

# Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Sığır Irklarında Asetil Koenzim A Dehidrogenaz Geni (g.2885C>A) Polimorfizminin ARMS-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi

Taki Karşlı

*Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Antalya*

Geliş Tarihi / Received: 03.10.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 29.05.2019

**Özet:** Asetil koenzim A dehidrogenaz (ACADVL) uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunda ve enerji salınımında önemli rol oynayan bir proteindir. Sığırlarda 19. kromozom üzerinde bulunan ACADVL geni üzerindeki bir SNP’in (g.2885C>A; Pro236Thr) bazı büyüme özellikleri (göğüs genişliği, göğüs derinliği ve sağrı genişliği) ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu gen için AA genotipli bireyler AC ve CC genotiplilere göre daha üstün büyüme özelliklerine sahiptir. Bu çalışmada Türkiye’de yetiştirilen Siyah Alaca (SA), Yerli Kara (YK), Boz (BI) ve Doğu Anadolu Kırmızı (DAK) sığır irklarında ACADVL (g.2885C>A) geni üzerinde bulunan polimorfizmin ARMS-PCR yöntemiyle belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada SA (64 örnek), YK (54 örnek), BI (48 örnek) ve DAK (44 örnek) sığır irklarına ait toplam 210 örnek incelenmiştir. ARMS-PCR analizleri sonucunda ACADVL (g.2885C>A) geni için Siyah Alaca ırkı monomorfik (CC-307-152 bp) bulunurken BI, DAK ve YK sığır irkları polimorfik (AC: 307-211-152 bp ve CC: 307-152 bp) bulunmuştur. AC genotipinin frekansı BI, DAK ve YK sığır irklarında sırasıyla 0.063, 0.045, 0.093 olarak hesaplanırken, CC genotipinin frekansı sırasıyla 0.937, 0.955 ve 0.907 olarak hesaplanmıştır. Yapılan bu çalışma ile SA, BI, DAK ve YK sığır irklarında ACADVL genindeki polimorfizmler ilk defa gösterilmiştir. Çalışılan sığır irklarında AA genotipi tespit edilememiştir.

**Anahtar kelimeler:** ACADVL geni, ARMS-PCR, polimorfizm, sığır

## Determination of Polymorphism in Acyl-coenzyme A Dehydrogenase Gene (g.2885C>A) by ARMS-PCR Methods in Some Cattle Breeds Raised in Turkey

**Abstract:** Acetyl coenzyme A dehydrogenase (ACADVL) is a protein that plays an important role in oxidation of long chain fatty and releasing energy. SNP (g.2885C>A; Pro236Thr) on the ACADVL dehydrogenase gene located on chromosome 19 in cattle is associated with some growth traits (chest width, chest depth and hip width). Individuals with AA genotype have superior growth traits than individuals with AC and CC genotypes. In this study was aimed to determine polymorphism on ACADVL gene (g.2885C>A) in Holstein (SA), Anatolian Black (YK) Turkish Grey Steppe (BI), and East Anatolian Red (DAK) cattle breeds raised in Turkey by ARMS-PCR method. In this study was used totally 210 samples obtained from SA (64 samples), YK (54 samples), BI (48 samples) and DAK (44 samples) cattle breeds. As a result of ARMS-PCR analyzes for ACADVL (g.2885C>A) gene SA breed was found to be monomorphic (CC-307-152 bp) while BI, DAK and YK cattle breeds were found to be polymorphic (AC: 307-211-152 bp and CC: 307-152 bp). Frequency of AC genotype were calculated as 0.063, 0.045 and 0.093 while frequency of CC genotype were calculated as 0.937, 0.955 and 0.907 in BI, DAK and YK cattle breeds, respectively. The polymorphism was shown for the first time on ACADVL (2885C>A) gene in SA, YK, BI and DAK cattle breeds. AA genotype could not be detected in studied cattle breeds.

