Autori:
Teodora Crina Carșai, Augustin Vlaic, Viorica Coșier, Valentin Adrian Bâlteanu

Referenţi ştiinţifici: Prof. univ. dr. ing. Teofil Oroian; Prof. univ. dr. ing. Ioan Vintilă

ISBN 978-606-92029-6-8

CUPRINS

CUVÂNT ÎNAINTE 7

INTRODUCERE 9

PARTEA I (STUDIUL BIBLIOGRAFIC)

CAPITOLUL I

IMPORTANŢA TEHNICILOR MOLECULARE UTILIZATE ÎN SELECŢIA ASISTATĂ DE MARKERI GENETICI 11

1.1. TEHNICA PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 12

1.2. VARIANTE ALE TEHNICII PCR 15

1.2.1. Tehnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 15

1.2.2. Tehnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 17

1.2.3. Tehnicile MAAP (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling) 21

1.2.3.1. Tehnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 21

1.2.3.2. Tehnica DAF (DNA Amplification Fingerprint) 23

1.2.3.3. Tehnica AP – PCR (Arbitrary Primed PCR) 24

1.2.4. Tehnica RT - PCR (Reverse Transcription-PCR) 25
1.2.5. Tehnica microsateliţilor SSR (Simple Sequence Repeats) 25
1.2.6. Tehnica EST (Expressed Sequence Taq) 26
1.2.7. Tehnica SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) ..... ……. 27
1.2.8. Tehnica SNP (Single Nucleotid Polymorphism) 27

1.2.9. Tehnica STS (Sequence –Tagged Site) 28
1.2.10. Tehnica ARMS –PCR (Amplification Refractory Mutation System –PCR) 28
1.3. TEHNICA SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM) 29
1.4. TEHNICI BAZATE PE SECVENŢIERE 30
CAPITOLUL II
SELECŢIA ASISTATĂ DE MARKERI MOLECULARI UTILIZATĂ ÎN AMELIORAREA POPULAŢIILOR DE TAURINE ……. 32
2.1. MARKERI GENETICI ASOCIAŢI CU PRODUCŢIA DE LAPTE 33
2.2. MARKERI GENETICI ASOCIAŢI CU PRODUCŢIA DE CARNE 41
2.3. MARKERI GENETICI PENTRU IDENTIFICAREA TIMPURIE A SEXULUI LA EMBRIONI 48
CAPITOLUL III
IMPORTANŢA GENEI OBEZITĂŢII (LEPTINA) CA MARKER GENETIC ASOCIAT CU CALITATEA CĂRNII ŞI A CARCASEI 50
3.1. CONSIDERAŢII GENERALE PRIVITOARE LA LEPTINĂ (GENA OBEZITĂŢII) 50
3.2. RECEPTORII LEPTINEI ŞI MECANISMUL DE ACŢIUNE AL ACESTORA 54

3.3. ACTIVITATEA LEPTINEI ŞI ROLUL LEPTINEI ÎN ORGANISM 59
3.4. FACTORII CARE INFLUENŢEAZĂ PRODUCŢIA DE LEPTINĂ 62
3.5. CERCETĂRI PE PLAN MONDIAL PRIVIND NIVELUL DE EXPRESIE ŞI POLIMORFISMELE GENEI LEPTINEI LA TAURINE 65

PARTEA II: CERCETĂRI PROPRII
CAPITOLUL IV
SCOPUL ŞI OBIECTIVELE CERCETĂRII 82
4.1. SCOPUL LUCRĂRII 82
4.2. OBIECTIVE METODOLOGICE ALE CERCETĂRII 83
4.3. IMPORTANŢA CERCETĂRII..... 85
CAPITOLUL V
TESTAREA EFICIENŢEI METODELOR DE EXTRACŢIE ADN DIN SÂNGE DE TAURINE 87
5.1. MATERIALE ŞI METODE 88
5.1.1. Materiale biologice 88
5.1.2. Materiale chimice 90
5.1.3. Aparatura utilizată 93
5.1.4. Metode de extracţie a ADN din sânge 93
5.1.5. Metoda directă de determinare a purităţii şi concentraţiei ADN cu spectofotometrul Nanodrop ND -1000 100
5.1.6. Metoda statistico-matematice utilizate în calcularea şi interpretarea rezultatelor 102
5.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII 103
5.2.1. Rezultate obţinute în cazul aplicării metodei de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification 103

5.2.2. Rezultate obţinute în cazul aplicării metodei de extracţie rapidă a ADN din sânge de taurine 105
5.2.3. Rezultate obţinute în cazul aplicării metodei de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation 107
5.2.5. Analiza statistică a diferenţelor dintre cele trei metode de extracţie ADN din sânge 109

5.3. CONCLUZII PARŢIALE 113
CAPITOLUL VI
STUDIEREA POLIMORFISMULUI GENIC LA LOCUSUL LEPTINEI 115
6.1. MATERIALE ŞI METODE 116
6.1.1. Materiale biologice 116
6.1.2. Materiale chimice 116
6.1.3. Aparatura utilizată 117
6.1.4. Metode de testare şi optimizare a unor protocoale de genotipizare în vederea studierii polimorfismelor la locusul leptinei 118
6.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII 152
6.2.1. Testarea şi optimizarea protocolului *PCR –RFLP* pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei *(POMP şi colab., 1997)* 152
6.2.1.1. Optimizarea temperaturii de ataşare a primerilor..... 153
6.2.1.2. Optimizarea concentraţiei de ioni de magneziu în reacţia PCR 156
6.2.1.3. Detectarea unei greşeli de împerechere în secvenţa primerilor utilizaţi 161
6.2.1.4. Optimizarea computerizată şi analiza de

secvenţe în vederea determinării polimorfismului Sau3AI din gena leptinei 162

6.2.2. Testarea şi optimizarea protocolului *PCR –RFLP* pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei (*LEIFFERS şi colab., 2002)* 166

6.2.2.1. Determinarea temperaturii de aliniere a primerilor şi amplificarea fragmentului de 400pb din gena leptinei 169

6.2.2.2. Digestia cu enzimele Sau 3AI şi MboI a produsului PCR de 400 pb şi analiza fragmentelor rezultate..... 171

6.2.2.3. Purificarea produsului PCR pentru eliminarea artefactelor 180

6.2.2.4. Optimizarea computerizată şi analiza de secvenţe în vederea determinării polimorfismului Sau3 AI din gena leptinei 184

6.2.3. Testarea şi optimizarea protocolului *PCR –RFLP* pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei (*LIEN şi colab.,1997)* 187

6.2.3.1. Amplificarea fragmentului de 522 pb din gena leptinei 188

6.2.3.2. Evidenţierea polimorfismului de tip RFLP /BsaAI din gena leptinei 191

6.3. CONCLUZII PARŢIALE 196

CAPITOLUL VII

TEHNICA SECVENŢIERII APLICATĂ FRAGMENTULUI DE 400 pb DIN GENA LEPTINEI 198

7.1. MATERIALE ŞI METODE 203
7.1.1. Materiale biologice 203
7.1.2. Materiale chimice 203
7.1.3. Aparatura utilizată 205
7.1.4. Metode de amplificare, purificare şi secvenţiere a produsului PCR 205

7.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII 210
7.2.1. Amplificarea PCR a fragmentului de 400 pb pentru secvenţiere 210
7.2.2. Purificarea produsului PCR 210
7.2.3. Reacţia PCR în vederea secvenţierii fragmentului analizat 213
7.3. CONCLUZII PARŢIALE 216
CAPITOLUL VIII
CALCULUL FRECVENŢEI GENELOR ŞI A GENOTIPURILOR ÎN POPULAŢIA STUDIATĂ 217
8.1. METODA MATEMATICĂ DE CALCUL A FRECVENŢEI GENELOR ŞI A GENOTIPURILOR 218
8.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII..... 220
8.2.1. Calculul frecvenţei genelor la locusul leptinei 220
8.2.2. Calculul frecvenţei genotipurilor la locusul leptinei 222
8.3. CONCLUZII PARŢIALE 225
CAPITOLUL IX
CONCLUZII GENERALE ŞI RECOMANDĂRI 227
BIBLIOGRAFIE 236

CUVÂNT ÎNAINTE
FOREWORD

Prezenta carte cu titlul ”***Cercetări privind polimorfismul la locusul genei leptinei în scopul aplicării selecţiei asistate de markeri genetici la taurine***”, a fost realizată în scopul studierii polimorfismelor la locusul genei leptinei, genă cu un deosebit rol în calitatea cărnii şi a carcasei la animalele de fermă.

Datorită importanţei creşterii speciei taurine la noi în ţară şi ponderii în consum a cărnii provenită de la rasele autohtone, studierea genei leptinei a oferit un potenţial informaţional cu perspective în ameliorare.

Pâna în prezent la noi în ţară rasele de taurine nu au mai fost genotipizate la acest locus, ţinându-se cont şi de faptul că ţara noastră este mare consumatoare de carne , iar cerinţele sunt tot mai mari pentru o carne slabă cu deosebite calităţi gustative.

Locaţiile unde au fost efectuate şi organizate experimentele au fost reprezentate de Laboratorul de Genetică Animală din cadrul Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca şi laboratorul Progenus S.A Gembloux, Belgia. Prelevarea probelor biologice s-a realizat în perioada 15.02.2005 - 30.11.2007, iar indivizii au provenit de la două rase autohtone ameliorate, rasa Bălţată românească şi rasa Brună de Maramureş

Lucrarea conţine un număr de nouă capitole şi cuprinde două părţi. Prima parte este compusă din studiu bibliografic şi a doua parte cuprinde toate cercetările proprii.Aceasta cuprinde număr de 17 tabele, 62 de figuri şi 3 anexe.

Majoritatea cercetărilor a fost susţinută financiar prin proiectul *CNCSIS TD numărul 363/2006*, cu titlul ”Cercetări privind genotipizarea raselor de taurine din România la locusul genei leptinei şi asocierea genotipurilor cu unele însuşiri ale producţiei de carne” (*director de proiect inginer Carşai Teodora-Crina*).

Sincera mea gratitudine se îndreaptă în primul rând către D-l prof.univ.dr.***Augustin Vlaic***, şeful disciplinei de Genetică Animală, conducătorul meu ştiinţific, pentru sprijinul în îndrumarea ştiinţifică care a stat la baza elaborării acestei teze de doctorat.

Cu deosebită consideraţie aduc mulţumiri domnului prof.univ.dr.***Robert Renaville*** şeful departamentului de Genetică Moleculară şi a laboratorului Progenus S.A, din cadrul Universităţii de Ştiinţe Agricole (Gembloux, Belgia).

Sincerele mele mulţumiri adresate colegilor din cadrul disciplinei de Genetică şi Ameliorarea Animalelor din cadrul Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca şi nu în ultimul rând familiei mele care m-a sprijinit şi m-a susţinut.

Cluj-Napoca, septembrie 2008 Autoarea

INTRODUCERE
INTRODUCTION

Până nu demult, selecţia clasică a fost singura metodă de ameliorare a particularităţilor genetice ale animalelor domestice. Recent, aplicarea tehnologiei markerilor ADN a avut o influenţă revoluţionară asupra proiectelor de cartare a genoamelor de la diferite specii şi de dezvoltare rapidă a cunoştinţelor din domeniul geneticii animale.

Genetica moleculară a pus la dispoziţia oamenilor de ştiinţă un instrument puternic pentru ameliorarea populaţiilor de animale - markerii moleculari. Cercetările efectuate la nivel ADN sunt focalizate pe identificarea genelor responsabile de fenogeneza caractereleor cantitative şi detectarea locilor de interes, ca markeri utili pentru programele de selecţie şi ameliorare.

Apariţia Ingineriei genetice ca ştiinţă, a făcut posibilă manipularea artificială a informaţiei genetice a organismelor vii, deschizând calea apariţiei biotehnologiilor moderne, cu impact deosebit asupra ameliorării plantelor şi animalelor.

Tehnologia markerilor moleculari are un rol tot mai important în ameliorarea şi selecţia animalelor de fermă, pentru însuşirile de interes economic.

Identificarea şi descifrarea structurii diferitelor gene prin metodele biologiei moleculare, a dus la stabilirea unor corelaţii între genotipuri şi anumite însuşiri calitative şi cantitative ale producţiilor, însuşiri de reproducţie şi de rezistenţă la boli şi dăunători, în aproape toate populaţiile de animale.

Prin utilizarea unor tehnici moleculare specifice, bazate pe analiza ADN (PCR, RFLP, RAPD, AFLP, SNP, STR, ARMS, etc.) se pot identifica şi selecţiona în populaţii, indivizi cu genotipuri dorite la nivelul locilor genelor ce codifică caracterele de interes, realizându-se în acest mod o selecţie sigură, rapidă şi eficientă în cadrul populaţiilor de animale.

Există mai multe categorii de însuşiri de care beneficiază selecţia asistată de markeri moleculari (MAS):

- rezistenţa la boli;

- calitatea carcasei şi atributele de palatabilitate (frăgezime, marmorare, suculenţă);
- fertilitatea;
- cantitatea carcasei şi creşterea;
- producţia de lapte şi abilităţile maternale;
- performanţele de creştere, greutatea corporală.

În prezent, sunt disponibile hărţile genetice cu un grad înalt de saturare la taurine, dar şi pentru alte specii cum ar fi suinele şi ovinele. Acestea furnizează cadrul genetic pentru dezvoltarea programelor de selecţie asistată de markeri moleculari (*Haley şi colab.*, 1998).

Selecţia asistată de markeri moleculari vizează trei direcţii de aplicare:

- markeri pentru caractere calitative;
- markeri pentru caractere cantitative;
- markeri pentru întreg genomul.

Selecţia asistată de markeri oferă avantajul că poate fi aplicată la ambele sexe pentru caracterele limitate de sex sau poate fi aplicată de timpuriu pentru caracterele de reproducţie sau cele care se manifestă târziu în viaţa animalului sau se măsoară după sacrificarea animalului. Eficienţa acestui tip de selecţie scade treptat din cauza recombinărilor care au loc între locii respectivi, în fiecare generaţie. Ritmul de scădere poate fi atenuat dacă locusul care prezintă interes în selecţie se transite înlănţuit cu locii învecinaţi.

Importanţa utilizării markerilor genetici în programele de ameliorare rezidă în posibilitatea depistării unor gene majore ce afectează caracterele cantitative sau calitative, sau a unor gene minore, strâns înlănţuite cu grupe de gene majore ce afectează aceste caractere cantitative. De asemenea, sunt bine cunoscute avantajele utilizării markerilor genetici ADN faţă de cei rezultaţi din polimorfismul proteinelor care prezintă următoarele deficienţe:

- nivel redus de polimorfism;
- necesitatea existenţei expresiei genice pentru a se putea detecta.

Din acest motiv, majoritatea proteinelor sintetizate în lapte (k-cazeina, β-lactoglobulina) sau în alte ţesuturi (Pit-1, leptina), au devenit subiectul diferitelor

cercetări prin care se încearcă creşterea cantitativă şi calitativă a producţiei de carne şi lapte la taurine, prin selecţia asistată la nivel molecular, cu ajutorul markerilor genetici.

Biotehnologiile avansate bazate pe metodele biologiei şi geneticii moleculare, ţintesc perfecţionarea directă a mecanismelor genetice ale organismului. Toate contribuie fie la îmbogaţirea genomului animalelor, fie la obţinerea unui plus de descendenţi peste limitele naturale de reproducere a speciei (*Vintilă I., şi colab., 2005).*

PARTEA I

PART I

STUDIU BIBLIOGRAFIC

BIBLIOGRAPHIC STUDY

CAPITOLUL I

IMPORTANŢA TEHNICILOR MOLECULARE UTILIZATE ÎN SELECŢIA ASISTATĂ DE MARKERI GENETICI

CHAPTER I

THE IMPORTANCE OF THE MOLECULAR TECHNIQUES USED IN GENETIC MARKERS ASSISTED SELECTION

Cantitatea şi calitatea laptelui, a cărnii şi altor produse animaliere, precum şi potenţialul genetic al animalelor, sunt condiţionate de proporţia genelor favorabile şi combinaţia lor în genotip.

Metodele geneticii moleculare oferă astăzi posibilitatea examinării şi vizualizării genelor superioare, sporindu-se astfel considerabil precizia estimării valorii genetice a animalului, accelerarea modificării genetice a populaţiilor, pentru creşterea producţiei de carne, lapte, ouă şi rezistenţă la boli.

Mai multe zone din hărţile de linkage sunt polimorfisme ADN anonime (ex. markerii RAPD, AFLP şi markeri microsateliţi) şi nu corespund cu nici una din genele a căror funcţie este cunoscută. Totuşi, câţiva markeri moleculari (inclusiv ADNc, EST şi markerii proteici) sunt markeri ai unor gene individuale. Markerii ADN sunt puşi în evidenţă printr-o mare varietate de tehnici, foarte diferite în funcţie de fiabilitate (repetabilitatea şi robusteţe), de dificultate, de costuri şi natura polimorfismului pe care-l detectează. Din cauza acestor diferenţe, alegerea uneia sau alteia dintre tehnici trebuie adaptată utilizări cerute şi costurilor pe care le implică.

Sub raport funcţional, ADN poate fi de două tipuri:

- ADN cu corespondenţi de codare, cu secvenţe unice (gene structurale) şi repetitiv (familii de gene, izogene);
- ADN fără corespondenţi de codare (netranscris şi netradus), înalt repetitiv, spaţiator (dispus între secvenţele unice) şi ADN satelit (minisatelit şi microsatelit).

Tehnicile moleculare pot fi bazate pe hibridare cu o sondă sau pe restrictarea cu o enzimă de restricţie (RFLP) sau pe PCR (PCR, RAPD şi AFLP) şi pot detecta polimorfismul unui singur locus sau de la mai mulţi loci, iar markerii pot fi moşteniţi în manieră dominantă sau codominantă.

1.1. TEHNICA PCR

PCR TECHNIQUE (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Tehnica PCR sau reacţia în lanţ a polimerazei, dezvoltată la mijlocul anilor ’80, a revoluţionat genetica moleculară, făcând posibilă studierea şi analizarea genelor prin metode mult mai accesibile şi foarte simple. Această tehnică a fost pusă la punct de *Kary Mullis* în anul 1983, plecând de la caracteristicile replicării ADN şi anume, cu ajutorul enzimei ADN polimeraza care utilizează o catenă a ADN ca matriţă pentru sinteza unei noi catene complementare. Prin această tehnică se produc un număr enorm de copii a unor secvenţe de ADN (gene) fără a se apela la clonare (*Vlaic A. şi colab., 1997).*

Tehnica PCR exploatează unele caracteristici ale replicării ADN, unde pentru amplificarea secvenţei de ADN dorite se utilizează o secvenţă de oligonucleotide numită primer sau amorsă.

Primerii sunt secvenţe scurte de 15 – 35 nucleotide, complementare capetelor 3' ale secvenţei de ADN ce se doreşte a fi amplificată; ei sunt specifici fiecărei gene şi sunt sintetizaţi cu ajutorul unor sintetizatoare automate de ADN. Pentru amplificarea secvenţelor specifice de ADN, prin tehnica PCR, se foloseşte o soluţie tampon (PCR buffer) în care se introduce ADN ce conţine gena de interes, primerii sintetizaţi, Taq-polimeraza şi cele patru tipuri de deoxinucleotid-trifosfaţi (dATP, dGTP, dCTP şi dTTP).

Tehnica PCR presupune parcurgerea a trei etape principale, într-un aparat în care realizarea ciclurilor termice este controlată automat de Termocycler:

1. *Denaturarea ADN,* presupune încălzirea soluţiei în care se află ADN la 94^0C timp de 5 minute, efectul fiind ruperea legăturilor de hidrogen şi separarea celor două catene.
2. *Ataşarea primerilor* se realizează prin răcirea la 40 – 60^0C a soluţiei în care se află secvenţa de amplificat. Primerii se leagă la capetele 3' a celor două catene de ADN ale genei pe care dorim să o amplificăm. De obicei, este nevoie de doi primeri numiţi sens şi antisens, dar amplificarea se poate realiza şi cu un singur primer, în cazul tehnicii PCR ancorat.
3. *Elongaţia* se produce la temperatura de circa 72^0C, temperatură la care Taq-polimeraza funcţionează optim, în faza de extensie, iar ciclul se repetă de 25 – 40 ori. Amplificarea este aproximativ exponenţială, realizându-se după 3 cicluri 2 copii, după 10 cicluri 256 copii, iar după 32 cicluri 1,73 miliarde copii ale secvenţei supuse amplificării. (*Vlaic A. şi colab.,1997).*

   După amplificare, gena de interes se vizualizează în lumină ultravioletă, la nivelul gelului de agaroză în care fragmentele au fost colorate cu bromură de etidiu. Dacă amplificarea s-a produs, în gel se vor observa una sau mai multe benzi, corespunzătoare secvenţei specifice de ADN.

   În tehnica PCR, alegerea primerilor este primordială şi putând fi utilizaţi două tipuri de primeri:

- *primeri specifici* - sunt dirijaţi spre un situs foarte precis al ADN, reprezentat de genele sau fragmentele de gene cunoscute. Prin primer specific se înţelege o secvenţă cunoscută de ADN utilizată pentru începerea sintezei unei anumite gene, cu structură cel puţin parţial cunoscută. Primeri specifici pot fi dirijaţi şi spre regiunile situate în amonte sau aval de secvenţele unice, la nivelul secvenţelor minisatelit (*Edwards A., şi colab.*, 1991) sau microsatelit (*Hubert R., şi colab.,1989).* Secvenţele de tip satelit, specifice fiecărui individ sunt astfel amplificate. Evidenţierea acestor polimorfisme se utilizează în momentul de faţă în medicina criminalistică pentru identificarea suspecţilor, pornind de la diferite mostre de ţesut (sânge, spermă, bulbi de păr etc.), pentru marcarea cărnii, sau altfel spus, urmărirea ei pe parcursul filierei de distribuţie şi consum. (*Fabrice D., şi colab.,2002).*
- *primeri aleatori* - sunt de dimensiuni reduse (10 – 20 perechi baze, în medie). Alegerea secvenţelor care constituie aceşti primeri este complet arbitrară.

În cursul reacţiei PCR aceşti primeri se vor hibrida de fiecare dată când în ADN se vor găsi secvenţe care le sunt complementare şi de orientare opusă.

Tehnica PCR şi-a găsit aplicare în cele mai diverse domenii:

- *în selecţia animalelor*: prin stabilirea genotipurilor la locii care codifică sinteza k-cazeinei, β-lactoglobulinei, leptinei, factorului de transcripţie pituitar(Pit1) care este responsabil pentru expresia hormonului de creştere la mamifere, este posibilă aplicarea selecţiei timpurii, reţinând la reproducţie numai animalele a căror genotip se asociază cu producţii cantitative şi calitative mai ridicate.
- *în alimentaţie*: se poate folosi pentru alegerea tulpinilor de levuri sau mucegaiuri ce vor putea fi utilizate ca probiotice (aditivi furajeri) în hrana animalelor.
- *în reproducţie*: se foloseşte pentru identificarea sexului încă din faza de embrion. Utilizând primeri specifici pentru amplificarea unor secvenţe de ADN de pe heterozomul Y, se poate stabili sexul. Dacă embrionul este de sex mascul (XY) se va produce amplificarea secvenţei specifice de pe cromozomul Y şi va putea fi vizualizată în gelul de agaroză. Dacă embrionul este de sex femel (XX) nu se va produce amplificarea secvenţei respective, în gelul de agaroză lipsind banda caracteristică.

- *în medicină*: se foloseşte pentru identificarea unor gene mutante (oncogene), care conduc la apariţia unor tumori maligne, în monitorizarea evoluţiei şi terapiei cancerului, în detectarea infecţiilor bacteriene şi virale.
- *în institutele medico – legale* : se foloseşte pentru determinarea paternităţii, sau pentru identificarea persoanelor care s-au făcut vinovate de delicte penale :crimă, viol etc. (*Landegren U., şi colab., 1996).*

1.2. VARIANTE ALE TEHNICII PCR
VARIANTS OF THE TECHNIQUE

1.2.1. Tehnica RFLP
RFLP technique (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Această tehnică se bazează pe proprietăţile de hibridare care există între două fragmente de ADN, prezentând un grad înalt de omologie (RFLP- bazat pe hibridare) şi tehnica PCR – denumită PCR-RFLP, în care se evidenţiază polimorfismele existente la nivelul situsurilor enzimelor de restricţie.

1. Tehnica RFLP bazată pe hibridare cu o sondă, implică parcurgerea următoarelor etape:

- extracţia ADN din organismele ce urmează să fie analizate;
- digestia ADN cu ajutorul enzimelor de restricţie;
- separarea fragmentelor obţinute în urma digestiei, în funcţie de mărimea lor, prin electroforeză în gel de agaroză;
- transferul ADN sub formă denaturată pe o membrană de nylon (*Southern blotting*) în care poziţia relativă a diferitelor fragmente de ADN din gel se păstrează pe parcursul transferului;
- hibridarea ADN cu sonda marcată prealabil, în regiunile în care prezintă omologie;

- vizualizarea regiunilor hibridate cu ajutorul unui film sensibil la radiaţii (autoradiografie) sau cu ajutorul unei reacţii enzimatice, care dă o coloraţie specifică.

În tehnica RFLP pot fi utilizate diferite tipuri de sonde, care permit evidenţierea unor tipuri diferite de polimorfism *(Favre D.,1996)*.

Sondele mono- sau oligogenice pun în evidenţă unul sau mai mulţi loci; ele dau un profil simplu care include câteva benzi. Utilizarea acestui tip de sonde permite vizualizarea polimorfismelor de secvenţă, localizate la nivelul situsurilor de restricţie, precum şi a polimorfismelor de inserţie/deleţie, situate între situsurile de restricţie. Acest tip de sondă a fost utilizat pentru a alcătui hărţi genetice la om, pentru a identifica unele varietăţi de măr şi pentru a pune la punct un test de depistare a anemiei falciforme (*Myrick K.V. şi colab., 2002*).

Sondele poligenice sau multilocus pot fi dirijate spre zonele care prezintă variabilitate foarte mare, cum sunt secvenţele de tip micro şi minisatelit, alcătuite de 2 până la 16 perechi de baze, repetate în tandem. Cu ajutorul sondelor multilocus, se observă, în general un grad ridicat de polimorfism între genotipurile înrudite. Acest tip de sondă a fost utilizat pentru prima dată de *Jeffreys şi colab., (1985*) la hibridarea cu ADN genomic uman digerat şi amprentizarea genetică a fiecărui individ. Ulterior, au fost descoperite alte secvenţe satelit şi la alte mamifere, la insecte şi plante. Sondele multilocus permit evidenţierea polimorfismului de secvenţă la nivelul situsurilor de restricţie, polimorfismului de inserţie/deleţie precum şi polimorfismului determinat de numărul unităţilor repetitive, pentru fiecare individ în parte *(Barroso A., şi colab., 1998*).

2. Tehnica RFLP, bazată pe PCR, utilizează o enzimă de restricţie pentru digerarea unui produs de amplificare, obţinut cu primeri specifici, iar în gelul de agaroză se vor obţine benzi de dimensiuni diferite, corespunzătoare celor trei genotipuri (homozigoţi pe una din cele două alele şi heterozigoţi).

Markerii RFLP sunt markeri cu polimorfism limitat ce identifică variaţiile secvenţei de ADN la nivelul unui situs de restricţie, prin analiza RFLP. O sursă abundentă de markeri genetici, utilizaţi în tehnicile de cartare a genomului animal au la bază modificările unor secvenţe de ADN care se produc la nivelul situsurilor de restricţie De regulă aceste variaţii sunt cauzate de mutaţii punctiforme (substituţia unei nucleotide

cu o alta), inserţii sau deleţii, în interiorul situsului de restricţie şi astfel, enzima de restricţie, nu mai recunoaşte situsul respectiv şi nu mai taie. Aceasta va determina obţinerea unor fragmente de restricţie de lungimi diferite (polimorfice) care pot fi uşor vizualizate şi identificate în gelul de agaroză datorită lungimii lor diferite. Din această cauză ele se vor separa în gelul de electroforeză sub forma unor benzi situate în diferite regiuni. Greutatea moleculară se apreciază cu ajutorul unui ADN standard de etalonare ”leadder” În practică, mărimea unui fragment ce se detectează prin Southern blotting este de 300 pb – 15 kb cu diferenţe detectabile mai mici de 50 pb. Prin tehnica PCR se detectează produşi între 60 pb-2kb, cu diferenţe chiar de câteva baze. Indivizii diferiţi genetic pentru un anumit locus, vor prezenta fragmente de restricţie de lungimi diferite, într-un număr diferit pentru un anumit cuplu format din sonda moleculară – enzimă de restricţie. În acest context, fiecare sistem format din ADN genomic – enzimă de restricţie, poate defini un locus polimorf care are cel mult două alele diferite.(*Pierce K.E. şi colab., 2007).*

Cu ajutorul RFLP se pot identifica variaţiile genetice dintre indivizi doar la nivelul situsurilor de recunoaştere a enzimelor de restricţie, respectiv dintre indivizii care posedă unul din cele trei genotipuri existente în locusul de interes (AA, Aa, aa) şi nu se pot detecta variaţiile la nivelul întregului genom, care la mamifere este de ordinul 3x 10^9 pb*(Bekman , J.S. şi colab., 1983).*

1.2.2. Tehnica AFLP

AFLP technique (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Tehnicile moleculare care permit obţinerea amprentelor genetice şi vizualizarea polimorfismelor, a diferenţelor dintre eşantioane la nivel de ADN, se bazează pe două principii: hibridare cu sonde sau amplificare prin reacţia PCR. Polimorfismul bazat pe numărul de repetiţii în tandem, a motivelor de tip satelit, este azi cel mai utilizat în studiul diversităţii genetice a raselor de animale şi a soiurilor de plante.

AFLP este o tehnică bazată pe punerea în evidenţă a polimorfismelor tot la nivelul situsurilor de restricţie. Această tehnică a fost descrisă de *Vos şi colaboratorii* în anul 1995 şi se bazează pe amplificarea selectivă, cu ajutorul PCR, a unei categorii de fragmente obţinute printr-o restricţie particulară, care utilizează 2 enzime de restricţie şi adaptori, marele avantaj al metodei este acela că nu necesită informaţii preliminare despre genom.

Tehnica AFLP se bazează pe amplificarea selectivă a fragmentelor de restricţie, obţinute din ADN genomic total digerat şi ea parcurge trei etape:

- restricţia ADN genomic şi legarea adaptorilor oligonucleotidici;
- amplificarea selectivă a seturilor de fragmente de restricţie ;
- analiza fragmentelor amplificate, în gel de poliacrilamidă.

Pentru prepararea unei matriţe AFLP, ADN genomic este izolat şi digerat simultan cu 2 enzime de restricţie, de exemplu: *Eco RI* şi *Mse I. Eco RI* are un situs de recunoaştere de 6pb (taie rar) iar, *Mse* I are un situs de recunoaştere de 4 pb (taie frecvent).

Fragmentele obţinute prin restricţie pot fi grupate în 3 clase:

- marea majoritate (90%) prezintă două situsuri *Mse I* la extremităţile lor;
- aproximativ 10% prezintă un situs *Eco RI* şi un situs *MseI;*
- câteva fragmente prezintă 2 situsuri *Eco RI.*

Procedeul AFLP se bazează pe detecţia predominantă a fragmentelor *Eco RI - MseI* care au o extremitate tăiată cu o enzimă care taie rar şi o extremitate tăiată de o enzimă care taie des. Succesul tehnicii AFLP depinde de digestia completă a ADN genomic. Pentru aceasta trebuie acordată o importanţă sporită izolării ADN de înaltă calitate, intact şi fără contaminări cu nucleaze sau inhibitori *(Muller , U.G. şi colab., 1999*). Legarea adaptorilor, după inactivarea prin căldură a endonucleazelor de restricţie, de tip *Eco RI* şi *MseI,* dublu catenari, se face la extremităţile fragmentelor de ADN.

Structura adaptorilor este următoarea:

- secvenţă nouă, care va servi ca situs ţintă pentru ataşarea primerilor PCR în etapa următoare a AFLP ;
- o secvenţă care permite restaurarea situsului de restricţie;

Sunt utilizate două tipuri de adaptori: cei care restaurează situsul *Eco RI* şi cei care restaurează situsul *MseI*. Primerii care sunt utilizaţi în reacţia PCR nu se fixează pe ADN genomic, dar se vor fixa pe adaptori. După digestia ADN genomic şi legarea adaptorilor, fragmentele de restricţie vor fi amplificate prin PCR. În structura primerilor PCR vom regăsi de o parte secvenţa adaptorilor şi un situs de restricţie (este acela la nivelul căruia se vor fixa primerii PCR în următoarea reacţie PCR), iar de cealaltă parte o nucleotidă selectivă, adăugată la extremitatea 3' a primerilor PCR. Numărul nucleotidelor selective poate varia de la 0 la 3 pe primer.

Fixarea nucleotidelor specifice determină ca un singur subansamblu de fragmente de restricţie să fie recunoscut şi amplificat. Condiţiile de reacţie sunt alese de aşa natură ca singurele fragmente de ADN care corespund perfect cu primerul să fie amplificate. Dacă se lucrează cu genoame complexe, cum sunt cele de la plante sau animale, PCR-ul este realizat în două etape consecutive. În prima reacţie, numită preamplificare**,** ADN genomic este amplificat cu doi primeri AFLP, având câte o singură nucleotidă selectivă şi produsul PCR al preamplificării este diluat şi utilizat ca matriţă pentru a 2-a amplificare selectivă, iar în al doilea PCR se vor utiliza primeri AFLP, ce conţin câte trei nucleotide selective.

Această strategie, de amplificare în două etape, permite obţinerea unei amprente genetice foarte clare, care poate fi analizată pentru detectarea polimorfismelor şi între indivizii strâns înrudiţi.

Unul din marile avantaje ale tehnicii AFLP este permisivitatea modulării numărului de profiluri genetice. Este posibilă creşterea sau reducerea complexităţii profilului, adaptând diferiţi parametrii, iar factorul cel mai important pentru determinarea numărului de fragmente, amplificate într-o reacţie simplă AFLP, este numărul de nucleotide selective din primerii selectivi. Numărul de fragmente detectate în gel, pentru o amprentă genetică, scade când numărul nucleotidelor selective creşte. Alegerea numărului de nucleotide selective este strâns legată de mărimea genomului, cu cât mărimea genomului este mai redusă cu atât numărul fragmentelor amplificate este mai restrâns şi amprenta genetică mai simplă. Pentru organismele cu genoame mari ($5x10^8$-

$5x10^9$pb) se utilizează primeri selectivi cu câte trei nucleotide, astfel încât să se amplifice în medie 50 fragmente pe probă şi pe perechea de primeri selectivi, acest număr poate varia însă între 10 şi 100, în funcţie de secvenţa nucleotidică şi complexitatea genomului.

Al doilea factor, ce determină numărul de fragmente amplificate, este compoziţia în baze G şi C a nucleotidelor selective din primeri. În general, se amplifică mai puţine fragmente când nucleotidele selective sunt G şi C.

Tehnicile amprentelor genetice sunt multiple, fiecare are caracteristici particulare de specificitate de locus, nivel de polimorfism, tehnicitate. Alegerea unei metode trebuie întotdeauna să fie luată în considerare în funcţie de obiectivul cercetării:

- pentru studii de diversitate ca şi pentru măsurarea variaţiilor inter sau intrapopulaţionale, distanţei genetice, pentru clasificarea în sistematică a populaţiilor distincte genetic.
- pentru clonarea poziţională ca şi pentru obţinerea unei densităţi mari de markeri moleculari, într-o regiune precisă din genom (hipervariabilă), din vecinătatea unei gene care urmează să fie clonată;
- pentru stabilirea hărţilor genetice la speciile puţin studiate sau acolo unde sondele şi primerii PCR nu au fost încă dezvoltaţi.

Marele avantaj al tehnicii AFLP este sensibilitatea în detectarea polimorfismului la nivelul genomului total.

Cu toate acestea, tehnica AFLP a devenit un standard molecular pentru clasificarea în sistematică a populaţiilor distincte genetic. Polimorfismele identificate în ADN sunt transmise mendelian şi utilizate apoi pentru genotipizare, identificarea markerilor moleculari şi cartografierea genelor.(*Coşier Viorica şi colab., 2007)*

1.2.3. Tehnicile MAAP

MAAP techniques (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling)

Din categoria tehnicilor MAAP (*Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*) face parte tehnica RAPD *(Random Amplified Polymorphic DNA),* alături de tehnicile DAF (*Amplification Fingerprinting*) şi AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*).

1.2.3.1. Tehnica RAPD

RAPD technique (Random Amplified Polymorphic DNA)

Tehnica RAPD se bazează pe determinarea polimorfismului la nivel alelic în ceea ce priveşte producerea unor produşi de amplificare sau lipsa lor, în urma utilizării unui primer oligonucleotidic, arbitrar, într-o poziţie care să-i permită realizarea amplificării.

Această variantă a tehnicii PCR nu necesită clonarea sau secvenţierea ADN şi poate detecta mai mulţi loci simultan.

Principiul tehnicii este simplu: ADN izolat de la un individ este supus unei reacţii PCR utilizând primeri oligonucleotidici, de secvenţă arbitrară, care vor hibrida la secvenţele sale complementare, în cazul în care acestea există. Dacă din întâmplare, doi primeri consecutivi, aflaţi în vecinătate, se ataşează la matriţă în sensuri opuse, fiecare pe una din cele două catene, la o distanţă nu prea mare unul de celălalt, fragmentul delimitat de ele va fi amplificat, iar dacă unul din cele două situsuri este absent la unul din indivizi, la acesta amplificarea nu va avea loc, evidenţiindu-se un polimorfism de prezenţă/absenţă *(Williams I. şi colab., 1990).*

Secvenţele de primeri scurţi, împerecheaţi aleator (8 – 12 perechi de baze) sunt folosiţi la amplificarea ADN de tip RAPD, de obicei rezultând un polimorfism de

prezenţă/absenţă, în gel. O astfel de situaţie, care permite amplificarea randomizat, în mai multe puncte, poate fi realizată la nivelul întregului genom.

Deoarece RAPD este o tehnică bazată pe PCR, vom prezenta câteva din particularităţile definitorii ale acesteia.

Modificarea unei singure baze în genom este suficientă pentru a împiedica ataşarea primerului în acel loc şi a împiedica amplificarea fragmentului delimitat de acel primer. Analiza RAPD poate detecta modificarea unei singure baze în ADN genomic, în anumite condiţii.

Polimorfismul detectat de RAPD poate rezulta din câteva tipuri de modificări:

- *inserţia* unei secvenţe mari de ADN, între secvenţele de ataşare a primerilor, care fac fragmentul delimitat de aceste secvenţe prea mare pentru a fi amplificat;
- *deleţia* unui fragment de ADN ce conţine unul din situsurile de ataşare a primerilor duce de asemenea la lipsa amplificării segmentului;
- *substituţia* unui nucleotid poate afecta hibridarea primerului la un anumit situs de ataşare, putând evidenţia sau nu un polimorfism (dispariţia unei benzi);
- *inserţia sau deleţia* unui mic fragment de ADN poate duce la modificarea mărimii unui fragment amplificat şi a poziţiei benzii în gel.

Modificările de mărime se observă rar, dar cel mai adesea polimorfismul se manifestă prin aceea că un fragment amplificat poate fi prezent sau absent. Polimorfismul detectat prin RAPD este folosit ca şi marker molecular. Markerii RAPD se comportă ca markeri dominanţi când sunt urmăriţi în descendenţă. Acest comportament rezultă din faptul că un fragment amplificat este prezent în gel (ca o alelă dominantă A) sau absent (ca alelă recesivă a). În analiza descendenţilor, un fragment este observat în stare homozigotă (analog cu AA), fiind amplificat atât ADN de la un părinte, cât şi de la celălalt, sau în stare heterozigotă (analog cu Aa), când este amplificat numai ADN provenit de la unul din părinţi, celălalt prezentând un polimorfism reperezentat prin absenţa fragmentului (*Saez R. şi colab., 2004)*.

În stare heterozigotă, absenţa fragmentului de la unul din părinţi este mascată de prezenţa benzii datorată fragmentului amplificat de la celălalt părinte. Prin urmare, analiza RAPD nu poate discerne între starea homozigotă (AA) şi cea heterozigotă (Aa).

În cazul markerilor codominanţi însă (în care fiecare părinte posedă o bandă distinctă, pe care celălalt nu o posedă), starea heterozigotă (AB) în descendenţă (prezenţa ambelor benzi în hibridul din F_1) poate fi deosebită de stările homozigote (AA) şi (BB).

Williams şi colab. 1990 au arătat că 95% din fragmentele RAPD se comportă ca markeri dominanţi (un singur fragment amplificat distinctiv la unul sau ambii părinţi şi descendenţi) şi sub 5% se comportă ca markeri codominanţi.

Calculul numărului de fragmente care poate fi aşteptat teoretic la folosirea unui primer care hibridează 100% cu matriţa, poate fi calculat din lungimea primerului şi din complexitatea genomului ţintă, presupunând că nucleotidele sunt prezente în proporţii egale *(Kornelia Smalla şi colab., 2002).* Produşii de amplificare se separă prin electroforeză în gel de agaroză şi se evidenţiază după colorare în bromură de etidiu .

1.2.3.2. Tehnica DAF
DAF technique (DNA Amplification Fingerprint)

Caetano-Anolles şi colab. (*1991)*, au introdus o metodă numită DNA Amplification Fingerprinting (DAF). Ei au folosit primeri scurţi, cel mai adesea de lungime între 5 – 8 nucleotide. De asemenea, ei au modificat anumiţi parametrii PCR, folosind paşi atât de joasă cât şi de înaltă stringenţă, precum şi un program al ciclurilor cu numai două temperaturi în loc de standardul cu trei. Produşii de amplificare au fost separaţi prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi vizualizaţi prin colorare cu argint. Nivelul complexităţii profilului benzilor poate fi predeterminat prin manipularea condiţiilor de reacţie. Ca urmare a apariţiei mai multor variante de amprentare a întregului genom, bazate pe PCR cu primeri arbitrari, *Caetano-Anolles şi colab.,* au propus în *(1994),* denumirea acestor metode înrudite cu numele generic de Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP).

Totuşi, datorită simplităţii şi utilităţii, numele şi metoda originală RAPD, cunoaşte cea mai largă răspândire. Această tehnică permite amplificarea unui număr mai mare de

fragmente de dimensiuni foarte mici, care ulterior vor fi separate într-un gel de poliacrilamidă.

1.2.3.3. Tehnica AP – PCR
AP – PCR technique (Arbitrary Primed PCR)

Lungimea primerului utilizat, este un criteriu principal de distincţie între cele trei tehnici descrise anterior; astfel că pentru RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sunt primerii decameri (9-10 pb), pentru DAF (DNA Amplification Fingerprint) primerii au 5-15 pb, iar pentru AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) primerii au lungimea de18-32 pb. Tehnicile AP-PCR şi DAF pot releva numeroase benzi (până la 100) în timp ce RAPD-ul produce un număr mic de benzi, până la 10. *(Welsh J. şi colab., 1991*) .

Avantajele tehnicilor Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP rezidă din: simplitate, rapiditate, costuri scăzute, şi faptul că nu necesită cunoştinţe anterioare despre genom, nu necesită digestie sau transfer pe o membrană, marcare radioactivă sau fluorescentă, cu ajutorul lor fiind generaţi markeri moleculari utilizând markerii deja disponibili *(Welsh J. şi colab., 1990*) . Tehnica RAPD fiind rapidă, poate fi utilizată în hibridări interspecifice, introgresia genelor, identificarea clonelor, descoperirea markerilor sex-linkaţi, măsurarea distanţelor genetice la plante, animale şi om. Dezavantajele tehnicii constau în reproductibilitatea scăzută, iar schimbările de scurtă durată a condiţiilor de reacţie pot cauza benzi nereproductibile. O singură procedură cuprinde trei etape importante .Tehnica AP-PCR utilizează primeri de 18 pb şi a fost dezvoltată şi utilizată ca metodă reprezentativă (*Sean, M. şi colab., 2000).*

1.2.4. Tehnica RT – PCR

RT - PCR technique (Reverse Transcription-PCR)

Această tehnică este tot o variantă a tehnicii PCR, în care amplificarea porneşte de la ARN mesager (ARNm). În prezenţa enzimei revers transcriptaza, ARNm devine matriţă pentru sinteza ADN complementar(ADNc), după care procesul de amplificare decurge în mod normal. Cuantificarea expresiei genice se bazează pe presupunerea că se păstrează o anumită proporţionalitate între cantitatea de ADN de la începutul reacţiei şi cantitatea produsului de amplificare *(Park D.J şi colab., 2004).*

Trebuie subliniat faptul că aplicarea reacţiei PCR la moleculele de ARN necesită o modificarea a reacţiei PCR în prima etapă. Pentru că molecula de ARN nu poate fi copiată în prezenţa Taq polimerazei, această etapă este catalizată de revers transcriptază, enzimă în prezenţa căreia este sintetizată molecula de ADN de pe matriţa de ARN. Copia de ADN este apoi amplificată în prezenţa Taq polimerazei. Descoperirea enzimelor termostabile (ex. ADN-polimeraza -T obţinută din bacteria *Thermus thermophilus*) cu ajutorul cărora pot fi obţinute copii termostabile de ADN atât de pe matriţe de ADN cât şi de pe matriţe de ARN face posibilă aplicarea RT – PCR în condiţiile în care va fi necesară o singură reacţie în prezenţa unei singure enzime (*Brown T.A. şi colab., 2002*).

A ceastă tehnică oferă o informaţie mai detaliată referitoare la detectarea cu sensibilitate ridicată a unor gene exprimate în cantităţi reduse, într-o anumită celulă.

1.2.5. Tehnica microsateliţilor SSR

Microsatellites technique SSR (Simple Sequence Repeats)

La organismele procariote şi eucariote o parte din ADN genomic este reprezentat de secvenţe de ADN înalt repetitive, de complexitate mică şi considerate noninformaţionale.

Microsateliţii sau SSR (*Simple Sequence Repeats*) sunt secvenţe înalt repetate, care conţin motive de 2 – 5 perechi de baze, repetate în tandem şi care flanchează o secvenţă unică de ADN. Se pare că aceştia sunt rezultatul crossing-overului inegal. Tehnica PCR este aceea care va fi utilizată pentru relevarea profilurilor individuale, furnizând markeri specifici de locus ce se transmit codominant.

Un microsatelit nu este specific la un locus particular, dar regiunile flancatoare sunt specifice *(Dakin E. şi colab., 2004).*

Aceşti markeri bazaţi pe PCR necesită investiţii considerabile pentru a putea fi generaţi, dar sunt înalt polimorfici pentru folosirea lor în aplicaţiile MAS (Selecţia asistată de markeri moleculari). Polimorfismul este determinat de diferenţele existente în lungimea produşilor de amplificare.

Acest polimorfism va duce la evidenţierea mai multor alele la acest locus. Fiind o regiune înalt polimorfică se pot distinge foarte multe alele, dar care pot determina diferenţele chiar şi între indivizi înrudiţi. Motivele repetate în tandem pot fi utilizate şi ca sonde, dirijate către ADN genomic, unde să-şi găsească regiunile complementare.

1.2.6. Tehnica EST

EST technique (Expressed Sequence Taq)

Această reacţie bazată pe PCR necesită atât clonare cât şi informaţii despre secvenţă, utilizând informaţiile proiectului de secvenţiere a genelor, când sunt generate clone de ADNc. Această secvenţă este folosită pentru designul unor primeri de 18 – 20 pb cu care se vor amplifica secvenţe învecinate. Markerul EST este de obicei detectat după mărime în produsul de amplificare şi este un marker codominant. Crearea acestor primeri se realizează cu costuri foarte mari, dar aceştia sunt foarte utili prin diversele aplicaţii în cartare, descoperirea genelor asociate cu locii caracterelor cantitative - QTL (*Quantitatif Traits Loci)* şi ar trebui să contribuie considerabil la înţelegerea mecanismelor la aceşti loci. (*Denise E .A. şi colab., 2003)*

1.2.7. Tehnica SCAR

SCAR technique (Sequence Characterized Amplified Region)

În cadrul acestei tehnici, fragmentele de ADN amplificate prin tehnica PCR-RAPD, sunt clonate şi pe baza lor se construiesc primeri specifici care vor avea lungime mai mare decât primerii RAPD.

Prin utilizarea primerilor SCAR în PCR, nu se rezolvă problema reproductibilităţii reduse, deseori întâmpinată de markerii RAPD. Obţinerea unui marker codominant poate deveni un avantaj în plus, în convertirea markerilor RAPD în markeri SCAR (*Giovannelli, J. şi colab.,2002*).

Totuşi, markerii SCAR pot manifesta dominanţă completă când unul sau ambii primeri coincid parţial cu variaţia din secvenţa unui anumit locus. Markerii SCAR dominanţi pot fi făcuţi deseori codominanţi, prin digestia produsului PCR cu diferite enzime de restricţie.

1.2.8. Tehnica SNP

SNP technique (Single Nucleotid Polymorphism)

Această tehnică se caracterizează prin detectarea mutaţiilor punctiforme la un locus particular, mutaţii determinate de substituţia unei singure nucleotide cu alta. Prin această tehnică pot fi evidenţiate diferenţele de secvenţă existente între alele, cum ar fi substituţia **A** în **T** de exemplu A**A**GGCTAA în A**T**GGCTAA (*Jiang , R. şi colab.,2004)* .Pentru ca o variaţie de secvenţă să fie considerată SNP ea trebuie să apară cu o frecvenţă de până în 1% în populaţie, ceea ce în populaţia umană va detemina mai mult de 90% din întreaga variaţie genetică *(Heaton , M.P. şi colab., 2002).* Aceasta înseamnă apariţia mutaţiei la fiecare 100 până la 300 perechi de baze din totalul de 3 miliarde. Două din trei polimorfisme SNP sunt determinate de înlocuirea citozinei cu timina, ce apar atât în regiunile codificatoare cât şi necodificatoare (*Fitzsimmons şi colab. 1998)*, polimorfisme de tip citozină –timină au fost descrise şi de *Schenkel F.S. şi colab.*, în anul 2005.

1.2.9. Tehnica STS

STS technique (Sequence –Tagged Site)

Această tehnică bazată pe PCR, detectează o secvenţă unică într-un punct definit din genom. Pe baza acestei tehnici pot fi convertiţi markerii genetici RAPD în markeri STS, pentru acelaşi locus. Tehnica nu necesită clonare dacă există informaţii anterioare despre secvenţă, pentru definirea primerilor. Designul primerilor de 18 – 20 pb, poate fi conceput după secvenţa fragmentelor RAPD excizate din gel, pentru a amplifica ulterior fragmente de ADN unice (de exemplu poate fi secvenţa unui produs PCR - RAPD sau a sondelor RFLP).

Polimorfismul este în general detectat ca o diferenţă de mărime în produsul de amplificare STS faţă de produsul RAPD, de la acelaşi locus. Dacă nu există nici o diferenţă de mărime, se apelează la restricţia enzimatică pentru a tăia produşii de amplificare şi pentru identificarea polimorfismului lor. Poate fi astfel detectat un polimorfism de câteva nucleotide. Din moment ce primerii STS sunt mai lungi decât primerii RAPD şi bazaţi pe o secvenţă specifică, această metodă detectează polimorfismul de la acelaşi locus, fiind potrivită pentru studii de cartare genică. Dezavantajul metodei este că proiectarea şi crearea primerilor poate implica o investiţie importantă *(Roach J. C. şi colab., 2000)*.

1.2.10. Tehnica ARMS –PCR

ARMS –PCR technique (Amplification Refractory Mutation System –PCR)

O modificare a metodei PCR, care permite detecţia mutaţiilor punctiforme cunoscute, prin amplificare cu primeri specifici de alelă, este metoda ARMS-PCR. Aceasta este o metodă care nu implică utilizarea izotopilor radioactivi, iar genotipizarea este posibilă prin simpla examinare a migrării produsului PCR prin elecroforeză în gel de

agaroză. Tehnica este cunoscută ca detectarea mutaţiilor prin amplificare refractară, descrisă pentru prima dată de *Newton C.R. şi colab., 1989.*

Metoda constă în utilizarea a doi primeri care prezintă aceeaşi secvenţă de nucleotide cu excepţia nucleotidei terminale 3' – unul complementar cu alela normală, iar celălat cu alela mutantă. Pentru amplificarea enzimatică se foloseşte Taq-polimeraza, enzimă care nu are activitate exonucleazică 3'→5', ceea ce implică necesitatea unei perfecte complementarităţi a primerului cu capatul 3' al matriţei ADN. Rezultatul se obţine în urma electroforezei în gel de agaroză prin prezenţa sau absenţa produsului de amplificare respectiv.

