch, J.C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J.A. and Kragelund, B., 2005. Solution Structure of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology*, 351, 810–823.
- Truong, A.T. , Duez, C., Belayew, A., Renard, A., Pictet, R., Bell, G.I. and Martial, J. A. , 1984. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *The EMBO Journal*, 3(2):429-437.
- Tucker, H.A. 1974. Physiological control of mammary growth, lactogenesis and lactation. *Journal of Dairy Science*, 4: 1403-1421.
- Tucker, H.A., 2000. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-Year Perspective. *Journal of Dairy Science* 83 (4): 874-88
- Udina, I.G., Turkova, S.O. , Kostuchenko, M.V., Lebedeva, L.A. , Sulimova, G.E., 2001. Polymorphism of bovine prolactin gene, microsatellites, PCR-RFLP. *Russian Journal. Genetics*, 4: 407-411.
- Ushizawa, K.T., Takahashi, T. Hosoe, M., Kaneyama, K. and Hashizume, K., 2005. Cloning and expression of two new prolactin-related proteins, prolactin-related protein-VIII and -IX, in bovine placenta. *Reproductive Biology and Endocrinology*, (3):68 doi:10.1186/1477-7827-3-68
- Verma, A., Gupta, I.D. and Gandhi, R.S., 2012. Genetic polymorphism in exon 3 of prolactin gene in Indian Murrah Buffaloes. *Wayamba Journal of Animal Science*, ISSN: 2012-578X; 2012
- Vikas, M., Parmar, S.N.S, Thakur, M. S., Gurudutt, S., 2012. Association of prolactin gene polymorphism with milk production traits in Frieswal cattle. *Journal of Animal Research*, 2, (2): 173/177
- Vomachka, A.J., Pratt, S.L., Lockeferri, J.A., Nelson, D.H., Weerdt, C.V., Peers, B., Belayew, A., Martial, J.A., Muller, M., 2000. Far upstream sequences regulate the human prolactin promoter transcription. *Neuroendocrinology*, 71:124–137
- Wojdak, M.K., Kmic, M. and Strzalak, J., 2008. Prolactin gene polymorphism and somatic cell count in dairy cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7(1) : 35-40.
- Wolf, J.B., David, V.A. and Deutch, A.H., 1990. Identification of a distal regulatory element in the 5' flanking region of the bovine prolactin gene. *Nucleic Acids Resources*, 18 (16): 4905–4912.
- Wright, S. , 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Society for the Study of Evolution*, 19 (3): 395-420.
- Yüksel, A.N., Soysal, M.İ., Kocaman, İ., 2000. *Süt Sığırcılığı Temel Kitabı*. Hasad Yayıncılık: 088-96
- Yüksel, S., Sezgin, E., Kopuzlu, S., 2011. Some of common features of eastern anatolian red cattle, its local position and importance as genetic resources. *RBI 8th Global Conference on the Conservation of Animal Genetic Resources*, 176/177
- Zhou, G., Zhu, Q., Wu, Y. and Jin, H., 2006. Polymorphism of PRL gene and its relationship with milk productin traits in cows. *Journal of Jilin Agricultural University*, 28 (1): 80-83.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1986'da Erzurum'da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Erzurum'da tamamladı. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Mezun olduğu 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü'nde Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizce olup bekindir.