**Key words:** ACADVL gene, ARMS-PCR, polymorphism, cattle

## Giriş

Çiftlik hayvanlarında genetik iyileştirme binlerce yıl önce çiftlik hayvanı türlerinin evcilleştirilmesi, değişik iklim ve üretim sistemlerine adaptasyonu ile başlamıştır. 1700’lü yılların sonunda başlayan ırkların geliştirilmesi, 20. yüzyılda hayvan ışlahı ve genetiği biliminin ortaya çıkması ile daha da artmıştır [10]. Hayvan ışlahı ve genetiğinde ortaya çıkan gelişmeler yetiştirici tercihlerine göre yüksek

verimli ırkların geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Geçtiğimiz 30 yılda ise moleküler biyoloji, moleküler genetik ve biyoteknoloji alanında yaşanan hızlı gelişim hayvan ışlahçıları için yeni fırsatlar sunmuştur.

Hayvan yetiştiriciliğinde bireylerin fenotipik verilerine dayalı olarak yapılan klasik ışlah çalışmaları zaman alan, zor ve pahalı işlemlerdir. Klasik ışlah çalışmalarına ek olarak ekonomik önemi

olan özellikler ile ilişkili aday genlerin belirlenerek Marker Destekli Seleksiyonda (Marker Assisted Selection-MAS) kullanılması seleksiyonda başarıyı ve genetik ilerleme hızını artırma potansiyeline sahiptir [1,5]. Çiftlik hayvanlarında geçtiğimiz 20 yılda MAS çalışmalarında kullanılabilir çeşitli verim özellikleri ile ilişkili çok sayıda aday gen belirlenmiştir. Verim özellikleri ile ilişkili aday genler dışında çeşitli hastalıklara dirençli bireylerin belirlenmesinde kullanılabilir çok sayıda aday gen tanımlanmıştır.

Süt sığırcılığında MAS çalışmalarında kullanılabilir aday genlere örnek olarak Prolaktin (PRL), Kazein,  $\beta$ -laktoglobulin genleri, et sığırcılığında ise Leptin, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I), Büyüme Hormonu Reseptör (GHR) ve Asetil Koenzim Dehidrogenaz (ACADVL) genleri gösterilebilir [1, 11, 16]. Sığırlarda bazı hastalıklara dirençli bireylerin belirlenmesinde kullanılabilir aday genlere örnek olarak Mannoza Bağlayan Lektin (MBL) ya da Integrin beta 6 genleri gösterilebilir [11, 14].

ACADVL proteinini kodlayan Asetil koenzim A (Acyl-CoA) dehidrogenaz (ACADVL) çok uzun bir zincirdir, mitokondriyal membranın iç tabakasında, mitokondriyal yağ asidi beta-oksidasyon yolunun birinci basamağını katalize ederek vücut metabolizmasında, uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunda ve enerji salınımında önemli rol oynamaktadır. Sığırlarda 19. kromozom üzerinde bulunan Acyl-CoA dehidrogenaz (ACADVL, VLCAD, LCAD, ACAD6) stres, egzersiz, açlık ve benzer olumsuz koşullarda enerji sağlamak için karcinogende keton cisimleri oluşturmaktadır [9, 16].

ACADVL geninin çeşitli büyüme özellikleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [16]. Zhang ve ark. [16] Çin yerli sığır ırklarından Qinchuan ve Jinnan sığırlarında yaptıkları çalışmada ACADVL geni üzerinde 2885. pozisyondaki C>A nokta mutasyonunu (Pro236Thr) ARMS-PCR (Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction) yöntemiyle belirlemişlerdir. Araştırmacılar ARMS-PCR işlemi sonrasında AA genotipi için 307-211 bp uzunluğunda iki bant, AC genotipi için 307-211-152 bp uzunluğunda üç bant ve CC genotipi için 307-152 bp uzunluğunda iki bant elde etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları istatistik analizler sonucunda Qinchuan ırkında

ACADVL ile göğüs genişliği ( $P<0.05$ ), göğüs derinliği ( $P<0.05$ ) ve sağrı genişliği ( $P<0.05$ ) arasında ilişki olduğunu bildirmiştir. AA genotipli sığırların AC ve CC genotipli sığırlara göre daha iyi büyüme özelliklerine sahip olduğunu belirlemişlerdir.