Specificitatea este obţinută dacă primerul oligonucleotidic este complementar cu secvenţa alelei dorite, dar nu este complementar cu cealaltă alelă la capătul 3', sau în imediata vecinătate a capătului 3' al primerului specific de alelă. Neamplificarea este rezultatul nepotrivirii dintre ADN matriţă şi oligonucleotidul din primer. Pentru că Taq-polimeraza nu are activitate exonucleoazică în direcţia 3'→5', această nepotrivire împiedică eficient elongarea la capatul 3' cu ajutorul Taq polimerazei . Metoda este aplicabilă, în general, în detecţia mutaţiilor punctiforme cunoscute, mici deleţii şi inserţii, polimorfisme şi alte variaţii în secvenţa ADN.

De aceea, o mutaţie (sau un polimorfism) poate fi detectată prin utilizarea unui construct oligonucleotidic adecvat, care permite o elongare eficientă, în cazul unui cromozom mutant şi o elongare ineficientă, în cazul unui cromozom normal.

1.3. TEHNICA SSCP

SSCP TECHNIQUE (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)

Această tehnică este utilă în detectarea polimorfismului determinat de cel puţin o nucleotidă. Evidenţierea polimorfismului se face în timpul electroforezei în gel de poliacrilamidă. Acest polimorfism se bazează pe diferenţele de conformaţie ale unei singure catene (mutantă) ce diferă de cealaltă într-un singur punct, datorită unei substituţii, deleţii sau inserţii *(Barroso , A. şi colab., 1998).* În anumite condiţii, acizii nucleici dintr-o catenă de ADN formează în soluţie o structură secundară. Structura

secundară depinde de compoziţia în baze, structură care poate fi alterată şi de substituţia unei singure nucleotide. Această diferenţă va determina o mobilitate electroforetică diferită în condiţiile unui gel nedenaturat (gel de poliacrilamidă nedenaturat). Vizualizarea fragmentelor ce urmează a fi detectate se face după o prealabilă colorare cu argint sau după marcarea radioactivă.(*Abba , M.C. şi colab.,2001*).

1.4. TEHNICI BAZATE PE SECVENŢIERE
TECHNIQUES BASED ON SEQUENCING

Prima secvenţă descifrată a fost a ARNt pentru alanina de la drojdie (1964), făcută de către Robert Holley şi colegii săi de la Universitatea Cornell. Aceştia au utilizat enzime specifice care au rupt molecula de ARNt în segmente mici până când s-a reuşit secvenţierea directă prin metode de degradare enzimatică. Abia în 1976 a fost descifrată secvenţa completă a ARN monocatenar de la fagul MS2, de către Walter Fiers în laboratorul din Ghent. S-a stabilit atunci structura completă a genomului viral şi organizarea acestuia, corespondenţa dintre codoni şi cele trei proteine codificate de genele fagului MS2 şi că un codon stop cauzează terminarea transcripţiei (Watson şi colab., 1992).

Secvenţierea ADN poate fi făcută prin procedee chimice (metoda Maxam şi Gilbert) sau cu ajutorul terminatorilor de lanţ (metoda dideoxi sau Sanger), aceasta din urma fiind astăzi utilizată mai mult.

Prima metodă a fost pusă la punct de către Maxam si Gilbert (1977) şi este de fapt o clivare chimică. Cea de-a doua, metoda dideoxi sau Sanger, a fost pusă la punct în acelaşi an de către Sanger şi se bazează pe întreruperea controlată a sintezei enzimatice a ADN, amplificat prin PCR.

În ambele cazuri, fragmentele obţinute sunt supuse marcării radioactive (cu ^{32}P, de exemplu) înaintea separării pe baza greutăţii moleculare într-un gel de poliacrilamidă. Vizualizarea şi analizarea produşilor rezultaţi se face prin autoradiografie.

O metodă mult mai convenabilă şi mai precisă este marcarea fluorescentă a fragmentelor şi secvenţierea automată. Fragmentele de ADN sunt migrate într-un gel de poliacrilamidă iar aparatul (secvenţiatorul), prevăzut cu un fascicul laser, excită fiecare moleculă marcată

fluorescent şi transformă valorile fluorescente în secvenţa în nucleotidice a fragmentului analizat. Un astfel de aparat (ALFexpress Auto Read) poate detecta 200 pb pe oră. Fiecărei secvenţe de acizi nucleici îi corespunde o diagramă a succesiunii de baze numită electroforegramă. În această diagramă fiecărei baze îi corespunde un vârf şi o coloraţie caracteristică.

O altă tehnică este secvenţierea automată, în cazul căreia, catena de ADN care va intra în reacţia de secvenţiere depinde de primerul utilizat, putând fi supusă secvenţierii atât catena sens cât şi cea antisens. În studiile de secvenţiere a genelor, pentru precizia rezultatelor obţinute sau atunci când sunt căutate mutaţii punctiforme, se recomandă secvenţierea ambelor catene şi compararea rezultatelor obţinute. În acest caz, este necesară cunoaşterea ambilor primeri, care să iniţieze sinteza genei ce urmează să fie descifrată.

În cazul în care se doreşte descifrarea structurii unui fragment de ADN, sau a unei gene, de la specii a căror genom nu este saturat în hărţi genetice, pentru amplificare se utilizează primeri universali, cum este cel de la fagul M13 (*Veira ,J şi colab., 1982*.. Pentru fragmente de dimensiuni diferite se aleg vectori corespunzători pentru clonare, de exemplu: plasmide (0,1-10 kb), fagi (8-20 kb), cosmide (35-50 kb), BAC (cromozom artificial bacterian 75-300 kb) şi YAC (cromozom artificial de drojdie 100-1000 kb) la care genomul este complet descifrat şi sunt întocmite hărţile de restricţie.

Etapele secvenţierii:

1. Izolarea ADN genomic sau a fragmentului (genei) de interes ce urmează să fie clonat sau secvenţiat;

2. Purificarea ADN izolat;

3. Amplificarea prin PCR a fragmentului de analizat cu ajutorul primerilor specifici sau a primerilor universali, în prezenţa celor patru dNTP marcaţi florescent, fiecare cu altă culoare - (adenina în verde, timina în roşu, guanina în negru şi citozina în albastru) şi a polimerazei ;

4. Vizualizarea produşilor de amplificare prin migrarea în gel de agaroză (procedeu care face posibilă atât identificarea produşilor de amplificare, determinarea lungimii fragmentelor amplificate şi a calităţii produsului de amplificare;

5. Purificarea produşilor de amplificare; pentru ca produşii de amplificare să poată fi utilizaţi în reacţii de secvenţiere trebuie să aibă un grad înalt de puritate (evitându-se contaminarea cu inhibitori şi prezenţa rezultatelor eronate) ;

6. Secvenţierea automată;

7. Citirea secvenţelor pe catena analizată;

8. Alinierea secvenţelor de pe cele două catene sens şi antisens;

Reacţia de secvenţiere începe întotdeauna după ce ADN supus secvenţierii a fost iniţial amplificat prin PCR, purificat şi cuantificat *(Coşier Viorica, 2007*).

CAPITOLUL II
SELECŢIA ASISTATĂ DE MARKERI MOLECULARI UTILIZATĂ ÎN AMELIORAREA POPULAŢIILOR DE TAURINE

CHAPTER II
MOLECULAR MARKERS ASSISTED SELECTION USED IN CATTLE POPULATION IMPROVEMENT

Selecţia asistată de markeri moleculari(MAS), utilizată pentru a estima potenţialul de producţie al animalelor *Laude şi colab.* (1990), oferă informaţii suplimentare rapide în selecţie şi pentru testarea descendenţilor. Aceasta ar trebui integrată în programele tradiţionale de selecţie şi ameliorare, pentru a obţine o îmbunătăţire maximă, precisă şi rapidă, la populaţiile de animale domestice (*Darius şi colab.,* 1998).

Markerii moleculari sunt utilizaţi în cadrul cartării genice pentru a marca spoturile într-un genom şi a întocmi hărţile de linkage. Markerii moleculari care flanchează locii însuşirilor cantitative (QTL) şi calitative prezintă polimorfism ridicat şi sunt o altă sursă de discriminare chiar şi între indivizi înrudiţi. Ei ne ajută să-i localizăm şi să-i vizualizăm pe cromozom, la fiecare individ folosit în cadrul formelor parentale, pentru încrucişări şi retroîncrucişări repetate, astfel încât să-i reţinem în efectiv numai pe acei indivizi care

prezintă genele de interes. Pentru genotipizarea indivizilor este necesară identificarea şi cartarea pe cromozom a unui număr suficient de mare de markeri genetici cu polimorfism ridicat dar care să acopere prin distribuţia lor întreg genomul. După localizarea lor pe cromozom, markerii respectivi vor servi în calitate de zone de marcaj a genelor sau a locilor cantitativi.

Markerii genetici sunt fragmente de ADN, de regulă noninformaţionale (regiuni hipervariabile de ADN sau introni), uneori chiar informaţionale (gene funcţionale), utilizate pentru detectarea segmentelor cromozomiale, implicate în manifestarea unui caracter precum şi a genelor care stau la baza manifestării acestora. Markerii genetici ideali sunt cei cu polimorfism ridicat, caracterizat prin posesia a două sau mai multe alele diferenţiabile, codominante şi care se pot evidenţia foarte uşor:

Georges I., şi colab. (1996*),* citându-l pe *Rohrer şi colab. (1996*), raportează existenţa unui număr de 1100 markeri genetici descoperiţi la taurine. Datorită hărţii genetice relativ complete la această specie s-au descoperit unii loci implicaţi în determinarea producţiei de lapte situaţi pe cromozomii din perechea 1, la rasa Holstein din SUA. (*Georges şi colab.*,1996).

2.1. MARKERI GENETICI ASOCIAŢI CU PRODUCŢIA DE LAPTE

2.1.GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH MILK PRODUCTION

Bibliografia de specialitate citează existenţa unor gene ce sunt asociate cu producţia de lapte, cum ar fi gena hormonului de creştere, gena ce determină sinteza prolactinei, genele ce determină sinteza cazeinelor şi lactoglobulinelor, factorul de transcripţie pituitar (Pit 1).

k- cazeina şi β-lactoglobulina – polimorfismul genetic la locii celor două gene a fost studiat la noi în ţară, pentru prima dată de către *Vlaic şi colab. (2001*). Au fost genotipizate la locii k-cazeinei 26 de vaci din rasa Brună şi 42 de tauri din următoarele rase: Brună, Bălţată germană, Bălţată românească, Bălţată cu negru, Red Holstein, Pinzgauer şi hibrizi Red Holstein x Bălţată românească. Taurii au fost genotipizaţi şi la locusul β-lactoglobulinei.Tehnica utilizată a fost PCR-RFLP (*Medrano şi Aguilar-*

Coordova, 1990) iar restricţia produşilor de amplificare s-a făcut cu *HinfI* pentru k-cazeina lucru prezentat în figura 1, şi Hae III pentru β-lactoglobulină.

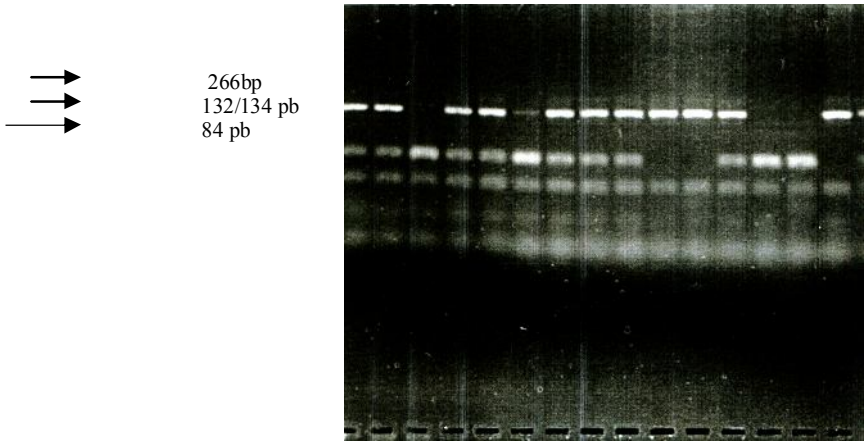


Fig. 1. Genotipurile la locusul k-cazeinei în funcţie de numărul şi mărimea fragmentelor de restricţie (pb) în gel de agaroză (după *Vlaic şi colab., 1990)*

Fig. 1. *The genotypes at the k-casein locus function of the number and size of the restriction fragments (bp) in agarose gel (according to Vlaic şi colab., 1990)*

Vikki şi colab. (2005) descoperă pe cromozomul **6** , lucru prezentat în figura 2, un marker ce influenţează producţia de lapte şi conţinutul în proteină la vacile din rasa Ayrshire din Finlanda.

1 2 3 4 5 **[6]** 7 8 910 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 X Y MT

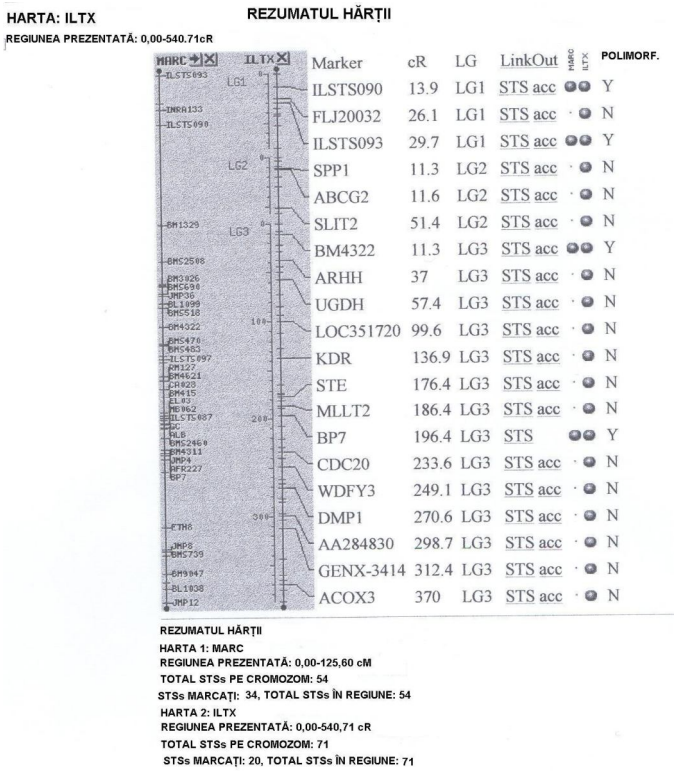


Fig. 2. Harta genetică la vacă – sursa NCBI.nih.gov.edu - Cromozomul 6

Fig. 2. *The genetic map in cow – source NCBI.nih.gov.edu - Cromosome 6*

Deşi acest domeniu, în prezent, este costisitor, susţinerea financiară a unor astfel de laboratoare de cercetare este necesară mai ales în scopul optimizării analizelor ADN,

precum şi testării efective a animalelor. În condiţiile economiei de piaţă, markerii oferiţi unităţilor de producţie beneficiare, trebuie să conducă la obţinerea unor performanţe care să justifice investiţiile acestor unităţi de testare. Identificarea precisă şi timpurie a genotipurilor care controlează proteinele din lapte prin metodele biologiei moleculare, poate avea impact direct în strategiile de ameliorare a vacilor de lapte, aducând un real progres genetic *(Horton R., şi colab., 2005).*

Familia proteinelor din lapte, reprezentată de cazeină (αS1, αS2, β, k) şi β-lactoglobulină, au o influenţă semnificativă asupra compoziţiei şi proprietăţilor fizico – chimice ale laptelui.

J.F. Medrano şi A.E. Cordova (1990), analizând frecvenţa alelelor genei k-cazeinei, în două populaţii de taurine din crescătoriile din California, au constatat că frecvenţa genotipului BB a fost de 3% la rasa Holstein şi de 81% la rasa Jersey. Rezultatele cercetărilor menţionate mai sus au fost confirmate şi de către *Eenennaam şi Medrano* (1991), care au arătat că alela B a k-cazeinei determină un nivel mai ridicat de proteină în lapte decât alela A. De asemenea frecvenţa superioară a alelei A a fost asociată cu o producţie superioară de lapte. Genotipul homozigot BB al k-cazeinei a fost asociat cu producerea unui lapte cu proprietăţi superioare de prelucrare în industria brânzeturilor. Folosirea laptelui de la vacile cu genotip BB al k-cazeinei în producerea brânzei, are ca rezultat un timp mai scurt de coagulare a cheagului, formarea unui cheag mai dens şi realizarea unei producţii mai mari de brânză în comparaţie cu laptele provenit de la vacile cu genotip homozigot AA.

Bulla şi colab. (1995) studiind o altă proteină din lapte, β-lactoglobulina, au constatat că genotipul AA este asociat unei producţii ridicate de lapte, iar genotipul BB este asociat laptelui cu conţinut ridicat de grăsime şi cazeină. Cercetările efectuate în Cehia de către *Sábliková şi colab.* (1999) confirmă clar că alela B a k-cazeinei conduce la creşterea semnificativă a cantităţii de proteină din lapte, animalele homozigote BB produc lapte mai puţin, dar cu un conţinut mai ridicat în proteină. Pe de altă parte, homozigoţii AA pe gena β-lactoglobulinei, se asociază atât cu o producţie crescută de lapte, precum şi cu un conţinut crescut de proteină în lapte. Aceşti cercetători recomandă selecţia vacilor din rasa Jersey cu genotipul homozigot BB al k-cazeinei

atunci când se urmăreşte obţinerea unui lapte cu o proteină de bună calitate, care este utilizat la producerea de brânză *(Lorraine şi colab.,1997).*

Futerová şi colab. (1999) au studiat asocierile dintre genotipurile β-lactoglobulinei şi conţinutul laptelui în această proteină. Producţia cea mai mare de β-lactoglobulină a fost înregistrată la vacile cu genotip AA , urmată de cele cu genotip AB (şi BB . Influenţa alelelor A şi B asupra conţinutului de β-lactoglobulină a fost de asemenea testată. Animalele homozigote pe alela A au avut o valoare mai ridicată de β-lactoglobulină decât cele homozigote pe alela B.

Fézüs şi Zsolnai (1997), studiind frecvenţa genelor k-cazeinei la rasa Holstein – Friză din Ungaria au găsit o frecvenţă a alelei A a k-cazeinei de peste 0,80 la taurii folosiţi pentru însămânţări artificiale, la vacile mame de tauri şi la taurii candidaţi la reproducţie. Ei au asociat frecvenţa superioară a alelei A cu o producţie mai ridicată de lapte.

Rezultate recente în România privind studiul polimorfismelor genetice ale proteinelor majore din laptele speciilor de fermă autohtone şi posibilitatea utilizării lor ca markeri genetici pentru creşterea calităţii laptelui şi identificare a autenticităţii/originii laptelui şi altor produse lactate, au fost obţinute în Laboratorul Zonal de Genotipizare a Animalelor de Fermă, din cadrul USAMV Cluj-Napoca *(Vlaic A., Bâlteanu V.A, şi colab., 2004, 2007, 2008)*. Tehnica de focalizare izoelectrică (IEF) şi tehnicile PCR au fost testate cu succes în premieră pentru România, pentru caracterizarea polimorfismelor proteinelor din lapte la populaţii de: taurine din rasele Bălţată românească de tip Simmental, Bălţată cu Negru românească, Brună de Maramureş, Sura de Stepa, bubaline din rasa Bivol românesc, caprine din rasa Carpatină *(Bâlteanu V.A, Vlaic A., şi colab., 2004, 2007, 2008)*. În urma acestor studii s-a constat la rasa Brună de Maramures o frecvenţă mare a alelelor de tip B de la locii K-cazeinei , beta-cazeinei şi beta-lactoglobulinei, asociaţi cu o calitate mai bună a laptelui şi proprietăţi superioare de procesare. La rasa Bălţată cu Negru românească s-a constatat o frecvenţă redusă a acestor alele, iar la rasa Băltată românească de tip Simmental frecvenţa lor a fost intermediară *(Bâlteanu V.A, Vlaic A şi colab., 2007).*

În urma acestor studii au fost descoperite şi caracterizate molecular trei noi alele la locii cazeinelor: la rasa Bivol românesc: β-cazeina C^{RV} si αS1- cazeina B^{RV} ,ce nu au mai fost semnalate pâna acum la nici o altă rasă de bivoli, respectiv αS1- cazeina I^{RV} descoperită la rasa Sura de Stepă, varietatea Moldovenească (*Bâlteanu V.A, Vlaic A.,şi colab., 2007, 2008)*. Deoarece cazeinele noi identificate la rasa Bivol românesc apar cu o frecvenţă mare ,de 15% în populaţiile genotipizate, ele vor putea fi folosite, ca markeri genetici de identificare a originii si autenticităţii brânzeturilor de bivoliţă autohtone, efectul lor asupra calităţii laptelui şi randamentului de procesare în brânzeturi fiind în curs de testare *(Bâlteanu V.A., Vlaic A ., şi colab., 2007, 2008).*

Alela αS1- cazeina I^{RV} descoperită la rasa Sura de Stepă, nu a mai fost semnalată la nici o alta rasă de taurine din Europa, fiind se pare o alelă ancestrală care provine direct de la stramoşii sălbatici ai rasei *(Bâlteanu şi colab., 2007),* şi a furnizat prima dovadă moleculară a poziţiei filogenetice a rasei, extrem de necesară în contextul conservării ei, rasa aflată din păcate în pragul extincţiei *(Bâlteanu V.A., Vlaic A., 2008).*

La rasa de caprine Carpatina a fost studiat polimorfismul celor 6 loci care codifică proteinele majore din lapte şi în special polimorfismul locusului cazeinei alfa S1 find constatată o frecvenţă mare a aleleor cu expresie slabă, cu influenţe negative asupra radamentului de procesarea a laptelui în brânzeturi (*Bâlteanu V.A şi colab., 2007* şi *Vlaic A., şi colab., 2008*

Factorul de transcripţie pituitar (Pit 1) este un factor celular specific pentru activarea expresiei genelor prolactinei (PRL), tirotropinei şi hormonului de creştere (GH) în hipofiza anterioară (*Tuggle şi Trenkle*, 1996) dar şi în diferenţierea şi proliferarea celulelor hipofizare (*Hoggard şi colab.*, 1993). Proteina **Pit1** de la bovine este formată din 291 aminoacizi şi este codificată de o genă candidat pentru producţia de lapte, genă situată pe cromozomul **1** prezentat în figura 3, la taurine, deoarece rolul său este de a regla expresia genei hormonului de creştere bovin (bGH) şi a genei prolactinei.

[1] 2 3 4 5 6 7 8 910 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 X Y MT

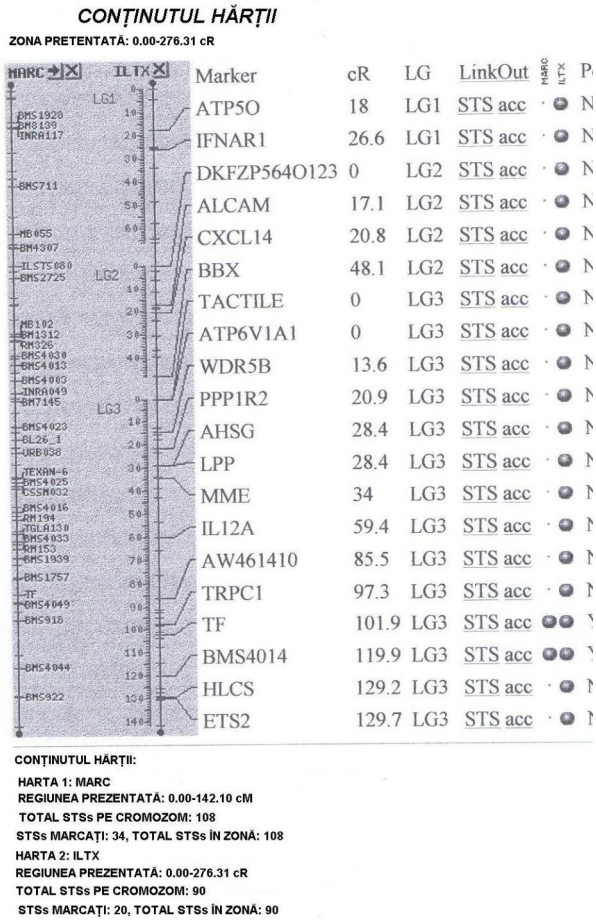


Fig. 3. Harta genetică la vacă – sursa www.NCBI.nih.gov.edu - Cromozomul 1

Fig. 3. *The genetic map in cow – source www.NCBI.nih.gov.edu - Cromosome 1*

Polimorfismul la locusul Pit 1 a fost studiat la mai multe rase de taurine, la care s-a calculat frecvenţa genelor şi s-au făcut asocieri între acestea şi cantitatea de lapte, precum şi cu anumite însuşiri de conformaţie (*Renaville şi colab.*, 1997). Alela A a fost asociată cu o producţie superioară de lapte şi o cantitate mai mare de proteine în lapte.

Polimorfismul la locusul Pit1 a fost studiat prin tehnica PCR-RFLP (*Moody şi colab.*, 1995) în care produsul de amplificare de 1355pb a fost digerat cu enzima *Hinf*I şi pe un fragment de 451 pb (*Renaville şi colab.*, 1997) a cărui produs de amplificare a fost

digerat cu aceeaşi enzimă de restricţie (obţinându-se fragmente de 451 pb pentru genotipul AA, 244 şi 207pb pentru BB şi 451, 244 şi 207 pb pentru heterozigotul AB – figura 4. Ulterior s-au stabilit asocieri ale polimorfismului la acest locus cu producţia de lapte (*Renaville şi colab.*, 1997) şi calitatea carcasei (*Jolanta Oprzadek şi colab.*, 2003). Alela A a genei Pit1 a fost asociată cu o producţie superioară de lapte, cantitate crescută de proteină şi cantitate scăzută de grăsime în lapte la hibrizii Holstein italiană x Friză. Adâncimea corpului şi angularitatea sunt caractere de conformaţie asociate cu cantitatea de lapte, la vacile de lapte.

Alela A are un efect superior alelei B în ceea ce priveşte: cantitatea de lapte, cantitatea de proteină, adâncimea trunchiului, angularitatea şi lungimea picioarelor. Aceste date arată un singur sens de acţiune, însă gena Pit1 are trei moduri diferite de a acţiona: primul este legat de producţia de lapte şi angularitate, al doilea legat de adâncimea trunchiului şi de creşterea picioarelor**,** şi al treilea legat de o cantitate scăzută de grăsime şi angularitate mai mare.

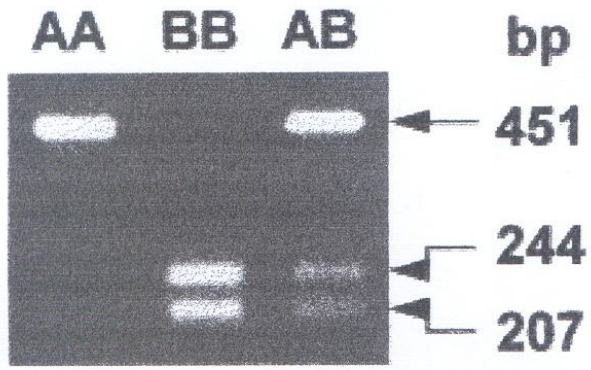


Fig. 4. Polimorfismele de tip PCR – RFLP/*Hinf I* din gena Pit-1 la taurii aparţinând rasei Holstein-Friză (după *Renaville şi colab.*, 1997)

Fig. 4. *The polymorphisms PCR – RFLP/Hinf I type from Pit-1 gene in Holstein – Friesian bulls (according to Renaville et al. 1997)*

Rezultatele arată că gena Pit 1 are rol în activarea expresiei genelor Tirotropinei (Tyr), Prolactinei (PRL) şi Hormonului de creştere (GH), şi influenţează cantitatea de lapte şi de proteină din lapte. În acelaşi timp, prin intermediul aceloraşi gene din axa somatotropică, gena influenţează dezvoltarea în două direcţii: una referitoare la adâncimea trunchiului, iar cealaltă în direcţia calităţii laptelui: alela A reduce muscularitatea, în favoarea creşterii angularităţii.

La rasa Bălţată alb cu negru, polimorfismul genei Pit1 a fost asociat doar cu performanţe de exterior. Homozigoţii AA au avut o circumferinţă şi o adâncime mai mare la piept, în timp ce homozigoţii BB au prezentat lungimea şi lărgimea trunchiului mai mare.

2.2. MARKERI GENETICI ASOCIAŢI CU PRODUCŢIA DE CARNE

2.2.GENETIC MARKERS ASSOCIATED WITH MEAT PRODUCTION

Genele care controlează locii caracterelor cantitative pentru producţia de lapte şi carne sunt dificil de identificat. Genele candidat pentru aceşti loci se selecţionează pe baza asocierilor ce se stabilesc între procese biochimice sau fiziologice şi caracterul cantitativ respectiv. Ulterior, aceşti loci se testează ca loci ai unui caracter cantitativ (QTL). Dintre acestea putem cita genele: *tiroglobulinei, calpastatinei, hormonului de creştere bovin (bGH), leptinei şi STAT 5A.*

În ultimii ani, cercetările au fost conduse spre identificarea de markeri genetici puternic asociaţi cu diferite caracteristici de palatabilitate**.** Recent, s-a stabilit că genele ce specifică tiroglobulina, leptina şi calpastatina influenţează frăgezimea, suculenţa şi gradul de marmorare al cărnii, calitatea carcasei şi greutatea corporală.

Tiroglobulina (Tyr) – Tiroglobulina este un hormon glicoproteic sintetizat de celulele foliculare ale tiroidei unde este depozitat şi care ulterior este iodat. Tiroglobulina este cărăuşul triiodotironinei (T3) şi tiroxinei (T4) depozitată în lumenul glandei. Când

oricare din aceşti hormoni este cerut, tiroglobulina este transportată prin membrană apicală. S-a demonstrat atât *in vivo* cât şi *in vitro* că aceşti hormoni afectează diferenţierea şi creşterea adipocitelor, de aceea, T3 şi T4 au fost asociaţi cu gradul de marmorare a cărnii la vacile Wagyu (*Mears şi colab.*, 2001).

Polimorfismul TG5 este situat în secvenţa leader de la capătul 5' al genei tiroglobulinei şi a fost asociat cu conţinutul intramuscular de grăsime la vacile hrănite *ad libidum*.

Vacile homozigote sau heterozigote pentru alela delta T (CT sau TT) au un grad de marmorare mult mai ridicat decât cele homozigote pe alela delta C (*Barendse*, 1997).

Indivizii care prezintă alela T în genotip au performanţe de creştere superioare şi un grad de marmorare superior al cărnii.

Selecţia asistată de acest marker nu va avea ca obiectiv o cantitate mai mică de grăsime subcutanat ci un grad superior de marmorare al cărnii.

Leptina (Lep) - este un hormon proteic de 16 kDa, sintetizat în principal de ţesuturile adipoase şi secretată în sânge, implicată în reglarea greutăţii corporale, balanţa energetică, controlul formării osoase, fertilitate şi funcţiile imune ale organismului.
Cercetările privitore la nivelul seric al **leptinei** şi nivelul ARNm al genei obezităţii **ob** din ţesuturile adipoase sunt proporţionale cu cantitatea de ţesut adipos din organism şi sunt asociate cu factori de risc în bolile cardiovasculare, sterilitate etc. Administarea leptinei la subiecţi cu obezitate severă a dus la o reducere în greutate în medie cu 16 kg atribuită în special pierderii în masa ţesuturilor adipoase.

Leptina joacă un rol important şi în sinteza glicogenului, transportul glucozei şi dispoziţia lipidelor în muşchi (*Margetic şi colab.*, 2002).

Cu cât adipocitele devin mai mari, cu atât va fi prezentă o cantitate mai mare de ARNm a leptinei (*Auwerx şi Staels*, 1998; *Masuzaki şi colab.,* 1995), iar concentraţia de leptină circulantă periferică va fi mai crescută.

Prin clonare poziţională locusul genei leptinei a fost cartat pe cromozomul **4 bovin** (figura 5).

1 2 3**[4]** 5 6 7 8 910 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 X Y MT

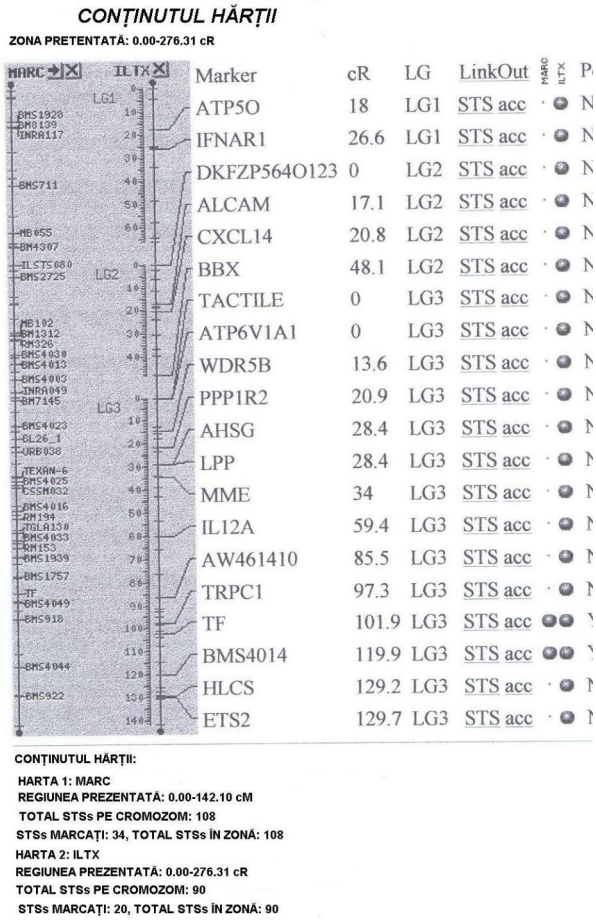


Fig. 5. Harta genetică la vacă – sursa www.NCBI.nih.gov.edu - Cromozomul 4

Fig. 5. *The genetic map in cow – source www.NCBI.nih.gov.edu - Cromosome 4*

Calpastatina (Capn) **-** Frăgezimea crescută a cărnii care ajunge pe masa consumatorului este determinată de activitatea enzimatică endogenă, determinată de cele 2 forme ale proteazei calpaine (m şi μ calpain) ce apar în mod natural în muşchi. Activarea uneia din formele proteazei calpainei este determinată de cantitatea de calciu necesitată şi anume: μ - calpaina necesită concentraţii micromolare de calciu (200 – 300 μM), iar m-calpaina necesită milimoli de ioni de Ca (~ 10 mM). Calpastatina este substratul endogen ce inhibă proteaza calpaina (atât forma m cât şi forma μ). După

sacrificarea animalului, proteaza m-calpaina este foarte stabilă în corp, datorită insuficienţei în calciu pentru activarea sa. În plus, un declin gradual apare şi la proteaza μ-calpaina datorită insuficienţei calciului şi pierderii activităţii calpastatinei foarte rapid. Calpastatina este hidrolizată de către proteazele de tip calpaina, observându-se cantităţi superioare ale proteazei în relaţie cu inhibitorul. Pentru caracteristicile frăgezimii şi suculenţei cărnii determinate de această genă, a fost dezvoltat un marker genetic. Gena calpastatinei are două variante genetice: una asociată cu frăgezimea cărnii şi cealaltă cu o carne mai dură. Ambele alele ale genei calpastatinei au fost găsite la toate rasele, observându-se diferenţe nete în frecvenţa acestora, între rase testate: Zebu are frecvenţa mai ridicată a alelei asociată cu o carne mai dură faţă de vacile din rasele engleze (Belmont Red şi Santa Gertruda). *Chung şi colab.* (2001), stabileşte existenţa unui polimorfism genetic între indivizi, pentru 2 domenii diferite la locusul calpastatinei cartată pe cromozomul 18 (figura 6), domeniul I – CAST67 – între exonul 10 şi 11 şi domeniul IV – CAST28 - între exonul 5 şi 6, ambele putând fi utilizate în selecţia asistată de markeri, prin tehnica SSCP (*Coşier Viorica, 2007).*

1 2 3 4 5 6 7 8 910 11 12 13 14 15 16 17 **[18]** 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 X Y MT

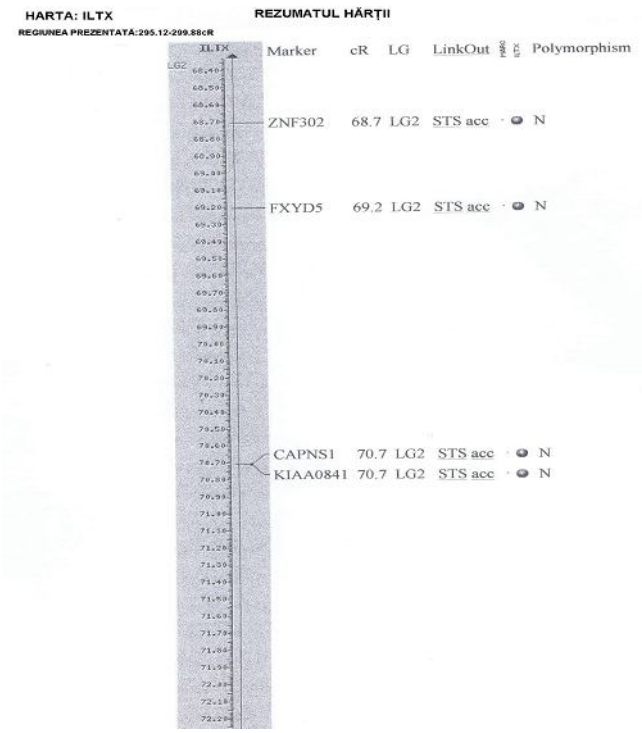


Figura 6. Harta genetică la vacă – sursa www.NCBI.nih.gov.edu - Cromozomul 18

Figure 6. *Genetic map in cow – source www.NCBI.nih.gov.edu - Cromozome 18*

Hormonul de creştere bovin (bGH) - este un hormon pituitar de 22kDa format din 191 aminoacizi. Gena bGH face parte dintr-o familie multiplă de gene din care mai fac parte prolactina şi hormonii lactogeni placentari, fiind cartat prin tehnica FISH pe cromozomul 19 bovin (fig. 7). Gena care controlează expresia hormonului bGH este formată din 5 exoni (I-V) şi 4 introni (A-D). Până în prezent au fost puse în evidenţă, în gena hormonului de creştere, câteva regiuni polimorfice la vaci. *Lucy şi colab. (*1991) găsesc polimorfisme în exonul 5, în poziţia 2141 *Zhang şi colab.* (1993) , descoperă un alt polimorfism în intronul 3 poziţia 1547 , iar *Unanian şi colab.* (1994), în poziţia 2637 a aceluiaşi intron, toate cele trei polimorfisme fiind evidenţiate prin PCR-RFLP *(Coşier*

Viorica, 2007). Celelalte polimorfisme au fost puse în evidenţă prin tehnica SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

În studierea polimorfismului la acest locus, la hibrizii Holstein x Friză, s-a utilizat enzima de restricţie *Taq I* şi s-au obţinut 2 fragmente de 6,2kb şi fragmente de 5,2kb din gena hormonului de creştere bovin (bGH) (*Falaki şi colab.*,1996). Două profile au putut fi detectate în gel, corespunzătoare genotipurilor AB şi AA. În cercetările efectuate de *Zang şi colab.* (1993), frecvenţa alelei A a fost de 0,852, iar a alelei B de 0,148. Frecvenţa alelei B a fost de trei ori mai mare la rasele de carne comparativ cu rasa Holstein luată în studiu.

STAT 5A- este un mediator intracelular cheie al semnalizării prolactinei ce poate activa transcripţia genelor ce codifică proteinele din lapte ca răspuns la prolactină (*Wakao şi colab.*, 1994). Este de asemenea cunoscut ca şi mediator al hormonului de creştere (GH) asupra căruia acţionează ca o genă ţintă. La vaci, gena ce codifică STAT 5A, a fost localizată pe cromozomul 19q17(figura 6), între locii STAT 40KPZ ce conţin şi genele STAT3 şi STAT 5B (*Seyfert şi colab.*, 2000; *Moleenar şi colab.*, 2000). Aceeaşi tehnică, PCR-RFLP (*Flisikowski* şi colab., 2003), a fost utilizată pentru studierea polimorfismului la locusul STAT5A.

Produşii de amplificare au fost tăiaţi cu enzima de restricţie *AvaI.* Două profiluri au fost decelate în gelul de agaroză, corespunzătoare genotipurilor CC şi CT. Genotipul CC a fost asociat cu un spor în greutate în viu mai mare (1,04 faţă de 0,97 kg zi), între lunile 8 şi 15 în timp ce genotipul CT a fost asociat cu o greutate mai mare a oaselor şi o lungime a regiunii toraco-lombare mai mare. *Flisikowski şi Zwierzchowski* (2003) au identificat 14 polimorfisme de secvenţă în gena STAT5A prin tehnica SNP.

1 2 3 4 5 6 7 8 910 11 12 13 14 15 16 17 18 **[19]** 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 X Y MT

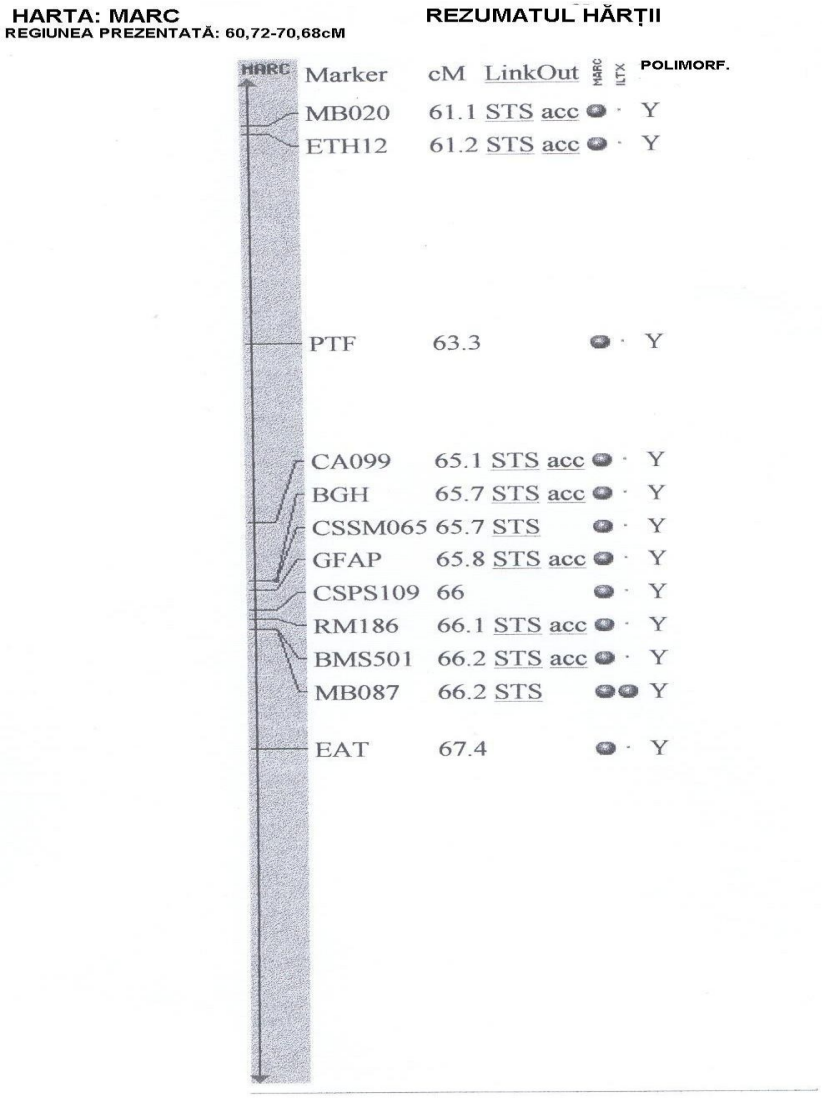


Fig. 7. Harta genetică la vacă – sursa www.NCBI.nih.gov.edu - Cromozomul 19

Fig. 7. *The genetic map in cow – source www.NCBI.nih.gov.edu - Cromosome 19*

Un nou polimorfism este determinat de substituţia C – T apărut în poziţia 6853 din interiorul exonului 7 (*PCR-RFLP/AvaI* şi *PCR-RFLP/ DdeI*) (*Moleenar şi colab.*, 2000) (figura 8).

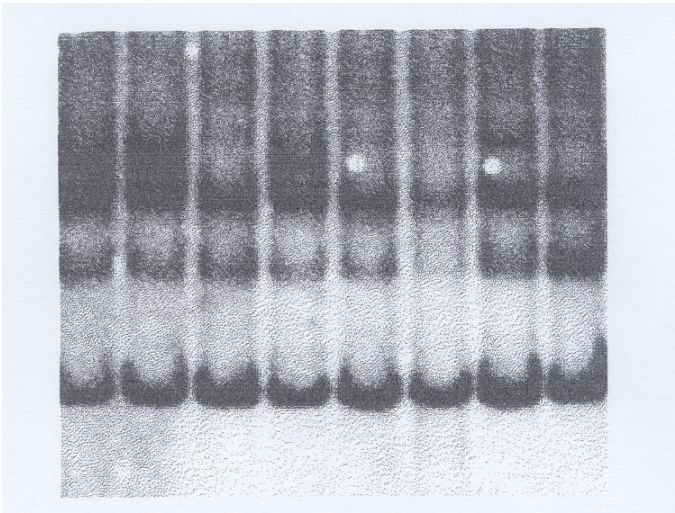


Fig. 8. Polimorfismul SSCP existent în intronul 6/ exonul 7 a genei codificatoare STAT5A la bovine, obţinut în gel de poliacrilamidă (după *Moleenar şi colab.*, 2000)

Fig. *8.* *SSCP polymorphism from the intron 6/ exon 7 of the codifying gene STAT5A in bovine, obtained in polyacrilamide gel (according to Moleenar et al. 2000)*

2.3. MARKERI GENETICI PENTRU IDENTIFICAREA TIMPURIE A SEXULUI LA EMBRIONI

2.3. GENETIC MARKERS FOR EARLY IDENTIFICATION OF EMBRYO SEX

Markerii genetici specifici cromozomului Y, pot identifica sexul la taurine cu ajutorul PCR, încă din faza de embrion. Secvenţele de ADN, specifice cromozomului Y bovin, au fost clonate de mai mulţi cercetători. Utilizarea primerilor specifici cromozomului Y în tehnica PCR, permite amplificarea secvenţelor de ADN specifice

sexului mascul, iar prezenţa sau absenţa segmentelor amplificate în gel permite sexarea embrionilor *(Vlaic, A. 1997*). Pentru a determina sexul embrionilor bovini s-au folosit două perechi de primeri specifici atât unei secvenţe repetitive (BRY1, BC1,2 şi ES6,0) cât şi unei secvenţe unice (BOV 97M) dintr-un fragment de ADN specific cromozomului Y. Rezultatele obţinute, folosind tehnica PCR pentru sexare, au fost comparate cu cele obţinute în urma cariotipizării embrionilor şi cu cele obţinute prin hibridare *in situ* a unei probe de ADN specifice cromozomului Y bovin, cu preparate celulare de interfaţă. Secvenţa unică necesită 50 cicluri de amplificare, iar secvenţele repetitive necesită 40-45 cicluri (*Schröder şi colab.*,1990).

Rezultatele obţinute demonstrează că embrionii pot fi sexaţi cu exactitate înainte de transfer, prin PCR, utilizând primeri specifici cromozomului Y. Întreaga procedură , de la recoltarea embrionilor şi până la vizualizarea ADN amplificat durează 6 ore. În prezent există preocupări pentru reducerea timpului necesar determinării sexului la aproximativ 2 ore prin detectarea rapidă *in situ* a secvenţelor de ADN specifice cromozomului Y (*Koch*,1995).

CAPITOLUL III
IMPORTANŢA GENEI OBEZITĂŢII (LEPTINA) CA MARKER GENETIC ASOCIAT CU CALITATEA CĂRNII ŞI A CARCASEI

CHAPTER III
THE IMPORTANCE OF THE LEPTINE – GENETIC MARKER ASSOCIATED WITH MEAT AND CARCASS QUALITY

3.1. CONSIDERAŢII GENERALE PRIVITOARE LA LEPTINĂ (GENA OBEZITĂŢII)

3.1. GENERAL CONSIDERATION CONCERNING LEPTINE (OBESITY GENE)

Gena obezităţii (ob) şi produsul ei – leptina (gr. leptos – slab) au fost descoperite în anul 1994 (*Friedman şi Halaas,* 1998, citaţi de *Chilliard Y. şi colab.,* 1999). Încă din anul 1953, cercetătorul Kennedy a susţinut o teorie lipostatică, conform căreia, ţesuturile adipoase ar putea furniza un semnal sistemului nervos central prin care să limiteze apetitul animalelor, ceea ce se concretizează prin îngrăşarea acestora până la o anumită limită şi ar explica şi precizia ridicată a mecanismelor care reglează compoziţia corporală pe termen lung.

Gena care codifică leptina este localizată pe cromozomul **4** la taurine (*Pomp şi colab.* 1997, citaţi de *Chilliard, Y. şi colab.*, 1999). La taurine, secvenţa regiunii codificatoare prezintă o omologie de 96, 93, 88, 84 şi 82% cu secvenţele de la ovine, porcine, om, şoarece şi respectiv şobolan. Ţesutul adipos exprimă un transcript (ARNm) de 3,1 kb la vacă (*Chilliard Y. şi colab.*, 1999) şi 4,1 – 4,5 kb la ovine. La păsări, expresia genei este întâlnită şi la nivel hepatic, unde este implicată în lipogeneză *(www.inra.fr/Internet/Produits/PA)*. Nivelurile ARNm a genei ob sunt proporţionale cu

dimensiunile adipocitelor, acestea crescând odată cu creşterea rezervelor de grăsime din organism. Expresia genei ob este reglată de insulină, glucocorticoizi şi testosteron (*Ren, M.Q. şi colab.,* 2002).

Leptina este un hormon proteic, alcătuit din167 aminoacizi (*Zhang, Z. şi colab.*, 1994, citaţi de *Friedman, J.M.,* 1998) sintetizat în principal de ţesuturile adipoase şi secretată în sânge. Se mai sintetizează în muşchii scheletici, placentă şi stomac. Leptina îşi exercită acţiunea pornind de la nucleii ventro-mediani din hipotalamus unde se găseşte o concentraţie ridicată de receptori ai proteinei, denumiţi ObR.

Cercetări efectuate de *Satoh, N.* (1999) citat de *Yanagihara, N. şi colab.* (2005) sugerează faptul că mecanismul de acţiune al leptinei ar viza influenţarea secreţiei de catecolamine (neurotransmiţători ce influenţează consumul de hrană) la nivel medular, prin stimularea sistemului nervos simpatic. Există o serie de studii contradictorii conform cărora la nivel medular leptina nu joacă nici un rol în eliberarea de catecolamine la om, în timp ce la porcine aceasta ar stimula secreţia (*Yanagihara, N. şi colab., 2005*).

Studii recente arată că pe lângă hipotalamus, leptina acţionează direct asupra unor ţesuturi situate înafara acestuia, în ţesuturi periferice cum sunt, celulele β - pancreatice şi limfocitele T (figura 9).

Studiile iniţiate asupra mecanismelor prin care proteinele pot traversa bariera hematoencefalică au concluzionat că anumite proteine endogene cum sunt citokinele, pot traversa aceasta barieră prin sistemul saturabil de transport sau prin difuzie transmembranară (*Banks W. A., şi colab., 2004*).

Traversând bariera hematoencefalică, se crede că leptina circulantă transmite informaţii clare la nivel cerebral despre cantitatea de energie stocată sub formă de ţesut adipos şi activează centrii hipotalamici cu privire la consumul energetic şi ingestia de hrană *(Hale H., şi colab.,).*Cercetările iniţiate pentru clarificarea acestui aspect au concluzionat că ţesutul adipos este o glandă endocrină şi au identificat leptina ca un hormon pleiotrop ce afectează diferite organe şi ţesuturi din organism *(Fruhbek şi colab., 1998)*. În completarea funcţiei de reglare a metabolismului grăsimilor**,** leptina intervine în fiziopatologia diferitelor maladii endocrine, legate de funcţiile: reproductivă, hematopoietică, imună sau adrenocorticoidă.