ARMS-PCR yöntemi bilinen tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesi için basit, ekonomik ve etkili bir metottur. Yöntemde dört farklı primer aynı anda kullanılarak yapılan PCR işlemi jel elektroforezi takip etmektedir. İki iç ile iki dış primerin kullanıldığı yöntemde dış primerler ile SNP'in de bulunduğu tüm bölge çoğaltılmaktadır. Her iç primer ve bir adet dış primer ile mutant ve normal alleller belirlenmektedir. Ko-dominant marker yöntemi olan ARMS-PCR'in Allel Spesifik PCR (AS-PCR)'dan farkı tüm işlemlerin aynı PCR tüpü içerisinde ve tek seferde gerçekleştirilmesidir [2]. AS-PCR işleminde de hem mutant alleli hem de normal alleli tanıyan primerler kullanılmakta ancak bu primerler aynı revers primer ile ayrı ayrı çoğaltılmaktadır [3]. ARMS-PCR tekniğinde nokta mutasyonlarını belirlemede en sık kullanılan yöntem olan PCR-RFLP tekniğinde olduğu gibi enzim gereksinimi ve dolayısıyla kesim işlemi için ayrıca bir süreye ihtiyaç yoktur. Bu nedenle PCR-RFLP tekniğine göre oldukça ekonomik ve hızlıdır. AS-PCR işlemine göre ise maliyetler benzer olmakla birlikte daha az iş gücü ve zaman gereksinimi vardır. Bu üstünlükleri yanı sıra ARMS-PCR işleminde optimizasyon daha zor ve zaman alıcıdır. ARMS PCR işleminde özellikle bağlanma sıcaklıkları ile  $MgCl_2$  yoğunluğuna dikkat edilmelidir. Özgün olmayan PCR ürünlerinin engellenmesi için bağlanma sıcaklıkları mümkün olduğunca yükseltilmeli ve ilk 10-15 döngüde kademeli olarak düşürülmelidir [6].

Bu çalışmada Türkiye'de yetiştiriciliği en çok yapılan Siyah Alaca (SA) sığır ırkı ile yerli ırklar olan Yerli Kara (YK), Boz (BI) ve Doğu Anadolu Kırmızısı (DAK) ırklarında ARMS-PCR yöntemi kullanarak ACADVL genindeki polimorfizmin (g. 2885C>A; Pro236Thr) belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Çalışmanın materyalini Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü Genetik Laboratuvarı'nda bulunan SA (n=64), YK (n=54), BI (n=48) ve DAK (n=44) ırklarına ait kanlardan izole edilen

toplam 210 adet DNA oluşturmuştur. Araştırmada kullanılan kan örnekleri Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2017.01.01 protokol numaralı izni ile toplanmıştır.

## Metot

### DNA İzolasyonu

Araştırmada genomik DNA molekülünün izolasyonunda Miller ve ark. [7] tarafından bildirilen protokolü kullanılmış ve DNA bütünlükleri %1'lik agaroz jel kullanılarak kontrol edilmiştir. DNA izolasyon işlemi sonunda DNA'ların miktar ve kalitesi spektrofotometre (NanoDrop ND 100) kullanılarak belirlenmiş ve ARMS-PCR işlemi için 50 ng/μl miktarına ayarlanmıştır.

### ARMS-PCR İşlemi

ARMS-PCR işleminde ACADVL geninin 2885. pozisyondaki C>A nokta mutasyonunu belirlemek üzere kullanılan primerler Tablo 1'de, kullanılan PCR programı ve PCR reaksiyon karışımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

ARMS-PCR işleminde özgün olmayan PCR ürünlerinin engellenmesi için bağlanma sıcaklığı başlangıçta mümkün olduğunca yüksek (68°C) tutulmuştur. Daha sonra her döngüde 1 °C azaltılarak 18. döngü sonunda 50 °C sıcaklığına kadar düşülmüştür. 50 °C bağlanma sıcaklığında ise 23 döngü daha uygulanarak ARMS-PCR işlemi tamamlanmıştır.

**Tablo 1.** ARMS-PCR işleminde kullanılan primerler

	Primer dizisi (5'-3')	Kaynak
<b>F (Outer)</b>	CCATCAGAACCCAGAGTAAAGGAGCGCT	Zhang ve ark. [16]
<b>R (Outer)</b>	GGTGTCTTGGCAAAGACCGTGAAGATGT	
<b>F (Inner A)</b>	CATCCGATCCTCAGCTGTGCCCAACA	
<b>R (Inner C)</b>	TCCGTTGAGGGTATAGTATTTCCACAAGG	

**Tablo 2.** PCR içeriği ve programı

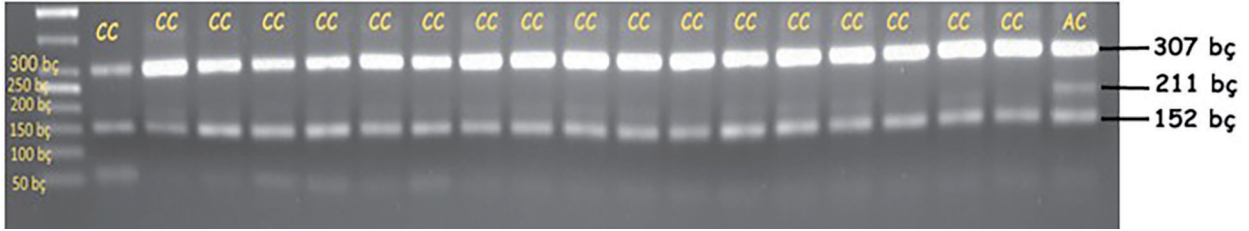
PCR Bileşeni (Marka)	Miktar (μl)	PCR Programı	
H <sub>2</sub> O	33.8	<b>İlk Den.</b>	95°C de 5 dk
MgCl <sub>2</sub>	4	<b>Denatürasyon</b>	94°C de 30 s
10X ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4	<b>Bağlanma</b>	68°C de 30 s
dNTPs(GeneAll)	3 (2,5 mM/μl)	<b>Uzama</b>	72 °C de 30 s
FO	0.5 (10 pmol/μl)	<b>Denatürasyon</b>	94°C de 30 s
RO	0.5 (10 pmol/μl)	<b>Bağlanma</b>	50°C de 30 s
FI	0.5 (10 pmol/μl)	<b>Uzama</b>	72 °C de 30 s
RI	0.5 (10 pmol/μl)	<b>Son Uzama</b>	72 °C de 5 dk
Taq (Fermantase) #EP0402	0.2 (1 U)		
DNA	3		

## İstatistik Analizler

Çalışılan populasyonlarda ACADVL (g.2885C>A) geni için allel ve genotip frekansları Nei'nin [8] gen sayma yöntemine göre Popgen32 [15] istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır. Populasyonlarda ACADVL (g.2885C>A) geni için Hardy Weinberg dengesinden sapma ki-kare ( $\chi^2$ ) istatistiği kullanılarak test edilmiştir [4].

## Bulgular

Çalışmada DNA izolasyonundan sonra gerçekleştirilen ARMS-PCR işlemi sonunda SA ırkının ACADVL geni için monomorf olduğu (CC: 307-152 bç) anlaşılmıştır. YK, BI ve DAK sığır ırklarında ise ACADVL geni için AA genotipine rastlanmazken AC (307-211-152 bç) ve CC (307-152 bç) genotipleri tespit edilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** ACADVL geni için ARMS-PCR agaroz görüntüsü

(Marker: Thermo 50 bp; Kat. No: SM0371; % 2'lik agaroz jel, PCR büyüklükleri AC:307-211-152 bp; CC: 307-152 bp)