Schimbările metabolice induse, au ca efect modificări indirecte la nivelul altor funcţii endocrine(*Houseknecht K., şi colab.,1998*). Astfel, s-a determinat că leptina intervine în reglarea activităţii insulinei la nivelul hepatocitar, reglarea sintezei *in vitro* a hormonilor steroizi - cu implicatii în angiogeneză şi reglarea activităţii glandei pituitare.

Leptina se poate găsi în ser, fie sub forma liberă, circulantă, sau legată de proteine. Studii recente au arătat că mutaţii în gena care codifică leptina determină suprimarea producţiei acestui hormon, iar mutaţiile din gena ce codifică receptorul leptinei suprimă efectul ei în ţesuturile ţintă. Toate aceste mutaţii au fost asociate cu obezitati morbide atât la rozătoare cât şi la om. Ţesutul adipos este un element major al obezităţii, implicat atât din punct de vedere cantitativ (obez vs non-obez) cât şi topografic în obezitate (dispoziţia androidă în raport cu cea ginoidă şi tesut adipos visceral vs. ţesut adipos subcutanat). Totuşi, ţesutul adipos nu este doar o formă de stocare a energiei ci şi un element activ metabolic şi secretor endocrin. Animalele adulte, inclusiv rozătoarele şi primatele, au în organism un procent de 10-15% substanţă grasă, în ceea mai mare parte stocată sub forma ţesuturilor adipoase albe. O funcţie importantă a grăsimilor este aceea de stocare a energiei sub formă de trigliceride. După hidroliza trigliceridelor în acizi graşi liberi şi glicerol, acizii graşi liberi pot fi utilizaţi ca sursă de energie sub forma de ATP. Cantitatea de energie stocată sub forma trigliceridelor este superioară celei stocate sub formă de glicerol, fiind mult mai mare fosforilarea de tip oxidativ. Ţesutul adipos secretă hormoni, citokine şi alte molecule, unite sub denumirea generica de adipokine, care înafara efectelor locale, odată ajunse în circulaţia sanguină influenţează metabolismul întregului organism *(Arner P., şi colab., 1997*). Fiziologia ţesutului adipos este foarte complexă, metabolismul adipocitar fiind în legatură cu sinteza de citokine (TNFα-factor necrotic tumoral şi leptina) şi numeroşi factori adipocitari *(Dahlman Karin şi colab., 2006).*

În metabolismul lipidic intervin o serie de alţi factori cum sunt enzimele: lipoproteinaza – în metabolismul trigliceridelor, fosfoenolpiruvat carboxikinaza (PEPCK), lipaza hormonosensibilă (LHS), care în condiţiile unui necesar energetic crescut, hidrolizează trigliceridele cu eliberare de monoglicerid lipază, cu efect lipolitic.

Excesul de ţesut adipos visceral se asociază cu rezistenţa la insulină şi complicaţii cardiovasculare.

O altă funcţie, cea secretorie a adipocitului, se referă la secreţia de leptină cu rol în controlul saţietăţii şi a TNFα (implicat în apoptoza celulară, proliferarea şi diferenţierea celulară, preinflamarea tumorală, precum şi în replicarea virală) două citokine implicate în sindromul de insulinorezistenţă. şi interleukina 6 (IL-6). Conceptul ca factorii de mediu, în interacţiune cu fondul genetic, ce contribuie la creşterea susceptibilităţii la apariţia obezităţii, reprezintă faza abordării clinice şi terapeutice a obezităţii (*Katsilambros N. şi colab., 2000).*

Citokinele sunt peptide cu ajutorul cărora celulele de apărare interacţionează între ele în realizarea răspunsului imun, ele sunt sintetizate de toate tipurile de leucocite *(Vintilă I., şi colab.,2005).*

Examinarea factorilor de mediu (regimul alimentar) în interrelaţie cu fondul genetic, poate contribui la înţelegerea mecanismelor prin care obezitatea ar reprezenta un defect de comportament individual, fără baze biologice, şi un punct de plecare în eforturile de identificare a factorilor genetici implicaţi (figura 9).

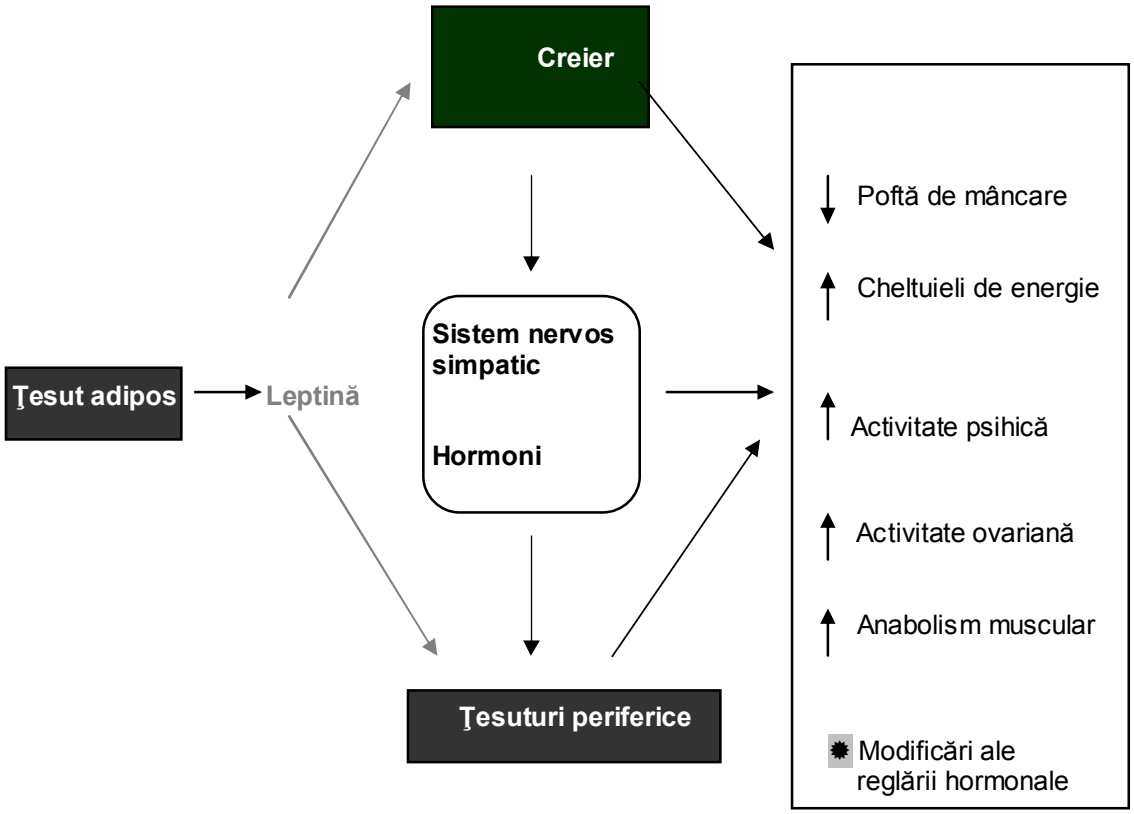


Fig. 9. Interacţiunea ţesut adipos – leptină – sistem nervos şi efectele acesteia (după de *Chilliard Y. şi colab.,* 1999)

Fig. 9. *The interaction adipous tissue – leptine – nervous system and their effects (according to Chilliard Y. et al.1999)*

3.2.RECEPTORII LEPTINEI ŞI MECANISMUL DE ACŢIUNE AL ACESTORA

3.2. LEPTINE RECEPTORS AND THEIR MECHANISM OF ACTION

Receptorul leptinei (ObR sau după unele notaţii LR), face parte din receptorii ce aparţin familiei din Clasa I a citokinelor. Ei sunt prezenţi în cel puţin cinci izoforme (ObRa, ObRb sau OBRL, ObRc, ObRd şi ObRe) care au acelaşi domeniu extracelular, înregistrând diferenţe doar la nivelul terminaţiei C (*Ren, M.Q. şi colab.,* 2002) şi un singur domeniu transmembranar; cu excepţia ObRe care nu are domeniu intracelular, fiind un receptor putativ solubil *(Yanagihara, N. şi colab.*, 2000). Toţi aceşti receptori posedă domenii intracelulare diferite (*Tartaglia, L.A. şi colab., 2005),* citaţi de *Iqbal, J. şi*

colab., 2000). Ei modulează expresia neuropeptidelor care reglează sistemul neuroendocrin la nivelul hipotalamusului, dar acţionează şi asupra hipofizei anterioare.

ObRa, ObRc şi ObRd sunt receptorii ce deţin un domeniu intracelular scurt. Ei au rolul de transport al leptinei prin bariera sânge – creier şi de purificare a leptinei aflate în circulaţie.

ObRb posedă domeniul citoplasmatic lung şi are rol esenţial în procesul de convertire a semnalului intracelular de către proteine cum sunt cele cu rol în convertirea semnalelor şi de activare a transcripţiei (STAT – signal transducers and activators of transcription).

Niveluri ridicate ale acestui receptor se întâlnesc la nivelul neuronilor hipotalamici, dar mai scăzute în adipocite şi celulele endoteliale vasculare.

În momentul de faţă se cunoaşte profilul general al aminoacizilor ce alcătuiesc ObRb atât la om, cât şi la alte specii , iar secvenţa acestora se poate observa în figura 10.

Nr. Acces Access no.	Secvenţa aminoacizilor Amino acid sequences																																			
U62124	P	E	T	F	**Q**	H	L	P	F	**I**	K	H	**T**	**E**	S	**A**	T	**F**	G	P	L	L	L	E	P	E	**T**	I	S	E	**D**	I	S	V	D	T	**S**
U43168					E									A		V		C																		
U49107					E					T			A			V	I										P				E						A

Fig. 10. Comparaţie între secvenţa de aminoacizi a ObRb la ovine (U62124), om (U43168) şi şoarece (U49107). Spaţiile libere indică secvenţe de aminoacizi identice cu cele ale speciei ovină (după *Dyer, C.J. şi colab.*, 1997)

Fig. 10. *Comparison between the amino acid sequence of the ObRb in sheep (U62124), man (U43168) and mouse (U49107). The free spaces are indicating amino acid sequences identical with sheep (according to Dyer, C.J. et al.1997)*

Studii efectuate de *Iqbal, J. şi colab.* 2000 la ovine indică prezenţa ObR în proporţie de 27% la nivelul hormonilor corticotropi, 69% în somatotropi şi 29% în gonadotropi, situaţi în lobii distali ai hipofizei anterioare.

Prezenţa ObRb în hipotalamus, hipofiza anterioară şi ţesutul adipos a fost pusă în evidenţă şi de cercetările efectuate de *Dyer, C.J. şi colab.* 1997 la oi adulte ovarectomizate şi căror li s-au administrat raţii cu niveluri nutritive diferite (la discreţie şi restricţionate). S-a constatat că expresia ObRb este predominantă în hipotalamusul ventro-medial, în zona despre care se cunoaşte că este implicată în consumul de hrană. Spre deosebire de cercetările efectuate de *Ren, M.Q. şi colab.* 2002 s-a înregistrat un nivel mult mai mare al expresiei ObRb la nivelul hipotalamusului oilor hrănite restricţionat în comparaţie cu cele hrănite *ad libidum*, explicată printr-o reglare bazală a expresiei acestuia, realizată de către leptină la ovinele hrănite la discreţie.

Cercetări efectuate de *Ren, M.Q. şi colab. (*2002) citat de *Carşai Crina şi colab., (2005)*, asupra nivelului ARNm a genelor ce codifică leptina, comparativ, la taurine de carne (Charolaise) şi lapte (Holstein german) au demonstrat că nivelurile acestuia în hipotalamus nu au prezentat o diferenţă semnificativă între cele două rase studiate(figura 11).

S-a emis ipoteza că aceasta s-ar putea datora faptului că, spre deosebire de monogastrice, rumegătoarele au un metabolism energetic influenţat în mare măsură de rolul important pe care îl joacă fermentaţia rumenală în sistemul lor digestiv.

Datorită faptului că tuturor animalelor li s-au administrat raţii în conformitate cu greutatea corporală şi cerinţele nutritive pentru producţie, este exclusă influenţa nivelului nutriţional asupra expresiei hipotalamice a ARNm a ObRb. Aceasta este o constatare experimentală cu totul diferită de cele observate de *Baskin şi colab.*, 1999, citaţi de *Ren, M.Q. şi colab.* 2002 la şobolan, unde expresia ARNm a ObRb în hipotalamus este influenţată de nivelul nutriţional.

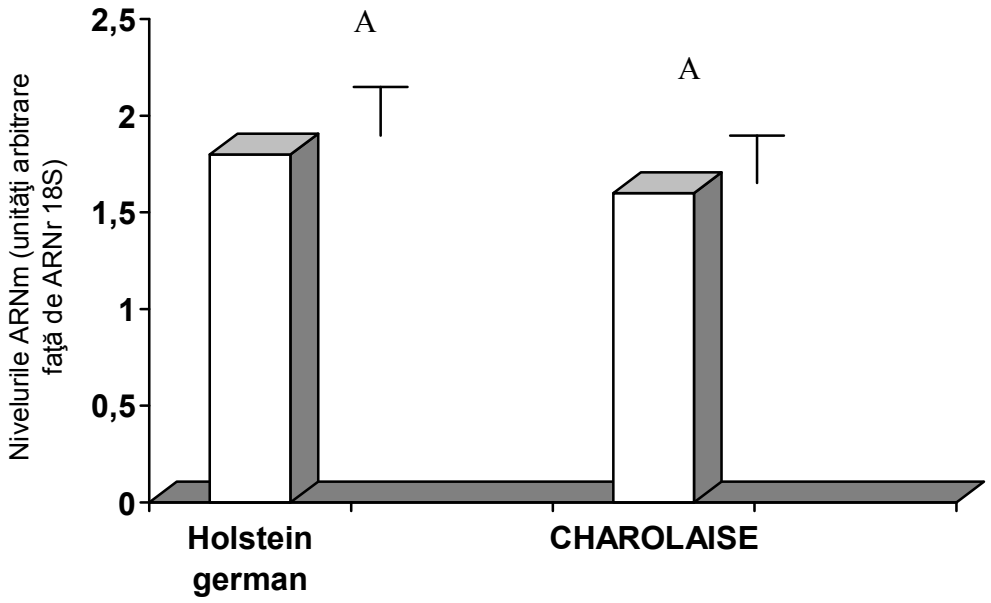


Fig. 11. Nivelurile ARNm ale ObRb la cele două rase studiate (după *Ren, M.Q. şi colab.,* 2002)

Fig. 11. *The ARNm levels of the ObRb in both studied breeds (according to Ren, M.Q. et al. 2002)*

Şi la păsări (www.inra.fr/Internet/Produits/PA), a fost pus în evidenţă receptorul ObRb (figura 12). Ca şi în cazul celorlalte specii, acesta aparţine superfamiliei citokinelor din Clasa I.

În diverse studii s-au evidenţiat interacţiunile dintre leptină reziduurile de tirozină (Y 986, Y 1079 şi Y 1141) ce reprezintă elementele conservate dintre diferiţi receptori ai superfamiliei citokinelor, motivele enzimatice WSXWS cu rol în legarea hormonului şi zona de interacţiune cu JAK (Janus – kinaza). Reziduurile de tirozină Y 986, Y 1079 şi Y 1141 sunt implicate în activarea factorilor de transcripţie STAT.

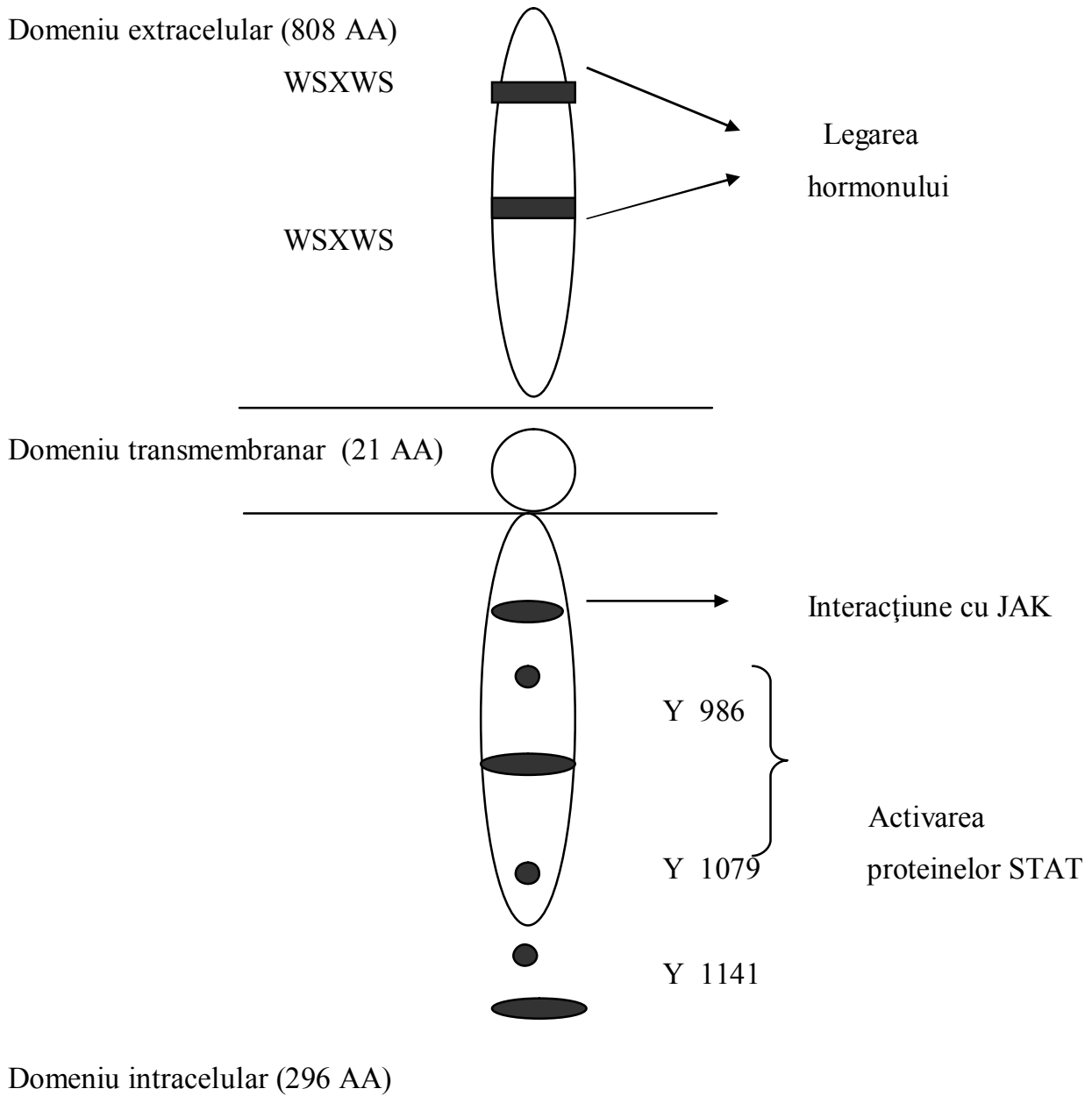


Fig. 12. Reprezentarea schematică a receptorului leptinei la pui

(după www.inra.fr/Internet/Produits/PA)

Fig. 12. *The pattern of the leptine receptor in chicken*

(according to www.inra.fr/Internet/Produits/PA)

3.3.ACTIVITATEA ŞI ROLUL LEPTINEI ÎN ORGANISM

3.3. LEPTINE ACTIVITY AND ITS ROLE IN ORGANISM

Leptina intervine în reglarea neuroendocrină a diferitelor funcţii (apetit, greutate corporală şi osteogeneză) a balanţei energetice, în reglarea funcţiilor reproductive (fertilitate) şi a funcţiilor imune ale organismului *(Rahmouni, K. şi colab 2003).*

La şoarecii cu genotipul (ob/ob), incapabili de a sintetiza leptina, s-a constatat obezitate morbidă şi ingestie crescută de hrană *(Woodside B., şi colab.,1998)*. Injectarea şoarecilor cu leptină a dus la descreşterea apetitului şi respectiv a consumului de hrană şi o balanţă energetică negativă, restabilirea gestaţiei şi lactaţiei la femele şi a funcţiei reproductive la masculi.

Toate acestea au indicat că leptina intervine în: reglarea cantităţii de grăsime depozitată de organism, reglarea apetitului şi a balanţei energetice, controlul funcţiei reproductive, controlul osteogenezei, fiind în legătură şi cu concentraţia serică a insulinei şi glucozei (*Friedman, J. şi colab.*, 1998).

S-a demonstrat şi rolul leptinei în reglarea instalării pubertăţii. Este bine cunoscut faptul că la femeile foarte slabe ovulaţia este întreruptă, iar la adolescentele foarte slabe pubertatea se instalează mai târziu decât la cele cu greutate normală.

Toate acestea indică faptul că ţesutul adipos produce un semnal care reglează funcţia de reproducţie.

Se presupune că acest factor este leptina. În sprijinul acestor constatări vin şi rezultatele experimentelor în care după tratamentul şoarecilor cu leptină s-a înregistrat maturarea timpurie a tractusului reproductiv la femele, urmată de accelerarea instalării ciclului estral şi a capacităţii de reproducere (*Chehab, F.F. şi colab.*, 1997 , *Ahima, R. şi colab.*, 1997, *Friedman, J. şi colab.*, 1998).

S-a emis ipoteza conform căreia leptina ar putea stimula secreţia hormonilor gonadotropi prin acţiunea asupra anumitor neuroni hipotalamici, sau secreţia de gonadotropine de către hipofiza anterioară (figura 13).Având astfel influenţă considerabilă asupra funcţiei de reproducţie, atât la animale, cât şi la om (*Bruneau, G. şi colab.*, 1999).

Secreţia leptinei de către ţesutiul adipos se realizează în mod pulsatil, similar modului de secreţie a hormonilor axei hipotalamo – hipofizare. De asemenea, s-a demonstrat că o creştere normală a testosteronului, la pubertate, la băieţii tineri, apare ca urmare a unei creşteri în secreţia de leptină (*Issad, T. şi colab.,* 1998).

De asemenea, s-a constatat că indivizi cu constituţie ectomorfă au leptina circulantă preponderent sub formă legată, în timp ce la indivizii obezi leptina este sub forma liberă, nelegată.

Nivelul leptinei la om este în legatură directă cu pubertatea şi cu sexul indivizilor, acesta fiind de 2-3 ori mai mare la bărbat decât la femeie.

Modificările în masa ţesutului adipos sunt în legătură cu nivelul circulant al leptinei care poate varia între 0,03 – 100ng/ml *(Zanagiara N. şi colab., 2000)*. Scăderea masei adipoase duce la scăderea nivelului circulant al leptinei, în timp ce acumularea de ţesut gras în organism duce la creşterea concentraţiei leptinei circulante (figura 13) .

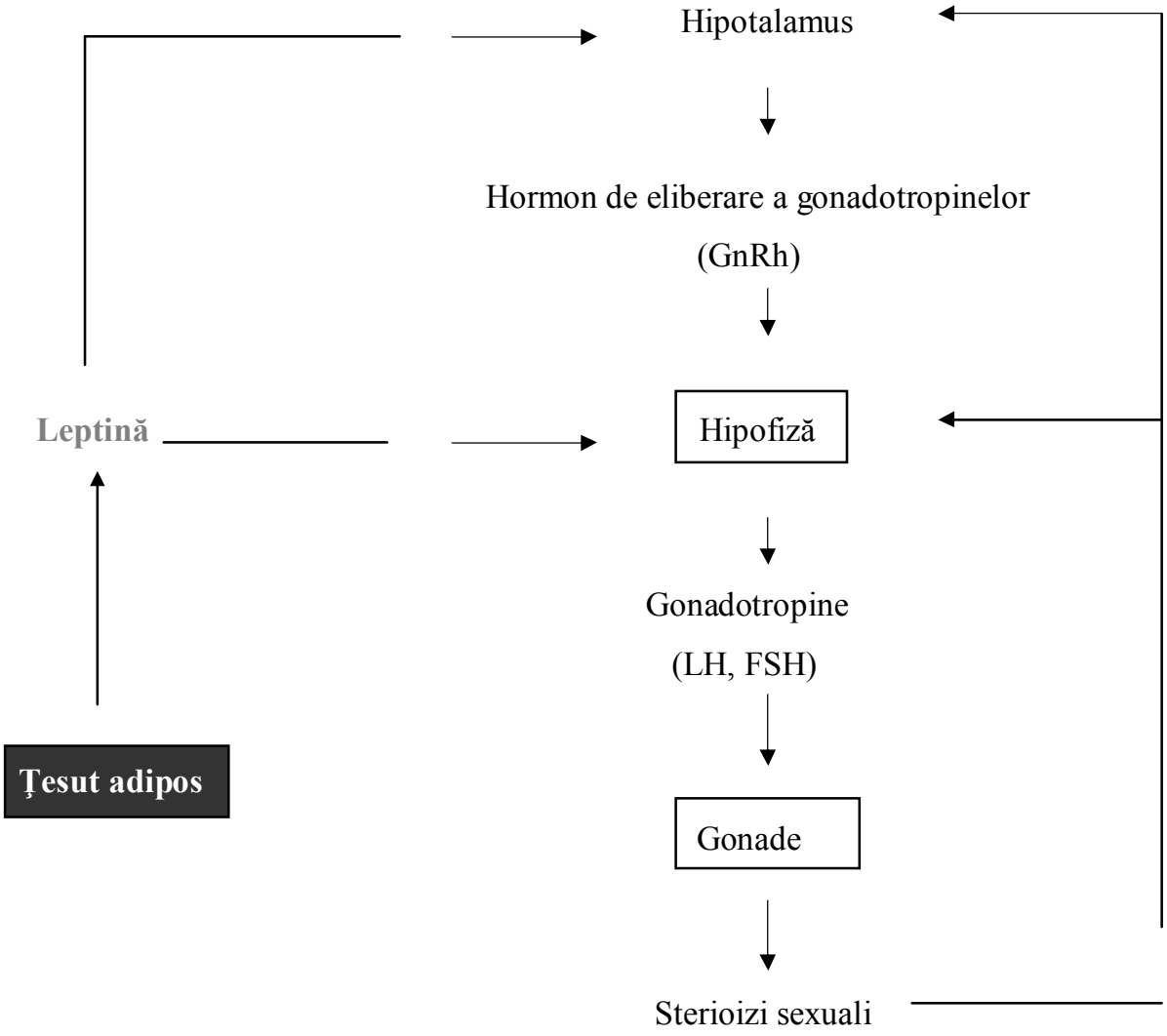


Fig. 13. Reprezentarea schematică a axei hipotalamo – hipofizo – gonadică (după *Issland, T. şi colab.,* 1998)

Fig. 13. *The pattern of the hypothalamo –pituitary – gonade axis a (according to Issland, T. et al.1998)*

Cercetări efectuate la taurine (*Williams, G.L. şi colab.,* 2002) au demonstrat faptul că activitatea genei leptinei şi concentraţia serică a leptinei cresc înainte de instalarea

pubertăţii la viţele, fenomen ce ar putea fi explicat prin capacitatea leptinei exogene de astimula secreţia LH.Leptina joacă un rol important şi în sinteza glicogenului, transportul glucozei şi dispoziţia lipidelor în muşchi (*Margetic şi colab.*, 2002).

Cu cât adipocitele devin mai mari, cu atât va fi prezentă o cantitate mai mare de ARNm a leptinei (*Auwerx J., şi Staels B.*, 1998; *Masuzaki şi colab.*, 1995), iar concentraţia de leptină circulantă periferică va fi mai crescută. Leptina este intens studiată pentru rolul ei în obezitate şi la reglarea apetitului *(Ahima R., şi Flier S., 1997*). Leptina intervine şi în comportamentul alimentar ,semnalul primit de la receptorii tractului gastro –intestinal este trimis la creier, de nervii aferenţi vagi, astfel leptina controlează producţia de neuropeptide fiind vorba de reglarea unui comportament alimentar de termen lung. Leptina este produsă de adipocite şi traversează bariera hemato-encefalică şi se fixează de receptorul Ob-Rb la nivelul hipotalamusului.

Legătura dintre acest hormon al saţietăţii, care diminuează senzaţia de foame, va controla producţia de hormoni secretaţi de receptorii neuronali (NPY, AgRP,MCH, POMC, CART) *(Havel J. P., 1999).* Şoarecii homozigoţi pe gena ob (ob/ob) sunt subiecţii experimentali pe care s-a descoperit leptina, ei sunt deficienţi în leptină şi supraponderali. Atât deficienţa în leptină cât şi rezistenţa la leptină – determinată de o concentraţie scăzută în receptor (la şoarecii db/db defectivi în receptor al leptinei) se caracterizează prin hiperfagie şi scăderea cheltuielilor energetice.

3.4.FACTORII CARE INFLUENŢEAZĂ PRODUCŢIA DE LEPTINĂ

3.4. FACTORS INFLUENCING THE LEPTINE PRODUCTION

Există o serie de factori ce au influenţă asupra producţiei de leptină. Cercetările (*Chilliard Y. şi colab.,* 1999) demonstrează că unul dintre cei mai importanţi este nivelul alimentar. Astfel, atât la rumegătoare, la rozătoare cât şi la om, o subalimentare conduce la scăderea leptinemiei şi la creşterea acesteia odată cu administrarea unei alimentaţii normale.

Prin stimulii nervoşi determinaţi de lipemie şi nivelul ARNm al leptinei în ţesutul adipos, trimişi la nivel hipotalamic, se crează un mecanism de feed-back prin care este reglat nivelul hormonului, prin mecanisme specifice de acţiune ale sistemului nervos vegetativ *(Taniguchi Y., şi colab., 2002).* Administrarea GH conduce la creşterea nivelului ARNm al leptinei în ţesutul adipos, iar administrarea zeranolului (anabolizant estrogen) conduce la scăderea acestuia (*Raymond şi colab.*, citaţi de *Chilliard Y. şi colab.,* 1999).

Glucocorticoizii conduc la creşterea nivelului ARNm al leptinei în ţesutul adipos, iar insulina are efect indirect prin acţiunea de potenţare a influenţei glucocorticoizilor (*Hardie w., şi colab.*, 1996 citati de *Chilliard Y. şi colab.,* 1999).

Deşi leptinemia şi insulinemia variază în acelaşi sens, datorită corelaţiei acestora cu bilanţul nutritiv şi efectelor potenţatoare ale insulinei, asupra hormonilor glucocorticoizi, nu s-a putut stabili o legătură directă între modul de variaţie al acestora (*Saladin R., şi colab.*, 1999 citati de *Chilliard Y. şi colab.,* 1999).

S-a emis ipoteza influenţei fotoperioadei (*Chilliard Y. şi colab.,* 1999; *Bocquier. F. şi colab.,* 1998) asupra metabolismului ţesutului adipos şi a nivelului de exprimare a genei leptinei. Acest efect este independent de nivelul raţiilor administrate şi de nivelul de îngrăşare.

Factorii care reglează producţia de leptină la rumegătoare şi modul cum acţionează aceştia sunt prezentaţi în figura 14.

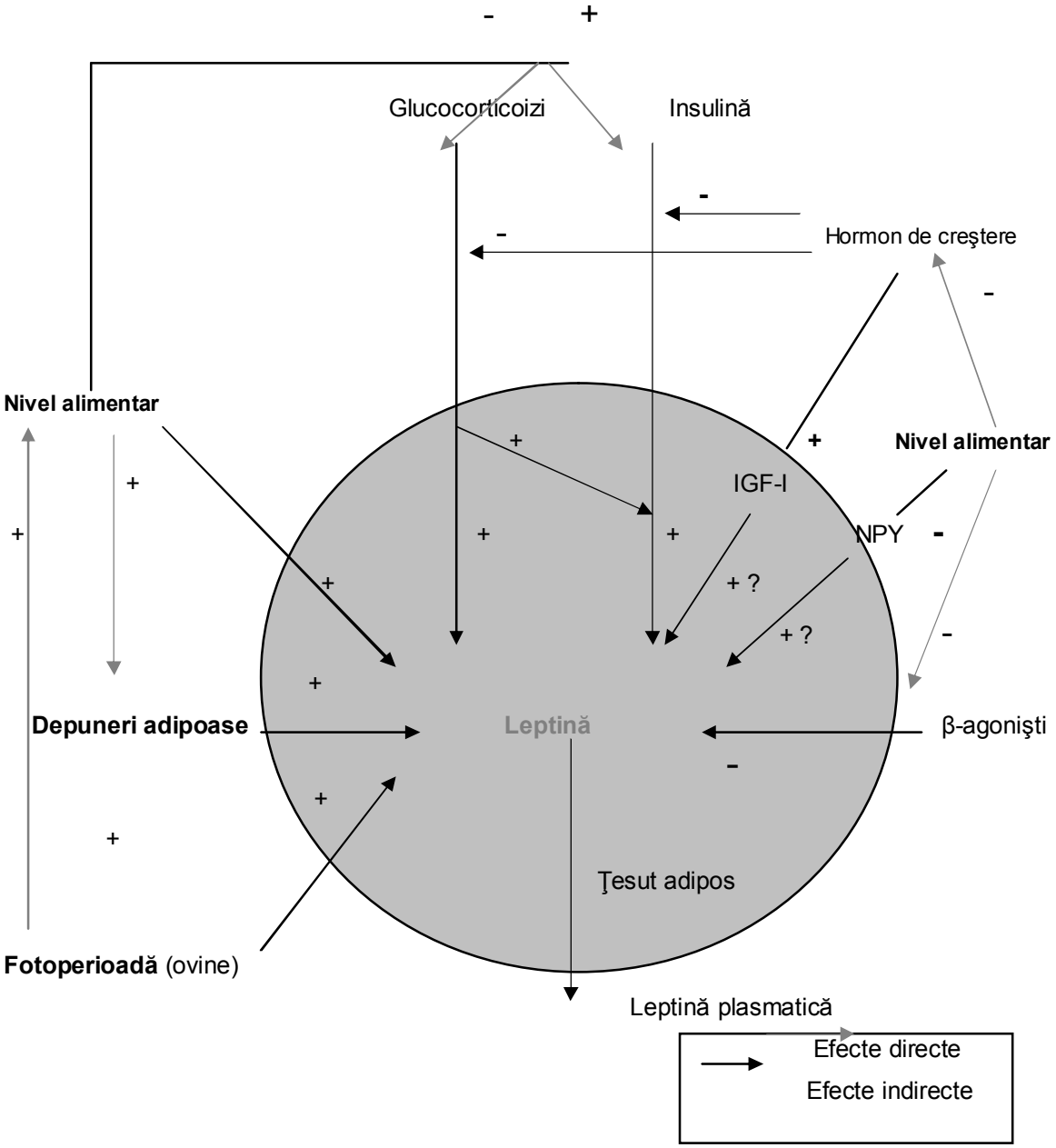


Fig. 14. Factorii care reglează producţia de leptină la rumegătoare (după de *Chilliard Y. şi colab.,* 1999)

Fig. 14. *Factors regulating the leptine production in ruminants (according to Chilliard Y. et al. 1999*)

3.5.CERCETĂRI PE PLAN MONDIAL PRIVIND NIVELUL DE EXPRESIE ŞI POLIMORFISMELE GENEI LEPTINEI LA TAURINE

3.5. WORLWIDE RESEARCH CONCERNING THE LEPTINE EXPRESSION LEVEL AND POLYMORPHISMS IN CATTLE

În identificarea expresiei unei gene se utilizează tehnica revers transcripţiei, o metodă de determinare semicantitativă.

Această tehnică, de înaltă sensibilitate, a fost utilizată cu succes în determinarea nivelului de expresie a genei leptinei în ţesutul adipos, prin comparare cu expresia unei gene menajere (housekeeping gene), care are nivel de expresie constant la fiecare individ.

Dyer, C.J. şi colab. 1997 au izolat ARNm ce codifică transcriptul receptorului ObRb pentru evidenţierea produşilor reverstranscripţiei, generaţi de pe ARN total extras din ţesutul adipos, hipotalamus şi hipofiza anterioară, ţesuturile unde se găsesc aceşti receptori. Primerii folosiţi pentru această cercetare au fost:

5’ - CC GAA ACR TTT CAG TTT ACG CAT CT - 3’

5’ – CAA AAG CAC ACC ACT CTC TC - 3’

Amplificarea s-a efectuat prin PCR, iar produşii de electroforeză au fost vizualizaţi în gel de agaroză prin colorare cu bromură de etidiu (figura 15).

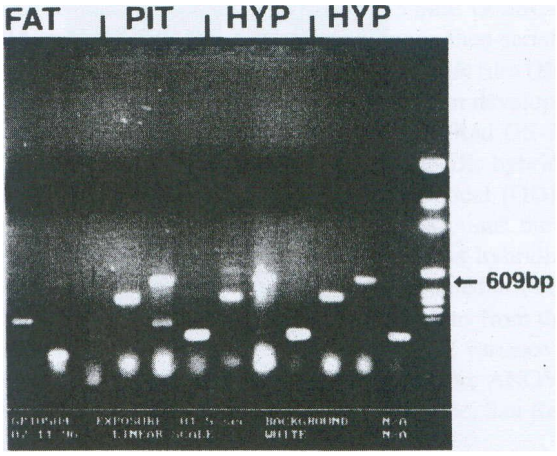


Fig. 15. Detecţia ObRb prin RT – PCR (după *Dyer, C.J. şi colab.*,1997)

Fig. 15. *The ObRb detection by RT – PCR (according to Dyer, C.J. et al.1997)*

Dimensiunea aşteptată a produsului PCR, a receptorului genei leptinei (ObRb), este de 609 pb.

Determinări cantitative ale prezenţei ARNm al genei leptinei în ţesutul adipos fetal prin reacţia de revers transcripţie , la oile gestante, au fost realizate şi de *Yuen, B.S.J. şi colab.,* 1999.

ADNc s-a obţinut prin revers transcripţia a 2 µg ARN total cu o secvenţă hexanucleotidică, utilizându-se kit-ul *(La Roche)* 18053-017 .

Fragmentul a fost amplificat prin PCR: în 26 de cicluri, 60 secunde la 94^0C, 15 secunde la 53^0C şi 60 secunde la 72^0C. A fost utilizată enzima Taq polimeraza, iar primerii aveau următoarea secvenţă:

5’ - GACATCTCACACACGCAG - 3’

5’ – GAGGTTCTCCAGGTCATT - 3’

Produşii rezultaţi au fost supuşi electroforezei şi vizualizaţi prin colorare cu bromură de etidiu (figura 16).

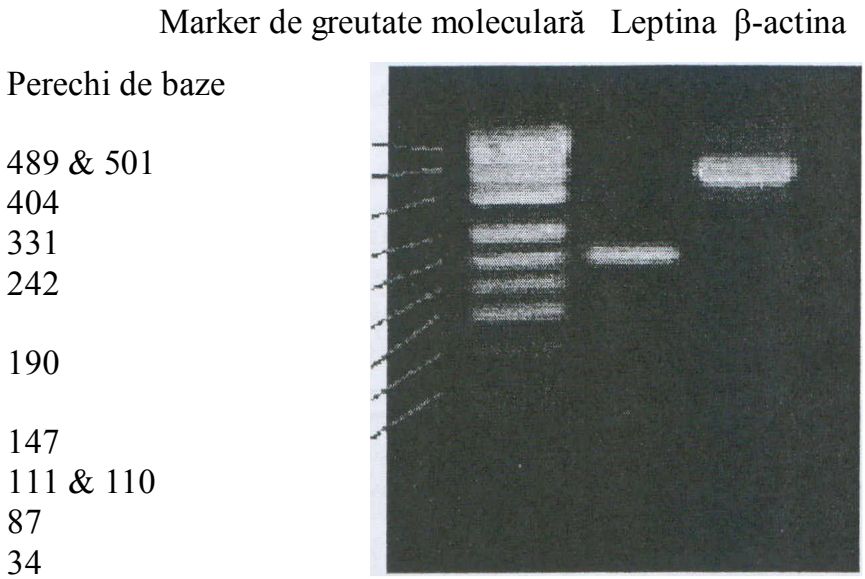


Fig. 16. Produşii RT-PCR în gel de agaroză
(după *Yuen, B.S.J. şi colab.,* 1999)

***Fig. 16**. The RT-PCR products in agarose gel*
(according to Yuen, B.S.J. et al. 1999)

Fiecare produs al genei leptinei, rezultat în urma revers transcripţiei a avut dimensiuni de 190 pb, foarte apropiat de valoarea anticipată de 183 pb. *(Yuen, B.S.J. şi colab.,* 1999). La ovine, s-a stabilit o corelaţie pozitivă între cantitatea relativă a ARNm al genei leptinei din ţesutul adipos fetal şi greutatea corporală la oile mame aflate între ziua a 90-a şi 144-a de gestaţie.

Ren M.Q. şi colab. 2002, într-un studiu privind evaluarea comparativă a nivelurilor ARNm ale genei ce codifică leptina la taurinele de lapte, din rasa Holstein german şi taurinele de carne din rasa Charolaise, au determinat cu ajutorul RT-PCR transcriptul genei ObRb la nivel hipotalamic, comparativ cu ARN ribozomal 18S .

ADNc s-a obţinut prin revers transcripţia a 1 µg ARN total, iar fragmentul a fost amplificat prin PCR: 10 minute la 25^0C, 10 minute la 42^0C şi 60 minute la 99^0C. Pentru amplificarea ADNc a fost utilizată enzima Taq polimeraza, iar primerii utilizaţi au fost:

5' - CATCTCACACACGCAGTCCG - 3'

5' – CTGCCGCAACATGTCCTGTA - 3'

Vizualizarea produşilor în gel de agaroză s-a realizat cu bromură de etidiu (figura 17), sunt reprezentaţi produşii receptorilor genei leptinei la rasele Holstein german şi Charolaisse, lucru evidenţiat de *Ren M.Q.* şi colaboratorii în 2002.

GH CHA

18S ARNr

ObRb

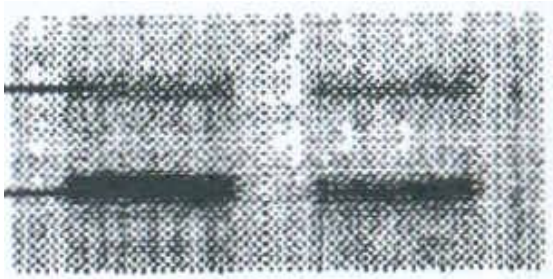


Fig.17. Produşii genei ObRb din hipotalamus la taurine din rasele Holstein german şi Charolaisse (după *Ren M.Q. şi colab.*, 2002)

Fig.17. *The hypothalamus ObRb gene products in German Holstein and Charolaisse cattle (according to Ren M.Q. et al.2002)*

Identificarea expresiei genei receptorului leptinei ObRb în hipotalamus a contribuit la întărirea convingerii că hipotalamusul joacă un rol cheie în secreţia leptinei.

Au fost efectuate studii (*Smith, J.L. şi colab.*, 2002) în vederea evidenţierii producerii de leptină şi la nivelul celulelor epiteliale ale ţesutului mamar la taurine.

ARNm a fost extras din ţesutul mamar bovin şi celule mamare bovine, aflate în cultură şi supus revers transcripţiei cu primerii:

5' – CACTACCATGGAGAAGGTGG - 3'

5' - GTGGTTCACGCCCATCACA - 3'.

Amplificarea s-a realizat prin PCR şi vizualizarea produşilor s-a efectuat în gelul de agaroză, după colorare cu bromură de etidiu.

Pentru stabilirea de corelaţii între concentraţia leptinei circulante şi caracteristicile carcasei, s-au făcut studii la două loturi de vaci hrănite asemănător *Buchanan S., şi colab.,(2002*).

Concentraţia serică a leptinei a fost corelată pozitiv cu grăsimea intercostală (P < 0,001) (r = 0,32), scorul de marmorare (r = 0,18), dar şi cu sporul mediu zilnic (r = 0,28).

Geary şi colab., 2003, găsesc de asemenea, concentraţia serică a leptinei corelată puternic cu compoziţia carcasei dar şi cu calitatea carcasei.

Într-un studiu efectuat între anii 2002 – 2003 în Belgia, a fost testată influenţa regimului furajer şi efectul rasei asupra producţiei de leptină la rasele Blanc-Bleu-Belge, Limousine şi Angus. Regimul furajer utilizat (orz/porumb, sfeclă) nu a avut o influenţă notabilă asupra valorilor leptinei din plasmă, dar nici asupra expresiei genei leptinei sau a receptorului ei în ţesutul adipos.

Sporul mediu zilnic la cele trei rase (grupate în două loturi), hrănite fiecare fie cu orz, fie cu sfeclă, a fost foarte apropiat. Rasa Angus a consumat o cantitate puţin mai mare de furaje şi implicit indicele de consum a fost superior faţă de Blanc-Bleu-Belge şi Limousine.

Performanţele la sacrificare au fost net superioare la Blanc-Bleu-Belge (randamentul carcasei, procentul de musculatură mai mare, iar procentul de ţesut conjunctivo-adipos mai mic) comparativ cu celelalte două rase(*Geary şi col*, 2003). Carnea obţinută de la rasa Blanc-Bleu-Belge a fost mult mai slabă decât la rasa Aberden-Angus, la care conţinutul intramuscular în lipide este de patru ori mai mare. Procentul de proteină din muşchi urmează o evoluţie inversă, fiind superior la Blanc-Bleu-Belge faţă de Limousine şi Aberden-Angus *(Klauzinska M. şi colab., 2000).*

Concentraţia plasmatică a leptinei a fost scăzută la Blanc-Bleu-Belge comparativ cu celelalte două rase, dar diferenţele nu au fost semnificative. Expresia genei leptinei în

ţesutul adipos a fost însă foarte semnificativă la Blanc-Bleu-Belge (P ≤ 0,01) faţă de celelalte două rase. Acelaşi lucru s-a constatat şi în cazul receptorului leptinei.

Procentul de ţesut conjunctiv şi adipos şi procentul de osatură este mai scăzut la Blanc-Bleu-Belge decât la Limousin sau Aberden-Angus. Nu s-au evidenţiat diferenţe notabile în ceea ce priveşte conţinutul în colesterol al cărnii între cele trei rase (*Geary şi col*, 2003.). Corelaţia între concentraţia plasmatică şi expresia genei leptinei a fost pozitivă (r = 0,61), pe când corelaţia între concentraţia plasmatică a leptinei şi receptorul său a fost foarte scăzută (r = 0,18).

Între expresia genei leptinei şi expresia receptorului său s-a stabilit o corelaţie medie (r = 0,37). Pe de altă parte au fost efectuate şi măsurători asupra carcasei. Procentul de ţesut adipos din carcasă şi expresia genei leptinei sunt puternic şi pozitiv corelate (r = 0,75) la cele trei rase luate în studiu. Pe de altă parte, corelaţia între acelaşi caracter (procentul de ţesut adipos în carcasă) şi expresia receptorului genei leptinei nu influenţează prea mult compoziţia carcasei (r = 0,36). Corelaţiile între diferite măsurători ale leptinei (în ţesut adipos sau plasmă) şi procentul de lipide intramusculare prezintă un profil similar, stabilindu-se o corelaţie slab pozitivă de r = 0,27 între procentul de lipide intramusculare şi concentraţia plasmatică a leptinei, în timp ce acest procent are o corelaţie puternic pozitivă cu expresia genei leptinei în ţesutul adipos (r = 0,61) şi mult mai slabă cu expresia receptorului (r = 0,30) în acelaşi ţesut (*Buchanan şi colab., 2002*).

Unii cercetători au găsit existenţa unei legături între leptina circulantă şi depunerile de ţesut adipos la taurine *(Konofort B., 1999)* .În experimentul realizat de aceştia la hibrizii Wagyu, comparativ cu taurinele continetale de rasă pură, au constatat existenţa unei variaţii a concentraţiei leptinei serice în funcţie de rasă. Legătura dintre acumularea de lipide şi leptina plasmatică poate fi considerată ca parte a feed-back-ului ce reglează consumul de hrană, influenţând performanţele taurinelor şi conţinutul de lipide din ţesutul muscular *(Wenger J. şi colab.* 2000).

În ceea ce priveşte polimorfismele identificate la nivelul secvenţei nucleotidice a genei leptinei ele pot fi asociate cu diferite caractere cantitative sau calitative cu o deosebită importanţă economică. Leptina a fost cartată la bovine pe cromozomul 4 (*Stone şi colab.,1996*), unele din polimorfismele din regiunea codificatoare a genei leptinei la

taurine au fost asociate cu concentraţia serică de leptină (*Leiffers S.C., şi colab.,2003*), calitatea producţiei de lapte (*Leiffers S.C., şi colab.,2002 , Oprzadek şi colab.,2003*), dar şi cu depunerile de grăsime (*Buchaman şi colab.,2002, Nkrumah şi colab. 2004)* .

Polimorfismul 252 SNP, la nivelul regiunii codificatoare a genei leptinei a fost asociat pozitiv cu consumul de hrană la bovine din rasele Charolaise şi Holstein (*Lagonigro şi colab., 2003*).

Deşi polimorfismele genei leptinei au fost descrise la bovine (*Pomp şi colab., 1997; Fitzsimmons şi colab., 1998; Haegeman şi colab., 2000*), la fel ca şi asocierile acesteia cu depunerea de grăsime la rasele de carne (*Fitzsimmons şi colab., 1998*), totuşi nu au fost încă efectuate multe studii legate de asocierile acestor polimorfisme la vacile de lapte. *Lindersson M. şi colab. 1998,* au identificat loci ai însuşirilor cantitative (QTL – Quantitative Trait Loci) asociaţi cu producţia de lapte, în vecinătatea genei leptinei, la o distanţă de 82,8 cM. Ei au găsit alţi QTL pentru calitatea producţiei lactate (grăsime şi proteină) la 65 şi 85 cM de locusul leptinei iar la 62 şi respectiv 95 cM, locii microsateliţii BM1500 şi BM1501 microsateliţi, nefiind însă stabilită transmiterea linkată a acestora (*Lien şi colab. 1997*) şi (*Stone R. şi colab. 1996*).

Într-un studiu efectuat la taurine, asupra genei leptinei, s- a evidenţiat prezenţa a trei alele A, B, C şi s-au găsit mai multe polimorfisme de tip RFLP, evidenţiate cu diferite enzime de restricţie (*Sau3AI, Bsa AI, Kpn2)*. Aceste polimorfisme ale genei leptinei controlează mai ales însuşirile carcasei, asociindu-se, la indivizii homozigoţi AA, , cu un consum sporit de hrană, în comparaţie cu indivizii heterozigoţi AB şi AC (*Oprzadek, J. şi colab., 2003*) .

Într-un alt studiu au fost evidenţiate alte trei polimorfisme, de tip SNP (Single Nucleotide Polymorphism) abreviate: USAMS1, USAMS2 şi USAMS3, localizate în poziţiile 207 cu substituţia (C/T) , 528 cu substituţia (C/T) şi 1759 cu substituţia (G/C), din combinarea cărora pot rezulta următoarele genotipuri: CC, CT, TT pentru USAMS1, USAMS2 şi CC, CG, GG pentru USAMS3 .Alela T a fost asociată cu concentraţia serică de leptină, superioară la genotipurile TT şi TC, comparativ cu genotipurile CC. Acest polimorfism – USAMS2, determinat de substituţia unei singure nucleotide din regiunea promotor a genei leptinei de la bovine, a fost asociat atât cu concentraţia leptinei

circulante cît şi cu greutatea corporală, cantitatea de hrană ingerată, dar şi cu alte caractere importante la taurine, cum ar fi producţia de lapte şi compoziţia laptelui, ceea ce ar putea avea un impact pozitiv în selecţia asistată de markeri genetici la taurine (*Nkrumah, J.D. şi colab., 2004).*

Yang G. şi colaboratorii săi (2007) au efectuat studii de asocieri dintre polimorfismele genei leptinei , greutatea corporală şi indici de mărime corporală la bovine indigene din China; indivizii cu genotipul homozigot BB, prezentând un spor mediu zilnic superior şi o greutate corporală mai mare decât indivizii cu genotipurile AA şi AB.