Araştırmada SA, YK, BI ve DAK sığır ırklarında elde edilen allel ve genotip frekansları Tablo 3'de gösterilmiştir. Tüm ırklarda AA genotipi tespit edilemezken AC genotipinin frekansı YK, BI ve DAK sığır ırklarında sırasıyla 0.093, 0.063 ve 0.045 olarak hesaplanmıştır. CC genotip frekansı en yüksek SA ırkında (1.000) hesaplanırken en düşük YK ırkında (0.907) tespit edilmiştir. Çalışmada ACADVL geni (g.2885C>A) için polimorfik olduğu tespit edilen YK, BI ve DAK populasyonlarının Hardy-Weinberg dengesinde olduğu görülmüştür.

**Tablo 3.** ACADVL geni (g.2885C>A) için allel ve genotip frekansları

İrk	n	Allel Frekansı		Genotip Frekansı			X <sup>2</sup>
		A	C	AA	AC	CC	
SA	64	0.000	1.000	-	-	1.000	-
YK	54	0.047	0.953	-	0.093	0.907	0.127 <sup>a</sup>
BI	48	0.032	0.968	-	0.063	0.937	0.052 <sup>a</sup>
DAK	44	0.023	0.977	-	0.045	0.955	0.024 <sup>a</sup>

X<sup>2</sup><sub>0.05;1</sub>: 3.84; a: Hardy-Weinberg dengesinden sapma önemsiz

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada Türkiye'de yetiştirilen dört sığır ırkında da bazı büyüme özelliklerini olumlu yönde etkilediği bildirilen [16] ACADVL (g.2885C>A) geni için AA genotipi tespit edilememiştir. Zhang ve ark. [16] ACADVL (g.2885C>A) geni için AA genotipinin frekansını Çin Qinchuan sığırlarında 0.020, Jinnan sığırlarında ise 0.019 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışma kapsamında YK, BI ve DAK sığır ırklarında tespit edilen AC genotipi frekansı (sırasıyla 0.093, 0.063 ve 0.045) Zhang ve ark. [16] tarafından Qinchuan ve Jinnan sığırlarında bildirilen değerlerden (sırasıyla 0.233 ve 0.179) düşüktür. YK, BI ve DAK sığır ırklarında tespit edilen

A alleli frekansları (sırasıyla 0.047, 0.032 ve 0.023) Zhang ve ark. [16] tarafından Qinchuan ve Jinnan sığır ırklarında bildirilen değerlerden (sırasıyla 0.136 ve 0.108) düşüktür.

Türkiye'de yetiştirilen dört farklı sığır ırkında AA genotipinin tespit edilememesi ve YK, BI ve DAK sığır ırklarında A allel frekansının Zhang ve ark. [16] tarafından Qinchuan ve Jinnan sığır ırklarında bildirilen değerlerden düşük olmasının altında yatan birkaç neden olduğu düşünülmektedir. Allel frekansları arasındaki bu farkın öncelikle Qinchuan ve Jinnan sığır ırklarının etçi ırklar olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir [12, 13]. Ayrıca Zhang ve ark. [16] tarafından yapılan çalışmada kullanılan örnekler koruma altındaki ıslah edilmiş hayvanlardan alınmıştır. Islah için uygulanan seleksiyon işlemi ilgili gen bakımından hayvanlardaki genotip ve allel frekanslarını etkilemiş olabilir. Bir diğer neden ise her iki çalışmada kullanılan hayvanların farklı genetik kökenlerden gelmesi olabilir. Bu çalışmada kullanılan dört sığır ırkının genetik kökeni *Bos taurus* (Taurine) iken Zhang ve ark. [16] tarafından yapılan çalışmada kullanılan iki ırkın genetik kökeni *Bos indicus*'dur (Zebu).