Polimorfismul genei leptinei a fost studiat la taurinele din rasa Holstein – Friză şi pe parcursul studiilor au fost înregistrate următoarele însuşiri: producţia de lapte, cantitatea de grăsime, proteină şi lactoză, procentele de grăsime, proteină şi lactoză din lapte, consumul de furaje, echilibrul energetic şi greutatea în viu, în vederea stabilirii de asocieri (*Leifers şi colab., 2002).*

Cu tehnica *PCR-RFLP/ Sau*3AI (*Pomp şi colab., 1997) şi PCR-RFLP/ HphI şi Sau3AI* (*Haegeman et al., 2000; Leifers şi colab., 2002*) şi prin tehnica SSR (microsateliţi) (*Fitzsimmons et al., 1998)* au fost evidenţiate *t*rei polimorfisme la locusul genei leptinei.

Amplificarea a fost realizată prin PCR în volum final de reacţie de 20-μl: $MgCl_2$ 1,5 m*M*, dNTP 200 μM, primer 0,3 μM, Tris HCl 10 m*M* şi KCl 50 m*M*.

În cazul RFLP1, alela A nu este digerată de enzima de restricţie.

Polimorfismul RFLP1, este localizat în intronul situat între primii doi exoni ai genei leptinei şi în exonul 2 al genei leptinei *(Leiffers şi colab., 2002*). Reacţia PCR descrisă de (*Pomp şi colab.(1997*) nu conduce la rezultatele scontate datorită artefactelor benzilor care dau acest polimorfism, iar ultimele benzi, care au greutate moleculară mică, nu sunt foarte bine vizibile în gelul de agaroză.

Polimorfismul RFLP 2 este situat în exonul 3 al genei leptinei (*Haegeman şi colab., 2000)* şi *(Lien şi colab., 1997)* este produs de înlocuirea aminoacidului alanina cu valina. Ambii aminoacizi aparţin grupei aminoacizilor alifatici, dar valina este mai hidrofobă.

Datorită faptului că protocolul propus de *Pomp şi colab.* nu a dat rezultate foarte bune, au fost concepuţi primeri noi de echipa *Leifers şi colab., 2002*:

5′-TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT-3′;
5′-GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT-3′

Aceasta, a avut drept rezultat un produs PCR de 400 pb. Pentru reacţia PCR a fost utilizată Taq polimerază 0,5 U şi 50 *ng/µl* ADN. Condiţiile PCR au fost următoarele, denaturare la 94°C, 2 min, 35 cicluri la 94, 55 şi 72°C (1 min fiecare) şi extensie finală la 72°C timp de 15 minute. Digestia produsului PCR cu 5 U din enzima *Sau*3AI peste noapte, la 37°C , a condus la obţinerea a doi produşi, unul de 100 pb, iar celălalt de 300 pb.

Haegeman şi colab.2000, au propus şi ei un protocol de evidenţiere a polimorfismului RFLP 2. Reacţia PCR a fost realizată cu 0,5 U Taq polimerază şi aproximativ 100 ng ADN genomic. Condiţiile PCR au fost următoarele: denaturare la 94°C, 2 min, 35 cicluri la 94 30 s, 55 1 minut şi 72°C 30 s şi extensie finală la 72°C timp de 15 minute.

Digestia produsului PCR cu 5 U de enzimă *HphI* la 37°C, peste noapte, a condus la obţinerea a doi produşi, unul de 311 pb, iar celălalt de 20 pb. În urma reacţiei PCR a rezultat o bandă artefact, care nu a interferat cu rezultatele obţinute, pentru că nu a fost digerată de enzimă.

În cazul evidenţierii polimorfismelor de tip microsatelit, primerii pentru locusul BM1500, localizat în aval de codonul stop, au fost cei descrişi de *Fitzsimmons şi colab. (1998*). După finalizarea reacţiei PCR, la 1 µl produs PCR, s-au mai adăugat: 0,5 µl soluţie tampon, 2 µl formamidă şi 0,5 µl ladder *M13*. Probele au fost denaturate 2 minute la 95°C , iar apoi au fost păstrate în gheaţă. Probele au fost migrate în gel de poliacrilamidă 6%, şi apoi introduse într-un secvenţiator ABI 373A timp de 1 h şi 30 min. Au fost detectate trei alele: de 136 pb (alela A), 144 (alela B) şi 146 pb(alela C). Frecvenţa alelelor obţinute cu ajutorul celor trei tehnnici este prezentată în tabelul 1.

Tabelul 1

Frecvenţele genotipurilor celor trei markeri

(*Fitzsimmons şi colab., 1998*)

Table 1

The frequencies of the genotypes of the three markers

(Fitzsimmons et al. 1998)

Genotipuri *Genotypes*	AA	AB	BB	AC	BC	CC
RFLP1	0,813	0,185	0,002	X	X	X
RFLP2	0,581	0,329	0,090	X	X	X
BM1500	0,230	0,381	0,126	0,126	0,086	0,051

Veerkamp R. şi colab. (2000) au demonstrat existenţa corelaţiilor dintre echilibrul energetic, producţia de lapte şi greutatea în viu la (taurine din rasa Holstein – Friză) şi una dintre mutaţiile de la locusul genei leptinei.

Cu ajutorul polimorfismului *RFLP 1* s-a demonstrat că vacile cu genotipul AB au producţia mai mare de lapte implicit şi cantităţi mai mari de proteină şi lactoză în lapte. Procentele de proteină şi lactoză din lapte diferă între genotipuri, dar echilibrul energetic nu este influenţat de nivelul leptinei *(Veerkamp R., 1995*).

În ciuda producţiei mari de lapte, la indivizii cu genotipul AB, evidenţiat prin RFLP 1, s-a înregistrat şi tendinţa de îngrăşare S-a emis ipoteza conform căreia această situaţie s-ar datora unor niveluri scăzute de leptină la acest genotip, care determină un consum sporit de hrană şi o cheltuială mică de energie.

Lindersson şi colab.(1998) au utilizat polimorfismele de tip microsatelit BM1500 şi BM1501 pentru a testa dacă aceşti loci pot fi definiţi ca loci QTL (Quantitative Trait Loci), cu influenţe asupra producţiei de lapte şi linkaţi cu locusul obezităţii.

Deşi nu au fost găsite asocieri în acest studiu, autorii nu exclud posibilitatea existenţei Locilor Caracterelor Cantitative, ceea ce este confirmat şi de faptul că doi microsateliţi sunt localizaţi la 2,5pb şi 3,6 pb în aval de secvenţa codificatoare a leptinei

şi nu flanchează polimorfismul *RFLP 1*; datorită acestui fapt este limitată posibilitatea identificării efectului *RFLP 1* asupra producţiei de lapte *(Ashwell M., şi colab., 2004).*

(Fitzsimmons şi colab. 1998) au stabilit asocieri între microsatelitul BM1500 şi depunerea de grăsime la taurine. În cazul markerului RM188 situat la 58,1 cM în amonte de locusul leptinei, a fost identificată o asociere cu longevitatea taurinelor , dar nu şi cu însuşirile producţiei de lapte (*Heyen şi colab., 1999).*

(Spelman şi colab. 1999) au identificat o asociere a markerului TGLA116 cu însuşiri de conformaţie exterioară, iar *Van Tassell (1999)* au detectat mai mulţi loci care afectează însuşirile producţiei de lapte, dar a găsit şi asocieri ale markerului BL21 dar cu lungimea sfârcului .

(Schrooten şi colab.2000) au găsit o asociere între durata gestaţiei şi markerii TGLA159 şi TGLA420 (17 cM), dar nu au fost găsite alte asocieri cu însuşiri funcţionale.

Nu este exclusă posibilitatea, ca gena responsabilă de unele dintre efectele detectate în mod uzual cu ajutorul acestor markeri, să fie de fapt o genă strâns linkată cu gena leptinei şi nu gena leptinei *Schrooten şi colab. (2000*).

Studii efectuate la taurine de carne din rasa Aberdeen Angus (*Tessane C. şi colab., 2007*) au urmărit evidenţierea polimorfismului la nivelul genei leptinei, datorită importanţei economice a acestei rase pentru însuşirile producţiei de carne.

Odată cu identificarea markerilor genetici polimorfici, pentru gena leptinei se identifică şi rolul jucat de leptină în procesele de depunere de grăsime, ceea ce va conduce la progrese importante în controlul genetic al conţinutului de grăsime al cărnii.

În acest fel, vor putea fi iniţiate şi realizate programe de selecţie ce vor utiliza locusului genei leptinei ca marker molecular în vederea asigurării selecţiei asistate de markeri. În urma aplicării acestor programe, va fi posibilă obţinerea de indivizi cu o carcasă mai slabă în care să predomine ţesutul muscular în detrimentul celui adipos şi carnea să aibă conţinut scăzut de grăsime în fibra musculară.

Pentru evidenţierea polimorfismului genei leptinei la rasa Angus, a fost utilizată metoda *PCR – RFLP* , iar primerii au fost următorii (*Tessane C. şi colab., 2007).*

5 ′- GGCTGGACGCAAAGGGCAGAGT - 3′;

5′ - CCCTGACGCCGCATTTCCCTA - 3′

Pentru reacţia PCR a fost utilizată 1 *µl* Taq polimerază, dNTP 125 M, 10 pmoli din fiecare primer şi aproximativ 100 ng/ *µl* ADN. Condiţiile PCR au fost următoarele: denaturare la 94°C, 2 min, 31 cicluri la 94, 58 şi 72°C (30 s fiecare) şi extensie finală la 72°C timp de 1 minut.

Digestia produsului PCR, cu *Hinf*I şi *Bsa*AI două ore la 37°C. Mixul de restricţie a conţinut 4 µl produs PCR 0,3 µl enzimă, 1 µl de tampon specific şi 4,7 µl apă.

La această rasă a fost identificată o mutaţie la situsul PCR-RFLP/*Hinf*I, fiind identificate două alele. Alela A a fost atribuită unui fragment de 170 pb şi alela B reprezentată de două fragmente, cu lungimi de 81pb şi respectiv 89 pb.

Produsul PCR a fost evidenţiat şi vizualizat în gel de agaroză după colorare cu bromură de etidiu. După determinarea genotipurilor au fost calculate frecvenţele alelelor care sunt redate în tabelul 2.

Tabelul 2

Frecvenţa alelelor A şi B (*Tessane, C. şi colab., 2007)*

Table 2

The frequency of the alleles A and B (Tessane, C et al. 2007)

Alela *Allele*	Frecvenţa superioară *Superiour frequency*	Frecvenţa Inferioară *Low frequency*	Frecvenţa Medie *Average frequency*
A	0,44	0,47	0,45
B	0,56	0,53	0,55

Rezultatele obţinute în urma experimentelor efectuate pe taurine de carne din rasa Angus au relevat necesitatea efectuării unor studii mai aprofundate care să includă

comparaţii între polimorfismele, identificate la nivelul genei leptinei şi concentraţiile leptinei în serul sanguin.

Experimente efectuate de către cercetători chinezi (*Yang, G. D. şi colab., 2007*), pe şase rase autohtone de taurine, au urmărit studiul polimorfismului la locusul genei leptinei, cu ajutorul tehnicii PCR – SSCP, precum şi stabilirea de asocieri între polimorfismul acestei gene şi indicii de greutate şi dimensiune corporală. Produsul PCR de 330 pb, a fost amplificat şi apoi supus tehnicii de secvenţiere. Pentru rasele analizate au fost identificate următoarele frecvenţe ale alelelor A/B: 0,558/0,442; 0,492/0,508; 0,571/0,429; 0,658/0,342; 0,591/0,409 şi 0,615/0,385.

În cazul indivizilor cu genotipurile BB, au fost identificaţi indici de masă corporală, superiori pentru genotipurile AA şi AB (lungimea corporală, greutatea corporală, sporul mediu zilnic). Aceste rezultate au condus la concluzia că, gena leptinei ar putea fi considerată genă candidată pentru anumite însuşirile de conformaţie- greutate corporală.

Polimorfismul identificat la nivelul genei leptinei a fost determinat de substituţiile,

G - T în poziţia 66 bp

A - C în poziţia 67 pb

G - T în poziţia 299 pb.

Lusk J.L. (2007) a realizat un studiu ce a vizat stabilirea de asocieri dintre polimorfismul punctiform de tip SNP, la nivelul genei leptinei, la taurine şi însuşirile: greutatea corporală şi stratul de grăsime.

Studii anterioare (*Schenkel E. şi colab. 2005*) au demonstrat existenţa unor diferenţe legate de unele însuşiri ale carcaselor (greutate corporală, însuşirile carcasei la sacrificare), la taurine acestea fiind asociate cu polimorfisme de tip SNP (polimorfismul dat de o singură nucleotidă), de la nivelul genei leptinei.

Cu toate acestea, sunt necesare mai multe studii pentru a pune în practică strategii de selecţie pe baza asocierilor dintre SNP, de la nivelul genei leptinei şi anumite însuşiri ale carcasei.

A fost investigat nivelul de asociere a 2 polimorfisme ale unei singure nucleotide (UASMS2 şi R25C), de la nivelul genei leptinei bovine, cu greutatea corporală şi grosimea stratului de grăsime.Variaţiile înregistrate la nivelul R25C- SNP nu au afectat parametrii de creştere, în timp ce variaţiile identificate la nivelul UASMS2/ SNP, au afectat semnificativ greutatea corporală şi grosimea stratului de grăsime.

Polimorfismul R25C-CC/UASMS2-TT la taurine a fost asociat cu cea mai mică grosime a stratului de grăsime. Indivizii cu genotipul R25C-CC/UASMS2-TT au prezentat cea mai rapidă rată de acumulare de grăsime, în timp ce indivizii cu genotipul R25C-CC/UASMS2-CC aveau cea mai redusă rată de creştere (*Schenkel, E. şi colab. 2005*).

Identificarea genelor candidat, asociate cu diferiţi loci ai caracterelor cantitative pentru producţia de lapte şi carne, reprezintă un mijloc de a promova criterii de selecţie mai eficiente în sectorul de creştere a animalelor.

Gena leptinei a fost studiată mult în ultimii ani, mai ales la vacă, şi a fost considerată a fi o genă candidat pentru producţia de lapte şi carne (*Nkrumah şi colab., 2005).*

Nivelul leptinei circulante şi al ARNm al leptinei, în ţesutul adipos, au fost corelate cu greutatea corporală, consumul de hrană, statusul nutriţional şi masa de ţesut adipos, la oameni şi animale (*Larsson H., şi colab., 1998, Delavaud şi colab., 2002*).

Polimorfismele din regiunile codificatoare ale genei leptinei la vacă au fost asociate cu concentraţiile de leptină provenită din serul sangvin (*Leiffers şi colab., 2003*), consumul de hrană (*Leiffers şi colab., 2002*, *Oprzadek şi colab., 2003*), cantitatea de lapte (*Leiffers şi colab., 2002, Buchanan şi colab., 200*3) si grăsimea corporala (*Buchanan şi colab., 2002, Nkrumah şi colab., 2004).*

Polimorfismele identificate la nivelul secvenţei nucleotidice a genei leptinei pot fi asociate şi pot anticipa diferite caractere cantitative sau calitative cu o deosebită importanţă economică.

Trei noi SNP-uri, UASMS1, UASMS2 si UASMS3 localizate în poziţiile 207 (substituţie C/T), 528 (substituţie C/T), respectiv 1759 (substituţie C/G) în regiunea promotorului genei leptinei bovine, au fost identificate de către *Nkrumah şi echipa sa*

(2005), fiind efectuate studii de asocieri cu concentraţia leptinei circulante, creşterea corporală, consumul de hrană şi dimensiuni ale carcasei.

Polimorfismul din poziţia 252 de tip SNP la nivelul regiunii codificatoare a genei leptinei a fost corelat pozitiv cu consumul de hrană la bovinele din rasele Charolaise şi Holstein. (*Lagonigro şi colab., 2003).*

Schenkel şi colab., 2005 semnalează prezenţa unor polimorfisme diferite ce au fost identificate la nivelul secvenţei nucleotidice a genei leptinei bovine E2FB (*Buchanan şi colab., 2002*), E2JW (*Lagonigro şi colab., 2003)* la nivelul exonului 2 si UASMS1, UASMS2 si UASMS3 (*Nkrumah şi colab., 2005)* în regiunea promotorului genei leptinei.

Produsul PCR rezultat în urma utilizării primerilor specifici PCR-RFLP, a fost digerat enzimatic cu enzimele de restricţie *Hinf*I si *BsaI,* polimorfismele la nivelul genei leptinei fiind determinate cu aparatul ABI 377 DNA. Sequencer Analyzer şi programul Genescan 672, fiind astfel combinată tehnica microsateliţilor cu tehnica PCR-RFLP; polimorfismele identificate au fost asociate cu caracteristici ale carcasei (*Tessanne si colab., 1999).*

Identificarea unor markeri polimorfici la nivelul genei leptinei ar putea influenţa favorabil studiile genetice pentru determinarea rolului leptinei în organism.

La locusul genei leptinei au fost studiate până în prezent prin tehnica PCR -RFLP cu ajutorul enzimelor de restricţie *Sau 3AI* şi *BSA AI* alelele A, B, C (*Oprzadek şi colab., 2003*), şi prin SNP alelele G şi T cu ajutorul enzimelor de restricţie *SAU 3AI , Kpn 2 şi Hinf I* (*Nkrumah şi colab., 2005*).

Polimorfismele la locusul genei leptinei au fost identificate prin tehnica PCR-RFLP cu ajutorul enzimei *BSA AI* şi au fost asociate cu conversia hranei, creşterea şi calitatea carcasei la indivizi din rasa Bălţată alb cu negru. Alelele genei leptinei, A, B si C au apărut în populaţia studiată cu o frecvenţă de 0,85, 0,07, respectiv 0,08, indivizii homozigoţi AA prezentând o greutate superioară a carcasei celorlalţi indivizi (*Oprzadek, 2003).*

Lien şi colab., 1997 într –un studiu la rasele de taurine din Norvegia , au identificat polimorfismul genei leptinei situat în intronul 2 şi exonul 3 al genei leptinei

prin SNP prin substituţia de tip, **G –A**. Amplificarea unui fragment de 522 pb din gena leptinei s-a făcut în următoarele condiţii de reacţie pentru 25 µl volum final, 100 µM dNTP mix,10 pmol din fiecare primer, 2,5µl 10x PCR Buffer, 1 unitate *Taq* ADN Polymeraza, 80 ng ADN taurine. Ciclul termic a fost următorul, denaturarea 5 min la 94^0C , 35 cicluri (94^0C timp de 15s, 64^0C timp de 30 s ,72^0C un minut) şi extensia finală 72 ^{0}C 5 minute. Produsul PCR a fost 522 pb a fost restrictat cu 5U enzimă de restricţie Bsa AI şi termostatat la 37 ^{0} C peste noapte. În urma digestiei ezimatice în gelul de agaroză 2 % se vor observa urmatoarele profile: pentru genotipul AA se va obţine un singur fragment de 522 pb, pentru genotipul GG se vor obţine fragmente de 441 şi 81 pb, iar pentru genotipul GA se vor obţine fragmente de 522, 441 şi 81 pb.

Primerii utilizaţi au avut următoarea secvenţă:

5 ′- GTCGGAGGCAAGGGCAGAGT - 3′;
5′ - CCACCACCTCTGTGGAGTAG- 3′

Polimorfisme de tip SNP la nivelul genei leptinei bovine au fost studiate de (*Buchanan şi colab.2002*, *Fitzsimmons şi colab. 1998* şi *Nkrumah şi colab. 2005*); unele din polimorfismele la locusul genei leptinei au fost asociate cu cantitatea grăsimii din carcasă (*Fitzsimmons si colab., 1998*), cantitatea de carne slabă si frăgezimea cărnii (*Schenkel şi colab., 2005),* cantitatea şi calitatea cărnii (*Kononoff şi colab., 2005*), consumul de hrană şi sporul mediu zilnic *(Nkrumah şi colab., 2005*) citaţi de *Lusk , 2007*.

Asocieri dintre genotipurile genei leptinei, greutatea corporală şi stratul de grăsime dorsală, reprezintă o modalitate de a identifica animale distincte genetic şi de a optimiza regimul de hrănire în concordanţă cu acestea, validarea unor astfel de metode reprezentând o potenţială aplicaţie în utilizarea informaţiei genetice în selectarea animalelor pentru perfecţionarea deciziilor de marketing.

Alela T este asociată la bovine cu un conţinut ridicat de grăsime în carcasă, iar alela C cu un conţinut redus de grăsime (*Buchanan si colab., 2002).*

De asemenea s-au efectuat studii pentru determinarea polimorfismelor genei leptinei şi la alte specii, cum sunt porcinele, care au condus la identificarea polimorfismului *XbaI,* localizat în poziţia 2845 a secvenţei genomice (*Bidwell şi colab., 1997*) şi o substituţie de tipul A/T, polimorfismul *BgAI*, localizat în poziţia 3996, fiind o substituţie C/T (*Bidwell şi colab., 1997*), polimorfismul *Hind III*, cauzat de o substituţie G/A, în poziţia 2728 *(Savell J.W. şi colab., 1998).*

Kennes şi colaboratorii săi (2001) afirmă că este posibil ca polimorfismele din poziţiile 2845 A -T şi 3469 T –C, să fie markeri genetici, în legătură cu alte polimorfisme în gena obezităţii, cu efect asupra caracterelor de producţie la suine, iar analizarea polimorfismelor la nivelul genei leptinei la porcine prin tehnica PCR-RFLP, a dus la identificarea polimorfismelor *MwoI 1792* şi *SmaI 5018 şi 5410*, genotipurile în aceste poziţii fiind asociate cu caracteristici pretabile pentru producţia unor preparate din carne.

Polimorfismele genei leptinei la om au fost asociate cu nivelurile scăzute ale leptinei circulante (*Hager şi colab., 1998*), greutatea corporală de la naştere (*Orbak şi colab. 2001*) şi obezitatea (*Ohshiro şi colab., 2000*).

PARTEA II: CERCETĂRI PROPRII

PART II (PERSONAL RESEARCH)

CAPITOLUL IV
SCOPUL ŞI OBIECTIVELE CERCETĂRII

CHAPTER IV
THE RESEARCH AIM AND OBJECTIVES

4.1. SCOPUL LUCRĂRII
4.1. THE AIM OF THE THESIS

Identificarea genelor candidat, asociate cu diferiţi loci ai caracterelor cantitative, pentru producţia de lapte şi carne, reprezintă un mijloc de a promova criterii de selecţie mai eficiente în sectorul zootehnic, în creşterea şi exploatarea animalelor de fermă.

Utilizarea genei leptinei ca marker ar putea dezvolta studiile pentru determinarea rolului leptinei în organism, iar asocierile dintre genotipurile genei leptinei, greutatea corporală şi stratul de grăsime dorsal, reprezintă o modalitate de a identifica genotipurile favorabile ale animalelor şi de a optimiza regimul de hrănire în concordanţă cu acestea.

Scopul acestei teze de doctorat a vizat studierea următoarelor aspecte: polimorfismele la locusul genei leptinei (genei obezităţii) la rasele de taurine Bălţată românească şi Brună de Maramureş, prin testarea a trei protocoale de genotipizare; testarea şi alegerea celei mai bune metode pentru obţinerea unui ADN extras din sânge în cantitate superioară şi de calitate foarte bună; secvenţierea genei la acest locus în vederea detectării eventualelor mutaţii apărute, a identificarea genotipurilor predispuse la îngrăşare şi a celor care produc carne de o foarte bună calitate (superioare calitativ din punctul de vedere al frăgezimii, suculenţei, marmorării), precum şi identificarea alelelor favorabile la acest locus.

Validarea metodelor de testare a polimorfismelor şi a celor de genotipizare şi implementarea lor în practica zootehnică de rutină, va putea constitui o potenţială aplicaţie a utilizării markerilor genetici în selectarea animalelor pentru perfecţionarea deciziilor de marketing zootehnic.

Prelevarea probelor biologice şi alegerea loturilor experimentale s-a realizat în perioada 15.02.2005 - 30.11.2007.

Testele PCR şi o mare parte a cercetărilor din cadrul temei de doctorat, au fost realizate în laboratorul de Genetică Animală al Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, iar o parte au fost efectuate şi în laboratorul Progenus S.A, Gembloux (Belgia).

4.2.OBIECTIVE METODOLOGICE ALE CERCETĂRII

4.2. METHODOLOGICAL OBJECTIVES

Tehnicile moleculare disponibile pentru studierea polimorfismului dintr-un genom vizează descoperirea mutaţiilor la nivelul situsurilor de restricţie prin tehnica *PCR-RFLP* sau depistarea polimorfismelor punctiforme din regiunile genice sau intergenice, denumite generic *SNP*. Aceste tehnici împreună cu cele ale amprentelor genetice, fac practic posibilă localizarea şi vizualizarea directă, la nivel molecular, atât a genelor responsabile de fenogeneza unui anumit caracter calitativ (monogenic), cât şi a sectoarelor de ADN, denumite generic markeri moleculari, care delimitează anumite gene majore sau anumiţi loci cantitativi, prezenţi în vecinătatea lor.

Alegerea unei tehnici în studierea polimorfismelor depinde de acurateţea rezultatelor obţinute, reproductibilitate, costuri şi echipamentele disponibile în laborator. În cazul cercetării noastre am ales studierea polimorfismelor de tip *RFL*P datorită disponibilităţii tehnicii în laborator, existenţei unei aparaturi de înaltă performanţă, costurilor relativ scăzute, existenţa literaturii de specialitate mai bogate şi a avantajelor

date de această tehnică, furnizarea markerilor codominanţi de tip *RFLP* ce pot fi urmăriţi în descendenţă, dar şi a reproductibilităţii ridicate.

Tehnica *PCR-RFLP* se bazează pe modificările unor secvenţe din ADN la nivelul situsurilor de restricţie. De regulă, aceste variaţii sunt cauzate de mutaţii punctiforme (substituţia unei nucleotide cu alta), inserţii sau deleţii în interiorul situsului de restricţie.

În acest fel, enzima de restricţie nu mai recunoaşte situsul respectiv şi nu mai realizează scindarea. Variaţia secvenţelor de tip *RFLP,* ne arată de fapt, un polimorfism de lungime a fragmentelor de ADN după tratare cu o enzimă de restricţie şi analiza electroforetică a lungimii fragmentelor. Polimorfismele de tip *SNP,* caracterizează un polimorfism punctiform prin detectarea mutaţiilor, determinate de substituţia unei singure nucleotide cu alta. Acest tip de polimorfism este cel mai frecvent întâlnit, fiind determinat fie de agenţi mutageni chimici, fie de greşelile din timpul replicării ADN. Şi tehnica *RFLP* detectează polimorfismul datorat unei singure nucleotide, dar la nivelul unui situs de restricţie. Diferenţa între *SNP* şi *RFLP* este că majoritatea acestor profile de tip *SNP* nu sunt recunoscute de către o anumită enzimă de restricţie.

Obiectivele acestei cercetări au constat în alegerea unei tehnici adecvate de studierea polimorfismelor în funcţie de acurateţea rezultatelor obţinute, reproductibilitate, costuri şi echipamentele disponibile în laborator, şi studiul polimorfismului la locusul genei leptinei, la indivizi proveniţi de la două rase de taurine autohtone ameliorate : rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş, testarea metodelor de extracţie a ADN pentru obţinerea unui ADN de calitate superioară folosit destinat testelor ulterioare; testarea protocoalelor disponibile pentru studiile de polimorfism genic, de tip *PCR/ RFLP* la locusul genei leptinei, care au fost ulterior optimizate, precum şi studiul polimorfismelor genice de tip *RFLP-Sau 3AI*, *RFLP-Mbo I* şi *RFLP- Bsa AI*, secvenţierea genei leptinei pentru studierea polimorfismului din situsul de restricţie, unde nu s-a realizat digestia enzimatică, cu enzima *Sau 3AI.*

În acest scop, a fost întocmit planul experimental al cercetării, luându-se în studiu un efectiv de 152 capete tineret taurin, provenit de la două rase de taurine autohtone ameliorate : rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş. Pentru realizarea studiilor de polimorfism au fost testate mai întâi metodele de extracţie a ADN pentru

obţinerea unui ADN de calitate superioară. Ulterior au fost testate trei protocoale disponibile pentru studiile de polimorfism genic, de tip *RFLP* la locusul genei leptinei, care au fost ulterior optimizate.Cu ajutorul celor trei protocoale s-au studiat polimorfismele genice de tip *RFLP-Sau 3AI*, *RFLP-Mbo I* şi *RFLP- Bsa AI*. Deoarece rezultatele cercetării au fost diferite la cele două rase pentru acelaşi protocol, cel propus de Leiffers şi echipa lui, s-a recurs la secvenţierea genei leptinei pentru studierea polimorfismului din situsul de restricţie, unde nu s-a realizat digestia enzimatică, enzima de restricţie în cazul *RFLP* fiind enzima *Sau 3AI.*

Clarificarea aspectelor legate de structura genetică la locusul genei leptinei, la rasele de taurine Bălţată românească şi Brună de Maramureş, sunt premisele pentru testarea de asocieri între polimorfism şi însuşirile producţiei de carne pentru stabilirea genei leptinei ca marker în selecţia asistată la nivel molecular, au constituit alt obiectiv al cercetărilor.

4.3.IMPORTANŢA CERCETĂRII

4.3. THE IMPORTANCE OF THE RESEARCH

La noi în ţară, printre puţinele studii efectuate asupra polimorfismului genei leptinei la animale, sunt cele efectuate de *Prof. Dr. Vlaic Augustin* la specia ovină, în cadrul unui proiect de cercetare internaţional, în care au fost determinate polimorfismele de tip *SNP* la 37 de loci, printre care şi polimorfismele din exonul 3 U43943 - 476G şi U43943 - 314G la rasa Ţurcană. Pe baza acestor polimorfisme s-a determinat diversitatea genetică la locusul *LEP1* ca fiind egală cu 0, iar a alelelor rare nedetectată. Pentru locusul *LEP2* diversitatea a fost 0,165, iar a alelelor rare - 0,089 *(www.econogene.eu-Econogene Consortium 2006, 2007*).

Leptina este intens studiată pentru rolul ei în obezitate şi în reglarea apetitului *(Ahima R., şi Flier S., 1997*). Leptina intervine şi în comportamentul alimentar; semnalul primit de la receptorii tractului gastro – intestinal este trimis la creier de nervii aferenţi vagi şi astfel leptina controlează producţia de neuropeptide (fiind vorba de reglarea unui comportament alimentar pe termen lung). Leptina este produsă de adipocite şi traversează bariera hemato-encefalică şi se fixează de receptorul Ob-Rb la nivelul hipotalamusului.

Legătura dintre acest hormon al saţietăţii, care diminuează senzaţia de foame, va controla producţia de hormoni secretaţi de receptorii neuronali (NPY, AgRP,MCH, POMC, CART) *(Havel J. P., 1999).*

Rata crescută a obezităţii în ţările dezvoltate se datorează în primul rând consumului de alimente hipercalorice, reducerii metabolice oxidative a acizilor graşi şi creşterii metabolismului carbohidraţilor, pe când în ţările în curs de dezvoltare obezitatea coexistă alături de subnutriţie, care este asociată preponderent taliei scăzute a indivizilor, această schimbare metabolică nefiind încă complet elucidată. De aceea, în studiul obezităţii trebuie luaţi în calcul şi alţi factori decât cei alimentari, în primul rând cei genetici.

Studiile efectuate până în prezent au demonstrat că la animalele domestice leptina intervine în reglarea apetitului şi a depozitelor de ţesut adipos, a funcţiei reproductive, dezvoltarea musculaturii, precum şi în reglarea balanţei energetice, motiv pentru care ne-am propus studierea acesteia şi la rasele româneşti de taurine, pentru elucidarea unor aspecte privind polimorfismele la nivel genic şi rolul pe care îl are leptina asupra caracteristicilor calitative ale cărnii. Acest studiu trebuie să clarifice o parte din întrebările pe care şi le adresează astăzi lumea stiinţifică referitoare la rolul acestei gene în formarea depozitelor de ţesut adipos şi influenţa produsului ei de sinteză - un hormon, asupra unor însuşiri ale carcasei.

Conform afirmaţiilor lui *Yang G., şi colaboratorii săi (2007*) care au efectuat studii de asocieri dintre polimorfismele genei leptinei, greutatea corporală şi indici de mărime corporală la bovine indigene din China, indivizii cu genotipul homozigot BB au prezentat un spor mediu zilnic superior şi o greutate corporală mai mare decât indivizii cu genotipurile AA şi AB. *Leiffers şi colaboratorii în anul 2002* a demonstrat,că polimorfismele identificate la nivelul secvenţelor nucleotidice, mai exact la nivelul exonilor şi intronilor din gena leptinei pot fi asociate cu diferite caractere cantitative sau calitative ale cărnii, care prezintă importanţă economică.

Prin ameliorarea taurinelor se urmăreşte mărirea capacităţii productive a raselor, iar selecţia se bazează în principal pe identificarea genotipurilor care corespund scopului prin care se face ameliorarea pe baza performanţelor de producţie.

Importanţa economică şi ştiinţifică a studierii speciei respective reiese din faptul că stabilirea genei leptinei ca marker ar putea influenţa favorabil studiile genetice pentru determinarea rolului leptinei în organism. Asocierile dintre posibilele genotipuri, greutatea corporală şi stratul de grăsime dorsal, reprezintă o modalitate de a identifica genotipurile favorabile şi de a optimiza regimul de hrănire în concordanţă cu acestea, deoarece până în prezent în ţara noastră , specia bovină, respectiv rasele de taurine Balţată românească şi Brună de Maramureş nu au mai fost genotipizate la locusul genei leptinei .

CAPITOLUL V
TESTAREA EFICIENŢEI METODELOR DE EXTRACŢIE ADN DIN SÂNGE DE TAURINE

CHAPTER V
TESTING THE EFFICIENCY OF THE DNA EXTRACTION METHODS FROM CATTLE BLOOD

Pentru realizarea unei amplificări PCR de bună calitate, cantitatea şi puritatea de ADN trebuie să fie adecvată. Cantitatea de ADN matriţă, adăugată într-o reacţie PCR, depinde de complexitatea ADN utilizat. În cazul organismelor cu genoame complexe, cum este cel animal, a cărui mărime este de 3,3 x 10^9 pb, o matriţă de 1 kb reprezintă doar 0,00003 % din cantitatea de ADN intrată în reacţie. Prin urmare, pentru obţinerea aceleiaşi cantităţi de produs PCR, de pe o matriţă de ADN de 1 kb în cazul genomului animal, este necesară o cantitate de aproximativ 1.000.000 ori mai mare decât în cazul ADN plasmidial bacterian. Reacţiile PCR cu o cantitate foarte mică de ADN matriţă la start vor avea şi o cantitate redusă de produs PCR, în timp ce în reacţiile cu cantitate de ADN matriţă în exces se vor produce şi amplificări nespecifice. Pentru o reacţie PCR calculul cantităţii de ADN matriţă care intră în reacţie porneşte de la un optim de 10^4

copii ale genei ţintă. Pentru reamplificarea produsului PCR se recomandă efectuarea unor diluţii seriale cu concentraţii cuprinse între 1:10 şi 1:10.000 (*Coşier, 2007*).

În acest studiu au fost testate mai multe metode de extracţie a ADN care au luat în considerare atât cantitatea matriţei cât şi puritatea ADN cu scopul de a alege metoda cea mai eficientă atât în ceea ce priveşte manopera utilizată, calitatea şi cantitatea obţinută, dar şi eficienţa acesteia. Pentru o reacţie PCR este suficientă o cantitate de ADN cu o concetraţie cuprinsă între 50-100 ng/µl, însă pentru o reacţie de secvenţiere sunt suficiente câteva ng de ADN, dar de puritate superioară.

Deoarece în testele *PCR- RFLP,* efectuate pe ADN extras de la mai multe rase, în cazul nostru ADN provenit de la două rase autohtone ameliorate (Bălţată românescă şi Brună de Maramureş), acelaşi protocol nu a dat aceleaşi rezultate pentru indivizi din rase diferite, probabil datorită unor mutaţii punctiforme apărute la unele rase. Din acest motiv a fost necesară secvenţierea genei, cu scopul evidenţierii mutaţiilor apărute în situsul de restricţie. Astfel că ne-a interesat în mod particular obţinerea unui ADN cu puritate mare cuprinsă între 1,8 şi 2, necesar reacţiei de secvenţiere şi eliminării artefactelor în amplificarea PCR.

5.1. MATERIALE ŞI METODE

5.1.MATERIALS AND METHODS

5.1.1.Materiale biologice

5.1.1.Biological materials

A fost prelevat sânge de la un efectiv total de 152 capete tineret taurin, de ambele sexe, cu vârste cuprinse între, 12 luni şi 20 luni, dintre care 88 capete sunt indivizi proveniţi din rasa Bălţată românească şi 64 capete indivizi proveniţi din rasa Brună de Maramureş, tineret taurin, masculi şi femele. Probele de sânge au fost recoltate din şase ferme din Transilvania, cuprinse în controlul oficial al producţiilor şi care continuă să fie un valoros rezervor de gene. Aceste ferme au fost: S.C. Agrozootehnica (Seini, Maramureş), S.C. Livada (Satu Mare), Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare), S.C.D.P.

Jucu aparţinătoare Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară (Cluj – Napoca), două ferme private din judeţul Cluj - ferma Corujan (Floreşti), ferma S.C. Crişan (Gherla).

Materialul biologic utilizat a constat din sânge, recoltat în condiţii aseptice, din vena jugulară cu ajutorul unor seringi cu ace groase care să permită penetrarea venei jugulare. În acest scop, au fost utilizate şi vacutainere pentru sângele prelevat de la indivizi proveniţi de la rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş.

Taxonomia. Regnul: Animalia; Subregnul: Chordata; Clasa: Mammalia; Ordinul: Artiodactyla; Familia: Bovidae: Genul: *BOS;* Specia: *Bos taurus.*

Cele două rase luate în studiu prezintă o serie de caracteristici specifice şi anume:

Rasa Brună de Maramureş este o rasă mixtă autohtonă, care s-a format în judeţul Maramureş, prin încrucişări dirijate ale raselor locale: Sura de Stepă şi vaca de munte – Mocăniţa, cu rasa Schwyz. Aria de răspândire este zona de deal - munte, din nordul Ardealului, nordul Moldovei şi Olteniei în întregime. Animalele au culoare brun – cenuşie. Greutatea corporală a vacii este între 500-550 kg, iar a taurilor între 700-850 kg. Este o rasă rezistentă care valorifică bine furajele, cu o producţie medie anuală de 5000 l lapte şi un procent mediu de grăsime de 3,7 %. Ameliorarea rasei se face prin selecţie şi încrucişări cu rasa Schwyz *(www.scholar google*).

Rasa Bălţată românescă, s-a format la început în Ardeal, apoi în Banat şi Bucovina, în jurul anilor 1860, având la bază rasa Sura de Stepă, prin absorţie cu rasa Siemmental, importată din ţările vest europene. În prezent, această rasă este răspândită în Banat, Bucovina, Ardeal şi în judeţul Botoşani. Animalele au culoare bălţat alb cu galben de diferite nuanţe, capul fiind de regulă alb ca şi picioarele, de la genunchi şi jarete în jos. Greutatea vacilor variază între 550-700 kg, a taurilor între 840-920 kg. Este o rasa de la care se obţine pe parcursul unui an, o producţie de lapte de 6000 l, în condiţii de furajare normală, cu un procent mediu de grăsime de 3,8 %. De asemenea, este recunoscută şi ca o rasă bună producătoare de carne. Pentru ameliorarea acestei rase, se folosesc pentru încrucişări, tauri din rasa Siemmental *(www.scholar google*).

5.1.2.Materiale chimice

5.1.2.Chemical materials

În această categorie de materiale chimice intră reactivii folosiţi în cadrul protocoalelor de lucru pentru extracţia ADN din sânge în cadrul celor trei metode utilizate în acest scop.

Pentru **Metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification** am utilizat următoarele materiale chimice existente în kitul achiziţonat de la firma Promega:

- soluţia de liză celulară;
- soluţia de liză a nucleilor;
- soluţia de precipitare a proteinei;
- izopropanol;
- etanol 70%;
- soluţia de rehidratare a ADN

Materiale şi consumabile :

- pipete (Eppendorf) cu volume reglabile de la 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl;
- tuburi (Eppendorf) de 1,5 ml;
- vărfuri de pipete de dimensiuni diferite (dimensiuni mari, medii şi mici), cu volume de 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl;
- vacuutainere (Nordic Invest) cu volume de 4 ml cu anticoagulant de tipul K_2EDTA;
- ace;
- seringi 4ml;
- alcool sanitar pentru dezinfectare.

Pentru **Metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine** se folosesc anumite materiale chimice, metoda nefiind bazată pe utilizarea unui kit, soluţiile trebuie preparate în laborator, acestea sunt :

- soluţie NE care conţine - NaCl 10mM
  - EDTA 10mM
  - pH 7
- soluţie A (50 µl) care conţine -200 mM NaOH
- soluţie B (50 µl) care conţine -200mM HCl,
  - Tris HCl 100mM
  - pH 8,5,
  - Tris-Hcl (10 ml) 1M
  - HCl (1,67 ml) concentrat
  - H_2O la volum final 100ml.

Materiale şi consumabile :

- pipete(Eppendorf) cu volume reglabile de la 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl
- tuburi (Eppendorf) de 1,5 ml
- vărfuri de pipete de dimensiuni diferite (dimensiuni mari, medii şi mici), cu volume de 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl
- vacuutainere (Nordic Invest) cu volume de 4 ml cu anticoagulant de tipul K_2EDTA
- ace
- seringi 4 ml
- alcool sanitar pentru dezinfectare
- apă sterilă

Pentru **Metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge** de taurine, cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation s-au utilizat următoarele materiale chimice existente în kitul achiziţonat de la firma La Roche:

Reactivii care se folosesc pentru extracţia ADN din sânge cu Kit MagNA Pure LC DNA Isolation sunt următorii:

- Wash Buffer I (100 ml)
- Wash Buffer II (60 ml)
- Lysis-Binding Buffer (100 ml)
- Proteinaza K (100 ml)
- Magnetic Glass Particles (MgPS) - (100 ml)
- Elution Buffer 100(ml).

Materialele şi consumabilele :

- RNA/DNA Stabilization Reagent for Blood/ Bone Marrow - (La Roche)
- MagNa Pure LC Reagent Tub (small) - (La Roche)
- MagNa Pure LC Medium Reagent Tub 20 - (La Roche)
- MagNa Pure LC Reagent Tub (large) - (La Roche)
- MagNa Pure LC Tub Lid (small, medium) - (La Roche)
- MagNa Pure LC Lid (large) - (La Roche)
- MagNa Pure LC Reaction Tip (large) - (La Roche)
- MagNa Pure LC Reaction Tip (small) - (La Roche)
- MagNa Pure LC Sample Cartridge - (La Roche)
- MagNa Pure LC Cartridge Seal - (La Roche)
- MagNa Pure LC Processing Cartridge - (La Roche)
- MagNa Pure LC Waste Bag - (La Roche)
- MagNa Pure LC Tip Stand - (La Roche)
- pipete (Eppendorf) cu volume reglabile de 100-1000 µl
- tuburi (Eppendorf) de 1,5 ml
- vărfuri de pipete de dimensiuni 100-1000 µl
- vacuutainere (Nordic Invest) cu volume de 4 ml cu anticoagulant K_2EDTA

- seringi 4ml
- ace
- alcool sanitar pentru dezinfectare
- apă sterilă

5.1.3 Aparatura utilizată

5.1.3.Equipment

- Agitator ultraturax (Helidolph)
- Aparat pentru produs gheaţă (Brema)
- Autoclav (Raypa)
- Baie marină (Fisher Bioblock Scientific polystat)
- Balanta analitica (Schimadzu AW 320M)
- Containere Biohazard pentru deşeuri (Brema)
- Deionizator de apă (Smeg WP 3000)
- Etuvă (Memmet)
- Hotă pentru chimicale (Kottermann)
- Hotă PCR (Steril)
- Microcentrifuge (Sigma 1-15)
- pH - metru (InoLab)
- Spectrofotometru UV-VISNano Drop ND-1000
- Robot MagNA Pure LC Instrument (La Roche)
- Vortex (Schimadzu).

5.1.4. Metode de extracţie a ADN din sânge

5.1.4. Methods of DNA extraction from blood

Pentru extracţia ADN din sânge de taurine am folosit trei metode de extracţie**,** metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA

Purification, metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine, metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation. Toate cele trei metode au tehnici diferite de extracţie a ADN din sânge.

A. Metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu Kitul manual Wizard Genomic DNA Purification

Pentru extracţia ADN cu această metodă, se utilizează ca material biologic 300µl de sânge de taurine şi se folosesc următoarele soluţii de extracţie, cuprinse în kit, după cum urmează: soluţia de liză celulară şi de liză a nucleilor, soluţia de precipitare a proteinei, izopropanol, etanol 70%, soluţia de rehidratare a ADN, pe parcursul mai multor etape şi cu utilizarea unor materiale şi consumabile specifice acestor metode descrise anterior. Pe parcursul aplicării metodei se folosesc anumite materiale şi soluţii descrise în protocolul de extracţie.

Etapele extracţiei ADN din sânge cu această metodă sunt următoarele**:**

Etapa I. Liza celulară

- 300 µl sânge se pun într-un tub Eppendorf de 1,5 ml;
- se adaugă 900 µl soluţie de liză celulară şi se amestecă prin răsturnare apoi se incubează 10 min la temperatura camerei;
- se centrifughează la 13000xG, 20 secunde;
- se îndepărtează supernatantul şi apoi se vortexează timp de 20 secunde;

Etapa II. Liza nucleilor şi precipitarea proteinelor

- se adaugă 300 µl soluţie de liză a nucleilor şi se amestecă prin răsturnare;
- se adaugă 100 µl soluţie de precipitare a proteinelor şi apoi se vortexează 20 secunde;
- se centrifughează la 13000XG, 3 minute;
- se transferă apoi supernatantul într-un tub care conţine izopropanol 300 µl şi se amestecă;

Etapa III. Precipitarea şi rehidratarea ADN

- centrifugare la 13000XG,1 minut;

- se îndepărtează supernatantul, se adaugă etanol 70% - 300 µl şi se centrifughează la 13000XG,1minut;
- se aspiră etanolul şi se lasă la uscat 10-15minute;
- se rehidratează ADN-ul în volumul corespunzător de soluţie de rehidratare timp de o oră la 65^0C sau peste noapte la 4^0C.

B. Metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine

Aceasta este o metodă de extracţie rapidă a ADN, din sânge care se diferenţieză de celelalte metode utilizate prin aceea că sângele care va fi supus extracţiei ADN trebuie să fie proaspăt recoltat. Dacă nu sunt îndeplinite aceste condiţii, riscăm să obţinem un ADN de o calitate şi cantitate inferioară, ceea ce conduce la imposibilitatea de a fi folosit în testele PCR. Soluţiile cu care se face extracţia ADN se prepară direct în laborator cu reactivi specifici. Se recoltează 200 µl, sânge din vena jugulară, de la indivizii aparţinând ambelor rase luate în studiu, Bălţată românească şi Brună de Maramureş.

Utilizarea acestei metode impune parcurgerea următoarelor etape:

- 200 µl sânge sunt pipetaţi într-un tub Eppendorf
- se execută o spălare cu soluţie NE care conţine (10mM NaCl, 10mM EDTA, pH 7), procedeul se repetă de trei ori , urmat de centrifugare la 14000 xG,10 secunde
- eliminare supernatant
- adăugare soluţie NE şi vortexare
- îndepărtare NE după ultima spălare
- adăugare 50 µl soluţie A care conţine (200 mM NaOH) şi vortexare
- plasare într-o baie de apă la 97^0C timp de 15 minute
- adăugare 50 µl soluţie B care conţine (200mM HCl, 100mM Tris HCl - pH 8,5, 10 ml Tris-Hcl 1M, 1,67 ml HCl concentrat şi H_2O până la 100 ml).

C. Metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge de taurine

Aceasta este una dintre metodele de extracţie a ADN din sânge, care oferă rezultate foarte bune, atât în ceea ce priveşte puritatea ADN dar şi cantitatea lui. Această metodă, se diferenţiază de celelalte două, prin faptul că sângele recoltat trebuie congelat în prealabil. Manopera este simplă deoarece necesită doar introducerea sângelui şi a consumabilelor în aparat, acesta efectuând extracţia ADN, însă metoda este costisitoare.

Extracţia se realizează în acest caz cu un aparatul MagNA Pure LC Instrument (La Roche), iar toată activitatea acestuia este monitorizată de un calculator care este prevăzut cu un soft special şi în care sunt introduse toate protocoalele de lucru cu care acest aparat lucrează (figura 18).

Fig. 18. Robotul de extracţie a ADN MagnaPure LC (LaRoche)

Fig. 18. *MagnaPure LC device for DNA extraction (LaRoche*)

În prima etapă se alege din calculator tipul de protocol cu care dorim să lucrăm, în cazul nostru am ales programul DNA Blood Cells High Performance, care permite extracţia de înaltă performanţă, a ADN din sânge.

Kitul de extracţie utilizat este suficient pentru 192 de izolări, iar aparatul execută câte o rundă de 32 de probe .

Această extracţie se realizează în mai multe etape:

1. Pregătirea aparatului şi setarea softului. Aparatul este prevăzut cu un soft instalat pe calculator prin care acesta controlează toate funcţiile pe care poate să le execute. Există posibilitatea alegerii mai multor protocoale de extracţie, cel ales de noi este ”*DNA I Blood_Cells_High_Performance*” deoarece acest protocol este conceput în aşa fel încât să se obţină un ADN de o puritate foarte mare, acest aspect fiind necesar pentru reuşita tehnicii *PCR- RFLP* dar şi a secvenţierii ulterioare.

Tot în această etapă se introduc datele privind numărul de ordine, numărul de identificare a probei (numerele matricole), provenienţa probei, aceste date primind un corespondent fix din partea robotului pe parcursul mişcării efectuate de aparat, neexistând posibilitatea amestecării accidentale a probelor (figura19).

2. Dozarea reactivilor. Softul cu care este prevăzut aparatul MagnaPure LC calculează exact cantitatea de reactivi necesară, în funcţie de numărul de probe care sunt procesate deodată. Aceste informaţii sunt prezentate în ecranul de la startul rundei de extracţie (figura 20).

Reactivii care se folosesc pentru extracţia ADN din sânge cu Kit MagNA Pure LC DNA Isolation au următoarele proprietăţi:

- Wash BufferI 100 ml pentru a îndepărta inhibitorii;
- Wash BufferII 60 ml pentru a îndepărta proteinele şi sărurile;
- Lysis-Binding Buffer 100 ml pentru liza celulară şi legare ADN;

Fig.19. Introducerea datelor în programul robotului de extracţie a ADN MagnaPure LC (La Roche)

Fig.19. *Data introduction in ADN MagnaPure LC (La Roche)*

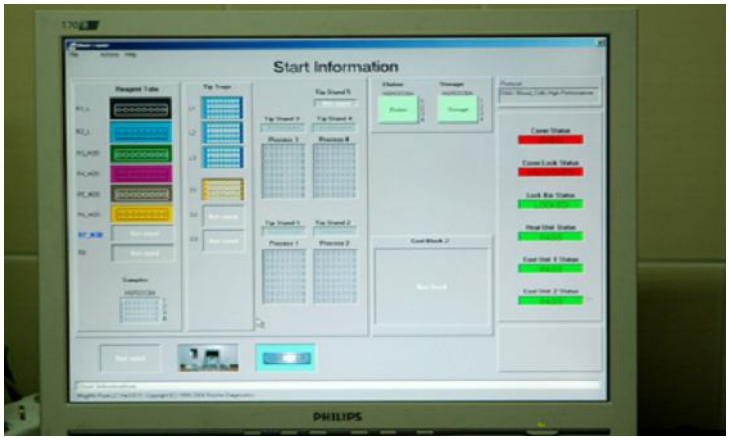


Fig.20. Pagina de start a programului de extracţie a ADN cu robotul Maga Pure LC (La Roche)

Fig.20*. The start page of the DNA extraction programme with Maga Pure LC device (La Roche)*

- Proteinaza K, diluată în 10 ml Ellution Buffer, are rolul de a digera proteinele;
- Magnetic Glass Particles (MgPS) suspension 100 ml, are rolul de legare a ADN;
- Elution Buffer 100 ml pentru eluarea ADN.

3. Adăugarea consumabilelor.

În pagina de start a extracţiei, softul indică exact numărul de consumabile din plastic pentru reactivi (tipsuri, cuvete, pungi) necesare, în funcţie de numărul de probe care sunt procesate simultan (figura 21).

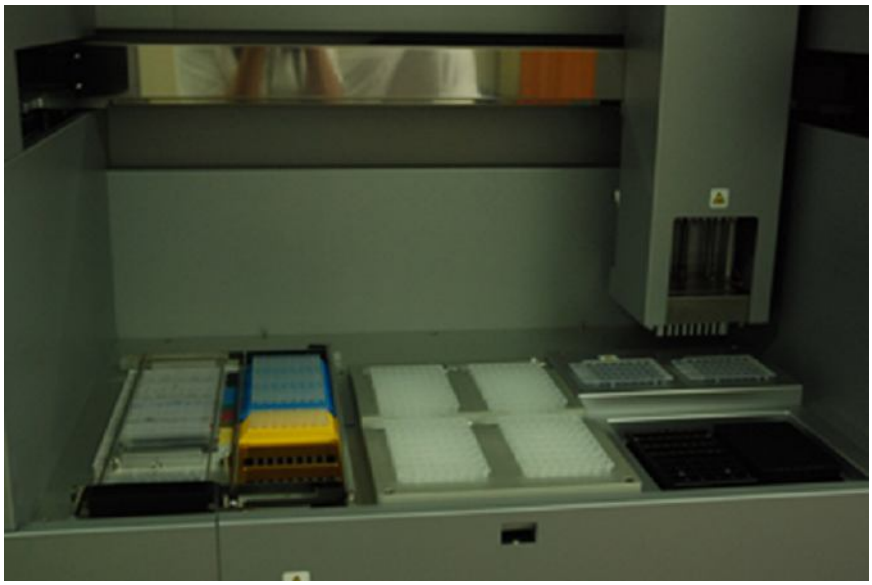


Fig. 21. Adăugarea consumabilelor şi a reactivilor în robotul MagnaPure LC (La Roche)

Fig. 21. *Furiniture and reagents loading in MagnaPure LC device (La Roche)*

4. Adăugarea probelor biologice. Probele biologice sunt reprezentate de sânge proaspăt sau decongelat, în cantitate de 200 µl, care sunt introduse în robot, chiar înaintea începerii extracţiei, pentru a se evita contaminarea lor.

Procesul de realizare a extracţiei este complet automatizat. Deşeurile rezultate din procesul de extracţie sunt colectate de aparat în pungi de plastic, prevăzute special pentru această operaţiune.

După terminarea extracţiei probele sunt ţinute într-o unitate de răcire, cu care este prevăzut MagnaPure LC, până în momentul în care acestea vor fi analizate la spectrofotometru, după care se va realiza congelarea acestora.

5.1.5. Metoda directă de determinare a purităţii şi concentraţiei ADN cu spectofotometrul Nanodrop ND -1000

5.1.5. Direct method of DNA purity and concentration with Nanodrop ND -1000 spectrophotometer

Pentru determinarea purităţii şi concentraţiei ADN se foloseşte **spectofotometrul Nanodrop ND - 1000**: Pentru a se putea afla concentraţia ADN extras din probele de sânge, lucru importantă de în testele PCR , se pot utiliza două metode şi anume:

1. *Metoda directă de determinare*, care presupune măsurarea densităţii optice a probei de ADN, la lungimea de undă 260/280 nm, pe un spectrofotometru, în domeniul UV/VIS.
2. *Metoda indirectă*, presupune migrarea probei de ADN într-un gel de agaroză 1 % alături de un marker de greutate moleculară. Cantitatea de ADN se estimează în funcţie de poziţia benzii în gel şi de mărimea ei.

Purităţile şi cantităţile ADN extras au fost cuantificate prin metoda directă, cu ajutorul Spectrofotometrului (Nanodrop), la lungimea de undă 260 nm. Raportul obţinut între absorbantele λ = 260/280 nm ne arată puritatea probei de ADN.

Nanodrop ND-1000 este un spectrofotometru, cu un spectru de măsurare cuprins între 220-750 nm, care măsoară probe cu volum de 1µl cu o acurateţe şi o reproductibilitate foarte ridicată. Acesta utilizează o tehnologie performantă care implică tensionarea suprafeţelor pe care se realizează măsurarea, pentru a reţine proba. Acestă inovaţie elimină inconvienientul de a utiliza cuvete sau alte recipiente pentru a depozita probele pe durata efectuării măsurătorii şi de asemenea permite curăţirea piedestalelor în câteva secunde. De asemenea ND-1000 poate să măsoare probe foarte concentrate de ADN fară a fi necesară diluţia probelor putându-se măsura astfel probe de 50 de ori mai concentrate decât în cazul utilizării unui spectrofotometru standard prevăzut cu cuvete. Nanodrop ND-1000 este controlat de un soft special care rulează de pe PC, iar datele obţinute în urma măsurătorilor sunt stocate pe calculator.Cantitatea redusă de probă necesară pentru efectuarea măsurătorii şi usurinţa manevrabilităţii fac ca spectofotometru

NanoDrop ND-1000 să se preteze pentru mai multe determinări, analize şi măsurări, cum ar fi:

- determinarea concentraţiei de acizi nucleici şi a purităţii acestora până la 3700 ng/µl(ADN bicatenar) fără a fi necesară diluţia;
- analiza purităţii proteinelor(A280) până la 100 mg/ml(BSA);
- măsurarea densităţii în culturi de celule;
- analiza prin metoda Bradford a proteinelor;
- analiza prin metoda Lowry a proteinelor ;
- spectrofotometrie UV –VIS în general;

Determinarea purităţii şi a concentraţiei de ADN din probă se realizează prin măsurarea absorbanţei la 260 nm pentru determinarea cantităţii de ADN. Absorbanţa măsurată la 280 nm indică cantitatea de proteine din probă, iar raportul 260/280 nm ne indică puritatea probei de ADN.

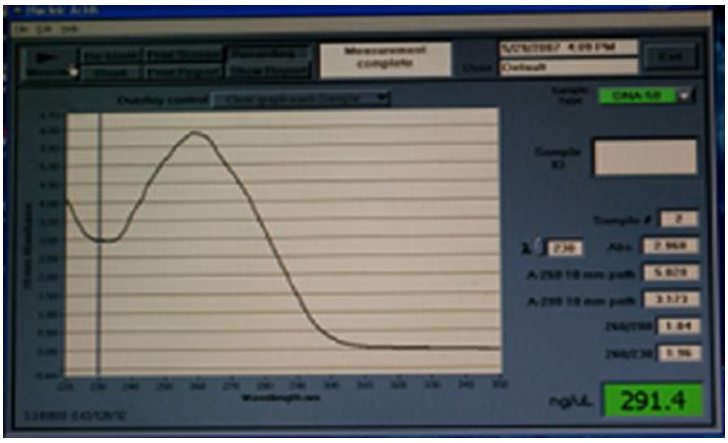


Fig.22. Interfaţa spectrofotometrului în determinarea purităţii şi a cantităţii de ADN (Nanodrop ND 1000)

Fig.22. *The interface of the spectrophotometer during identification of the DNA purity and quantity (Nanodrop ND 1000)*

Valorile situate în intervalul 1,8 – 2 (DO260/280nm) ne arată o puritate foarte bună a probei în timp ce valorile peste 2 indică contaminarea proteică, iar cele sub 1 indică contaminarea cu ARN (figura 22).

5.1.6. Metode statistico-matematice utilizate în calcularea şi interpretarea rezultatelor

5.1.6. Statistico-mathematical methods used in results calculation and interpretation

Pentru testarea semnificaţiei diferenţelor dintre cele trei metode de extracţie ADN s-a utilizat testul "t"(STUDENT) ca metodă de prelucrare statistică (programul *WINSTAT v.6.0.*).

Au fost calculate iniţial mediile şi parametrii dispersiei pentru cantităţile şi purităţile ADN obţinute în urma extracţiei realizată cu cele trei metode prezentate mai sus utilizând datele brute ale cantităţii şi purităţii ADN.

Analiza celor trei metode s-a recurs la compararea probelor şi s-a testat semnificaţia diferenţei dintre mediile a două probe. În prezentul studiu, s-au comparat mediile pentru cantităţile şi purităţile ADN.

Se calculează iniţial:

$\overline{X}$ - media caracterului la nivel de probă,

s – deviaţia standard la nivel de probă,

$s_{\overline{X}}$ - eroarea standard a mediei,

V% - coeficientul de variabilitate .

Pe baza valorii " t" se face în final compararea şi testarea semnificaţiilor dintre probe.

5.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII

5.2. RESULTS AND DISCUSSIONS

5.2.1. Rezultate obţinute în cazul aplicării metodei de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification

5.*2.1. Results obtained when DNA extraction method with manual Wizard Genomic DNA Purification kit was used*

În cazul metodei de extracţie ADN din sânge cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification, cuantificarea s-a realizat spectofotometric. Determinarea purităţilor şi cantităţilor de ADN extras s-a realizat la rasa Bălţată românească din ferma Corujan (Floreşti). S-au obţinut valori medii ale cantităţii şi purităţii ADN de 351,96 ± 76,81 ng/µl şi respectiv 1,33 ± 0,03 (tabelul 3).

Această metodă de extracţie a ADN din sânge oferă rezultate bune în ceea ce priveşte calitatea şi cantitatea ADN extras din sânge.

Diferenţa dintre această metodă şi celelalte, pe care le vom descrie în continuare este că ea prezintă avantajul că sângele nu trebuie să fie proaspăt recoltat de la taurine, el poate să fie congelat câteva zile, serul trebuie să fie bine separat de plasmă după care să fie supus tehnicii extracţiei ADN.

La prelucrarea datelor privind purităţile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge, recoltate de la rasa Brună de Maramureş, de la ferma S.C. Agrozootehnica Seini, s-a obţinut o cantitate medie de ADN de 234,43 ± 34,10 ng/µl cu o puritate medie de 1,16 ± 0,01 (tabelul 3).

Tabelul 3

Mediile şi parametrii dispersiei pentru cantităţile şi purităţile ADN extras de la indivizi din rasele Bălţată românească (ferma Corujan Floreşti) şi Brună de Maramureş (S.C. Agrozootehnica Seini)

Table 3

The averages and dispersion parameters for quantities and purities of the DNA extracted from Bălţată românească (farm Corujan Floreşti) and Brună de Maramureş (S.C. Agrozootehnica Seini) individuals

Însuşirea *Trait*	n	$\overline{X}$	±	$s_{\overline{X}}$	s	V%
Bălţată românească(ferma/*farm Corujan –Floreşti*)						
Cantitatea de ADN DNA quantity	5	351,96	±	76,81	171,76	48,80
Puritatea ADN DNA purity	5	1,33	±	0,03	0,07	5,87
Brună de Maramureş (S.C. Agrozootehnica Seini)						
Cantitatea de ADN DNA quantity	17	234,43	±	34,10	140,63	59,99
Puritatea ADN DNA purity	17	1,16	±	0,01	0,08	7,10

Cantitatea de ADN şi puritatea nu au prezentat diferenţe notabile la cele două rase de la care s-a recoltat sângele.

5.2.2. Rezultate obţinute în cazul aplicării metodei rapide de extracţie a ADN din sânge de taurine

5.2.2. Results obtained when rapid DNA extraction method from cattle blood was used

În cazul metodei de extracţie rapidă a ADN, în urma cuantificării şi determinării purităţilor şi cantităţilor de ADN extras, de la rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş (S.A Petreşti, judeţul Satu-Mare), s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 209,79 ± 13,65 ng/µl şi o puritate medie de 1,46 ± 0,02 (tabelul 4).

Pentru puritătile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge recoltate de la rasa Bălţată Românească, S.C.D.P. Jucu, judeţul Cluj s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 393,85 ± 54,73 ng/µl şi o puritate medie de 1,34 ± 0,02 (tabelul 4).

Pentru puritătile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge recoltate de la rasa Bălţată românească, S.C. Crişan din Gherla, judeţul Cluj s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 185,72 ± 28,79 ng/µl şi o puritate medie de 1,42 ± 0,04 (tabelul 4).

Aceasta este una dintre cele mai des utilizate metode în laboratorul nostru deorece calitatea şi puritatea de ADN obţinută este foarte bună, metoda este puţin costisitoare şi manopera nu necesită mult timp de lucru. Condiţia esenţială pentru reuşita extracţiei ADN este că aceasta să se efectueze în cel mai scurt timp după recoltarea sângelui.

Tabelul 4

Mediile şi parametrii dispersiei pentru cantităţile şi purităţile ADN extras de la indivizi din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş (ferma S.A.Petresti, judeţul Satu Mare, SCDP Jucu judeţul Cluj şi S.C.Crişan Gherla judeţul Cluj)

Table 4

The averages and dispersion parameters for quantities and purities of the DNA extracted from Bălţată românească and Brună de Maramureş (farm S.A.Petresti, county of Satu Mare, SCDP Jucu county of Cluj and S.C.Crişan Gherla county of Cluj) individuals

Însuşirea *Trait*	n	$\overline{X}$ ± $s_{\overline{X}}$	s	V%
Bălţată românească şi Brună de Maramureş (S.A Petreşti) *Bălţată românească and Brună de Maramureş (S.A Petreşti)*				
Cantitatea de ADN DNA quantity	60	209,79 ± 13,65	105,77	50,42
Puritatea ADN DNA purity	60	1,46 ± 0,02	0,15	10,25
Bălţată românească, (S.C.D.P. Jucu, judeţul/ *county of Cluj)*				
Cantitatea de ADN DNA quantity	15	393,85 ± 54,73	211,96	53,82
Puritatea ADN DNA purity	15	1,34 ± 0,02	0,09	6,35
Bălţată românească (S.C. Crişan Gherla,judeţul /*county of Cluj)*				
Cantitatea de ADN DNA quantity	21	185,72 ± 28,79	131,93	71,04
Puritatea ADN DNA purity	21	1,42 ± 0,04	0,20	13,87

5.2.3. Rezultate obţinute în cazul aplicării metodei automatizate de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation

5.2.3. Results obtained when rapid DNA extraction method from cattle blood with Magna Pure LC DNA Isolation kit was used

ADN obţinut prin extracţie cu kitul MagnaPure LC este de foarte bună calitate, cu o greutate moleculară medie de aproximativ 50 kb şi nu prezintă urme de degradare. De asemenea ADN obţinut este liber de contaminări cu ARN şi proteine.

Acest lucru a fost demonstrat prin efectuarea unei electroforeze în gel de agaroză şi confirmat prin spectrofotometrie cu NanoDrop ND-1000.

Pentru puritităţile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge recoltate de la rasa Brună de Maramureş, S.C. Agrozootehnica Seini s-a obţinut o valoare medie de 50,54 ± 15,16 ng/µl cu o puritate medie de 1,77 ± 0,03 (tabelul 5).

Pentru puritităţile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge recoltate de la rasa Brună de Maramureş, S.C.Livada judeţul Satu – Mare s-a obţinut o valoare medie de 54,73 ± 9,09 ng/µl cu o puritate medie de 1,76 ± 0,02 (tabelul 5).

Ceea ce se poate observa, din aplicarea acestor metode de extracţie a ADN din sânge, este faptul că puritatea ADN urmează o relaţie invers proporţională cu cantitatea de ADN. Metoda prezintă avantajul că nu necesită sânge proaspăt, acesta poate să fie utilizat şi congelat *(Carşai Crina şi colab., 2006).*

Tabelul 5

Mediile şi parametrii dispersiei pentru cantităţile şi purităţile ADN extras de la indivizi din rasa Brună de Maramureş (judeţul Maramureş şi judeţul Satu-Mare)

Table 5

The averages and dispersion parameters for quantities and purities of the DNA extracted from Brună de Maramureş (S.C. Agrozootehnica Seini, county of Maramureş and S.C Livada, county of Satu Mare)

Însuşirea *Trait*	n	$\overline{X} \pm s_{\overline{X}}$	s	V%
Brună de Maramureş (S.C. Agrozootehnica Seini, judeţul/*county of Maramureş)*				
Cantitatea de ADN DNA quantity	17	50,54 ± 15,16	62,53	23,73
Puritatea ADN DNA purity	17	1,77 ± 0,03	0,14	7,87
Brună de Maramureş (S.C.Livada, judeţul/*county of Satu – Mare)*				
Cantitatea de ADN DNA quantity	34	54,73 ± 9,09	53,00	16,85
Puritatea ADN DNA purity	34	1,76 ± 0,02	0,13	7,37

5.2.4. Analiza statistică a diferenţelor dintre cele trei metode de extracţie ADN din sânge

5.2.4. Statistical analysis of the differences between the three DNA blood extraction methods

După testarea eficienţei celor trei metode de extracţie ADN din sânge (metoda de extracţie a ADN din sânge cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification, metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge şi metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge cu kitul Magna Pure Lc DNA Isolation), s-a trecut la analiza statistică, în vederea evidenţierii metodei de extracţie ADN care dă rezultatele cele mai bune, în ceea ce priveşte cantitatea şi calitatea acestuia. Obţinerea unui ADN, superior din punct de vedere calitativ şi cantitativ, este necesară pentru desfăşurarea cu eficienţă maximă a testelor PCR pentru detectarea polimorfismului genei leptinei. În unele dintre aceste metode s-a obţinut o cantitate mare de ADN, dar cu o puritate mică, iar altele o cantitate mică de ADN, dar de puritate superioară. Utilizând datele prelucrate statistic, ale purităţilor şi cantităţilor de ADN, prezentate în tabelele anterioare, am comparat cele trei metode de extracţie între ele şi anume: metoda de extracţie a ADN din sânge cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) cu metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge (M_2) ; metoda de extracţie a ADN din sânge cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) cu metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge cu kitul Magna Pure Lc DNA Isolation (M_3) şi metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge (M_2) cu metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge cu kitul Magna Pure Lc DNA Isolation (M_3) .

S-a testat semnificaţia diferenţelor dintre valorile medii a două probe prin testul testul "t" luând în calcul cantitatea şi puritatea probelor de ADN extrase de la cele două rase. La prelucrarea statistică a datelor, privitoare la cantităţile de ADN extras cu cele trei metode de extracţie, la cele două rase luate în studiu, se constată o diferenţă foarte semnificative statistic (+ 207,81 ng/ µl ; $p < 0,001$) între metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi metoda

automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3). De asemenea, tot o diferenţă foarte semnificativă statistic (+179,95 ng/ µl;p < 0,001) a fost înregistrată şi între metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine (M_2) şi metoda automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3) (tabelul 6).

Tabelul 6

Semnificaţia diferenţelor dintre valorile medii ale cantităţilor de ADN provenit de la taurine (ng/µl) extrase cu ajutorul a trei metode

Table 6

The significance of the differences between the average values of the DNA quantities from cattle (ng/µl) extracted with three methods

Metodele comparate *Compared methods*	Media *Abverage* $\overline{X}$	Diferenţa *Difference* ± d	GL	t	Semnificaţia *Significance*
M_1 M_2	261,14 233,28	+27,86	116	0,789	ns
M_1 M_3	261,14 53,32	+207,81	71	8,559	***
M_2 M_3	233,28 53,32	+179,95	145	8,319	***

ns – p > 0,05; *** - p < 0,001

M_1 - metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification/*DNA extraction method with manual Wizard Genomic DNA Purification kit*

M_2 - Metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine/ *rapid DNA extraction*

method

M_3 - Metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation/*automatic DNA extraction method from cattle blood with Magna Pure LC DNA Isolation kit*

În ambele cazuri diferenţele au fost pozitive, ceea ce semnifică faptul că utilizarea metodei de extracţie a ADN din sânge de taurine, cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification, cât şi a metodei rapide, asigură extracţia unei cantităţi superioare de ADN, comparativ cu rezultatele obţinute în cazul utilizării metodei automatizate de extracţie.

Diferenţe statistic nesemnificative (+27,86 ng/ µl; $p > 0,05$) au fost obţinute între metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi metoda rapidă de extracţie ADN (M_2) (tabelul 6).

Diferenţe foarte semnificative statistic ($p < 0,001$) au fost înregistrate între toate valorile medii ale purităţilor ADN obţinute pentru cele trei metode, (M1), (M2) şi (M3).

Când comparaţia s-a efectuat între puritatea ADN, obţinută în urma extracţiei cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi cea a ADN obţinut, în urma extracţiei cu metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine (M_2) precum şi metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3), toate diferenţele au fost în favoarea celor din urmă, respectiv a metodelor M_2 şi M_3 (tabelul 7).

Dacă luăm în considerare comparaţia între valorile medii ale purităţilor de ADN obţinute în urma extracţiei prin metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine (M_2) şi metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3), diferenţele au fost în favoarea ultimei metode (M_3).Aceasta susţine superioritatea tehnică a acestei metode şi ne determină să o recomandăm pentru practicile de laborator de genetică moleculară, unde este necesar obţinerea de ADN de puritate ridicată, pentru testele PCR şi secvenţiere. Această metodă este adecvată scopului şi datorită rapidităţii cu care se extrage ADN din sânge.

Tabelul 7

Semnificaţia diferenţelor dintre valorile medii ale purităţilor de ADN provenit de la taurine (λ = 260/280 nm) extrase cu ajutorul a trei metode

Table 7

The significance of the differences between the average values of the DNA purities from cattle (λ = 260/280 nm) extracted with three methods

Metodele comparate *Compared methods*	Media *Abverage* $\overline{X}$	Diferenţa *Difference* ± d	GL	t	Semnificaţia *Significance*
M_1 M_2	1,20 1,43	-0,231	116	-6,505	***
M_1 M_3	1,20 1,76	-0,560	71	-17,489	***
M_2 M_3	1,43 1,76	-0,329	145	-12,713	***

*** - $p < 0,001$

M_1 - metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification/*DNA extraction method with manual Wizard Genomic DNA Purification kit*

M_2 - Metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine/ *rapid DNA extraction method*

M_3 - Metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation/*automatic DNA extraction method from cattle blood with Magna Pure LC DNA Isolation kit*

5.3. CONCLUZII PARŢIALE

5.3. PARTIAL CONCLUSIONS

- În cazul metodei de extracţie ADN din sânge cu **kitul manual Wizard Genomic DNA Purification,** în urma prelucrării datelor privind puritățile şi cantităţile de ADN extras din probele provenite de la rasa Bălţată românească, din ferma Corujan (Floreşti), s-au obţinut valori medii ale cantităţii şi purităţii ADN de 351,96 ± 76,81 ng/µl şi respectiv 1,33 ± 0,03, iar la rasa Brună de Maramureş, ferma (S.C. Agrozootehnica Seini), s-a obţinut o cantitate medie de ADN de 234,43 ± 34,10 ng/µl şi o puritate medie de 1,16 ± 0,01.
- Această metodă de extracţie a ADN din sânge oferă rezultate bune în ceea ce priveşte calitatea şi cantitatea ADN extras din sânge. Diferenţa dintre această metodă şi celelalte două, este că ea prezintă avantajul că sângele nu trebuie să fie proaspăt recoltat de la taurine, el poate să fie congelat câteva zile, serul trebuie să fie bine separat de plasmă, după care să fie supus tehnicii extracţiei ADN. Cantitatea şi puritatea de ADN nu a prezentat mari diferenţe între cele două rase luate în studiu.
- În cazul **metodei de extracţie rapidă a ADN**, în urma prelucrării datelor privind puritățile şi cantităţile de ADN, extras de la indivizi proveniţi din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş, S.A Petreşti, judeţul Satu-Mare, s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 209,79 ± 13,65 ng/µl şi o puritate medie de 1,46 ± 0,02.
- La prelucrarea datelor, privind puritățile şi cantităţile ADN extras cu aceeaşi metodă din probele de sânge recoltate de la indivizii din rasa Bălţată românească, (S.C.D.P. Jucu, judeţul Cluj) s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 393,85 ± 54,73 ng/µl şi o puritate medie de 1,34 ± 0,02, iar la rasa Bălţată românească, (S.C. Crişan din Gherla, judeţul Cluj) s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 185,72 ± 28,79 ng/µl şi o puritate medie de 1,42 ± 0,04. Aceasta este una dintre cele mai des utilizate metode în laboratorul nostru

deoarece cantitatea şi puritatea de ADN obţinută este foarte bună, metoda este puţin costisitoare şi manopera nu necesită mult timp de lucru, metoda este folosită pentru analize de rutină.

- Probele de ADN obţinute prin extracţie cu **kitul MagnaPure LC automatizat,** sunt de o calitate, foarte bună cu o greutate moleculară medie de aproximativ 50 kb, nu prezintă urme de degradare şi sunt libere de contaminări cu ARN şi proteine , iar în urma prelucrării datelor privind purităţile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge recoltate de la rasa Brună de Maramureş, S.C. Agrozootehnica Seini s-a constatat o valoare medie de 50,54 ± 15,16 ng/µl cu o puritate medie de 1,77 ± 0,03, iar la rasa Brună de Maramureş, S.C.Livada judeţul Satu – Mare s-a obţinut o valoare medie de 54,73 ± 9,09 ng/µl cu o puritate medie de 1,76 ± 0,02 .
- Metoda de extracţie cu **kitul Magna Pure Lc** prezintă avantajul că sângele poate să fie congelat şi vechi.
- În urma analizării comparative a acestor metode de extracţie a ADN din sânge, se poate concluziona că puritatea ADN urmează o relaţie invers proporţională cu cantitatea de ADN.
- La prelucrarea statistică a datelor, privitoare la cantităţile de ADN extras cu cele trei metode de extracţie de la cele două rase luate în studiu, în urma testării semnificaţiei diferenţelor prin testul ‘t”, se constată o diferenţă foarte semnificative statistic (+ 207,81 ng/ µl ; $p < 0,001$) între metoda de extracţie a ADN din sânge cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi metoda automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3). Tot o diferenţă foarte semnificativă statistic (+179,95 ng/ µl;$p < 0,001$) a fost înregistrată şi între metoda rapidă de extracţie a ADN-ului din sânge de taurine(M_2) şi metoda automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3) .
- Diferenţe statistic nesemnificative (+27,86 ng/ µl; $p > 0,05$) au fost obţinute între metoda de extracţie a ADN din sânge cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi metoda rapidă de extracţie ADN (M_2).
- Diferenţe foarte semnificative statistic ($p < 0,001$) au fost înregistrate între toate valorile medii ale purităţilor ADN, obţinute pentru cele trei metode.

- Dacă luăm în considerare comparaţia între valorile medii ale purităţilor de ADN obţinute în urma extracţiei cu metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine (M_2) şi metoda automatizată de extracţie a ADN din sânge cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3), diferenţele au fost în favoarea celei din urmă metode (M_3), ceea ce susţine superioritatea tehnică a acestei metode şi ne determină să o recomandăm pentru practicile de laborator de genetică moleculară unde este necesară obţinerea de ADN de puritate ridicată necesară testelor PCR şi secvenţierii. Această metodă este adecvată scopului urmărit şi datorită rapidităţii cu care se extrage ADN din sânge.

CAPITOLUL VI
STUDIEREA POLIMORFISMULUI GENIC LA LOCUSUL LEPTINEI

CHAPTER VI
THE STUDY OF THE GENIC POLYMORPHISM AT LEPTINE LOCUS

Scopul acestui studiu a fost testarea şi optimizarea a trei protocoale de genotipizare la locusul genei leptinei, la taurine, protocoale utilizate de cercetătorii: *Pomp şi colab., 1997*, *Leiffers şi colab., 2002* şi *Lien şi colab., 1997,* care au studiat diferite polimorfisme existente în exonii şi intronii existenţi în gena leptinei prin tehnica *PCR-RFLP,* utilizând enzimele de restricţie *Sau3AI, MboI şi Bsa AI.* Cele trei protocoale au fost testate pentru prima dată, în laboratorul de Genetică animală al Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară, Cluj-Napoca.

6.1. MATERIALE ŞI METODE

6.1. MATERIALS AND METHODS

6.1.1. Materiale biologice

6.1.1.Biological materials

Materialul biologic este constituit din ADN provenit din sânge prelevat de la taurine din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş. ADN care a fost extras, cuantificat şi stocat în condiţii sterile, fiind depozitat la -20 ^{0}C, pe perioade mai lungi de timp, pentru ca probele de ADN extrase să fie de o calitate şi cantitate superioară .

6.1.2. Materiale chimice

6.1.2.Chemical materials

Materialele chimice utilizate au fost reprezentate de reactivi, enzime şi primeri, utilizaţi pentru testele PCR, având următorea provenienţă:

Enzime

- *Sau3AI – 5U/ µl (Promega)*
- *MboI – 10U/ µl (Promega)*
- *BsaAI sau Ppu21I- 10U/ µl (Fermentas)*
- *Taq DNA Polymerase- 10U/ µl (Promega)*
- *DNA Step Ladder 52 lanes(Promega)*

Primeri sau amorse sens şi antisens - (Microsynth – Elveţia)

Reactivi şi soluţi

- *Buffer(Promega)*
- *$MgCl_2$ (Promega)*
- *dNTP (Promega)*

- Apă sterilă(Promega)

- Soluţie TAE 50X (Tris HCl, Acid Acetic, EDTA)

- Soluţie TBE 5X (Tris Hcl, Acid Boric, EDTA)

- Bromură de etidium (Promega)

- Fenol (Nordic Invest)

- Cloroform (Merk)

- Etanol absolut (Merk)

- Izopropanol (Merk)

- Seybr safe(Medist)

-Agaroză (Promega)

Materialele şi consumabilele :

- pipete (Eppendorf Research) cu volume reglabile de la 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl;
- tuburi (Eppendorf Research) de 1,5 ml;
- tuburi (Eppendorf Research) de 0,2 ml;
- vărfuri de pipete de dimensiuni diferite (mari, medii şi mici) , cu volume de 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl;
- sticlărie de laborator , recipienţi;
- stative;

6.1.3. Aparatura utilizată

6.1.3.Equipment

- Agitator ultraturax (Helidolph)
- Aparat pentru produs gheaţă (Brema)

- Autoclav (Raypa)
- Baie marină (Fisher Bioblock Scientific polystat)
- Balanta analitică (Schimadzu AW 320M)
- Containere pentru deşeuri (Biohazard)
- Deionizator de apă (Smeg WP 3000)
- Etuvă (Memmet)
- Hotă pentru chimicale (Kottermann)
- Hotă PCR (Raypa)
- Microcentrifuge (Sigma 1-15)
- pH - metru (InoLab)
- Cuve pentru electroforeza orizontlă acizilor nucleici (Fisher)
- Cuptor cu microunde (Sharp)
-Thermocycler - Mastercycler (Eppendorf)

- Sistem video de achiziţie şi prelucrare a imaginii (Alpha Inotech 200)
- Vortex (Bioblock)
- Centrifugă (SIGMA 1-15)
- Bidistilator apa(GFL 2104)
- Sistem de fotodocumentare (Vilber Lourmat E-BOX 1000/20M)
- Aparat Real Time PCR (Biorad)

6.1.4. Metode de testare şi optimizare a unor protocoale de genotipizare în vederea studierii polimorfismelor la locusul leptinei

6.1.4. Testing and optimization methods of genotyping protocols with the aim of studying the polymorphisms at leptine loci

Principul tehnicii *PCR-RFLP* se bazează pe modificările unor secvenţe din ADN la nivelul situsurilor de restricţie. De regulă, aceste variaţii sunt cauzate de mutaţii

punctiforme (substituţia unei nucleotide cu alta), inserţii sau deleţii în interiorul situsului de restricţie. În acest fel, enzima de restricţie nu mai recunoaşte situsul respectiv şi nu mai taie. Variaţia secvenţelor de tip *RFLP,* ne arată de fapt, un polimorfism de lungime a fragmentelor de ADN după tratare cu o enzimă de restricţie şi analiza electroforetică a lungimii fragmentelor. La generarea markerilor de tip *RFLP* contribuie două surse de variaţie: (1) prezenţa sau/şi absenţa situsurilor de restricţie, ce va determina numărul de fragmente generate, (2) lungimile diferite cauzate de inserţii sau deleţii între situsurile de restricţie. Restricţia fragmentelor poate fi făcută prin digestia produşilor de amplificare dintr-o reacţie PCR sau, prin restricţia întregului ADN genomic şi hibridare cu sonde marcate radioactiv (în cartare).

Polimorfismele de tip *SNP* caracterizează un polimorfism punctiform prin detectarea mutaţiilor determinate de substituţia unei singure nucleotide cu alta. Acest tip de polimorfism este cel mai frecvent întâlnit, fiind determinat fie de agenţi mutageni chimici, fie de greşelile din timpul replicării ADN.

Prin această tehnică pot fi evidenţiate diferenţele de secvenţă existente între alele, cum ar fi de exemplu substituţia A în T (A**A**GGCTAA în A**T**GGCTAA). Pentru ca o variaţie de secvenţă să fie considerată *SNP,* ea trebuie sa apară cu o frecvenţă de până la 1% în populaţie, ceea ce semnifică apariţia mutaţiei la fiecare 100 până la 300 perechi de baze din totalul de perechi de baze. În mod similar tehnica *RFLP* detectează polimorfismul datorat unei singure nucleotide, dar la nivelul unui situs de restricţie. Diferenţa între *SNP* şi *RFLP* este că majoritatea polimorfismelor de tip *SNP,* nu sunt recunoscute de către o anumită enzimă de restricţie *(Coşier Viorica, 2007)*.

Polimorfismele existente la locusul genei leptinei pot să fie detectate în introni şi în exoni. Exonii sunt secvenţe de nucleotide care codifică aminoacizii din proteine, iar intronii sunt secvenţe de nucleotide care nu codifică aminoacizi.

În prezentul studiu ne–am propus testarea şi optimizarea a trei protocoale de genotipizare pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei propuse de (*Pomp şi colab., 1997*, *Leiffers şi colab., 2002* şi *Lien şi colab., 1997*).

1.Pentru testarea şi optimizarea protocolului propus de *Pomp şi colab.(1997)* a fost utilizată următoarea secvenţă de primeri sens şi antisens (Microsynth – Elveţia) care au fost diluaţi la o concentraţie de 10 picomoli:

5'-GTCACCAGGATCAATGACAT-3'

5'-AGCCCAGGAATGAAGTCCAA-3'

S-a testat protocolul propus de (*Pomp şi colab., 1997)* utilizând ADN provenit de la indivizi din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş şi s-au folosit într-o primă etapă condiţiile date în protocolul original, cu scopul de a se observa dacă protocolul dă rezultatele dorite, necesare pentru studiul polimorfismului la acest locus utilizând următoarele concentraţii ale reactivilor:

- Taq ADN polymeraza - 0,65 *U/µl*
- ADN - 50 ng
- *Sau*3AI -5 *U/µl*
- $MgCl_2$ -1,95 m*M*
- dNTP - 200 *µM*
- Primer - 0,3 *µM*

Metoda utilizată este bazată pe tehnica *PCR-RFLP* şi permite studierea polimorfismului de la nivelul intronului **2** din gena leptinei, polimorfism care este studiat cu ajutorul profilelor electroforetice obţinute în urma restricţiei fragmentelor de 1820 pb din gena leptinei, cu enzima de restricţie *Sau3AI.*

S-au calculat amestecurile de reacţie (mixurile) pe care urmează să le utilizăm, în funcţie de concentraţiile reactivilor date de protocolul original, pentru reacţia PCR şi pentru restricţia enzimatică, urmând etapele de amplificare, restricţie, migrare în gel de agaroză şi colorare cu bromură de etidiu pentru vizualizarea produşilor obţinuţi.

Compoziţia amestecului de reacţie PCR, dat de protocol şi calculat pentru 20 µl volum final pe probă este următoarea:

Apă sterilă	- 13,9 µl
Tampon(buffer)	- 2,5 µl

dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2-2 µl
$MgCl_2$	-1,8- µl
Taq polymeraza	- 0,8 µl
ADN	- 1 µl
Volum final: 20 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, prevăzute în protocolul original, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, elongaţie, sunt următoarele:

1 x 94^0 C	- 2 minute
35 x 94^0 C	- 30 secunde
58^0 C	- 30 secunde
72^0C	- 30 secunde
72^0C	- 10 minute

Amestecul (mixul) de restricţie enzimatică este următorul:

Tampon(Buffer) -2,5 µl

Produs PCR -15 µl

H_2O - 7 µl

Sau3AI- 0,5 µl

Volum final: 25µl

Produsul PCR amplificat, a fost restrictat cu enzima *Sau3AI* şi termostatat timp de 4 ore la temperatura de 37^0C.

După termostatarea şi restrictarea probelor, s-a efectuat electroforeza în gel de agaroză de concentraţie 4% într-o cuvă de electroforeză orizontală, pentru o bună separare a benzilor. Soluţia tampon folosită pentru patul electroforezei a fost TBE de concentraţie 1x. Această soluţie a fost obţinută din soluţia mamă TBE de concentraţie 10x şi care este utilizată pentru patul electroforezei. Soluţia TBE 10x are următoarea compoziţie: Tris – 10,8 g, EDTA -0,83 g la un pH - 8,00; şi acid boric 5,5 g pentru obţinerea a 100 ml volum final de soluţie. Migrarea s-a realizat un voltaj de 60V. Preluarea imaginii s-a făcut cu un sistem de fotodocumentare Gel Doc.

Pentru compararea şi determinarea dimensiunilor fragmentelor a fost utilizat ca etalon, DNA Step Ladder 50 pb (Promega). Astfel s-au efectuat mai multe încercări utilizând condiţiile protocolului original, cu probe de ADN aparţinând de la mai mulţi indivizi din ambele rase.

Deoarece în urma utilizării protocolui ca atare propus de *Pomp* şi colaboratorii, în *1997* nu s-au obţinut rezultatele aşteptate, s-a trecut la optimizarea protocolului .

Iniţial s-a determinat cu exactitate temperatura de ataşare sau aliniere a primerilor pe care i-am utilizat pentru testele PCR, deoarece am presupus că ar fi una din cauzele neataşării primerilor (neamplificării). În acest sens, a fost necesară efectuarea unor reacţii PCR în gradient de temperatură, cu ajutorul aparatului Termocycler Eppendorf Mastercycler, cu scopul de a determina temperatura optimă de ataşare a primerilor, pentru amplificarea fragmentului de 1820 pb din gena leptinei, evitându-se astfel obţinerea unor produşi nespecifici.

Pentru testele PCR, în cadrul acestui protocol, s-a utilizat ADN provenit de la 20 indivizi de la rasa Bălţată românească şi 20 indivizi de la rasa Brună de Maramureş,

ADN de calitate bună, a cărui puritate este de 1,89**.** Tot în scopul optimizării protocolului am folosit mai multe mixuri pentru reacţia PCR şi pentru restricţia enzimatică, calculate şi efectuate în mai multe încercări, pe care le vom enumera în continuare.

Iniţial s-a utilizat un amestec (mix) de reacţie PCR care nu a avut în compoziţia lui $MgCl_2$, pentru reacţia PCR în gradient, cu ADN provenit de la indivizii ambelor rase.

Amestecul de reacţie PCR utilizat, ce nu conţine $MgCl_2$, a fost calculat la un volum final de 25 µl :

Apă sterilă	- 17,2 µl
Tampon(buffer)	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Aparatul a fost setat de la temperatura de ataşare a primerilor de la 58^0C, care a fost prevăzută în protocolul original, până la temperatura de $65,9^0$C, pe care o afişează aparatul pentru ultima probă introdusă astfel :

- 1 - 58^0 C
- 2 - $58,2^0$ C
- 3 - $58,7^0$ C
- 4 - $59,3^0$ C
- 5 - $60,3^0$ C
- 6 - $61,5^0$ C
- 7 - $62,8^0$ C
- 8 - 64^0 C
- 9 - $64,8^0$ C
- 10 - $65,4^0$ C

- 11 - 65,9^0 C

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, efectuată în gradient de temperatură, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, şi elongaţie sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
3 5x 95^0 C	- 1 minut
58^0 - 60^0 - 62^0 - 65^0,9 C	- 1 minut
72^{0}C	- 1 minut
72^{0}C	- 10 minute

Pentru determinarea temperaturii optime de ataşare a primerilor şi validarea rezultatelor , probele astfel amplificate, la care diferă doar temperatura de ataşare a primerilor, au fost migrate într-un gel de agaroză, de concentraţie 2%, la un voltaj de 100V.

Pentru electroforeză s-a folosit soluţia tampon TAE, de concentraţie 1 x preparată din soluţia mamă care conţine: Tris - 242 g, EDTA -18,6g pH - 8,00; H_2O 700 ml, şi acid acetic glacial - pH 7,8 pentru un volum final de 1000 ml soluţie tampon TAE. Au fost utilizaţi 3 µl Smart ladder, 2 µl Loading dye şi 5 µlDNA step ladder, ca etalon pentru compararea lungimii benzilor fragmentelor obţinute.

În gelul de agaroză se evidenţiază profilul electroforetic al fragmentului de 1820 pb rezultat în urma reacţiei de amplificare (poziţia 8 din gel), care corespunde temperaturii de ataşare a primerilor la 64^0 C. La probele de ADN provenit de la indivizi din rasa Brună de Maramureş s-a obţinut amplificarea specifică fragmentului de 1820 pb, dar la rasa Bălţată românească nu se evidenţiază clar acest lucru.

Din acest motiv la probele de ADN provenite de la rasa Bălţată românească s-a utilizat un nou amestec de reacţie PCR, care conţine în plus 1 µl $MgCl_2$, care probabil influenţează pozitiv ataşarea primerilor şi activitatea enzimei Taq polimerazei, fără obţinerea unor produşi de amplificare nespecifici. În acest scop am efectuat o altă reacţie PCR în gradient de temperatură prin utilizarea a 11 probe de ADN la care temperatura de amplificare variază în intervalul 58^{0}C şi 65^0,9 C, nefiind modificate celelalte condiţii de reacţie şi parametrii de lucru.

Amestecul de reacţie PCR, care conţine 1 µl $MgCl_2$ calculat pentru un volum final de 25 µl, este următorul:

Apa sterilă	- 16,2 µl
Tampon(buffer)	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2 -1 µl
$MgCl_2$	- 1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, efectuată în gradient de temperatură, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, şi elongaţie sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
3 5x 95^0 C	- 1 minut
58^0 - 60^0 - 62^0 - 65^0,9 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Temperaturile afişate de Termocycler, pentru fiecare din cele 11 probe introduse în aparat, sunt:

- 1 - 58^0 C
- 2 - 58,2^0 C
- 3 - 58,7^0 C
- 4 - 59,3^0 C

- 5 - 60,3^0 C
- 6 - 61,5^0 C
- 7 - 62,8^0 C
- 8 - 64^0 C
- 9 - 64,8^0 C
- 10 - 65,4^0 C
- 11 - 65,9^0 C

Pentru determinarea temperaturii optime de ataşare a primerilor şi validarea rezultatelor şi la rasa Bălţată românească, probele supuse amplificării în gradient au fost migrate într-un gel de agaroză de concentraţie 2%, la un voltaj de 100V. Pentru patul electroforezei s-a utilizat, soluţia TAE 5X şi 3 µl Smart ladder, folosit ca etalon pentru compararea şi determinarea lungimii fragmentului nerestrictat de 1820 pb, din gena leptinei. În urma preluării imaginii şi analizei fragmentelor obţinute la toate cele 11 temperaturi s-a observat în gelul de agaroză că în poziţia (8) corespunzătoare temperaturii de 64^0 C, este profilul electroforetic al fragmentului de 1820 pb care nu conţine artefacte .

Odată stabilită temperatura de ataşare a primerilor, şi a evidenţierii fragmentului de 1820 pb din gena leptinei la temperatura de ataşare a primerilor de 64^0 C, s-au efectuat noi reacţii de amplificare pe mai multe probe de ADN provenite de la indivizii ambelor rase, pentru a avea certitudinea că amplificarea fragmentului are loc în cazul fiecărei probe de ADN.

Deoarece fragmentul supus amplificării este mare, s-a utilizat un nou mix de reacţie PCR în care s-au utilizat 2 µl din fiecare primer. S-a adăugat $MgCl_2$ pentru creşterea specificităţii la probele de ADN provenite de la ambele rase. Şi în acest caz au fost parcurse aceleaşi etape ca şi în protocolul descris anterior.

Şi în acest caz amestecul de reacţie PCR conţine 2 µl din fiecare primer şi 1 µl $MgCl_2$, calculat pentru volum final de 25 µl, este următorul:

Apă sterilă	- 14,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2-2 µl
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl

Volum final: 25 µl

Ciclurile termice pentru reacţia PCR cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, elongaţie şi temperatura de ataşare a primerilor de 64^0 C, sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
35 x 95^0C	- 1 minut
64^0 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Pentru a se evidenţia profilele electroforetice ale fragmentului aşteptat, s-a efectuat o nouă electroforeză în gel de agaroză de concentraţie 3% pentru o migrare mai lentă a fragmentului de 1820pb, celelalte condiţii ale electroforezei fiind identice cu cele descrise anterior. Imaginea a fost preluată şi prelucrată , observându-se fragmentul amplificat dar nerestrictat la probele provenite de la indivizii ambelor rase.

Pentru evidenţierea polimorfismului la acest locus, prin tehnica *PCR-RFLP*, a fost necesară efectuarea unor reacţii de restricţie enzimatică cu enzima de restricţie *Sau3AI* prin utilizarea ei în diferite concentraţii. Specificitatea enzimei în digestie a fost testată.

Restricţia probelor de ADN amplificate s-a făcut şi pentru pentru a testa efectul concentraţiei ionilor de Mg la probele de ADN provenite de la indivizi diferiţi din ambele rase.

S-au utilizat două mixuri de restricţie enzimatică, un mix cu 1 µl respectiv cu 2µl enzimă *Sau3A I* ambele calculate pentru 30µl volum final:

Mix1 de restricţie	**Mix2 de restricţie**
Produs PCR -12 µl	Produs PCR -12 µl
Buffer - 3 µl	Buffer -3 µl
H_2O -14 µl	H_2O - 14 µl
Sau3AI -1 µl	*Sau3AI*- 2 µl
Volum final: 30µl	**Volum final: 30µl**

Termostatarea probelor cu enzima s-a făcut la temperatura de 37^0C, temperatură la care enzima funcţionează optim. De asemenea am mărit timpul de termostatare de la 4 ore cât era specificat în protocolul original la 6 ore, pentru o bună digestie.

Probele restrictate au fost migrate într-un gel de agaroză de concentraţie 3%, soluţia tampon pentru patul electroforezei TAE 5x. Migrarea s-a făcut la un voltaj scăzut de 50V pentru a permite o mai bună separare a benzilor .

În urma prelucrării şi analizării imaginii nu s-au observat toate fragmentele pe care ne –am aşteptat să le observăm, conform protocolului.

Din acest motiv, am efectuat un nou test cu un (amestec) mix de reacţie PCR şi de restricţie enzimatică diferit de cel anterior.

Mixul de reacţie PCR, pentru o altă încercare, a fost calculat la volum final de reacţie de 30 µl, cu 2 µl din fiecare primer şi 1 µl $MgCl_2$, iar ceilalţi parametrii au rămas neschimbaţi:

Apa sterilă	- 16,7 µl
Tampon	- 3 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2 -2 µl
$MgCl_2$	- 1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl

Volum final: 30 µl

Ciclurile termice utilizate pentru reacţia PCR cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare şi elongaţie sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
3 5x 95^0 C	- 1 minut
64^0 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

În această încercare s-a utilizat un nou amestec (mix) de restricţie enzimatică în care s-a adăugat 1 µl enzimă *Sau3AI* şi s-a adăugat 20 µl produs PCR. S-a adăugat un volum mai mare de produs PCR calculat la 30µl volum final, pentru a se observa dacă nu se produce o digestie mai bună a fragmentului de 1820 pb.

Produs PCR -20 µl

Tampon - 3 µl

H_2O - 6 µl

Sau3AI- 1 µl

Volum final: 25 µl

Probele de ADN, provenite de la indivizii ambelor rase studiate, după ce au fost astfel restrictate, au fost migrate într-un gel de agaroză de concentraţie 4%, pentru o separare lentă a benzilor, la un voltaj de 50V ; soluţia folosită pentru pat a fost TAE 5x, iar ca şi etalon de comparare a benzilor s-a utilizat 7 µl DNA Step Ladder, colorare cu 1 µl bromură de etidiu.

În urma preluării şi analzării imaginii prin folosirea acestor condiţii şi parametrii de lucru, rezultatele nu au fost cele aşteptate în ceea ce priveşte evidenţierea produşilor aşteptaţi şi a evidenţierii fragmentelor polimorfice.

Unele benzi nu au fost observate în gelul de agaroză. Din acest motiv a fost necesară efectuarea de noi încercări, deoarece deşi se produce amplificarea fragmentului de 1820 pb din gena leptinei, restricţia acestuia pentru evidenţierea fragmentelor nu a dat rezultatele aşteptate.

A fost efectuată o altă încercare cu probe de ADN provenite de la indivizii ambelor rase, în cadrul cărei s-a utilizat un alt mix de reacţie PCR, ce a avut în componenţa lui 1 µl $MgCl_2$ şi 2 µl din fiecare prime. S-a mărit cantitatea de Taq polymeraza de la 0,3 la 0,5 µl. Pentru volumul final de 25 µl pe probă s-au folosit:

Apă sterilă	- 14 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2 -2 µl
$MgCl_2$	- 1 µl
Taq polymeraza	- 0,5 µl
ADN	- 2 µl

Volum final: 25 µl

Ciclurile termice utilizate pentru reacţia PCR cu etapele predenaturare, enaturare, ataşare, şi elongaţie sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
3 5x 95^0 C	- 1 minut
64^0 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Un volum de 12 µl din produsul PCR, la care s-au utilizat condiţiile de reacţie PCR şi parametrii descrişi mai sus, au fost supuse restricţiei enzimatice cu 2 µl enzimă *Sau3AI*, calculat pentru un volum final de 30µl .

Amestecul de restricţie enzimatică folosit în acest caz este următorul:

Produs PCR -12 µl

Tampon -3 µl

H_2O - 14 µl

Sau3AI- 2 µl

Volum final: 30µl

Optimizarea protocolului în vederea obţinerii unei analize ADN eficiente s-a efectuat şi pentru probele provenite de la alţi indivizi. S-a utilizat un volum de 10 µl produs PCR ce a fost supus digestiei enzimatice cu 2 µl enzimă *Sau3AI* în volum final de 25µl .

Produs PCR -10 µl

Tampon -2,5 µl

H_2O - 9,5 µl

Sau3AI- 2 µl

Volum final: 25µl

Toate probele restrictate au fost termostatate la o temperatură de 37^0C la care am mărit din nou timpul de reacţie, la 8 ore .

După termostatare, pentru evidenţierea profilelor electroforetice, probele au fost migrate într-un gel de agaroză de concentraţie 4%, la un voltaj de 50V, soluţia pentru patul electroforezei utilizată a fost TBE 1X, iar colorarea s-a făcut cu bromură de etidiu 1,5 µl. După preluarea imaginii cu sistemul Gel Doc, s-a observat, din nou, că nu în toate cazurile s-au obţinut produşii aşteptaţi.

2.Cel de al doilea protocol testat a fost cel propus de *Leiffers şi colab.(2002*), în vederea testării şi optimizării acestuia a fost utilizată următoarea secvenţă de primeri (produs Microsynth – Elveţia), corespunzători fragmentului de 400pb, din gena leptinei:

5'- TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT -3'

5'- GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT -3'

Primerii fiind liofilizaţi au fost prelucraţi şi diluaţi astfel încât concentraţia finală a primerului sens si antisens să fie de 10 picomoli pentru a putea fi astfel utilizaţi în studierea polimorfismului de la acest locus.

Utilizând acest protocol de genotipizare, s-a studiat polimorfismul la locusul genei leptinei dintre exonul **2** şi intronul **2** al genei leptinei, la toţi cei 152 de indivizi luaţi în studiu, aparţinând celor două rase: 88 indivizi din rasa Bălţată românească şi 64 indivizi din rasa Brună de Maramureş, cuprinzând tineret taurin de sex mascul şi femel. Metoda utilizată este bazată deasemenea pe tehnica *PCR-RFLP* şi permite studierea polimorfismului prin restrictarea fragmentului de 400 pb din gena leptinei cu enzima de restricţie dată de protocol şi anume enzima *Sau3AI*, dar şi prin testarea eficienţei unei alte enzime de restricţie care are acelaşi situs de restricţie cu aceasta şi anume enzima de restricţie Mbo*I,* care nu a fost prevăzută în protocolul original.