Çalışmada SA ırkında ACADVL (g.2885C>A) geni için A allelinin tespit edilememesi ancak yerli sığır ırkları olan YK, BI ve DAK populasyonlarında düşük frekanslarda da olsa A allelinin belirlenmesi, hayvan gen kaynağı olarak yerli ırkların önemini ortaya koymaktadır. Çünkü yerli ırklar sahip olduğu bazı gen ya da genler bakımından genetik çeşitliliğe önemli katkılar yapmaktadır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile Türkiye'de yetiştiriciliği en çok yapılan sığır ırkı olan SA sığırları ile Türkiye yerli sığır ırklarından YK, BI ve DAK sığır ırklarında ACADVL (g.2885C>A) geni polimorfizmi ilk defa gösterilmiştir. Büyüme özel-

likleri üzerine olumlu etkileri bildirilen AA genotipi çalışılan ırklarda tespit edilememiştir. Bu ırklarda yapılacak MAS çalışmaları için et verimiyle ilişkili diğer aday genlerin taranmasında yarar vardır. Ayrıca yapılan çalışma ile çiftlik hayvanlarında nokta mutasyonlarının belirlenmesinde oldukça ekonomik ve hızlı olan ARMS-PCR tekniğinin kullanılabilmesi gösterilmiştir.

## Kaynaklar

1. Elmacı C, Öner Y (2007): Et Sığırcılığında Moleküler Genetik Yaklaşımlar. Hayvansal Üretim, 48(2): 45-48.
2. Gen M, Ahmed HI (2018): Amplification Refractory Mutation System (ARMS). <http://grcpk.com/wp-content/uploads/2014/10/7.-ARMS.pdf> [Son Erişim Tarihi: 02.09.2018]
3. Ghanem ME, Akita M, Suzuki T, Kasuga A, Nishibori M (2008): Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. Animal Reproduction Science, 103: 348-354.
4. Hartl DL, Clark AG (1989): Principles of Population Genetics. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, pp.37
5. Karşlı T, Balcıoğlu MS, Demir E, Fidan HG, Aslan M, Aktan S, Kamanlı S, Karabag K, Sahin E (2017): Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nde Yetiştirilen Yumurtacı Saf Tavuk Hatlarında Yumurta Verimi ile İlişkili IGF-I ve NPY Aday Genlerindeki Polimorfizmlerin Belirlenmesi. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5(9): 1051-1056.
6. Medrano RFV, Oliveira CA (2014): Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR technique development. Molecular Biotechnology, 56: 599-608.
7. Miller S, Dykes D, Plesky HA (1988): Simple salting out procedure for extracting DNA from human cells. Nucleic Acids Research, 16: 1215
8. Nei M (1987): Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. New York
9. Redshaw C, Stewart C (2014): Anesthetic gents in patients with very long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a literature review. Paediatric Anaesthesia, 24: 1115-1119.
10. Rothchild MF, Plastow GS (2014): Applications of genomics to improve livestock in the developing world. Livestock Science, 166: 76-83.
11. Singh U, Deb R, Alyethodi RR, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, Dhama K, Sharma A (2014): Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. Biomarkers and Genomic Medicine, 6: 49-58.
12. Sun W, Chen H, Lei C, Lei X, Zhang Y (2007): Study on population genetic characteristics of Qinchuan cows using microsatellite markers. Journal of Genetics and Genomics, 34(1): 17-25.
13. Waldron S, Jimin W, Huijie Z, Xiaoxia D, Mingli W (2015): The Chinese Beef Cattle Industry. ss:1-31. Regional Workshop on Beef markets and trade in Southeast Asian and China, 30 Kasım-3 Aralık 2015, Ben Tre, Vietnam.
14. Wang C, Liu M, Li Q, Ju Z, Huang J, Li J, Wang H, Zhong J (2011) Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits. Veterinary Immunology and Immunopathology, 139: 229-236.
15. Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. "POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis". Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
16. Zhang S, Dang Y, Qingfeng Z, Qiaomei Q, Lei C, Chen H, Lan X (2015): Tetra-primer amplification refractory mutation system PCR (T-ARMS-PCR) rapidly identified a critical missense mutation (P236T) of bovine ACADVL gene affecting growth traits. Gene, 559: 184-188.