Situsul enzimelor de restricţie utilizate *MboI* şi *Sau 3AI* este acelaşi:

5' … GATC … 3'

3' …CTAG … 5'

Pentru a testa protocolul propus de ***Leiffers şi colab.(2002)***, s-au folosit prima dată condiţiile date în protocolul original, cu următoarele concentraţii ale reactivilor:

- Taq ADN polymeraza - 0,5 *U/μl*
- ADN- 50 ng
- *Sau*3AI-5 U/*μl*
- $MgCl_2$-1,5 m*M*

- dNTP-200 *μM*
- Primer-0,3 *μM*

Folosind aceste concentraţii s-a testat protocolul de genotipizare menţionat anterior, folosind condiţiile de reacţie şi parametrii de lucru specificate de protocol. S-au calculat amestecurile (mixurile) de reacţie în vederea utilizării lor, în funcţie de concentraţiile reactivilor date de protocolul original, pentru reacţia PCR şi pentru

restricţia enzimatică, urmând etapele de amplificare, restricţie enzimatică, migrare în gel de agaroză şi colorare cu bromură de etidiu pentru vizualizarea produşilor obţinuţi. Probele de ADN, pentru testarea protocolului original, au provenit de la indivizi de la ambele rase şi au avut purităţi situate între 1,5 şi 1,9.

Amestecul (mixul) de reacţie PCR prevăzut în protocol a avut următoarea compoziţie, calculată pentru 20 µl volum final pe probă:

Apa sterilă	- 11,1 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2 -1 µl
$MgCl_2$	- 1 µl
Taq polymeraza	- 0,4 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 20 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, prevăzute în protocolul original, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare şi elongaţie, sunt următoarele:

1 x 94^0 C	- 2 minute
3 5x 94^0 C	- 1 minut
55^0 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 15 minute

Amestecul de restricţie enzimatică, calculat conform protocolului original pentru 30 µl volum final, este următorul:

Produs PCR -12 µl

Tampon -3 µl

H_2O - 14 µl

Sau3AI- 2 µl

Volum final: 30µl

Teremostatarea amestecului de digestie s-a făcut în baie de apă, peste noapte, la o temperatură de 37^0C.

În urma amplificării fragmentului de 400 pb din gena leptinei şi a restricţiei lui cu enzima *Sau3AI* s-a realizat electroforeza în gel de agaroză de concentraţie 3% şi apoi colorare cu 1 µl bromură de etidiu. Pentru patul de electroforeză s-a folosit tamponul TAE de concentraţie 1x cu următoarea compoziţie chimică: Tris Base, Acid Acetic Glacial şi E .D.T.A. Migrarea s-a făcut la un voltaj de 50 V, de la start şi până la finalul electroforezei.Imaginea obţinută în urma migrării fragmentelor, a fost analizată şi preluată cu un sistem de fotodocumentare Gel Doc. Deoarece rezultatele date în urma utilizării protocolului original, propus de *Leiffers şi colab., 2002,* nu a dat rezultatele dorite, s-a trecut la optimizarea lui.

Şi în cazul acestui protocol, pentru a optimiza condiţiile de reacţie PCR şi parametrii de lucru s-a trecut la determinarea temperaturii la care primerii, corespunzători fragmentului de 400 pb din gena leptinei, se ataşează la matriţă. Din acest motiv s-a efectuat reacţia PCR în gradient de temperatură, într-un Termocycler Eppendorf

Mastercycler, pentru probele de ADN provenite de la indivizi din rasa Brună de Maramureş în intervalul55^0C (temperatura prevăzută în protocolul original) şi 64 ^{0}C (temperatura calculată conform compoziţiei în baze azotate).

Pentru reacţia PCR în gradient de temperatură, am utilizat un amestec de reacţie care a avut în compoziţia lui $MgCl_2$, pentru a spori activitatea Taq polimerazei şi a

favooriza ataşarea primerilor atunci când s-a folosit ADN provenit de la indivizii rasei Brună de Maramureş.

Amestecul de reacţie PCR a fost calculat la un volum final de 25 µl pe probă:

Apa sterilă	- 16,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2-1 µ
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Termocyclerul a fost setat în intervalul de temperatură de la 55^0C, specificată în protocolul original, la temperatura de 64^0 C, calculată de noi şi care o afişează aparatul pentru ultima probă introdusă. Astfel au fost folosite 11 probe cu ADN provenit de la indivizi diferiţi, din rasa numită mai sus.Temperaturile de ataşare pentru probele utilizate sunt următoarele:

- 1 - 55^0 C
- 2 - $55,8^0$ C
- 3 - $56,5^0$ C
- 4 - $57,6^0$ C

- 5 - 58,9^0 C
- 6 - 60,4^0 C
- 7 – 61,7^0 C
- 8 – 62,4^0 C
- 9 - 63,4^0 C
- 10 - 63,8^0 C
- 11 - 64^0 C

Ciclurile termice pentru reacţia PCR efectuată în gradient de temperatură cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, şi elongaţie sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
40 x 95^0 C	- 1 minut
55^0 - 64^{0}C	- 1 minut
72^{0}C	- 1 minut
72^{0}C	- 10 minute

După reacţia de amplificare în gradient de temperatură, pentru determinarea temperaturii optime de ataşare a primerilor, produşii amplificaţi au fost supuşi electroforezei.Migrarea probelor s-a făcut într-un gel de agaroză de concentraţie 2% soluţia folosită pentru patul electroforezei a fost soluţie tampon TAE 1x, iar vizualizarea produşilor a fost posibilă după colorare cu 1 µl bromură de etidiu, migrarea probelor s-a făcut la un voltaj de 100. Imaginea a fost preluată cu un sistem de fotodocumentare Gel Doc. În urma analizei imaginii preluate la probele migrate, provenite de la indivizii rasei Brună de Maramureş, s-a observat profilul electroforetic al fragmentului de 400 pb din gena leptinei, atunci când temperatura de ataşare optimă a primerilor a fost situată între 58,9^{0}C şi 64^{0}C.

Pentru probele de ADN provenite de la indivizii rasei Bălţată românească în aceleaşi condiţii de reacţie şi parametrii de lucru ca şi cei descrişi anterior . După efectuarea electroforezei în gel de agaroză şi a analizării imaginii obţinute, s-a observat că şi la probele provenite de la rasa Bălţată românească, temperatura optimă la care se produce ataşarea primerilor şi amplificarea produsului de 400 pb din gena leptinei, este similară cu rezultatele obţinute la rasa Brună de Maramureş.

Odată stabilită temperatura de ataşare a primerilor, s-au efectuat pentru probele provenite de la indivizii rase Bălţată românească, o serie de reacţii PCR, în care am variat cantităţile de primeri şi condiţiile reacţiei de restricţie enzimatică. Restricţia fragmentului de 400 pb a fost efectuată cu scopul de a evidenţia fragmentele polimorfice de la acest locus dar şi de a detecta genotipurile posibile în populaţia de taurine studiată.

Amestecul (mixul) de reacţie PCR care conţine 1 µl din fiecare primer a fost calculat pentru volum final de 25 µl având următoarea compoziţie:

Apă sterilă	- 16,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2-1 µl
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, elongaţie şi temperatură de ataşare a primerilor de 64^0 C sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
40 x 95^0 C	- 1 minut
64^0	- 1 minut

72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Electroforeza şi migrarea probelor a fost realizată în gel de agaroză de concentraţie 2%, soluţia folosită pentru patul electroforezei a fost TAE 1x, iar profilul electroforetic al produsului PCR de 400 pb, nerestrictat, a fost analizat prin folosirea a 10 µl DNA Step ladder ca etalon şi voltaj de 100V. În urma preluării imaginii s-a observat fragmentul de 400 pb din gena leptinei, amplificat. Într-o altă încercare şi prin utilizarea de probe provenite de la alţi indivizi de la rasa Bălţată românească, s-au efectuat alte reacţii PCR în care am utilizat 2 µl din fiecare primeri. Amestecul de reacţie PCR a fost calculat pentru un volum final de 25 µl pe probă astfel **:**

Apă sterilă	- 14,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2-2 µl
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, elongaţie şi temperatură de ataşare a primerilor de 64^0 C în cadrul unei noi încercări au fost:

1 x 95^0 C	- 5 minute
40 x 95^0 C	- 1 minut

64^0	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Electroforeza s-a efectuat în aceleaşi condiţii, ca la probele testate mai sus.

În aceleaşi condiţii de reacţie PCR şi urmând aceaşi parametrii de lucru, s-au efectuat teste PCR de amplificare şi evidenţiere a produsului de 400 pb din gena leptinei nerestrictat, la probe provenite de la indivizi diferiţi din rasa Brună de Maramureş. În urma acestor încercări şi la această rasă s-au obţinut profile electroforetice ale fragmentelor nerestrictate, aşteptate.

Pentru evidenţierea polimorfismelor este necesară efectuarea restricţiei cu enzimele de restricţie *Sau3AI* şi *MboI*.

S-au calculat amestecurile pentru restricţie şi s-a făcut restricţia fragmentelor amplificate în etapele anterioare, pentru probele provenite de la indivizii ambelor rase luate în studiu.

Restricţia probelor de ADN amplificate, provenite de la indivizii ambelor rase studiate, s-a realizat cu enzima *Sau 3A I* şi cu enzima *MboI,* într-un amestec de reacţie separat pentru fiecare enzimă.

Pentru restricţia enzimatică au fost testate concentraţii diferite de enzimă. Pentru enzima *Sau3AI* am folosit mixuri ce conţineau 1 µl şi mixuri ce conţineau 2 µl de enzimă de restricţie. Amestecul de restricţie ce conţine 1 µl enzimă *Sau3AI* şi 15 µl produs PCR destinat restricţiei, calculat pentru 30 µl final pe probă este :

Produs PCR -15 µl

Tampon - 3 µl

H_2O -11 µl

Sau 3AI -1 µl

Volum final: 30µl

Amestecul de restricţie enzimatică ce conţine 2 µl enzimă *Sau3AI* şi 15 µl produs PCR destinat restricţiei, calculat pentru 30 µl final pe probă este :

Produs PCR -15 µl
Tampon - 3 µl
H_2O -11 µl
Sau 3AI -2 µl
Volum final: 30µl

Probele restrictate cu ambele mixuri de restricţie, ce conţineau enzima *Sau3AI,* au fost termostatate în baie de apă la o temperatură de 37^0C timp de 8 ore.

După termostatare probele au fost supuse electroforezei în gel de agaroză de concentraţie 3%, după colorare cu bromură de etidiu 2 µl şi migrare în soluţie tampon TAE 1x la un voltaj lent de 50V, care permite o separare bună a fragmentelor. Imaginea a fost preluată cu sistemul de fotodocumentare.

Într-o altă încercare am efectuat alte amestecuri de restricţie în care am utilizat enzima de restricţie *MboI* cu alte probe amplificate provenite de la alţi indivizi din ambele rase studiate.

Amestecul de restricţie ce conţine 1 µl enzimă *MboI* şi 15 µl produs PCR ce va fi restrictat, calculat pentru 30 µl final pe probă este:

Produs PCR -15 µl
Tampon - 3 µl
H_2O -11 µl
Mbo I -1 µl
Volum final: 30µl

Amestecul de restricţie ce conţine 2 µl enzimă *MboI* şi 15 µl produs PCR ce va fi restrictat, calculat pentru 30 µl final pe probă, este :

Produs PCR -15 µl

Tampon - 3 µl

H_2O -11 µl

Mbo I -1 µl

Volum final: 30µl

Probele restrictate în condiţiile ambelor amestecuri de restricţie, ce conţineau enzima *Sau3AI,* au fost termostatate în baie de apă la o temperatură de 37^0C , iar timpul de digestie a fost mărit la 10 ore.

După termostatare probele au fost supuse electroforezei în gel de agaroză de concentraţie 4%, după colorare cu bromură de etidiu 2 µl, şi migrare în soluţie tampon TAE 1x la un voltaj lent, de 50V.

Datorită faptului că, la unele probe provenite de la o parte din indivizii rasei Brună de Maramureş, au fost observate restricţii parţiale în cazul ambelor enzime, s-au efectuat alte reacţii PCR, la care s-a modificat un singur parametru şi anume temperatura de ataşare a primerilor care fost de 59^0C .

Amestecul (mixul) de reacţie PCR a fost calculat pentru un volum final de 30 µl şi cu 2 µl din fiecare primeri are următoarea compoziţie:

Apă sterilă	- 19,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2-2 µl
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl

Volum final: 30 µl

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, elongaţie şi temperatură de ataşare a primerilor de 59^0 C, sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
40 x 95^0 C	- 1 minut
64^0	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Amestecul de restricţie, ce conţine 1 µl enzimă *Sau3AI* şi 20 µl produs PCR, ce va fi restrictat, calculat pentru 30 µl final pe probă a fost următorul :

Produs PCR -20 µl

Tampon - 3 µl

H_2O -6 µl

Sau3AI -1 µl

Volum final: 30µl

Termostatarea probelor restrictate s-a făcut la temperatura de 37^0C timp de 8 ore. Probele astfel restrictate şi termostatate au fost migrate în gel de agaroză de concentraţie 4% , pentru buna separare a fragmentelor la un voltaj de 50V.

În urma preluării şi analizării imaginii obţinute, s-au evidenţiat profilele electroforetice aşteptate ale fragmentelor restrictate, atunci când ataşarea primerilor s-a făcut la temperatura de 59^0C.

Pentru o mai bună calitate a profilelor electroforetice şi eliminarea artefactelor, am recurs la purificarea probelor de ADN de la o parte de indivizi proveniţi de la ambele rase. Atât probele purificate cât şi cele nepurificate au fost amplificate cu primerii descrişi de *Pomp şi colab., 1997* şi *Leiffers şi colab., 2002* şi restrictate comparativ cu probele nepurificate.

Metoda de purificare cu fenol a probelor de ADN presupune parcurgerea următoarelor etape:

- în tuburi Eppendorf se plasează 25 µl ADN şi175 µl H_2O până la un volum de 200 µl
- se adaugă 200 µl fenol în fiecare tub
- se vortexează 30 secunde
- centrifugare la 12000 rpm 30 secunde
- se prelevează supernatantul
- peste probele de ADN extras se adaugă 18 µl $NaCl_2$
- se adaugă 400 µl etanol 100%
- se depozitează la - 80^0C
- se centifughează din nou 15 minute la 12000 rpm
- se adaugă etanol 70% şi se centrifughează 5 minute
- se centrifughează în centrifugă cu vacuum
- resuspendare în amestec de restricţie

Condiţiile de reacţie PCR şi parametrii de lucru folosiţi în cadrul comparării celor două protocoale sunt neschimbate şi sunt cele folosite la optimizarea lor.

Pentru probele ADN purificate şi nepurificate, la compararea celor două protocoale de genotipizare studiate, diferă doar mixurile de restricţie enzimatică, provenite de la indivizii ambelor rase studiate.

Amestecul de restricţie enzimatică, cu 1 µl enzima *Sau3AI,* pentru probele de ADN purificate are compoziţia :

Produs PCR
(liofilizat)
Tampon - 3 µl
H_2O -26 µl
Sau 3AI -1 µl
Volum final: 30µl

Amestecul de restricţie enzimatică cu 1 µl enzima *Sau3AI* pentru probele de ADN nepurificate :

Produs PCR- 25 µl

Tampon - 3 µl

H_2O - 1 µl

Sau 3AI -1 µl

Volum final: 30µl

3. În vederea testării protocolului de genotipizare propus de *Lien şi colab. (1997*) a fost utilizată secvenţa de primeri (produs Microsynth – Elveţia) liofilizaţi corespunzători fragmentului de 522pb din gena leptinei:

5'-GTCTGGAGGCAAAGGGCAGAGT-3'

5'-CCACCACCTCTGTGGAGTAG-3'

Primerii fiind liofilizaţi au fost prelucraţi şi diluaţi astfel încât concentraţia finală a primerului sens si antisens să fie de 10 picomoli. Cu ajutorul acestui protocol au fost studiate polimorfismele dintre intronul **2** şi exonul **3** din gena leptinei, pe probe de ADN prelevate de la 50 de indivizi proveniţi din rasa Bălţată românească şi 50 indivizi proveniţi de la rasa Brună de Maramureş. S-a lucrat pe un număr mai mic de indivizi doar pentru a testa dacă acest protocol oferă rezultate bune.

Metoda de lucru utilizată a fost tehnica *PCR-RFLP* şi presupune, amplificarea unui fragment de 522 pb din gena leptinei, prin utilizarea unor primeri specifici, pentru porţiunea din genă pe care dorim să o studiem.

După amplificare se face restricţia fragmentului de 522 pb cu enzima de restricţie *BsaAI* .Această enzimă recunoaşte următorul situs de restricţie:

5' … ACGT … 3'

3' …TGCA … 5'

În prima etapă s-au testat condiţiile menţionate de protocolul original propus de *Lien şi colab., 1997,* utilizând concentraţiile reactivilor date de protocol, astfel :

- dNTPs mix -100M
- Primeri-10 picomoli
- MgCl2-1,5 mM
- *Taq* ADN Polymerase-1,0 U/ µl
- DNA- 80-100 ng
- *Bsa*AI-5 U/ µl

Folosind aceste concentraţii am testat protocolul de genotipizare original în condiţiile de reacţie şi parametrii de lucru, prevăzute de protocol. S-au calculat amestecurile de reacţie în funcţie de concentraţiile reactivilor date pentru reacţia PCR şi pentru restricţia enzimatică, urmând etapele de amplificare, restricţie enzimatică, migrare în gel de agaroză şi colorare cu bromură de etidiu pentru vizualizarea produşilor obţinuţi. Probele de ADN pentru testarea protocolului original au provenit de la indivizi din ambele rase şi au avut purităţi situate între 1,5 şi 1,9 şi de concentraţie 50ng/ µl.

Amestecul (mixul) de reacţie PCR dat de protocol a fost preparat cu următoarea compoziţie, pentru volum final de 25 µl pe probă:

Apa sterilă	- 16,3 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
$MgCl_2$	-P2-1 µl
	- 1 µl
Taq polymeraza	- 0,2 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, prevăzute în protocolul original cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare şi elongaţie sunt următoarele:

1 x 94^0 C	- 5 minute
35 x 94^0C	- 15secunde
64^0 C	- 30secunde
72^0C	- 5 minute
72^0C	-10 minute

Probele de ADN provenite de la indivizii ambelor rase au fost restrictate cu enzima de restricţie *BsaAI,* cu următorul amestec (mix) de restricţie calculat după protocolul propus original:

Produs PCR -10 µl

Tampon – 2,5 µl

H_2O -11,5 µl

Bsa AI -1 µl

Volum final:25µl

După reacţia de restricţie enzimatică, probele au fost termostatate la o temperatură de 30^0C, temperatură la care această enzimă acţionează optim şi lăsate peste noapte.

Probele restrictate au fost supuse electroforezei în gel de agaroză, de concentraţie 2,5% după colorare cu bromură de etidiu. Pentru patul electroforezei s-a utilizat soluţie TAE 1x şi migrarea probelor s-a făcut la un voltaj de 90V.

În urma preluării şi analizării imaginii, rezultate în urma migrării produşilor, PCR s-a constatat că protocolul original nu a dat rezultatele scontate atunci când am utilizat condiţiile de reacţie şi parametrii de lucru daţi în protocolul original, astfel că s-a trecut la optimizarea condiţiilor şi a parametrilor daţi de acest protocol prin mai multe încercări în mai multe repetiţii de amestecuri de reacţie PCR şi de restricţie enzimatică.

S-a calculat în cadrul unei prime încercări un mix de reacţie PCR pentru probe de ADN provenite de le indivizii ambelor rase studiate.

Amplificarea s-a efectuat într-un Termocycler Eppendorf, iar amestecul (mixul) de reacţie a avut în compziţia lui 1 µl din fiecare primer şi a fost calculat pentru 20 µl volum final**:**

Apă sterilă	- 11,7 µl
Tampon	- 2 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2-1 µ
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
AND	- 2 µl
Volum final: 20 µl	

Parametrii daţi de protocolul original au fost modificaţi, iar temperatura de ataşare a primerilor a fost calculată la 59^0 C şi nu de 64^0 C, ca şi în protocolul original. Ciclurile termice pentru reacţia PCR, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare şi elongaţie, sunt următoarele:

1 x 95^0 C	- 5 minute
40 x 95^0 C	- 1 minut
59^0 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Produsul PCR, obţinut de la indivizii ambelor rase, a fost supus restricţiei cu enzima de restricţie *BsaAI,* utilizată în diferite concentraţii.

Amestecul de restricţie, ce conţine 2 µl enzimă *BsaAI* şi 15 µl produs PCR ce va fi restrictat, calculat pentru 30 µl volum final pe probă are compoziţia:

Produs PCR -15 µl
Tampon - 3 µl
H_2O -10µl
Bsa AI -2 µl
Volum final:30µl

Probele au fost supuse restricţiei prin incubare la termostat, timp de 6 ore, la temperatura de 30^0C, temperatură la care lucrează optim această enzimă. Probele restrictate au fost supuse electroforezei prin migrare într-un gel de agaroză de concentraţie 3%, colorat cu 1 µl bromură de etidiu în soluţie TBE 1x folosită pentru patul electroforezei. Pentru compararea benzilor polimorfe s-a folosit ca etalon 50 DNA Step Ladder (Promega), migrarea probelor s-a făcut la un voltaj de 60V pentru o migrare mai bună şi o separare mai lentă, dar sigură, a fragmentelor. Imaginea a fost preluată şi analizată cu un sistem de fotodocumentare Gel Doc.

S-a efectuat o nouă încercare, pe alte probe de ADN, provenite de la alţi indivizi din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş, în cazul căruia a fost calculat un nou mix de reacţie PCR. Amestecul de reacţie PCR dat de protocol, a fost calculat având următoarea compoziţie pentru un volum final 25 µl pe probă şi 2 µl din fiecare primer:

Apă sterilă	- 14,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-2 µl
	- P2-2 µl
$MgCl_2$	-1 µl
Taq polymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl

Volum final: 25 µl

Ceilalţi parametrii, inclusiv temperatura de ataşare a primerilor rămân neschimbaţi.

Produsul PCR obţinut de la indivizii ambelor rase a fost supus restricţiei cu enzima de restricţie *BsaAI,* iar amestecul de restricţie enzimatică în acest caz, conţine 1 µl enzimă *BsaAI* şi 15 µl produs PCR de restrictat, calculat pentru 25 µl final pe probă :

Produs PCR -15 µl

Tampon - 3 µl

H_2O -7 µl

Bsa AI -1 µl

Volum final:25µl

Probele astfel au fost supuse restricţiei, prin incubare la termostat timp de 6 ore, la temperatura de 30^0C.

Reacţia de electroforeză a fost făcută în aceleaşi condiţii ca la probele anterioare cu deosebirea că gelul de agaroză avea concentraţia de 4%.

Într-o altă încercare, s- a efectuat o reacţie PCR cu ajutorul aparatului Real Time PCR, în care am folosit următorul amestec de reacţie PCR şi următoarele concentraţii pentru a obţine un fragment aşteptat de 522 pb, prin observarea curbelor de amplificare date de aparat:

Amestec (mix) de reacţie Seybr Safe (Fermentas) utilizat are următoarea compoziţie:

- KCl_2 -100mM
-Tris Hcl- 40 mM
-PH 8,4
-dNTP- 0,4 mM
- Taq ADN Polymerase - 50 U/µl
-$MgCl_2$ - 6 mM
-Floresceină - 20 nM

-Primeri de concentraţie 10 pmol fiecare.

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, în cazul utilizării aparatului RealTime PCR au fost:

Ciclul 1(1 x)	95^0 C	- 3 minute
Pasul 1		
Ciclul 2 (35 x)	95^0 C	- 1 minut
Pasul 1	94^0C	-1 minut
Pasul 2	59^0C	-1 minut
Pasul 3		-1 minut
72^0C		
Ciclul 3(1x)		7 minute
Pasul 1	72^0C -	
Ciclul 4 (1x)		Aşteptare
Pasul 1	8^0C -	

Probele amplificate au fost restrictate cu enzima *Bsa AI* în cazul căreia am folosit următorul amestec de restricţie enzimatică, cu 1µl enzimă şi 25µl produs PCR pentru digestie, calculate pentru un volum final de 30µl:

Produs PCR - 25µl

Tampon - 3 µl

H_2O - 1 µl

Bsa AI -1 µl

Volum final: 30µl

Termostatarea probelor s-a făcut la temperatura de 30^0C, dar s-a mărit timpul de incubare la 10 ore.

Probele astfel restrictate au fost migrate în gel de agaroză de concentraţie 3 % la un voltaj de 50V în soluţie tampon TAE 1x pentru patul electroforezei, 7 µl DNA Step Ladder folosit pentru determinarea lungimii fragmentelor obţinute, iar imaginea a fost preluată cu acelaşi sistem de fotodocumentare.

6.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII

6.2.RESULTS AND DISCUSSIONS

6.2.1. Testarea şi optimizarea protocolului *PCR –RFLP* pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei *(POMP şi colab., 1997)*

6.2.1.Testing and optimization the PCR – RFLP protocole with the aim of studying the polymorphisms at the leptine gene locus (POMP et al., 1997)

Pentru testarea protocolului, s-a utilizat ADN provenit de la 20 indivizi din rasa Bălţată românească şi 20 indivizi proveniţi de la rasa Brună de Maramureş .

Iniţial a fost testat protocolul original, propus de *Pomp şi colab., 1997* cu parametrii de lucru şi condiţiile de reacţie propuse de autor.

După testarea protocolului original urmând parametrii de lucru şi condiţiile de reacţie PCR şi restricţie enzimatică, rezultatele obţinute nu au fost favorabile (figura 23).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 Ladder

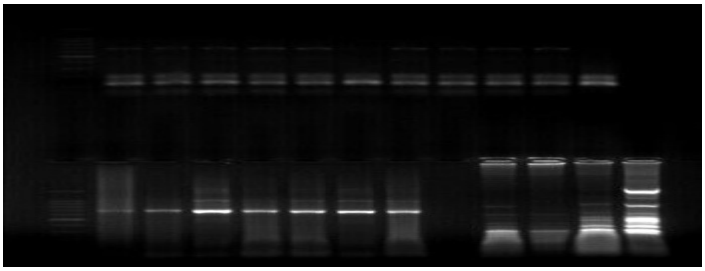


Fig.23. Fragmentul de 1820 pb din gena leptinei (original)

Fig.23.*The fragment of 1820 bp from the leptine gene (original)*

În urma rezultatului electroforezei în gel de agaroză ,în poziţiile 1, 2, 3 în care am migrat probe de ADN amplificate dar nerestrictate nu se observă clar fragmentul de 1820 pb din gena leptinei, iar probele de ADN amplificate provenite de la alţi indivizi din poziţiile 4, 5, 6, 7 pe lângă fragmentul amplificat apar şi produşi de amplificare nespecifici care sunt de nedorit.

După restricţia probelor de ADN amplificate, provenite de la indivizii luaţi în studiu, în urma utilizării amestecului de restricţie entimatică dat de protocolul original , rezultatele nu au fost cele aşteptate. În urma electroforezei în gel de agaroză şi a analizării imaginii nu s-a observat profilul electroforetic al fragmentelor aşteptate, date de protocol pentru evidenţierea polimorfismelor la acest locus, poziţiile 9, 10 ,11 (figura 23).

Conform protocolului dat de *Pomp şi colaboratorii*, fragmentul produsului nerestrictat are o lungime aşteptată de 1820 pb, iar în urma restricţiei cu enzima de restricţie *Sau3AI*, pentru evidenţierea fragmentelor polimorfice, trebuiau să se obţină următoarele fragmente: pentru indivizi cu genotipul AA, fragmente de 730 pb, 690 pb şi 400 pb pentru genotipul AB, fragmente de 730 pb, 690 pb, 400 pb, 310 pb şi 90 pb (ultima bandă nu a putut fi vizualizată în gel), pentru genotipul BB, fragmente de 730 pb, 690 pb 310 pb şi 90 pb (ultima bandă nu se evidenţiază în gel), iar *Pomp şi colab., 1997* a explicat acest fapt prin prisma greutăţii moleculare mai mici.

6.2.1.1. Optimizarea temperaturii de ataşare a primerilor
6.2.1.1.The optimization of the primers alignment temperature

Deoarece utilizarea protocolului original propus de *Pomp şi colab., 1997*, nu a dat rezultatele dorite , nefiind posibilă studierea polimorfismului din intronul **2** de la locusul genei leptinei, s-a trecut la optimizarea acestuia.

Una din cauzele importante pentru care nu a dat rezultate bune reacţia PCR respectiv amplificarea fragmentului de 1820pb din gena leptinei şi restrictarea lui, fiind

temperatura la care primerii se ataşează, s-a trecut la optimizarea temperaturii de ataşare a primerilor. Aceasta s-a făcut prin efectuarea unor reacţii PCR în gradient de temperatură pentru probe de ADN provenite de la indivizii luaţi în studiu de la ambele rase, cu condiţiile de reacţie şi parametrii de lucru descrişi la materialul şi metoda de lucru descrisă *(Subcapitolul 6.1.4).*

În urma electroforezei în gel de agaroză, la probele de ADN provenite de la indivizi din rasa Bălţată românească, profilul electroforetic al produsului PCR nerestrictat, obţinut în reacţie PCR în gradient de temperatură a fost observat atunci când temperatura de ataşare a primerilor a fost de 64^0C, corespunzătoare poziţiei 8 din gel (figura 24).

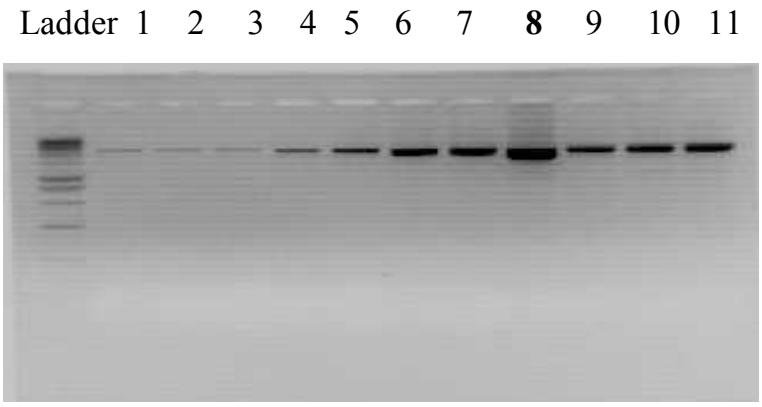


Fig. 24. Profilul electroforetic al produsului PCR obţinut în gradient de temperatură la rasa Bălţată românească (original)

Fig. 24. *The electroforetic profile of the PCR product obtained in temperature gradient in Bălţată românească(original)*

La probele de ADN provenite de la indivizi din rasa Brună de Maramureş la care s-a efectuat reacţia PCR în gradient pentru determinarea temperaturii la care primerii se ataşază, urma efectuării electroforezei s-a constatat că amplificarea fragmentului de 1820 pb a avut loc la temperatura de ataşare de 64^0C la fel ca şi la cealaltă rasă.

În poziţia 8 din gelul de agaroză corespunzătoare temperaturii de ataşare a primerilor de 64^0C se constată rezultate bune ale amplificării fragmentului de 1820 pb.

Pentru poziţiile din gel: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, care au avut temperaturi de ataşare cuprinse între 58^0C şi $65,9^0$C, rezultatele au fost satisfăcătoare (figura 25).

Ladder 1 2 3 4 5 6 7 **8** 9 10 11

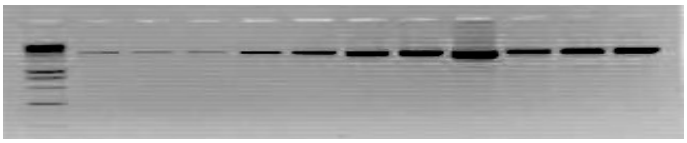


Fig. 25. Profilul electroforetic al produsului PCR de 1820 pb la rasa Brună de Maramureş (original)

Fig. 25. *The electroforetic profile of the 1820 bp PCR product obtained in Brună de Maramureş (original)*

Deoarece la probele provenite de la unii indivizi din rasa Bălţată românească reacţia PCR în gradient nu a dat rezultatele dorite, în urma efectuării unei reacţii PCR normale, pe probe de ADN provenite de la 7 indivizi din această rasă, s-a obţinut produsul amplificat de 1820 pb din gena leptinei, dar au apărut şi produşi nespecifici de amplificare şi artefacte în poziţiile 1, 2, 3, 4, 5, 6 .

S-au obţinut rezultate bune ale amplificării la proba din poziţia 7 din gel (figura 26).

Ladder 1 2 3 4 5 6 7

1820 pb

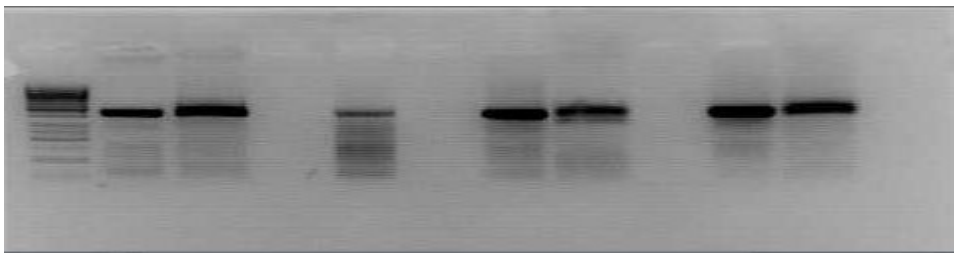


Fig. 26. Profilul electroforetic al produsului PCR de 1820 pb la rasa Bălţată românească(original)

Fig. 26. *The electroforetic profile of the 1820 bp PCR product obtained in Bălţată românească(original)*

6.2.1.2. Optimizarea concentraţiei de ioni de magneziu în reacţia PCR
6.2.1.2. The optimization of the concentration of the magnesium ions in PCR reaction

Clorura de magneziu ($MgCl_2$) este un cofactor cerut de enzima *Taq polimeraza* în timpul reacţiei de amplificare. Concentraţia ionilor de magneziu în amestecul de reacţie este un factor crucial pentru succesul amplificării şi al ataşării cu succes a primerilor. În absenţa unei concentraţii adecvate de ioni de magneziu în reacţia PCR, enzima *Taq polimeraza* poate fi inactivă. Cantitatea de ioni de magneziu liberi, într-un amestec PCR, poate fi influenţată de concentraţia matriţei, prezenţa chelaţilor (EDTA sau citrat), concentraţia dNTP şi prezenţa proteinelor. Excesul de ioni de magneziu în reacţia PCR reduce fidelitatea *Taq polimerazei* şi creşte nivelul amplificărilor nespecifice. Din aceste motive, cercetătorii trebuie să ajusteze empiric concentraţia ionilor de magneziu în reacţia PCR şi să determine astfel concentraţia optimă pentru fiecare reacţie în parte. Pentru aceasta se fac mai multe amestecuri de reacţie în care concentraţia ionilor de magneziu va fi cuprinsă între 1 şi 4 mM Mg^{2+}. După vizualizarea produsului PCR se determină concentraţia optimă la care se obţine cea mai mare cantitate de produs PCR şi cea mai mică cantitate de produs nespecific de amplificare. Cantitatea optimă de ioni de magneziu depinde şi de tipul de polimerază utilizat (*Coşier Viorica, 2007*).

În urma acestor reacţii PCR, în gradient de temperatură, în care în amestecul de reacţie nu era adăugată $MgCl_2$, s-a concluzionat că la probele de ADN provenite de la rasa Brună de Maramureş, ataşarea primerilor a avut loc la temperatura de 64^0C, la fel ca şi la rasa Bălţată românească, cu deosebirea că la aceasta din urmă la unele probe amplificate, provenite de la alţi indivizi, apar rezultate satisfăcătoare pentru această rasă.În urma efectuării unei alte reacţii PCR în gradient, la probe provenite de la alţi indivizi din rasa Bălţată românească, în urma adăugării în amestecul de reacţie PCR a 1µl $MgCl_2$ de concentraţie 10 mM, rezultatele ampificării au fost favorabile cu evidenţierea produsului amplificat de 1820 pb din gena leptinei. Acesta poate fi observat în poziţia 7 din gel, corespunzătoare temperaturii de ataşare a primerilor de 64^0C. Poziţiile 1, 2, 3, 4, 5, 6 corespund probelor din intervalul de temperatură cuprins $58,2^0$C şi $62,8^0$C (figura 27).

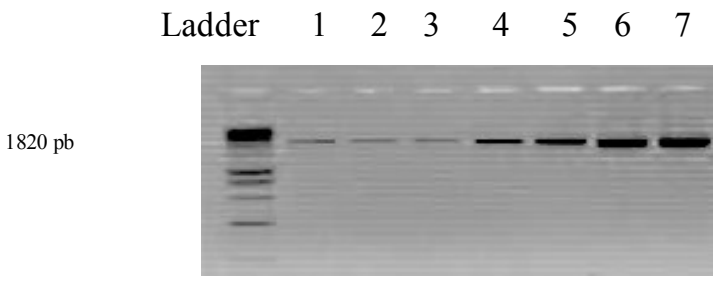


Fig. 27. Profilul electroforetic al produsului PCR în gradient în prezenţa $MgCl_2$ la rasa Bălţată românească (original)

Fig. 27. *The electroforetic profile of the PCR product in gradient obtained in presence of the $MgCl_2$ in Bălţată românească(original)*

În urma efectuării unei noi reacţii PCR, în condiţii normale, cu adăugarea în amestecul de reacţie a 1 µl $MgCl_2$ la o temperatură de ataşare a primerilor determinată de 64^0C, în urma efectuării restricţiei fragmentului de 1820 pb la indivizii proveniţi de la rasa Bălţată românească s-a constatat că restricţia cu 1µl enzimă *Sau3A I* a fost parţială, datorită faptului că s-au observat doar fragmente de 730 pb, 690 pb şi 400 pb corespunzătoare indivizilor cu genotipul homozigot AA, ultimele benzi nefiind prea bine evidenţiate în gel şi fragmente de 730 pb, 690 pb, 400 pb, 310 pb şi 90 pb, corespunzătoare poziţiilor 1, 2, 3 din gel. Ultimele benzi, care ar trebui să corespundă indivizilor cu genotip heterozigot AB, nu se evidenţiază în gel *(Carşai Crina, 2007)*. În acest caz nu s-a semnalat prezenţa unor produşi nespecifici de amplificare (figura 28).

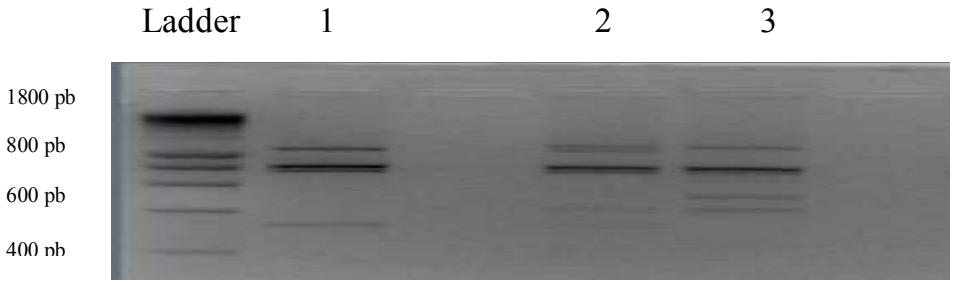


Fig. 28. Profilul electroforetic al produsului PCR digerat cu enzimă *Sau 3A I* la rasa Bălţată românească(original)

Fig. 28. *The electroforetic profile of the PCR product digested with 1 µl Sau 3A I in Bălţată românească(original)*

În urma unei noi reacţii PCR, tot în prezenţa $MgCl_2$ în mixul de reacţie, atunci când s-a făcut digestia produsului de 1820 pb din gena leptinei, la probe provenite de la alţi indivizi proveniţi de la rasa Bălţată românescă, restricţia cu 2 µl enzimă *Sau3AI* a fost de asemenea doar parţială, datorită faptului că s-au observat doar fragmentele de 730 pb, 690 pb şi 400 pb corespunzătoare genotipului homozigot AA vizibile în poziţiile 1,2,3 din gel. Fragmentele de 730 pb, 690 pb, 400 pb, 310 pb şi 90 pb corespunzătoare indivizilor cu genotip heterozigot AB nu au fost toate evidenţiate în gel. Nu se constată în gel prezenţa nici unui individ posibil homozigot BB în probele luate în studiu (figura 29).

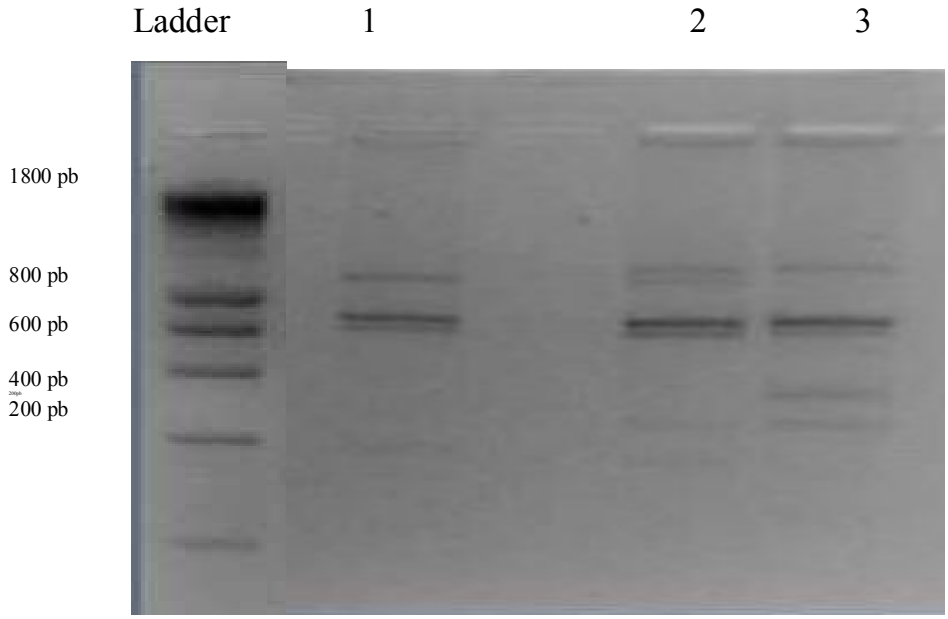


Fig. 29. Profilul electroforetic al produsului PCR digerat cu 2 µl enzimă *Sau 3A I* la rasa Bălţată românească(original)

Fig. 29. *The electroforetic profile of the PCR product digested with 2 µl Sau 3A I in Bălţată românească(original)*

Rezultatele obţinute în urma efectuării unei alte reacţii PCR şi a restricţiei fragmentului de 1820 pb din gena leptinei, cu 1 µl enzimă *Sau 3A I,* respectiv 2 µl enzimă *Sau 3A I* la probele provenite de la indivizi din rasa Brună de Maramureş, în aceleaşi condiţii de reacţie şi parametrii de lucru ca şi la probele provenite de la indivizii Bălţată românească,au fost satisfăcătoare în sensul că au fost detectaţi doar indivizi presupuşi heterozigoţi AB, evidenţiaţi în poziţiile 1, 2, 3, 4 din gelul de agaroză.

Aceste genotipuri detectate ar fi trebuit să prezinte un profil electroforetic cu: 730 pb, 690 pb, 400 pb, 310 pb şi 90 pb, dar în cazul nostru nu s-au observat decât primele trei fragmente (figura 30).

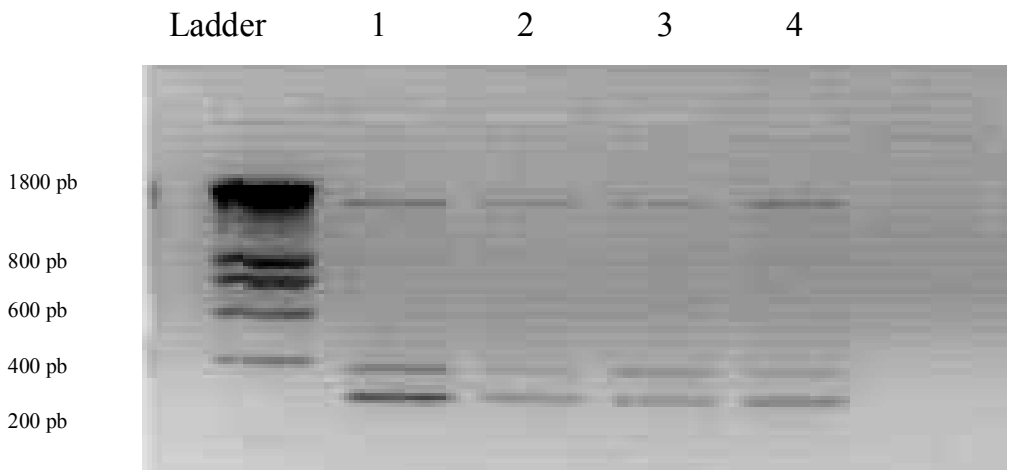


Fig. 30. Profilul electroforetic al produsului PCR digerat cu 1 µl enzimă *Sau 3A I* la rasa Brună de Maramureş(original)

Fig. 30. *The electroforetic profile of the PCR product digested with 1 µl Sau 3A I in Brună de Maramureş(original)*

Atunci când reacţia PCR şi restricţia enzimatică s-a efectuat în aceleaşi condiţii şi parametrii de lucru, dar cu probe provenite de la alţi indivizi din rasa Brună de Maramureş, în gelul de agaroză s-au evidenţiat doar fragmente de 730, 690 pb corespunzătoare indivizilor cu genotipul homozigot AA, în poziţiile 1,2,3,4 din gel, ultimele benzi nefiind prea bine evidenţiate.

În acest caz nu se constată prezenţa nici unui profil, corespunzător indivizilor cu genotip heterozigot AB şi homozigot BB (figura 31).

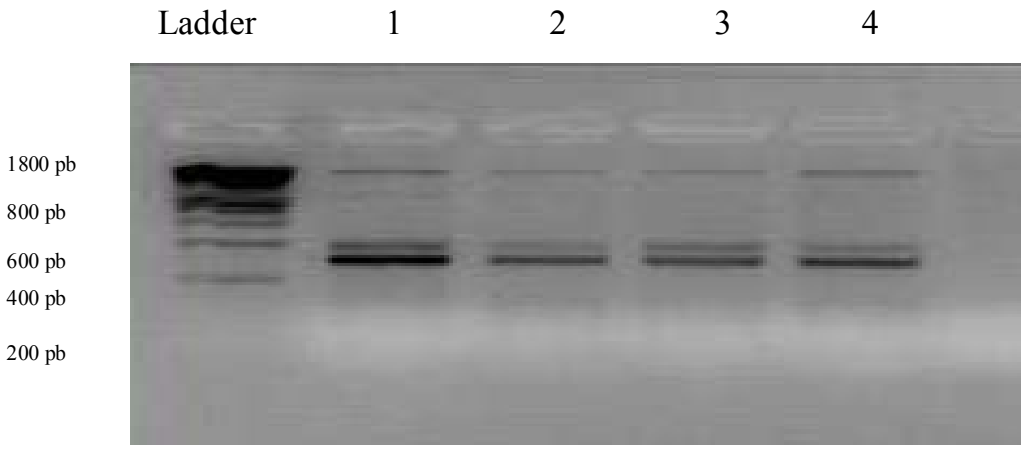


Fig. 31. Profilul electroforetic al produsului PCR digerat cu 2 µl enzimă *Sau 3A I* la rasa Brună de Maramureş(original)

Fig. 31. *The electroforetic profile of the PCR product digested with 2 µl Sau 3A I in Brună de Maramureş(original)*

În cadrul încercării de optimizare a acestui protocol s-a determinat şi optimizat temperatura de ataşare a primerilor în cadrul probelor de ADN provenite de la indivizi diferiţi din ambele rase. La ambele rase, în urma optimizării protocolului a fost posibilă evidenţierea fragmentului amplificat de 1820 pb, nerestrictat din gena leptinei, dar atunci când s-a efectuat restricţia cu enzima de restricţie *SauAI* a fost posibilă vizualizrea fragmentelor polimorfice, corespunzătoare indivizilor cu genotipuri diferite.

6.2.1.3. Detectarea unei greşeli de împerechere în secvenţa primerilor utilizaţi
6.2.1.3. Detection of a pairing mistake within the sequence of the used primers

Bazele de date *NCBI* şi *EMBL* pun la dispoziţia cercetătorului un bogat material informativ cu privire la stadiul actual al cunoaşterii în ceea ce priveşte cartarea genoamelor de la diferite specii. În urma alinierii primerilor şi a studierii secvenţei întregi a genei leptinei, care are o lungime de 4067 pb (*www. ncbi.nlm.nih.gov*), s-a constatat că există o eroare în protocolul lui *Pomp şi colab. (1997*), la nivelul unei nucleotide situate în primerii antisens, respectiv prezenţa citozinei în loc de timină.

5'-GTCACCAGGATCAATGACAT-3'
5'-AGCC**C**AGGAATGAAGTCCAA-3'

Pentru fragmentul de 1820 pb în urma digestiei enzimatice se aşteptau următoarele fragmente, conform protocolului *Pomp şi colab. (1998*):

- pentru indivizi cu genotipul AA fragmente de 730 pb, 690 pb şi 400 pb
- pentru genotipul AB fragmente de 730 pb,690 pb, 400 pb, 310 pb şi 90 pb ultima bandă neevidenţiată în gel)
- pentru genotipul BB fragmente de 730 pb, 690 pb 310 pb şi 90 pb ultima bandă neevidenţiată în gel.

În urma testării acestui protocol s-au obţinut doar rezultate parţiale. Se presupune că acest fapt s-ar datora greutăţii moleculare mai mici a ultimei benzi. Acest protocol a fost testat pe rasele Siemental, Angus, Gelbviech, Limousin, Brahman, Holstein şi Hereford. În urma testării, prin restricţie cu enzima *Sau3AI*, s-a observat un nou polimorfism, adiţional. Fragmentul de 690 de perechi de baze, la rasele amintite, a fost digerat la rândul său în 2 fragmente de 470 pb şi 220 pb *(Pomp.şi colab., 1997)*.

6.2.1.4. Optimizarea computerizată şi analiza de secvenţe în vederea determinării polimorfismului Sau3AI din gena leptinei

6.2.1.4. Computer optimization and sequence analysis with the aim of identification of the Sau3AI polymorphism from the leptine gene

Produsul PCR de 1820 pb a fost evidenţiat în gel de agaroză la ambele rase luate în studiu. În urma alinierii primerilor, făcută în secvenţa genei leptinei din banca de gene, pentru căutarea situsurilor enzimei *Sau*3AI s-au constatat următoarele aspecte:

Sursa de informare *www.ncbi.hln.nib.gov* menţionează că în gena leptinei enzima de restricţie *Sau 3A I*, recunoaşte următoarea secvenţă situs de restricţie:

5' … GATC … 3'
3' …CTAG … 5'

De asemenea, în cadrul acesteia se specifică faptul că dimensiunea produsului PCR este 1837 pb, diferit de cel citat de *Pomp şi colab., 1997* şi anume de 1820 pb.

În tabelele 8 şi 9 se pot observa lungimile fragmentelor care ar trebui să rezulte în urma restricţiei cu enzima *Sau3AI* care sunt diferite de cele citate în protocolul *Pomp şi colab, 1997*.

Pentru posibilii indivizi homozigoţi literatura de specialitate *(sursa www.ncbi.hln.nib.gov)* semnalează prezenţa fragmentelor pentru genotipul BB -742 pb, 696 pb 392 pb şi 8 pb, ceea ce este diferit de protocolul *Pomp şi colab., 1997* (tabelul 8).

Tabelul 8

Structura fragmentelor din gena leptinei obţinute în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Sau 3A I* (sursa www.ncbi.hln.nib.gov)

Table 8

The structure of the fragments from the leptine gene obtained after restriction with Sau 3A I (source www.ncbi.hln.nib.gov)

Nr.crt *No.*	Capete *Heads*	Coordonate *Coordinates*	Lungime (pb) *Length (bp)*
1	*Sau3AI – Sau3AI*	9-750	742
2	*Sau3AI* – capătul din dreapta	1142-1837	696
3	*Sau3AI – Sau3AI* capătul din stânga	751-1141	391
4	*Sau3AI*	1-8	8

În protocolul *Pomp şi colab.,1997* se obţineau următoarele fragmente: pentru homozigoţii AA – 730 pb, 690 pb şi 400 pb, pentru heterozigoţi AB -730 pb,690 pb, 400 pb, 310 pb şi 90, iar pentru posibilii homozigoţi BB -730 pb, 690 pb 310 pb şi 90 pb, aceştia fiind mai rari în populaţiile de taurine. Sursa *www.ncbi.hln.nib.gov,* semnalează prezenţa următoarelor fragmente care ar trebui să se obţină pentru genotipul AA -742 pb, 696 pb şi 391 pb, pentru heterozigoţi AB -742 pb, 696 pb, 391 pb, şi 8 pb (tabelul 9).

Tabelul 9

Structura fragmentelor din gena leptinei, obţinute în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Sau3A I* (sursa www.ncbi.hln.nib.gov)

Table 9

The structure of the fragments from the leptine gene obtained after restriction with Sau 3A I (source www.ncbi.hln.nib.gov)

Nr.crt *No.*	Capete *Heads*	Coordonate *Coordinates*	Lungime (pb) *Length (bp)*
1	capătul din stânga – *Sau3AI*	1-8	8
2	*Sau3AI – Sau3AI*	9-750	742
3	*Sau3AI – Sau3AI*	751-1141	391
4	*Sau3AI* – capătul din dreapta	1142-1837	696

Structura fragmentului din gena leptinei, obţinut în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Sau 3A I* este următoarea:

gtcaccagg atcaatgaca tctcacacac ggtagggagg

gactgggaga cgaggtagaa ccgtggccat cccgtggggg accccagagg ctggcggagg

aggctgtgca gccttgcaca ggccccagtg gcctggacgc ccccctggca taaagacagc

tcctctcctc ctctacttcc cttgcctcct gccttctcac tctcctccct cccagaccgg

aatcctagtg cccaggccca gaaggagtca cagaggtcct ggggtcccct tggcaggtgg

ccagaacccc agcagcagtc cctctgggcc tccatctcat ttctagaatg ttttagtcgt

taggcattct tcctgcctgg taactgagct tagaccctgc gagctcatta ctcattactg

ccagccctgc ctgtcaagcc ctcttcagat acaaccctct gtgtttttgt aaatagttat

cagtgtctct tggggcattt tttctgaggt ccataagctc agacctgcaa ccatagatga

ggtctgtatt tagaatgagg gagatgtctg taaagtctta agctagtcag gttccacaag

gtttttaaac tccagtttcc tcatctagaa aatgaaagtg ggaaagtgtt agttgctcag

tcatgtccaa ctctttgaga ccccatgaac tgtagtctac caggctcctc tgtccatgaa
attcttcagg caagaatact ggagtggctt gttattttct tctcccaaca agatcttccc
aacccaggga ttgaacctgg gtcttctaaa ttgcaggcag attctttacc gtctgagcca
ccagggaaac ccataagacc ttgtgaagac tattaagata gtcatctaga caacaagact
atcttaatag tcttcataag gtcttcatga gactaaatta gataaagcaa gtgaccctcc
ctgaataccc ttgcagaacc agaactgtgt gtgccctctt tcaaggtttt cagtcatgac
ttttgatagc ttcccacctt aaaagccaac ttgctcacct gcgtggagca atctggagac
ttccacatct cctgaccact ctatatttct aacagtggct ttgggaagcc agagagcagt
taggtagcca gaagcgggga cagatcagaa atagacagtg tctgcatttc ctagagaaaa
gcccttaaat tcattgcttt caaaacagtc attcagcaag ctgtacacaa tagacccaga
gtgccccaac ctgtgtggtg ccgggattga ttgctgtggg tggcggagag gggagagccc
ctctggtaac cagggttact tgagcagagc agtgagctgg ggcatcgctg gggtaatggc
ctgaatccct tagggggtga gacttcctgg agaatctgac tgtgagggag gagtctgctt
ggggtggaag agttggggac ggggaatgta cggaagacct caatgcctgg ggaagaaact
caagcaggaa atagggagtc atggctggtt ctatagcaga gtcatttgga aaagggaaca
gcctgcaaag gctggtctgg aggcaaaggg cagggtggtt tgggaagggc agaaagatag
gagcccagga gaccagcttg gaaacatggt ggtcacgtgg gcacaagaag taagggccca
gggaggatgg tgtggaagcg ggggaggaag cacctctacg ctctagggaa aggcggagtc
aggggagctc tgaggagctg ccctctctcc cactgagctc ttgctctccc cttcctcctg
catagcagtc cgtctcctcc aaacagaggg tcactggttt ggacttcatc cctgggct

În conformitate cu datele bibliografice (*www.ncbi.hln.nib.gov)* lungimea fragmentului de 1837 pb din gena leptinei care este restrictat cu enzima *Sau3AI* în vederea obţinerii şi studierii polimorfismelor la acest locus (figura 32).

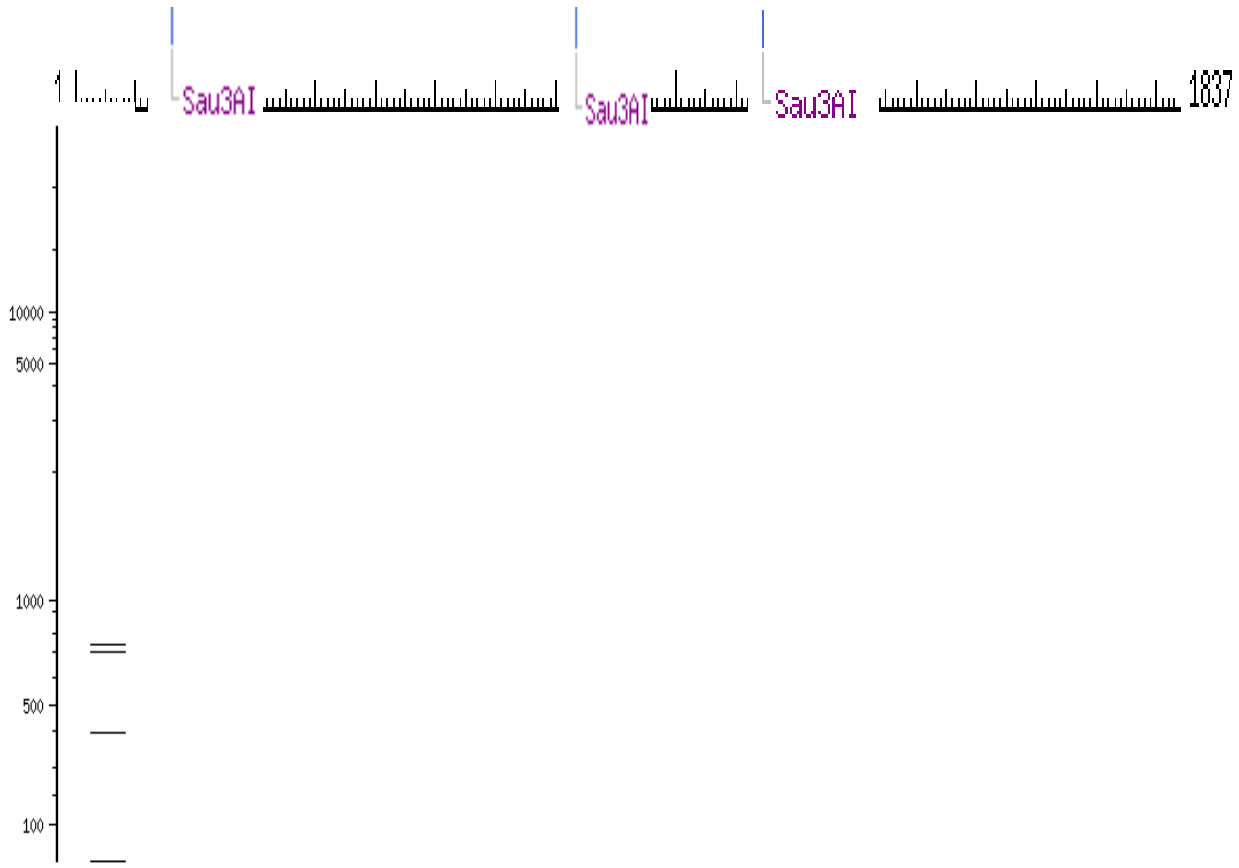


Fig. 32. Situsul de restricţie al enzimei *Sau 3AI* (sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Fig. 32. *The restriction site of the Sau 3AI (source www.ncbi.hln.nib.gov)*

De asemenea este reprezentat schematic locul unde enzima Sau3AI flanchează fragmentul de 1837 pb din gena leptinei semnalat de sursa *www.ncbi.hln.nib.gov(*figura 32).

6.2.2 . Testarea şi optimizarea protocolului *PCR –RFLP* pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei (*LEIFFERS şi colab., 2002)*

6.2.2. Testing and optimization of the protocole with the aim of studying the polymorphisms at the leptine gene locus (LEIFFERS et al., 2002)

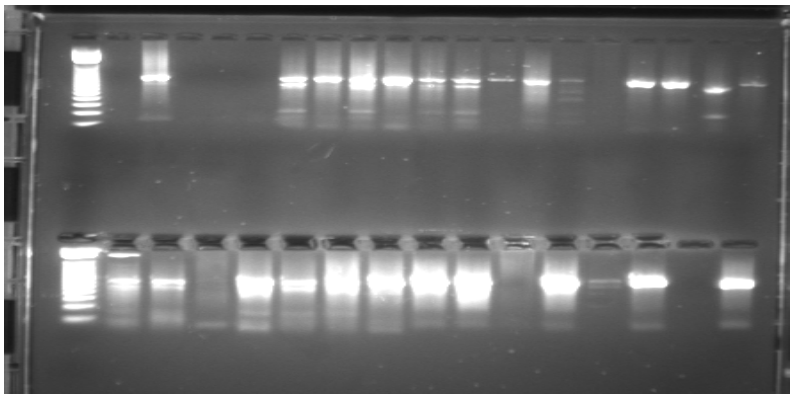
Cel de-al doilea protocol testat şi optimizat a fost protocolul propus de *Leiffers şi colaboratorii, 2002* , care au studiat diferite polimorfisme existente în intronul şi exonul **2** prin tehnica *PCR-RFLP,* cu ajutorul enzimei de restricţie *Sau3AI.* Deoarece enzima

de restricţie *Mbo I* are acelaşi situs de restricţie ca enzima *Sau3 A I,* utlizată de *Leiffers* şi echipa lui, am testat eficienţa acestei enzime de restricţie.

Conform protocolului propus de *Leiffers şi colab., 2002*, lungimea fragmentului amplificat, rezultat în urma reacţiei PCR ar trebui să fie de 400 pb. În urma restricţiei cu enzima *Sau3AI,* utilizată în protocolul original în urma restricţiei fragmentului amplificat ar trebui să se obţină următoarele fragmente astfel: pentru indivizii homozigoţi AA un singur fragment, cu lungime de 400 pb care nu va fi digerat de enzimă, pentru indivizii heterozigoţi AB, ar trebui să se obţină trei fragmente cu lungimi de 400pb, 300pb şi 100pb, iar pentru indivizii homozigoţi BB, ar trebui să se obţină două fragmente cu lungimi de 300pb şi 100 pb.

În urma testării protocolului original propus de *Leiffers şi colab., 2002* s-au obţinut profilul electroforetic aferent restricţiei fragmentului de 400 pb din gena leptinei cu enzima de restricţie *Sau3AI* nu a condus în cazul celor 26 de poziţii din gelul de agaroză la evidenţierea prezenţei fragmentelor aşteptate şi au fost detectaţi şi produşi de amplificare nespecifici, care nu sunt de dorit pentru studierea unui polimorfism de la un anumit locus (figura 33).

Ladder 1 2 3 4 5 6 7 8 9 1011 12 13



Ladder 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

Fig.33. Rezultatele testării protocolului iniţial *Leiffers şi colab., 2002(*original)

Fig.33.*The testing results of the initial protocole Leiffers et al., 2002(original)*

Deoarece, în urma testării protocolului original, rezultatele nu au fost cele aşteptate am trecut la optimizarea lui prin mai multe încercări şi efectuarea de repetate amestecuri de reacţii PCR şi restricţii enzimatice, în vederea obţinerii fragmentelor aşteptate şi a evidenţierii polimorfismului dorit.

Rezultatele obţinute în urma efectuării reacţiei PCR în gradient de temperatură cu probele de ADN provenite de la indivizii ambelor rase luate în studiu, au evidenţiat faptul că, temperatura optimă la care are loc ataşarea primerilor este situată între $58,9^0$ şi 64^0C, diferite de temperatura utilizată în protocolul original. În gelul de agaroză, profilele corespunzătoare acestor temperaturi optime, detectate prin reacţii PCR în gradient , la care se poate evidenţia fragmentul de 400 pb amplificat, corespund poziţiilor 7, 8, 9, 10, 11 din gelul de agaroză. În poziţiile 1, 2, 3, 4, 5,6 din gel, temperaturile de ataşare a primerilor au fost apropiate de cele date în protocolul original, dar în care se poate observa prezenţa unor amplificări nespecifice (figura 34)

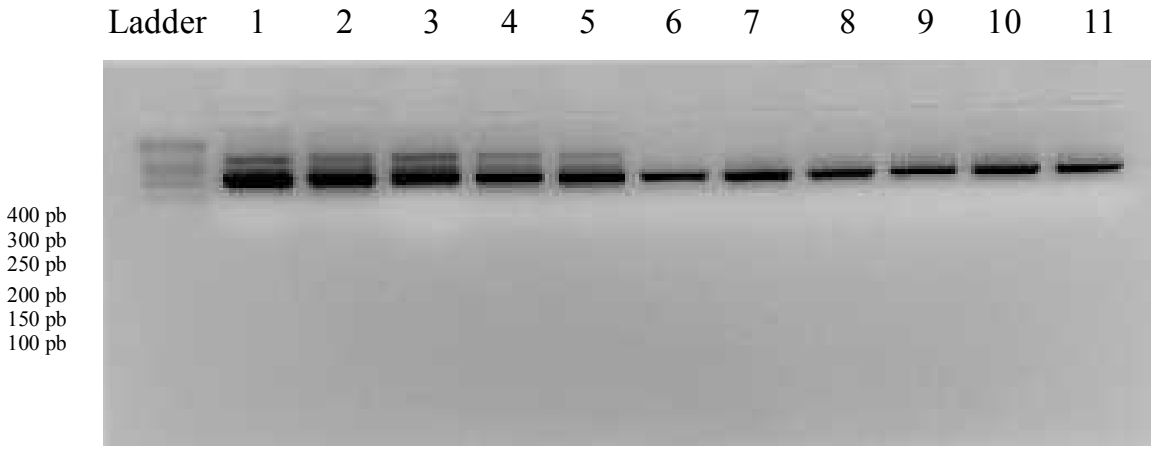


Fig. 34. Profilul electroforetic al produsului PCR în gradient de temperatură la indivizii din rasa Brună de Maramureş şi Bălţată românească(original)

Fig. 34. *The electroforetic profile of the PCR product in temperature gradient in Brună de Maramureş and Bălţată românească individuals(original)*

S-a concluzionat astfel, că temperatura optimă de ataşare la 64^0C, ar fi cea mai indicată deoarece această temperatură furnizează produşi PCR intacţi la ambele rase.Aceasta este o informaţie deosebit de importantă cu privire la reacţia PCR care se desfăşoară în condiţii foarte bune, fără a rezulta erori de amplificare şi aceste rezultate obţinute au fost hotărâtoare pentru optimizarea reacţiei PCR.

6.2.2.1. Determinarea temperaturii de aliniere a primerilor şi amplificarea fragmentului de 400 pb din gena leptinei

6.2.2.1. Determination of the primers alignment temperature and amplification of the 400 bp fragment from the leptine gene

Ca urmare a rezultatelor bune, obţinute în urma reacţiei PCR în gradient, în urma efectuării testelor PCR în condiţiile de reacţie şi parametrii de lucru descrişi la materiale şi metode, atunci când temperatura de ataşare a fost de 64^0C, la probele provenite de la indivizii rasei Bălţată românească în gelul de agaroză, a fost vizualizat fragmentul de 400 pb din gena leptinei, amplificat şi nerestrictat, ce se poate observa în poziţiile 1, 2, 3, 4 şi 5 din gelul de agaroză, în spaţiul gol observat în gel nu a fost încărcată nici o probă (figura 35).

În condiţii asemănătoare cu cele utilizate anterior, la probele provenite de la indivizi din rasa Brună de Maramureş, rezultatele au fost bune atunci când temperatura de ataşare a primerilor a fost de 64^0C. Prezenţa fragmentului de 400 pb amplificat dar nerestrictat, la această rasă, este observată în poziţiile 1, 2, 3, 4 şi 5 din gelul de agaroză.

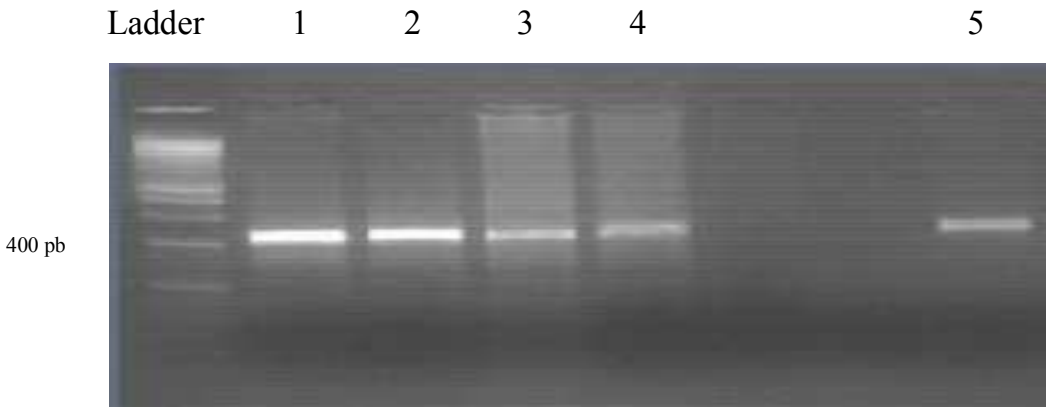


Fig. 35. Profilul electroforetic al produsului PCR la indivizi din rasa Bălţată românească şi evidenţierea produsului de 400 pb(original)

Fig. 35. *The electtroforetic profile of the PCR product in Bălţată românească individuals and emphasizing the 400 bp product(original)*

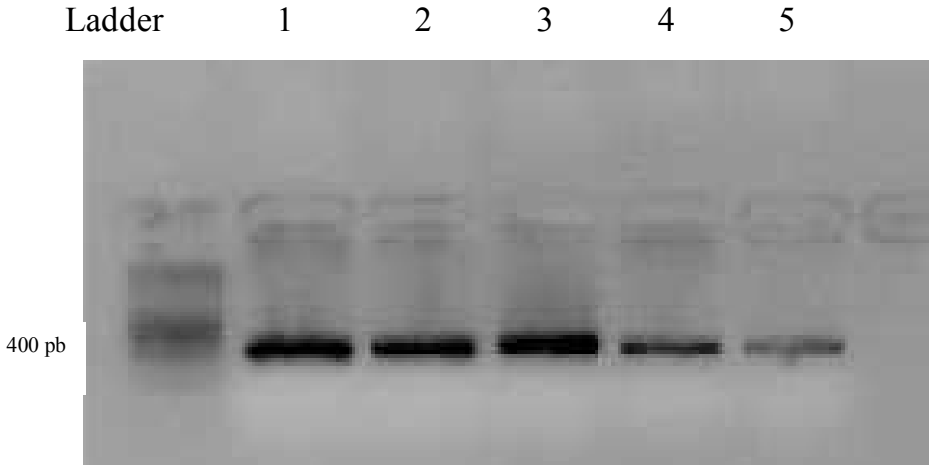


Fig. 36. Profilul electroforetic al produsului PCR la rasa Brună de Maramureş şi evidenţierea produsului de 400 pb(original)

Fig. 36. *The electtroforetic profile of the PCR product in Brună de Maramureş and emphasizing the 400 bp product(original)*

6.2.2.2 .Digestia cu enzimele Sau 3AI şi MboI a produsului PCR de 400 pb şi analiza fragmentelor rezultate

6.2.2.2. Digestion with the Sau 3AI and MboI enzymes of the 400 bp product and analyzes of the resulted fragments

După obţinerea produsului PCR de 400 pb din gena leptinei şi restrictarea lui enzima de restricţie *Sau3AI,* la probele provenite de la indivizi din Bălţată românească au fost obţinute rezultate bune atunci când am utilizat 1 µl de enzimă. (figura 37).

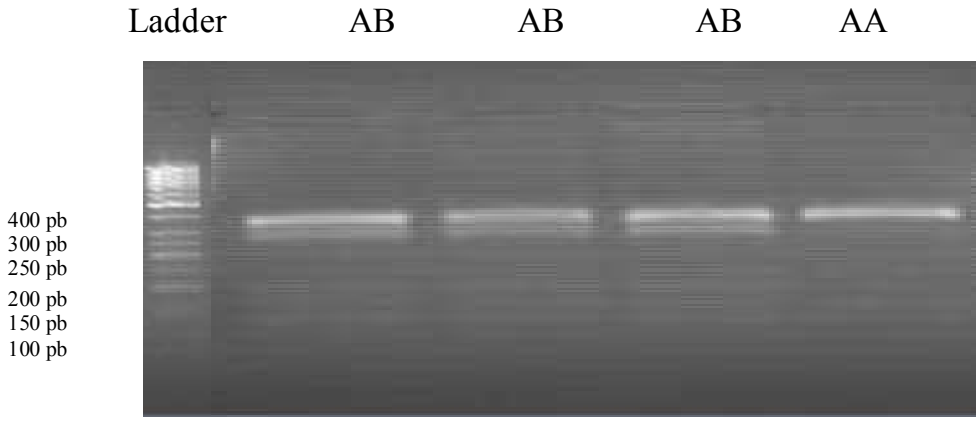


Fig. 37. Profilul electroforetic al fragmentului restrictat cu enzima *Sau 3A I* la indivizii din rasa Bălţată românească(original)

Fig. 37. *The electroforetic profile of the restricted fragment with Sau 3A I in Bălţată românească individuals(original)*

În profilul electroforetic, obţinut în gelul prezentat anterior, se evidenţiază fragmentele de 400 pb şi respectiv 300 pb pentru indivizii cu genotip heterozigot AB şi un singur profil, corespunzător fragmentului de 400 pb, corespunzător unui individ homozigot AA.

Conform literaturii de specialitate (*Leiffers şi colab., 2002*) şi analizei computerizate a situsurilor de restricţie din genă, alela A nu este restrictată de enzima *Sau*

3A I , în timp ce alela B este restrictată de enzimă într-un singur situs. Aplicarea acestui protocol conduce la identificarea următoarelor genotipuri posibile: AA (400 pb), AB (400pb, 300 pb şi 100 pb) şi BB (300 pb şi 100 pb).

Rezultatele obţinute, în cazul electroforezei fragmentului restrictat, la indivizii din rasa Bălţată Românească, evidenţiază trei fragmente de 400 pb şi respectiv 300 pb şi unul de 100 pb, greu vizibil în gel, ceea ce ne determină să presupunem că aceşti indivizi ar fi heterozigoţi AB, ultima bandă având greutate moleculară mică şi fiind dificil de evidenţiat în gelul de agaroză. Pentru compararea lungimii fragmentelor obţinute s-a folosit pentru comparare ladder-ul de 100 pb DNA Step Ladder (Promega).

În urma restricţiei produsului PCR obţinut de la probe de ADN de la alţi indivizi din rasa Bălţată românească, în condiţii de reacţie identice cu cele menţionate anterior, cu excepţia faptului că timpul de acţiune a enzimei de restricţie *Sau3 AI* a fost mult mărit şi cantitatea de enzimă a fost de 2 µl de enzimă pe probă, a condus la obţinerea profilelor heterozigote AB, cu fragmente de 400 pb, 300 pb şi 100 pb, ultima bandă nefiind bine evidenţiată în gel şi observarea unui individ, homozigot AA, corespunzător fragmentului de 400 pb (figura 38).

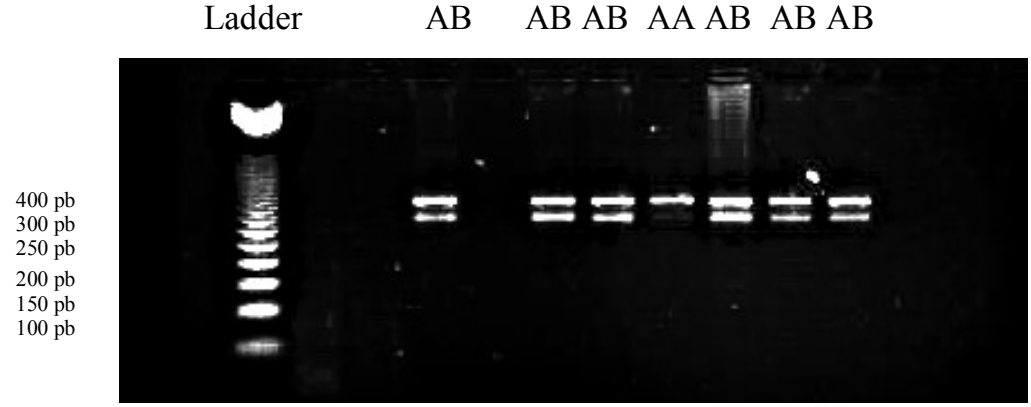


Fig.38. Profilul electroforetic de evidenţiere a heterozigoţilor AB (*RFLP/Sau 3A I)* la indivizii din rasa Bălţată românească(original)

Fig. 38. *The electroforetic profile of emphasizing the AB heterozygous (RFLP/Sau 3A I) in Bălţată românească individuals(original)*

Rezultate bune au fost obţinute şi atunci când restrictarea produsului PCR, s-a făcut la probe provenite de la indivizii rasei Brună de Maramureş. Când a fost realizată restricţia produsului PCR, de 400 pb, cu 1 µl enzima *Sau 3AI,* au fost detectaţi indivizi cu genotip AA cu profile corespunzătoare fragmentului de 400 pb şi indivizi heterozigoţi cu genotip AB, corespunzători fragmentelor de 400 pb, 300 pb şi fragmentului de 100 pb puţin vizibil în gel (figura 39).

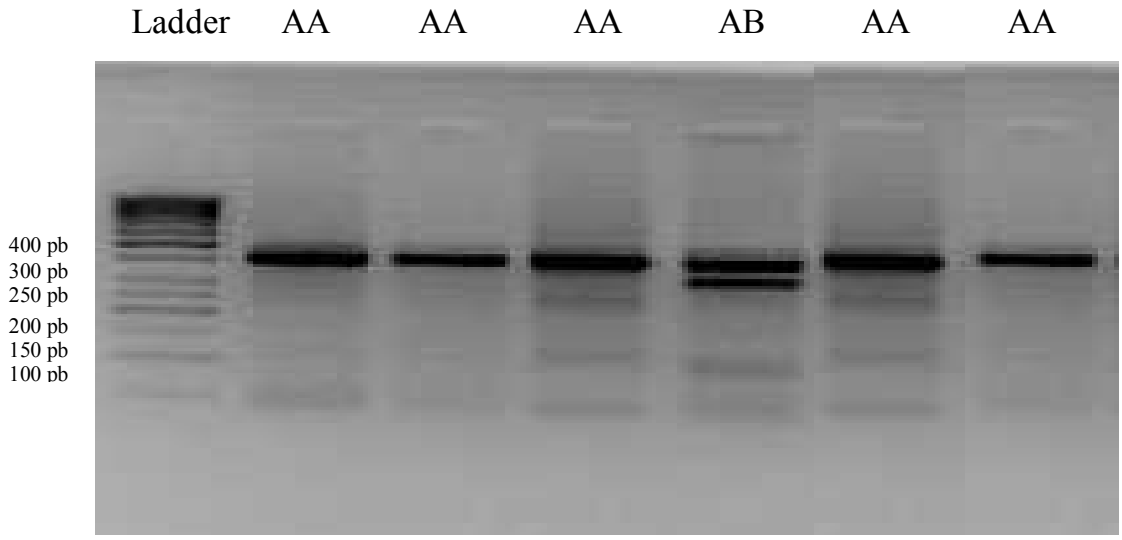


Fig.39. Profilul electroforetic al fragmentului restrictat cu enzima *Sau 3A I,* la indivizii din rasa Brună de Maramureş(original)

Fig. 39. *The electroforetic profile of the restricted fragment with Sau 3A I in Brună de Maramureş individuals(original)*

Atunci când restrictarea produsului PCR de 400 pb s-a făcut la probe provenite de la alţi indivizi ai rasei Brună de Maramureş, când a fost realizată restricţia produsului PCR de 400 pb cu 2 µl enzima *Sau 3AI.* Au fost detectaţi indivizi cu genotip AA, cu profile corespunzătoare fragmentului de 400 pb.

Într-o altă încercare, au mai fost detectaţi şi indivizi heterozigoţi cu genotip AB, corespunzători fragmentelor de 400 pb , 300 pb respectiv de 100 pb, puţin vizibil în gel (figura 40).

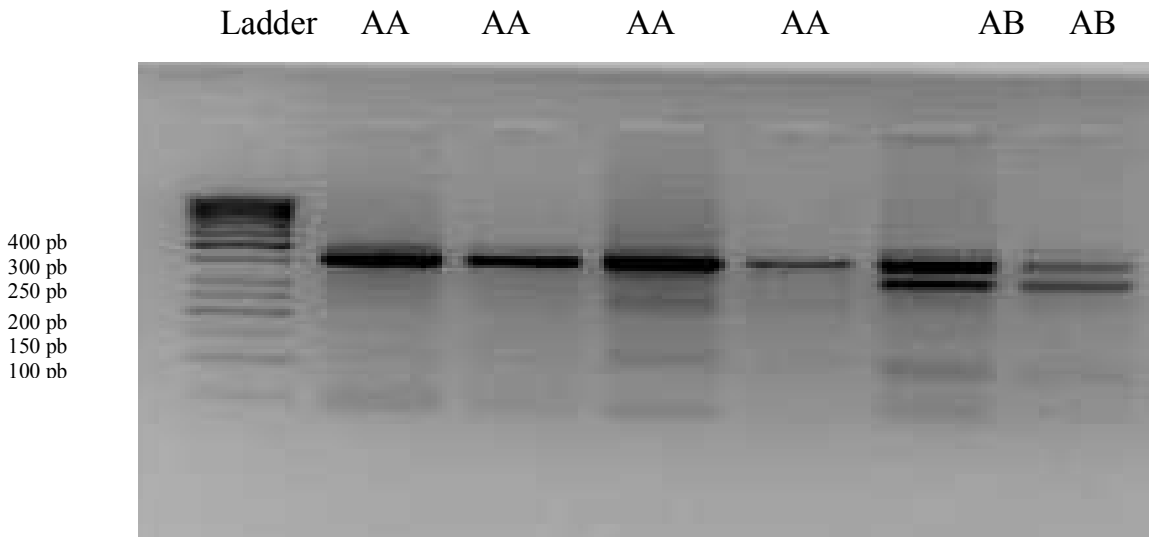


Fig.40. Profilul electroforetic al fragmentului restrictat *Sau 3A I* la indivizii din rasa Brună de Maramureş(original)

Fig. 40. *The electroforetic profile of the Sau 3A I restricted fragment in Brună de Maramureş individuals(original)*

În urma efectuării unei alte reacţii PCR, cu probe de ADN, provenit de la indivizi aparţinând ambelor rase studiate, în condiţii similare cu probele efectuate anterior, cu excepţia temperaturii de ataşare , fixată la 59^0C (deoarece în urma reacţiei de amplificare în gradient, temperaturile optime pentru ataşarea primerilor se situau între 58,9 şi 64 ^{0}C) am dorit să vedem dacă şi la această temperatură se obţine fragmentul de 400 pb , fără a se obţine alţi produşi nespecifici de amplificare.

Astfel s-a obţinut fragmentul aşteptat de 400 pb, pentru probele provenite de la rasa Bălţată românească, evidenţiate în poziţiile 1, 2, 3, 4, 5, 6, din gelul de agaroză (figura 41).

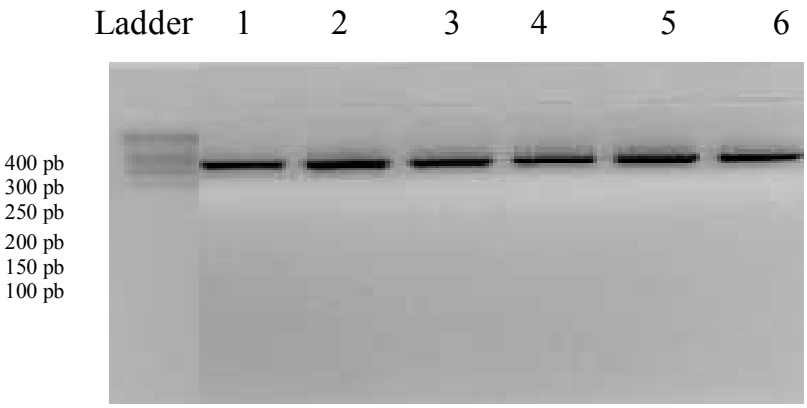


Fig.41. Profilul electroforetic al produsului PCR nerestrictat de 400 pb la indivizii din rasa Bălţată românească(original)

Fig.41. *The electroforetic profile of the unrestricted PCR product of 400 bp in Bălţată românească individuals(original)*

În figura 42 se pot observa profilele electroforetice ale fragmentelor de 400 pb, atunci când temperatura de ataşare a primerilor a fost de 59^0C, şi s-au utilizat probe de ADN provenite de la indivizi din rasa Brună de Maramureş, la care s-au obţinut rezultate bune de amplificare cu profile corespunzătoare poziţiilor 1, 2, 3, 4, 5 şi 6 din gel *(Carşai Crina şi colab., 2008).*

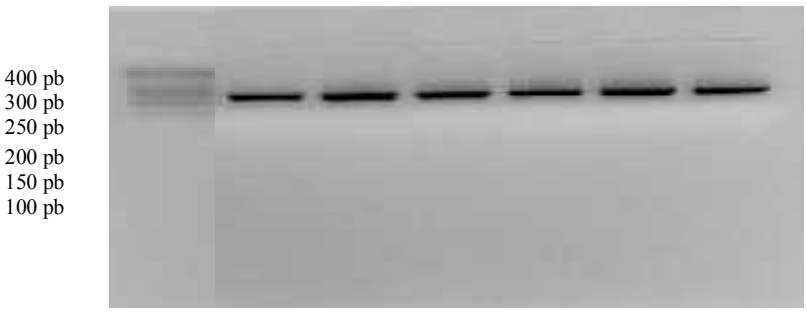


Fig.42. Profilul electroforetic al produsului PCR nerestrictat de 400 pb la indivizii din rasa Brună de Maramureş (original)

Fig. 42. *The electroforetic profile of the unrestricted PCR product of 400 bp in Brună de Maramureş individuals (original)*

Într-o altă încercare, în urma restrictării produşilor PCR, aparţinând probelor provenite de la rasa Brună de Maramureş, cu enzima *Sau 3AI,* cu termostatarea timp de 8 ore, la 37^0C, au fost evidenţiate profile corespunzătoare indivizilor homozigoţi AA (400 pb) şi profile corespunzătoare indivizilor heterozigoţi AB, cu fragmentele de 400 pb, 300 pb, şi fragmentul de 100 pb care este puţin vizibil în gel(figura 43).

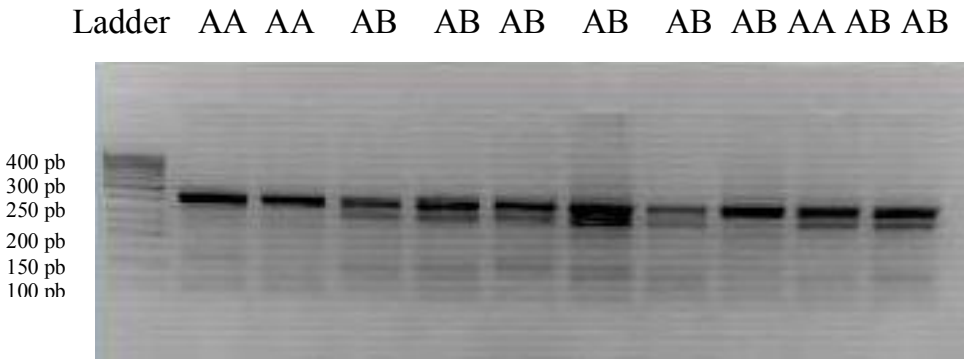


Fig.43. Profilul electroforetic al fragmentului restrictat cu enzima *Sau 3A I* la indivizii din rasa Brună de Maramureş (original)

Fig. 43. *The electroforetic profile of the Sau 3A I restricted fragment in Brună de Maramureş individuals (original)*

Atunci când s-a efectuat o nouă încercare pentru probe de la alţi indivizi ai rasei Bălţată românească în aceleaşi condiţii de reacţie şi parametrii de lucru identici cu cei de la rasa descrisă anterior, au fost evidenţiate profile corespunzătoare indivizilor homozigoţi AA (400 pb) şi profile corespunzătoare indivizilor heterozigoţi AB cu fragmente de 400 pb, 300 pb, şi fragmentul de 100 pb care este puţin vizibil în gel (figura 44).

Când s-a testat, eficienţa digestiei fragmentului de 400 pb din gena leptinei, cu enzima de restricţie *Mbo I,* urmând toţi paşii descrişi la material şi metodă, s-au obţinut rezultate bune la restricţia produsului PCR, obţinut de la indivizii ambelor rase studiate.

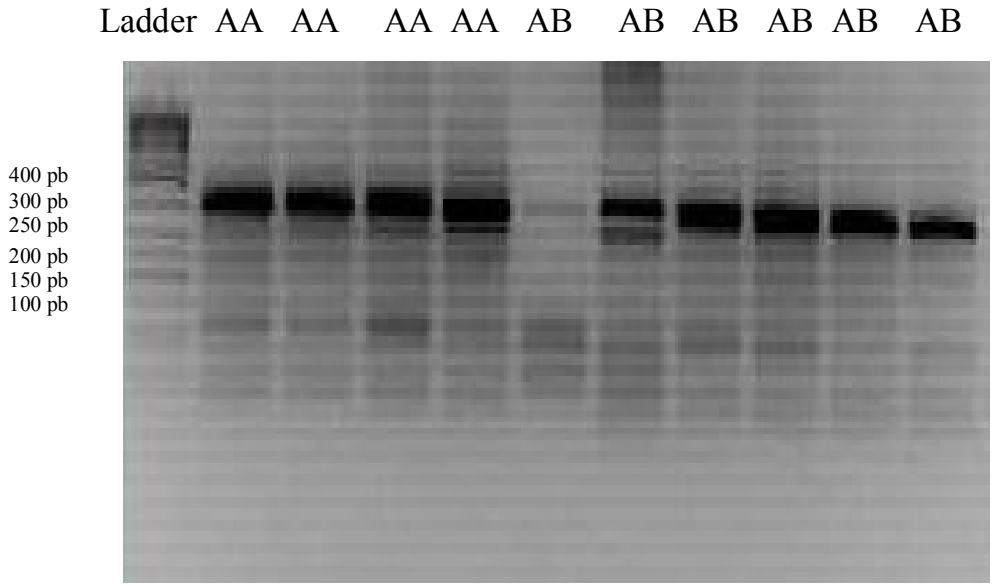


Fig.44. Profilul electroforetic al fragmentului restrictat cu enzima *Sau 3 A I* la indivizii din rasa Bălţată românească (original)

Fig. 44. *The electroforetic profile of the Sau 3A I restricted fragment in Bălţată românească individuals (original)*

În figura 45 se poate observa profilul electroforetic al fragmentului de 400 pb nerestrictat, la probe de ADN de la indivizii rasei Brună de Maramureş (poziţiile 1,2) şi fragmentul de aceeşi lungime, obţinut când s-au utilizat probe de ADN de la indivizii rasei Bălţată românească, profil care poate fi observat în poziţiile 3, 4, 5 când produşii au fost migraţi în gel de agaroză de concentraţie 2% .

În urma restricţiei produşilor PCR, proveniţi de la alţi indivizi care au aparţinut ambelor rase rezultatele restricţiei au fost bune în cazul utilizării a 1µl respectiv 2 µl enzimă *MboI.*

Atunci când pentru ambele rase s-au folosit aceleaşi condiţii de reacţie, s –au obţinut fragmentele corespunzătoare celor trei genotipuri, după cum urmează, trei indivizi de rasa Bălţată românească cu genotipul homozigot BB (corespunzători fragmentelor de 300 şi 100 pb), de la ferma S.A. Petreşti, indivizi cu genotipul homozigot AA

(corespunzători fragmentului de 400 pb) şi de asemenea indivizi heterozigoţi AB corespunzători fragmentelor de 400, 300 şi 100 pb. Probele proveneau de la indivizi din fermele: S.C. Agrozootehnica (Seini), S.C. Livada (Satu Mare), Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare), S.C.D.P. Jucu a Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară (Cluj – Napoca), şi ferme private din judeţul Cluj, ferma Corujan (Floreşti), şi ferma S.C. Crişan (Gherla).

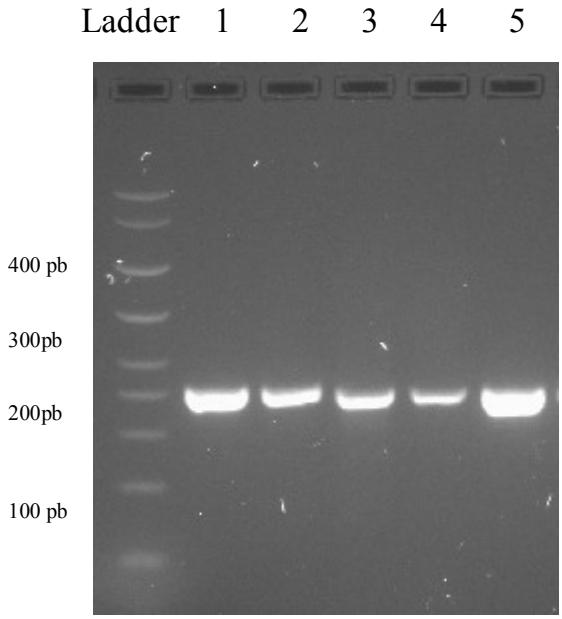


Fig.45. Profilul electroforetic al fragmentului de 400 pb nerestrictat din gena leptinei(original)

Fig. 45. *The electroforetic profile of the 400 bp unrestricted fragment from leptine gene(original)*

Profilul electroforetic obţinut în urma restricţiei fragmentului de 400 pb din gena leptinei atunci când s-au utilizat 1µl enzimă evidenţiază, indivizi cu genotipul homozigot AA în rândul indivizilor ambelor rase, homozigot BB numai la indivizi rasei Bălţată românească şi heterozigot AB, la indivizi aparţinând ambelor rase dar cu observaţia că la probele provenite de la unii indivizi din rasa Brună de Maramureş este o digestie parţială atât cu enzima *Sau3AI* cât şi cu enzima *MboI* (figura 46).

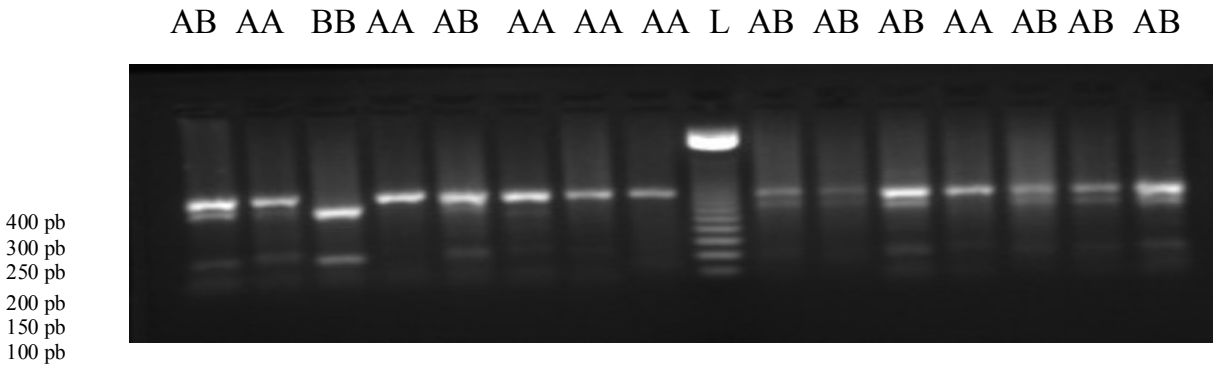


Fig.46. Profilul electroforetic al fragmentelor restrictate cu enzima *MboI* la rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş (original)

Fig. 46. *The electroforetic profile of the MboI restricted fragments in Bălţată românească and Brună de Maramureş (original)*

Rezultatele unei noi restricţii, cu 2µl enzimă *MboI,* efectuată pe alte probe provenite de la alţi indivizi din rasa Bălţată românească, au dus la obţinerea profilului electroforetic al probelor de ADN migrate în gel de agaroză agaroză de concentraţie 4%, profile corespunzătoare indivizilor cu genotip homozigot AA, heterozigot AB şi homozigot BB (figura 47).

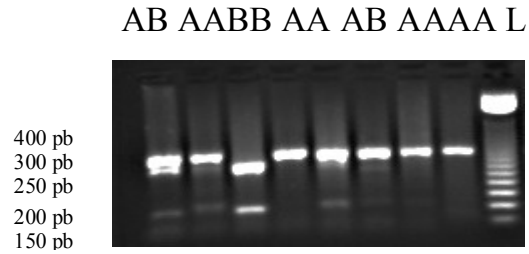


Fig.47. Profilul electroforetic al fragmentelor restrictate cu enzima *MboI* gel de agaroză 4% la rasa Bălţată românească (original)

Fig. 47. *The electroforetic profile of the MboI restricted fragments in 4% agarose gel in Bălţată românească (original)*

6.2.2.3. Purificarea produsului PCR pentru eliminarea artefactelor

6.2.2.3.Purification of the PCR product with the aim of artifacts elimination

Pentru a se elimina posibilele artefacte din profilele electroforetice se recurge la o prealabilă purificare a produsului PCR de 400 pb din gena leptinei la probele de ADN provenite de la ambele rase când digestia s-a făcut cu enzima *Sau3AI.*

Pentru evidenţierea eventualelor contaminări sau amplificări nespecifice, comparativ, s-a utilizat pentru restrictare, produs PCR ca atare şi purificat, atât la rasa Brună de Maramureş cât şi la Bălţată românească

Atât probele restrictate cu enzima de restricţie *Sau 3AI* cât şi cele nerestrictate au fost migrate în gel de agaroză de concentraţie 3% .

La probele purificate, provenite de la rasa Brună de Maramureş au fost obţinute fragmente de 400 pb corespunzătoare indivizilor homozigoţi AA şi fragmente de 400 pb, 300pb, şi 100 pb pentru indivizii heterozigoţii AB (figura 48).

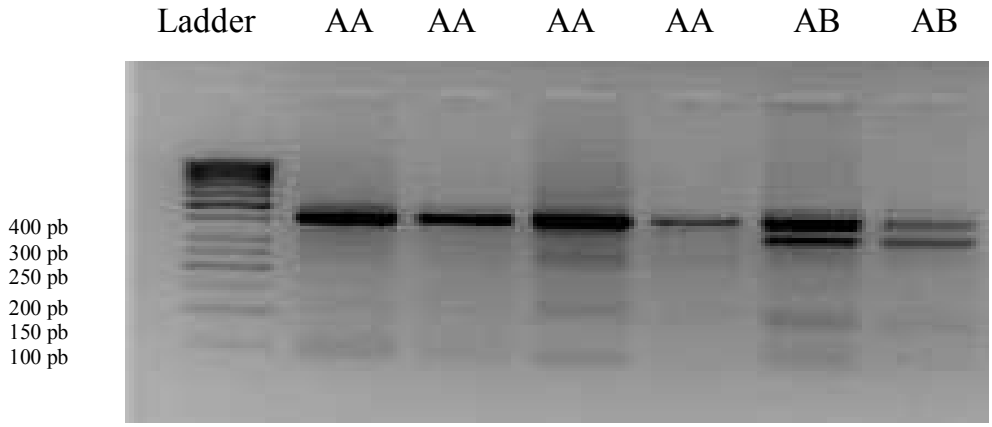


Fig.48. Profilul electroforetic al fragmentului purificat şi restrictat cu enzima *Sau 3A I* la indivizii din rasa Brună de Maramureş (original)

Fig. 48. *The electroforetic profile of the purified and Sau 3A I restricted fragment in Brună de Maramureş individuals(original)*

La probele purificate provenite de la rasa Bălţată românească s –au obţinut profile pentru indivizii ce prezintă genotipul homozigot AA şi profile pentru indivizii cu genotip heterozigot AB (figura 49).

Şi în acest caz, atât probele restrictate cât şi cele nerestrictate (cu enzima de restricţie *Sau 3AI*) au fost migrate în gel de agaroză de concentraţie 3% .

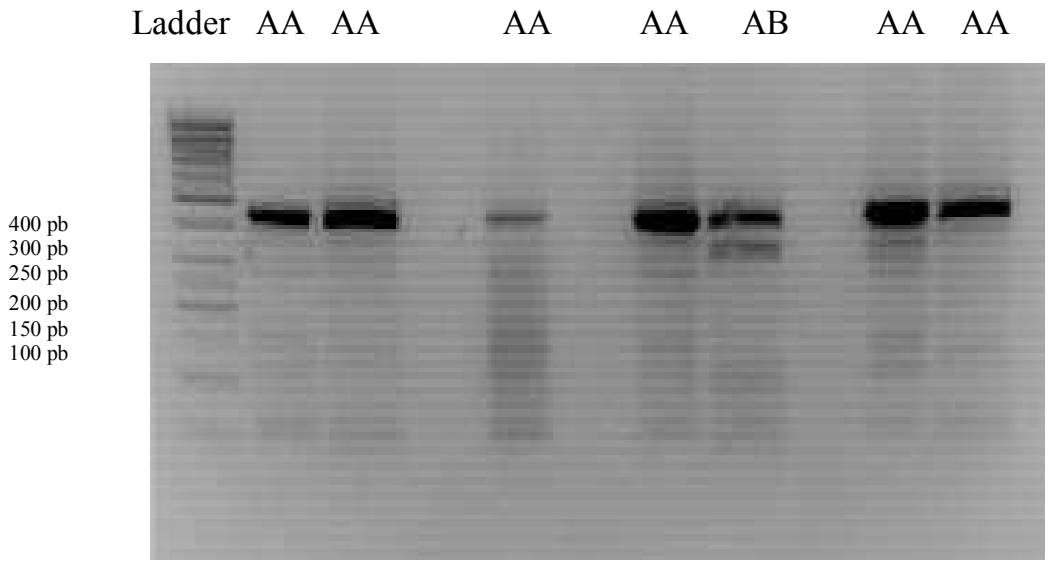


Fig.49. Profilul electroforetic al fragmentului purificat şi restrictat cu enzima *Sau 3A* I la indivizii din rasa Bălţată românească (original)

Fig. 49. *The electroforetic profile of the purified and Sau 3A I restricted fragments in Bălţată românească individuals (original)*

Comparativ, au fost realizate reacţii de amplificare pentru probe de ADN prelevat de la rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş comparativ cu cele două protocoale utilizate de cercetătorii *Pomp şi colab. (1997*) şi *Leiffers şi colab. (2002*).

Cu protocolul propus de *Pomp şi colab. (1997)* a fost obţinut produsul PCR de 1820 pb , dar rezultatele amplificării pentru rasa Brună de Maramureş şi pentru rasa Bălţată românească au fost satisfăcătoare în ceea ce priveşte studiul polimorfismului la acest locus .

S-a obţinut doar produsul PCR de 1820 pb dar la restricţie cu această enzimă, nu evidenţiază fragmentele aşteptate (figura 50).

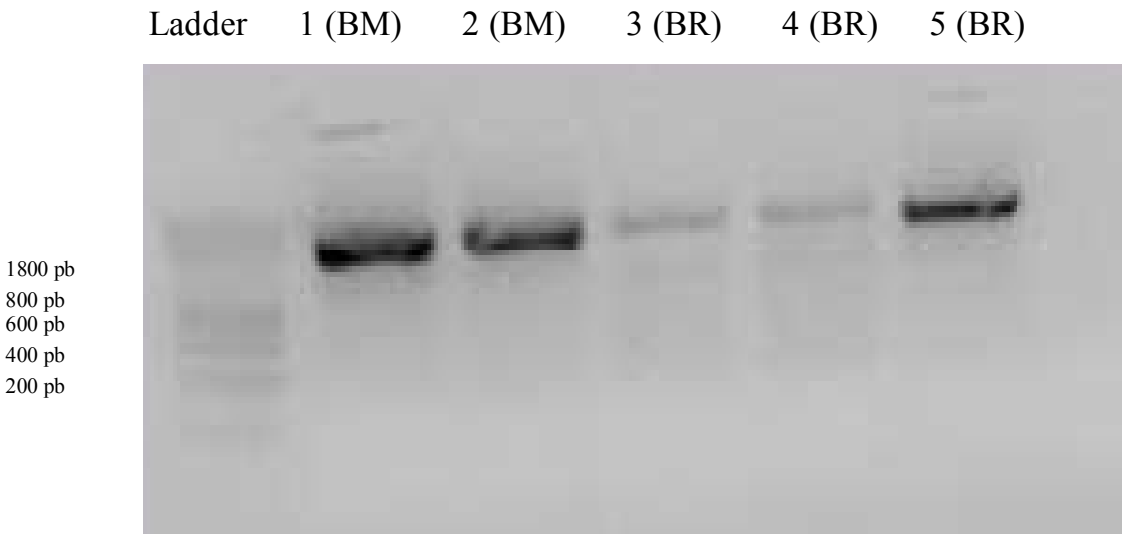


Fig.50. Profilul electroforetic al fragmentului nepurificat şi nerestrictat la indivizii din rasa Brună de Maramureş (BM) şi Bălţată românească (BR), conform protocolului utilizat de *Pomp şi colab. (1997) (original)*

Fig. 50. *The electroforetic profile of the unpurified and unrestricted fragments in Brună de Maramureş (BM) and Bălţată românească (BR) individuals, according to Pomp et al. (1997) protocole (original)*

Probele migrate în poziţiile 1 şi 2 din gel, au provenit de la indivizi din rasa Brună de Maramureş, iar probele din poziţiile 3, 4 şi 5 din gelul de agaroză corespund probelor de ADN provenite de la rasa Bălţată românească.

Atunci când s-a utilizat protocolul propus de *Leiffers şi colab*. (1997) optimizat ulterior în laboratorul nostru, am obţinut rezultate bune atât în ceea ce priveşte amplificarea fragmentului cât şi restricţia cu enzime de restricţie (figura 51).

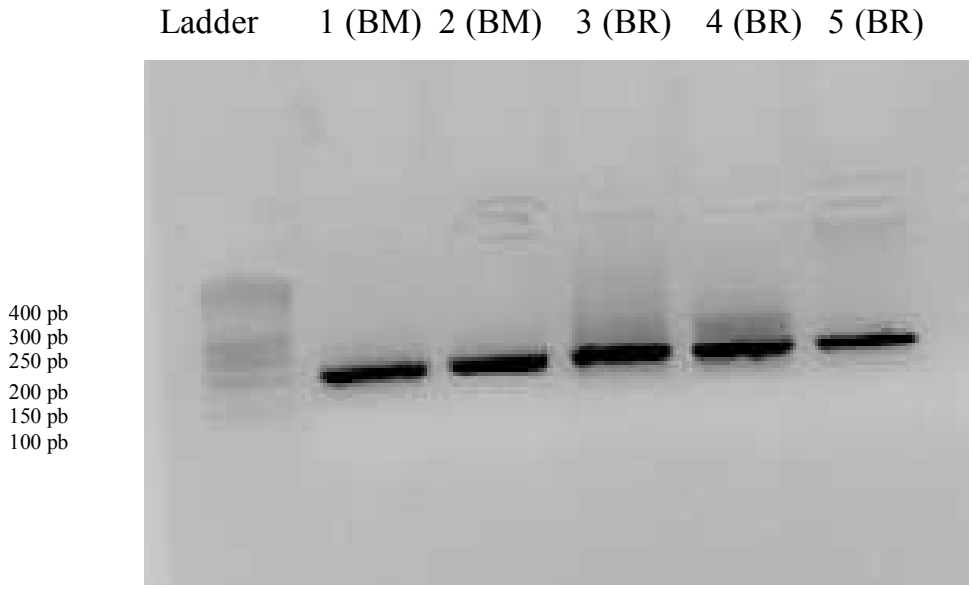


Fig.51 Profilul electroforetic al fragmentului nepurificat şi nerestrictat la indivizii din rasa Brună de Maramureş (BM) şi Bălţată românească (BR), conform protocolului utilizat de *Leiffers şi colab*. (1997) (original)

Fig.51 *The electroforetic profile of the unpurified and unrestricted fragments in Brună de Maramureş (BM) and Bălţată românească (BR) individuals, according to Leiffers et al., (1997) protocole (original)*

Protocolul optimizat, a dat ulterior rezultate bune, în ceea ce priveşte evidenţierea fragmentului de 400 pb din gena leptinei la rasele Brună de Maramureş (BM) şi Bălţată românească (BR).

6.2.2.4 Optimizarea computerizată şi analiza de secvenţe în vederea determinării polimorfismului Sau3 AI din gena leptinei

6.2.2.4. Computerized optimization and analyze of the sequences with the aim of Sau 3 AI polymorphism identification from leptine gene

Sursa de documentare *www.ncbi.hln.nib.gov* menţionează că în gena leptinei enzima de restricţie, *Sau 3A I,* recunoaşte următoarea secvenţă şi are următorul situs de restricţie:

5' … GATC … 3'

3' …CTAG … 5'

De asemenea, pentru protocolul utilizat de *Leiffers şi colab. (2002)* se specifică faptul că dimensiunea produsului PCR este 400 pb, iar în sursa *www.ncbi.hln.nib.gov* s-a demonstrat că dimensiunea produsului PCR era de 422 pb (tabelele 10 şi 11).

Tabelul 10

Structura fragmentelor din gena leptinei obţinute în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Sau 3A I*(sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Table 10

The structure of the fragments from the leptine gene obtained after restriction with Sau 3A I (source www.ncbi.hln.nib.gov)

Nr.crt *No.*	Capete *Heads*	Coordonate *Coordinates*	Lungime (pb) *Length (bp)*
1	*Sau3AI* - capătul din dreapta	33 - 422	390
2	Capătul din stânga - *Sau3AI*	1 - 32	32

Tabelul 11

Structura fragmentelor din gena leptinei obţinute în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Sau 3A I* (sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Table 11

The structure of the fragments from the leptine gene obtained after restriction with Sau 3A I (source www.ncbi.hln.nib.gov)

Nr.crt *No.*	Capete *Heads*	Coordonate *Coordinates*	Lungime (pb) *Length (bp)*
1	Capătul din stânga - *Sau3AI*	1 - 32	32
2	*Sau3AI* - capătul din dreapta	33 - 422	390

Structura fragmentului din gena leptinei obţinut conform sursei *www.ncbi.hln.nib.gov* în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Sau 3A I* este următoarea:

t ggagtggctt gttattttct tctcccaaca agatcttccc
aacccaggga ttgaacctgg gtcttctaaa ttgcaggcag attctttacc gtctgagcca
ccagggaaac ccataagacc ttgtgaagac tattaagata gtcatctaga caacaagact
atcttaatag tcttcataag gtcttcatga gactaaatta gataaagcaa gtgaccctcc
ctgaataccc ttgcagaacc agaactgtgt gtgccctctt tcaaggtttt cagtcatgac
ttttgatagc ttcccacctt aaaagccaac ttgctcacct gcgtggagca atctggagac
ttccacatct cctgaccact ctatatttct aacagtggct ttgggaagcc agagagcagt
taggtagccagaagcgggga c

Conform sursei www.ncbi.hln.nib.gov, se poate observa lungimea fragmentului de 422 pb din gena leptinei, restrictat cu enzima *Sau3AI,* în vederea obţinerii polimorfismelor la acest locus. Fragmentele obţinute în urma restricţiei, conform acestei surse, sunt următoarele :pentru genotipul homozigot AA se obţine un singur fragment de 422 pb, pentru genotipul homozigot BB se obţin fragmente de 390 pb şi 32 pb , iar pentru genotipul heterozigot AB se obţin fragmente de 422 pb, 390 pb şi 32 pb, fragmente diferite de cele obţinute conform protocolului *Leiffers şi colab., 2002*, unde se obţine pentru genotipul homozigot AA un singur fragment de 400 pb, pentru genotipul homozigot BB se obţin fragmente de 300 pb şi 100 pb , iar pentru genotipul heterozigot se obţin fragmente de 400 pb, 300 pb şi 100 pb (figura 52).

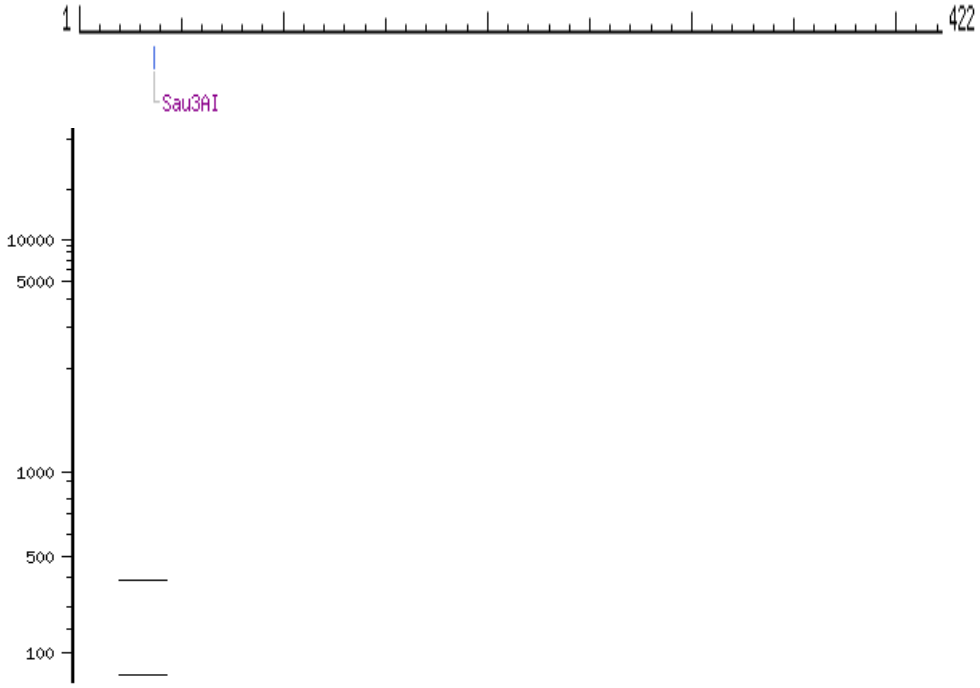


Fig.52. Situsul de restricţie al enzimei *Sau 3AI,* pentru fragmentul de 422 pb din gena leptinei (sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Fig.52. *The restriction site of the Sau 3AI, for the 422 bp fragment from the leptine gene (source www.ncbi.hln.nib.gov)*

6.2.3 Testarea şi optimizarea protocolului *PCR –RFLP* pentru studierea polimorfismelor la locusul genei leptinei (*LIEN şi colab.,1997)*

6.2.3.Testing and optimization the PCR – RFLP protocole with the aim of studying the polymorphisms at the leptine gene locus (LIEN et al., 1997)

Cel de-al treilea protocol, testat şi optimizat, a fost protocolul propus de *Lien şi colab., 1997,* în care echipa de cercetare a studiat la locusul genei leptinei, polimorfismele dintre intronul **2** şi exonul **3** la mai multe rase de taurine, prin tehnica *PCR-RFLP,* cu ajutorul enzimei de restricţie *Bsa A I,* cunoscută şi sub denumirea de *Ppu 21I.* Modificarea din situsul de restricţie de tip G-C, în poziţia 1620, a fost identificată cu această enzimă.

Rezultatele nu au fost cele aşteptate atunci când s-a utilizat protocolul original cu condiţiile şi parametrii descrişi de acesta. La temperatura de ataşare a primerilor, prevăzută de protocol ca fiind de 64^0C, şi în urma restricţiei fragmentului amplificat, nu s-au obţinut rezultate bune.

În urma restricţiei cu enzima *BsaAI,* conform literaturii de spcialitate, fragmentele aşteptate pentru fiecare genotip trebuiau să fie următoarele: pentru genotipul homozigot AA - un singur fragment de 522 pb, alela A fiind nerestrictată de enzimă, pentru genotipul homozigot BB fragmente de 441 pb şi 81 pb, enzima tăind într-un singur situs alela B, iar pentru genotipul heterozigot AB se obţineau fragmente de 522 pb, 441 pb şi 81 pb.

Profilele electroforetice ale fragmentelor de 522 pb din gena leptinei, amplificate şi restrictate nu au condus la rezultate bune în urma testării protocolului ca atare, deoarece se observă prezenţa unor produşi de amplificare nespecifici pe lângă cei specifici.

Acest lucru a fost prezent la toate cele 19 poziţii din gelul de agaroză (figura 53).

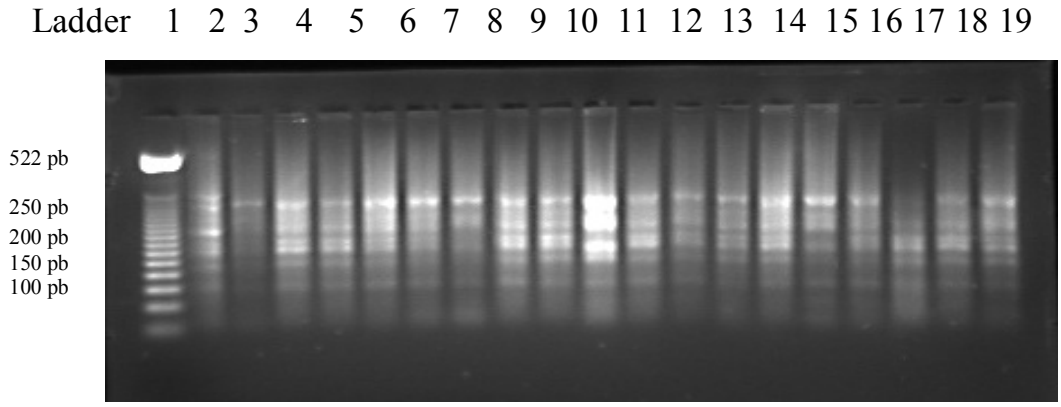


Fig.53. Profilul electroforetic al probelor amplificate şi restrictate în urma testării protocolului *Lien şi colab., 1997.*

Fig.53. *The electroforetic profile of the amplified and restricted samples according to the Lien et al., 1997.*

În urma acestei testări rezultatele nu au fost mulţumitoare şi pentru a se elimina orice produşi nespecifici, am recurs la optimizarea protocolului.

6.2.3.1 Amplificarea fragmentului de 522 pb din gena leptinei
6.2.3.1 The amplification of the 622 bp fragment from the leptine gene

S-a făcut o reacţie PCR şi în aparatul Real-Time PCR , obţinându-se graficul de amplificare, iar condiţiile de reacţie au fost diferite de cele ce vor urma, deoarece mixul de reacţie PCR în această situaţie, a fost format de fapt dintr-un mastermix denumit

Sybrgreen Supermix, 2µl de ADN din fiecare probă şi 2µl din fiecare primer sens şi antisens. În graficul rezultat în urma amplificării fragmentului de 522 pb din gena leptinei în aparatul Real Time PCR, unde se pot observa cele patru curbe ale probelor de ADN, amplificate în cele 35 cicluri de amplificare şi proba martor, pe verticală este prezentată rata amplificării, iar pe orizontală este prezentat numărul ciclului de amplificare, aceste reacţii, fiind făcute cu probe de ADN, provenite de la indivizii ambelor rase luate în studiu, pentru acest locus (figura 54).

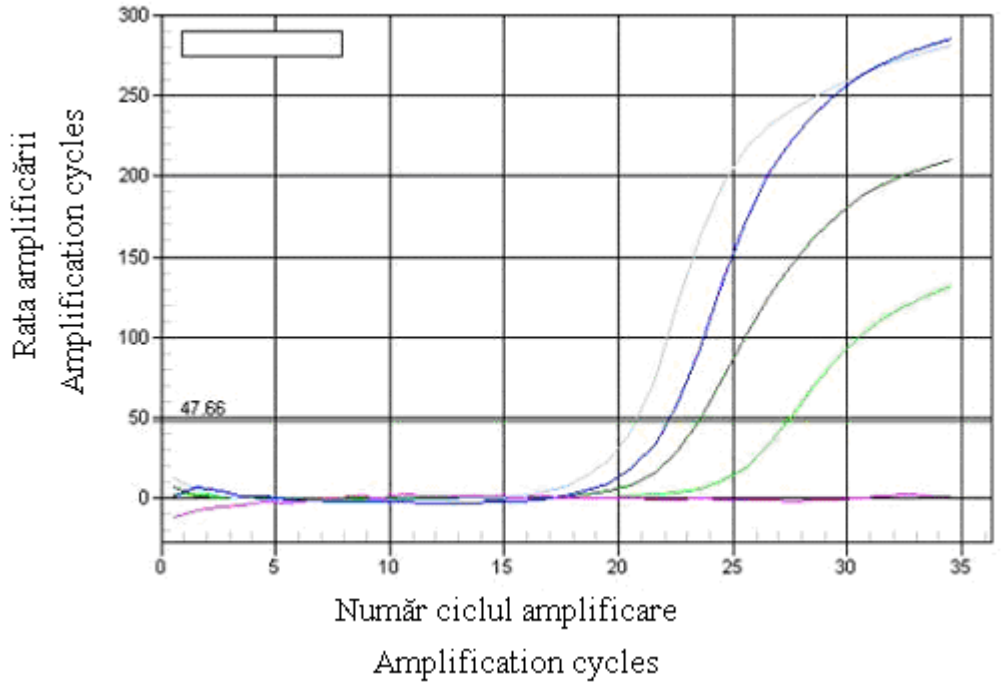


Fig.54. Rata amplificării şi ciclurile de amplificare a fragmentului de 522 pb din gena leptinei

Fig.54.*The amplification rate and amplification cycles of the 522 pb fragment from the leptine gene*

Protocolul optimizat şi testat prin reacţia PCR efectuată în Real Time PCR a dat rezultate bune atât la probele de ADN provenite de la indivizi din rasa Bălţată românească ce aparţin poziţiilor 1, 2 din gel cât şi la cele provenite de la rasa Brună de Maramureş ce aparţin poziţiilor 3, 4 din gelul de agaroză corespunzătoare fragmentului de 522 pb amplificat dar netrestrictat (figura 55).

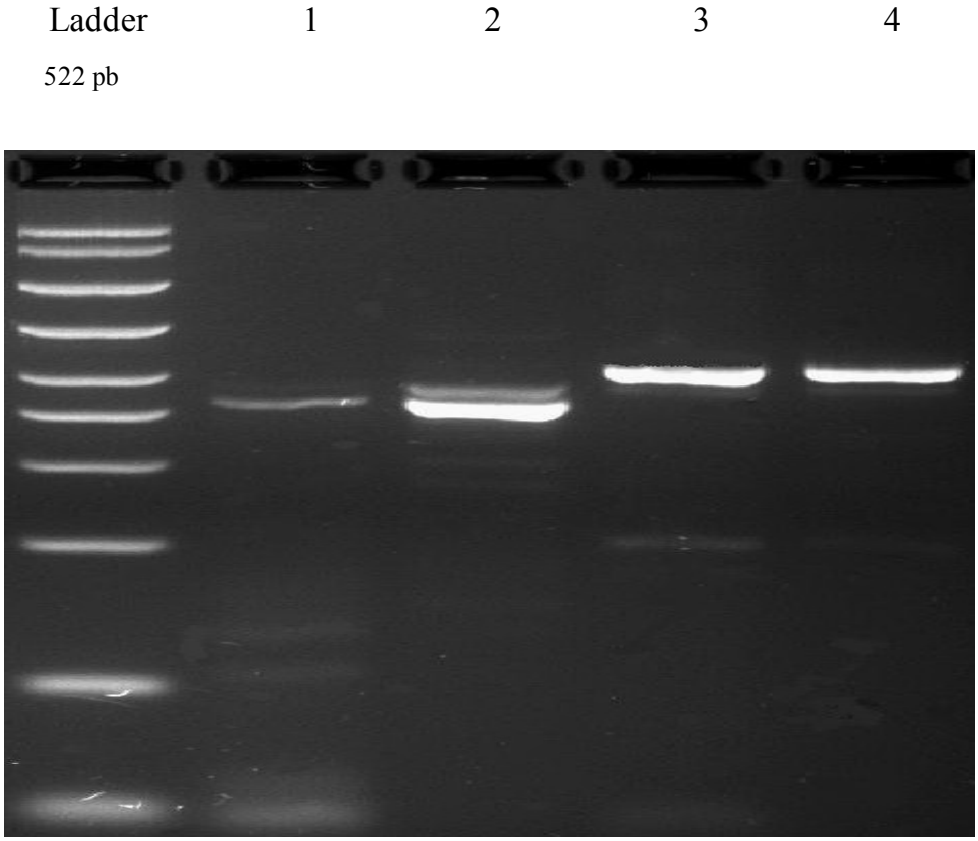


Fig. 55. Profilul electroforetic al fragmentului nerestrictat de 522 pb din gena leptinei

Fig. 55. *The electroforetic profile of the 522 bp unrestricted fragment from the leptine gene*

6.2.3.2 Evidenţierea polimorfismului de tip RFLP /BsaAI din gena leptinei
6.2.3.2 Emphasizing of the polymorphism RFLP /BsaAI type from the leptine gene

După reacţia PCR, făcută la temperatura de ataşare a primerilor, stabilită la 59 ^{0}C şi restrictarea probelor amplificate cu enzima de restricţie *Bsa AI*, pentru evidenţierea polimorfismelor la acest locus ş-au obţinut fragmentele aşteptate pentru acest polimorfism, după ce am optimizat protocolul propus de *Lien şi colab., 1997*.

În urma restricţiei cu enzima *Bsa A I,* la indivizii din rasa Brună de Maramureş au rezultat fragmente de 522 pb, 441pb şi 81pb corespunzătoare indivizilor cu genotip heterozigot AB şi fragmente de 522 pb corespunzătoare indivizilor cu genotip homozigot AA (*Carşai şi colab., 2007*).

Profilul electroforetic al fragmentelor restrictate cu 2µl din enzima *BsaAI,* a fost evidenţiat prin migrarea probelor în gel de agaroză de concentraţie 4%, şi obţinerea unor indivizi cu genotip homozigot AA şi heterozigot AB (figura 56) .

AA AA Ladder AB AB

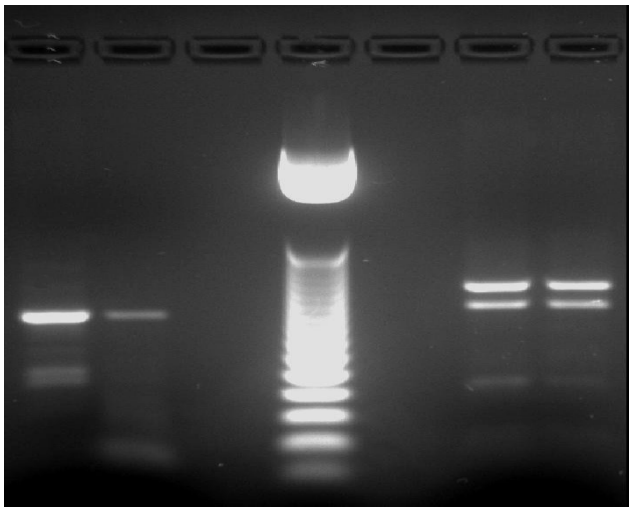


Fig.56. Profilul electroforetic al fragmentelor restrictate cu enzima *Bsa AI* migrate în gel de agaroză 4% la rasa Brună de Maramureş

Fig.56. *The electroforetic profile of the restricted fragments with the Bsa AI enzyme migrated in 4% agarose gel in Brună de Maramureş*

În urma restricţiei cu 1µl enzima *Bsa AI* a probelor provenite de la indivizi din la rasa Bălţată românească au rezultat fragmente de 522 pb, 441pb şi respectiv 81 pb, corespunzătoare indivizilor cu genotip heterozigot AB (*Carşai şi colab., 2008)* .

De asemenea, au mai rezultat şi fragmente de 441 pb şi 81 pb corespunzătoare indivizilor homozigoţi BB şi fragmente de 522 pb corespunzătoare homozigoţilor AA

L BB BB AB AB AA AB BB AB AA AB AA AB AB AB AB AA AB AB AB

522pb

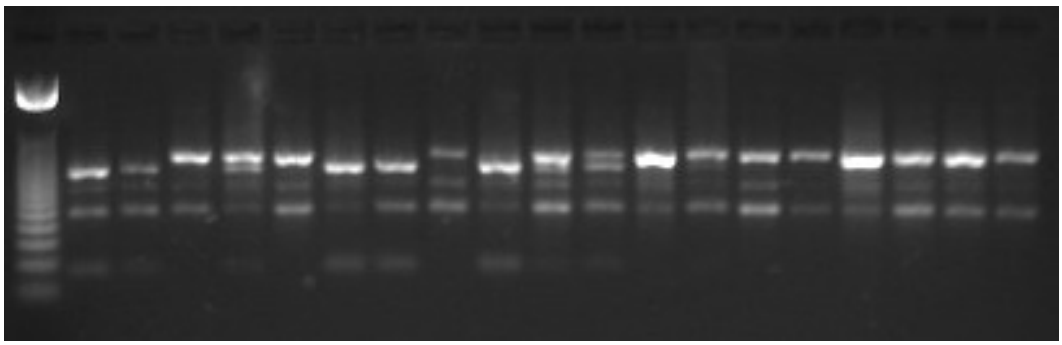


Fig. 57. Profilul electroforetic al probelor restrictate cu enzima *Bsa AI* migrate în gel de agaroză 4% la rasa Bălţată românească

Fig. 57. *The electroforetic profile of the restricted fragments with the Bsa AI enzyme migrated in 4% agarose gel in Bălţată românească*

Pentru protocolul utilizat de *Lien şi colab. (1997),* se specifică faptul că dimensiunea produsului PCR este de 522 pb, iar în urma analizei computerizate a situsurilor din gena leptinei, pentru enzima *BsaAI,* sursa *www.ncbi.hln.nib.gov,* semnalează prezenţa unei baze suplimentare în produsul PCR total obţinut, adică de 523 pb .

Sursa de documentare *www.ncbi.hln.nib.gov* menţionează că în gena leptinei enzima de restricţie, *Bsa AI,* recunoaşte următoarea secvenţă şi are următorul situs de restricţie:

5’ … ACGT … 3’

3’ …TGCA … 5’

Se observă structura fragmentelor din gena leptinei rezultate în urma restricţiei cu enzima *Bsa AI* şi fragmentele care rezultă în urma acţiunii enzimei, începând din capătul din dreapta spre capătul din stânga (tabelul 12).

Tabelul 12

Structura fragmentelor din gena leptinei obţinute în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Bsa AI* (sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Table 12

The structure of the fragments from the leptine gene obtainede from Bsa AI restriction (source www.ncbi.hln.nib.gov)

Nr.crt *No.*	Capete *Heads*	Coordonate *Coordinates*	Lungime (pb) *Length (bp)*
1	*BsaAI* - capătul din dreapta	83-523	441
2	Capătul din stânga - *BsaAI*	1 - 82	82

În tabelul 13 se observă structura fragmentelor din gena leptinei obţinute în urma restricţiei cu enzima *Bsa AI* şi fragmentele care rezultă în urma acţiunii enzimei, începând din capătul din stânga spre capătul din dreapta.

Tabelul 13

Structura fragmentelor din gena leptinei obţinute în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Bsa AI*(sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Table 13

The structure of the fragments from the leptine gene obtainede from Bsa AI restriction (source www.ncbi.hln.nib.gov)

Nr.crt *No.*	Capete *Heads*	Coordonate *Coordinates*	Lungime (pb) *Length (bp)*
1	Capătul din stânga - *BsaAI*	1 -82	82
2	*BsaAI* - capătul din dreapta	83-523	441

Structura fragmentului din gena leptinei obţinut conform sursei *www.ncbi.hln.nib.gov* în urma restricţiei cu ajutorul enzimei *Bsa A I* este următoarea:

gtctggaggcaaagggcagggtggtttgggaagggcaaagataggagcccagg
agaccagcttggaaacatggtgg
tcacgtgggcacaagaagtaagggcccagggaggatggtgtggaagcggggagg
aagcacctctacgctagggaa
aggcggagtcagggggagctctgaggagctgccctctgaggagctgccctctctcccactgagctcttgctct
ccccttcctcctgcattagcag
tccgtctccttccaaacagagggtcaactggtttggactccctgggctcctgggctccaccct
ctccctgagtttgtccaagatg
gaccagacattggcgatctaccaacagatcccagtcgcttccagaaatgtcttccagaaatgaaatgttg
gtcccaaaatatccaatgacctg
gagaacctccggggcagacccttctcacctgctggcggcctaagagcccctttgcccg
caggtcagggccctggagagc
ttggagagctttgggcgttgtccctggaagcttccctcactcacccagggtggggtgagggtgg

În figura 58, conform sursei *www.ncbi.hln.nib.gov,* se poate observa că lungimea totală a fragmentului, obţinut prin amplificare cu primerii propusşi de *Lien,* este de 523 pb din gena leptinei, care ulterior este restrictat cu enzima *Bsa AI* în vederea obţinerii polimorfismelor la acest locus.

Fragmentele obţinute în urma restricţiei, conform aceste surse, sunt următoarele: pentru genotipul homozigot AA, se obţine un singur fragment de 523 pb, pentru genotipul homozigot BB, se obţin fragmente de 441pb şi 82 pb , iar pentru genotipul heterozigot AB se obţin fragmente de 523 pb, 441pb şi respectiv 82 pb, fragmente diferite de cele obţinute conform protocolului *Lien şi colab,(1997)*, unde se obţine pentru genotipul homozigot AA un singur fragment de 522 pb, pentru genotipul homozigot BB se obţin fragmente de 441 pbşi 81 pb , iar pentru genotipul heterozigot AB se obţin fragmente de 522 pb, 441pb şi 81 pb.

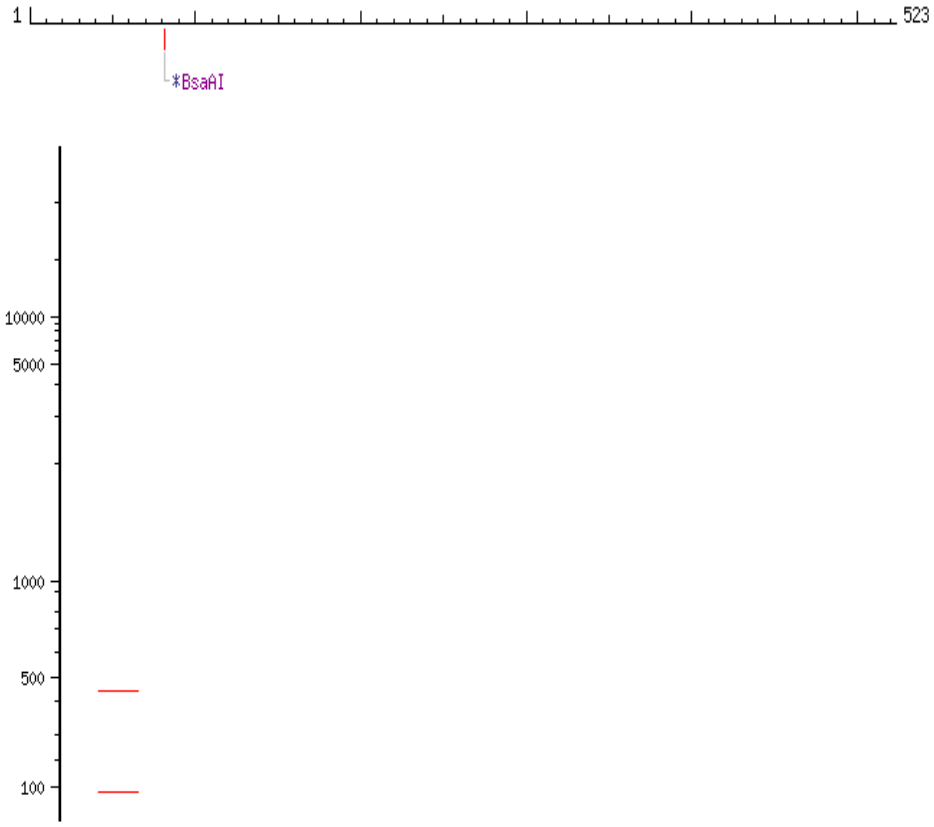


Fig.58. Situsul de restricţie al enzimei *Bsa A II,* pentru fragmentul de 523 pb din gena leptinei (sursa *www.ncbi.hln.nib.gov)*

Fig.58. *The restriction site of the Bsa A II, for the 523 bp fragment from the leptine gene (source www.ncbi.hln.nib.gov)*

6.3 CONCLUZII PARŢIALE

6.3. PARTIAL CONCLUSIONS

- Aplicarea temperaturii determinată în gradient la protocolul propus de *Pomp şi colab.* (1997) a dat rezultate satisfăcătoare, obţinându-se produsul de amplificare aşteptat, de 1820 pb, la probele de ADN provenite de la indivizii din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş.
- La rasa Bălţată românească, s-a constatat că adăugarea în amestecul de reacţie PCR a 1µl $MgCl_2$, de concentraţie 10 mM, a dus la rezultate mai bune ale amplificării produsului de 1820pb din gena leptinei.
  - În urma efectuării încercărilor de determinare a temperaturii de ataşare a primerilor, pentru amplificarea fragmentului de 1820 pb, s-a determinat ca temperatură optimă de ataşare temperatura de 64^0C, la care s-a obţinut produsul aşteptat.
  - În urma analizei computerizate a secvenţei întregi a genei leptinei de 4067 pb, s-a constatat că există o eroare în protocolul lui *Pomp şi colab. (1997*) la nivelul unei nucleotide situate în primerii antisens, printr-o înlocuire de tipul Citozina -Timină.
- Rezultatele obţinute în cazul electroforezei în gel de agaroză şi a evidenţierii fragmentului de 400 pb din gena leptinei, restrictat cu enzima de restricţie *Sau*3AI, utilizând protocolul propus de *Leiffers şi colab., 2002* şi optimizat de noi, la probele de la indivizii proveniţi din rasele Bălţată Românească şi Brună de Maramureş, evidenţiază fragmentele de 400 pb, 300 pb şi 100 pb, ultima bandă de 100 pb, având greutate moleculară mică, este dificil de evidenţiat în gel.
  - Pentru indivizii homozigoţi AA profilul corespunzător este un singur fragment de de 400 pb, această alelă nefiind digerată de enzimă, pentru indivizii heterozigoţi, sunt evidenţiate trei fragmente de 400pb, 300pb şi 100 pb, iar pentru indivizii homozigoţi BB, sunt evidenţiate doar două fragmente de 300pb şi de 100 pb.

- În urma efectuării amplificărilor comparative, între rasele Bălţată Românească şi Brună de Maramureş, cu protocoalele utilizate de *Pomp şi colab. (1997) şi Leiffers şi colab. (2002,* au fost obţinute rezultate satisfăcătoare atât pentru rasa Brună de Maramureş cât pentru rasa Bălţată românească, în condiţiile optimizării protocolului *Pomp şi colab. (1997* şi rezultate bune la ambele rase cu protocolul propus de *Leiffers şi colab. (2002)* de asemenea optimizat de noi.
- Când restricţia fragmentului de 400 pb a fost realizată cu ajutorul enzimei *Sau 3AI,* în cazul protocolului *Leiffers şi colab. (2002)*, s-a obţinut o digestie parţială la indivizii heterozigoţi AB care aveau trei fragmente de 400, 300 şi 100 pb, fragmentul de 100 pb nefiind suficient evidenţiat în gelul de agaroză.
- Rezultate bune au fost obţinute şi atunci când restrictarea produsului PCR de 400 pb, s-a făcut cu enzima *MboI,* folosită în diferite concentraţii.

➢ În populaţiile studiate, aparţinătoare raselor Bălţată românească şi Brună de Maramureş, în urma genotipizării, au rezultat profile corespunzătoare genotipurilor homozigot AA, respectiv BB şi heterozigot AB, iar la unele probe, provenite de la rasa Brună de Maramureş, s-a constatat că se produce o digestie parţială a produsului PCR de 400 pb, probabil datorită unei mutaţii apărută în situsul de restricţie.

➢ Protocolul propus de *Lien şi colab.* (1997) a condus la obţinerea de rezultate bune, obţinându-se profilele corespunzătoare homozigoţilor AA, heterozigoţilor AB şi homozigoţilor BB, în urma restricţiei cu enzima *BsaAI*. Acest protocol fiind odată testat şi optimizat va putea fi utilizat în viitoarele teste de stabilire a polimorfismelor la locusul genei în vederea testării de asocieri cu diferite însuşiri calitative şi cantitative.

CAPITOLUL VII

TEHNICA SECVENŢIERII APLICATĂ FRAGMENTULUI DE 400 pb DIN GENA LEPTINEI

CHAPTER VII

SEQUENCING TECHNIQUE APPLIED TO THE 400 bp FRAGMENT FROM THE LEPTINE GENE

Secvenţierea fragmentelor ADN, pe un secvenţiator automat (Applied Biosystems) se realizează în capilare care conţin polimer o rezoluţie foarte înaltă. Principiul constă în migrarea prin capilar, a ADN marcat cu 4 fluorocromi diferiţi. Fragmentele de ADN sînt separate în funcţie de mărime şi traversează regiunea din dreptul unui fascicul laser. Laserul excită fluorocromii care emit fiecare un semnal cu lungimi de undă diferite, detectat de o cameră video cuplată cu un spectrograf (CDD). Prin intermediul unor filtre, datele privind intensitatea emisiilor sînt colectate şi conservate sub forma unor semnale electrice. Un program informatic, conectat la secvenţiator, permite analiza automatizată şi convertirea directă a datelor în secvenţe nucleotidice. Secvenţele se obţin în format ABI (electroforegrame) şi în format text. Acestea sunt ulterior analizate cu programe informatice cum ar fi BioEdit, Clustal w, Mega, Chromas.Una din metodele de secvenţiere aplicată pe acest analizor genetic este cea enzimatică, dezvoltată de *Sanger* şi colaboratorii. Această metodă se bazează pe utilizarea unor nucleotide modificate, 2',3'- dideoxiribonucleotid trifosfaţi (ddNTP), care joacă rolul de terminatori de lanţ în timpul reacţiei de polimerizare enzimatică a ADN. Datorită acţiunii ADN polimerazelor, ddNTP-urile sunt încorporate în catena în curs de elongare a ADN aşa cum sunt utilizate dNTP-urile normale. Diferenţa constă în faptul că un ddNTP încorporat, marcat cu fluorocromi, declanşează, la un moment dat, blocarea elongării. Dezvoltarea PCR a permis descoperirea şi caracterizarea unor noi ADN

polimeraze, cum este ADN polimeraza modificată, care este foarte utilă şi în secvenţiere, în special pentru regiunile cu structuri secundare. Secvenţierea prin PCR, integrată în sistemul automat, neradioactiv (cu fluorocromi), are avantajul că permite atât secvenţierea ADN după clonare într-un vector (ex. fagul M13) ca în celelalte sisteme de secvenţiere, dar şi direct, a produsului obţinut prin PCR, fără o clonare prealabilă *(Sanger, F., 1980).*

Gena leptinei a cărei fragment de 400 pb, urmează să-l secvenţiem, are următoarea lungime şi secvenţă de nucleotide (sursa *www.gene bank):*

Bos taurus - leptina (GENA OBEZITĂŢII)

LOCUS BTU50365 4067 bp ADN

VERSIUNE U50365.1 GI:2196855

SURSA Bos taurus (TAURINE)

ORGANISM BOS TAURUS

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae; Bovinae; Bos.

REFERINŢE 1 (NUCLEOTIDE 1 LA 4067)

SURSA 1..4067

gena <1108..>3365

gena="obezitatii"

ARN mesager <1108..1251,3006..>3365)

gena="obezitatii"

produs="leptina"

Codonul start (1108..1251,3006..3365)

codon_start=1

proteina_id="AAB61244.1"

db_x ref="GI:2196856"

Proteina

"MRCGPLYRFLWLWPYLSYVEAVPIRKVQDDTKTLIKTIVTRINDIS
HTQSVSSKQRVTGLDFIPGLHPLLSLSKMDQTLAIYQQILTSLPSRN
VVQISNDLENLRDLLHLLAASKSCPLPQVRALESLESLGVVLEASL
YSTEVVALSRLQGSLQDMLRQLDLSPGC"

1 gaattcacgg ttccatgact ttggagtttc agacatcctg agtgaacacg gtaggctgag
61 agtgtatgtg ctctctctgg ccttcaggtc tttgtaccag ctgctctctt ggccacttat
121 ggcaaccact tgtattcttc caagacctcc ccttcgcctt caatacccag ctcaggcgac
181 acctcttctc agggaggcca ctttgtaatc ctgcaatatc ttgtccttct tgcagagctc
241 tttcttaaaa aaaaaaaaaa aatatatata tatatatata taatttattt ttaattgaag
301 ggtaattgct ttacaatatt gtgttggttt cagccatact tgcagagctc tttcctcctg
361 tactgctacg gcctgtttac tatctcccct attaaactgg aaacactttg agagtaaaaa
421 aacatccgtt gttcactgtg gcatccttgg tgcccagcac tgcgtctgat tatcagacct
481 tctgtaagtg cccgtcggag tcaggctccc aatgggagag aaaggaagca ataaagccag
541 tggtaaatgc catcacggag gtatcagtgc gctgctgtga gagagtaatg aagaggacag
601 tcacataaac tctaataata gggtagtaat agagaacctt tcacaactcc tttaaagctc
661 tttcacgcac attatctaat ttgatcctca taaaaccctg gagataggta cattgtgggg
721 gatacagggg gagtttttag cggttatggg atatgcctgc agtcgtacag ctattaaatg
781 tctggattca aaccagacct tgaaagcccg ccgtccaccc gctcgtgccc tggctcactg
841 ctgcgtggtc tacagcacac ctcctgtggt tttcttgatt ccgccgcacc tctccccagg
901 gagtgccttt cattactgtc atttctagac aatgaattgt ctttgaggag atgatagcca
961 tggcagacag caaatctcgt tgttatccgc atctgaagac gtggatgcgg gtggtaacgg
1021 agcacgtggg tgttctcgga gatcgacgat gtgccacgtg tggtttcttc tgttttcagg
1081 ccccagaagc ccatcccggg aaggaaaatg cgctgtggac ccctgtatcg attcctgtgg
1141 ctttggccct atctgtctta cgtggaggct gtgcccatcc gcaaggtcca ggatgacacc
1201 aaaaccctca tcaagacaat tgtcaccagg atcaatgaca tctcacacac ggtagggagg
1261 gactgggaga cgaggtagaa ccgtggccat cccgtggggg accccagagg ctggcggagg

1321 aggctgtgca gccttgcaca ggccccagtg gcctggacgc ccccctggca taaagacagc
1381 tcctctcctc ctctacttcc cttgcctcct gccttctcac tctcctccct cccagaccgg

1441 aatcctagtg cccaggccca gaaggagtca cagaggtcct ggggtcccct tggcaggtgg
1501 ccagaacccc agcagcagtc cctctgggcc tccatctcat ttctagaatg ttttagtcgt
1561 taggcattct tcctgcctgg taactgagct tagaccctgc gagctcatta ctcattactg
1621 ccagccctgc ctgtcaagcc ctcttcagat acaaccctct gtgtttttgt aaatagttat
1681 cagtgtctct tggggcattt tttctgaggt ccataagctc agacctgcaa ccatagatga
1741 ggtctgtatt tagaatgagg gagatgtctg taaagtctta agctagtcag gttccacaag
1801 gtttttaaac tccagtttcc tcatctagaa aatgaaagtg ggaaagtgtt agttgctcag
1861 tcatgtccaa ctctttgaga ccccatgaac tgtagtctac caggctcctc tgtccatgaa
1921 attcttcagg caagaatact ggagtggctt gttattttct tctcccaaca agatcttccc
1981 aacccaggga ttgaacctgg gtcttctaaa ttgcaggcag attctttacc gtctgagcca
2041 ccagggaaac ccataagacc ttgtgaagac tattaagata gtcatctaga caacaagact
2101 atcttaatag tcttcataag gtcttcatga gactaaatta gataaagcaa gtgaccctcc
2161 ctgaataccc ttgcagaacc agaactgtgt gtgccctctt tcaaggtttt cagtcatgac
2221 ttttgatagc ttcccacctt aaaagccaac ttgctcacct gcgtggagca atctggagac
2281 ttccacatct cctgaccact ctatatttct aacagtggct ttgggaagcc agagagcagt
2341 taggtagcca gaagcgggga cagatcagaa atagacagtg tctgcatttc ctagagaaaa
2401 gcccttaaat tcattgcttt caaaacagtc attcagcaag ctgtacacaa tagacccaga
2461 gtgccccaac ctgtgtggtg ccgggattga ttgctgtggg tggcggagag gggagagccc
2521 ctctggtaac cagggttact tgagcagagc agtgagctgg ggcatcgctg gggtaatggc
2581 ctgaatccct taggggggtga gacttcctgg agaatctgac tgtgagggag gagtctgctt
2641 ggggtggaag agttggggac ggggaatgta cggaagacct caatgcctgg ggaagaaact
2701 caagcaggaa atagggagtc atggctggtt ctatagcaga gtcatttgga aaagggaaca
2761 gcctgcaaag gctggtctgg aggcaaaggg cagggtggtt tgggaagggc agaaagatag
2821 gagcccagga gaccagcttg gaaacatggt ggtcacgtgg gcacaagaag taagggccca
2881 gggaggatgg tgtggaagcg ggggaggaag cacctctacg ctctagggaa aggcggagtc
2941 aggggagctc tgaggagctg ccctctctcc cactgagctc ttgctctccc cttcctcctg
3001 catagcagtc cgtctcctcc aaacagaggg tcactggttt ggacttcatc cctgggctcc

3061 accctctcct gagtttgtcc aagatggacc agacattggc gatctaccaa cagatcctca
3121 ccagtctgcc ttccagaaat gtggtccaaa tatccaatga cctggagaac ctccgggacc
3181 ttctccacct gctggccgcc tccaagagct gccccttgcc gcaggtcagg gccctggaga

3241 gcttggagag cttgggcgtt gtcctggaag cttccctcta ctccaccgag gtggtggccc
3301 tgagccggct gcaggggtca ctacaggaca tgttgcggca gctggacctc agtcccgggt
3361 gctgaagcct tgaaggcctc tcttcccaaa gtccagggaa gaaacctgag cttctggctg
3421 tccacaggag aagagagcct atgtgggcat cctttatgca ggccagcggg ccatttctct
3481 ctcgctcctc tcagctgctc ttccaaaggc agaaaactgc gaggcaggaa accaaagata
3541 taaatacaga ttccacgccc accgggaagg ggggcccatc cagcaaacac tagaccggag
3601 ctgggatttt cacagcagtc ttcctccctg ttccagctcc ctctcactgc atgcttcagc
3661 gtgacctggg gtgatttcag agcctttgga ccatcaagca agattccctc tgagaatcca
3721 gggagcatca tgaaggctac agcacataca gctggatatt cccacacaac atacgatgga
3781 agcatttatt tatttattat gcattttatt ctgaatgaat ttgaagcaaa acaccagctt
3841 ttccaggctc tttggggtca gctggggtga ggaacgctcc tggggtgccc atcgacaggc
3901 ctcactgagg caaacccatt ttgagtgact tgaggcctct caagtttgtt ctccagggac
3961 tggctttgtt tctactgtga ctgactttaa attacagtgt ttgcaatggc attgctctga
4021 atggatctcg aaggaccaag ttgttttaaa aagaagaaga tgaattc

AUTOR Tellam, R.L. JOURNAL Submitted (29-FEB-1996) Ross L. Tellam, CSIRO, CSIRO Division of Tropical Animal Production, PMB 3, Indooroopilly, QLD 4068, Australia On Jun 16, 1997.

7.1. MATERIALE ŞI METODE

7.1. MATERIALS AND METHODS

7.1.1. Materiale biologice

7.1.1.Biological materials

Materialul biologic utilizat în experimente este reprezentat de ADN prelevat din sânge, recoltat de la indivizi proveniţi de la rasa Brună de Maramureş, ADN care trebuie să fie de o calitate superioară în cantitate suficientă.

7.1.2. Materiale chimice

7.1.2. Chemical materials

Enzime

- Sau3AI (Promega) - 5U/ µl

-Taq DNA Polymerase (Promega) - 10U/ µl

***Primeri sau amorse sens şi antisens - (* Mycrosinth – Elveţia)**

5'- TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT -3'

5'- GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT -3'

Reactivi şi soluţi

- *Tampon (Buffer) (Invitrogen))*
- *$MgCl_2$ (Invitrogen)*
- *dNTP (Invitrogen)*
- *Apă sterilă (Invitrogen)*
- *TAE 50X –Preprat*
- *Bromură de etidiu (Invitrogen)*
- *Fenol (Invitrogen)*
- *Cloroform (Merk)*
- *Etanol absolut (Merk)*
- *Izopropanol(Merk)*
- *DNA Step Ladder (Invitrogen)*
- *Smart Ladder (Fermentas)*
- *Apă ultrapură(Invitrogen)*
- *Big Dye Terminator(Applyed Biosystem)*
- *Tampon Big DyeTerminator (Applyed Biosystem)*
- *Agaroză (Invitrogen)*

Materialele şi consumabilele folosite au fost :

- pipete (Biohit) cu volume reglabile de la 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl
- tuburi PCR de 0,2 ml
- vărfuri de pipete de dimensiuni diferite (mari, medii şi mici) cu volume de 0,2-5 µl, 5-10 µl, 50-100 µl şi 100-1000 µl
- sticlărie de laborator, recipienţi
- stative
- coloane de purificare (Microcon)

7.1.3. Aparatura utilizată

7.1.3. Equipment

- Agitator ultraturax (Helidolph)
- Aparat pentru produs gheaţă(Brema)
- Autoclav (Raypa)
- Baie marină(Fisher Bioblock Scientific polystat)
- Balanta analitica (Schimadzu AW 20M)
- Containere Biohazard pentru deşeuri (Brema)
- Deionizator de apă (Smeg WP 3000)
- Etuvă (Memmet)
- Hotă pentru chimicale (Kottermann)
- Hotă PCR(STERIL)
- Microcentrifugi (Sigma 1-15)
- pH – metru (InoLab)
- Cuve pentru electroforeza orizontlă acizilor nucleici(Fisher)
- Cuptor cu microunde (Sharp)
- Thermocycler – Mastercycler (Eppendorf)
- Sistem video de achiziţie şi prelucrare a imaginii (Alpha Inotech 2200)
-Vortex (Bioblock)
-Centrifugă(SIGMA 1-15)
-Bidistilator apa GFL 2104 (Bioblock)
- Sistem de fotodocumentare – Vilber Lourmat E-BOX 1000/20M (Applyed Biosystem)
-Centrifugă cu vacuum (SIGMA)
-Liofilizator (SIGMA)
-Secvenţiator automat (Applyed Biosystem)

7.1.4. Metode de amplificare, purificare şi secvenţiere a produsului PCR

7.1.4. Methods of amplification, purification and sequencing of the PCR product

Pentru a elucida cauzele restricţiei parţiale atunci când s-a utilizat la restricţia fragmentului de 400 pb din gena leptinei, enzima *Sau 3A I* de la unele probe de ADN de la indivizii proveniţi de la rasa Brună de Maramureş, s-a recurs la secvenţierea fragmentului de 400 pb din gena leptinei la unele probe provenite de la această rasă.

Acest lucru este necesar pentru a se cunoaşte cauza pentru care nu pot fi observate întotdeauna toate fragmentele polimorfice provenite de la această rasă. Probele de ADN folosite aveau o concentraţie de 50 ng /µl .

In prima etapă a fost amplificat fragmentul care urmează să fie supus secvenţierii, utilizând primerii propuşi de *Leiffers şi colab. (2002*) cei cu care s-a efectuat genotipizarea, trecându–se apoi la secvenţierea propriu zisă a acestei porţiuni din gena leptinei. Acest lucru a fost posibil prin utilizarea secvenţiatorului automat (Applied Biosystems). Pentru secvenţierea produşilor PCR purificaţi este utilizat kitul de secvenţiere ciclică Big Dye ^{TM} Terminators (Applied Biosystems).

Secvenţele vor fi aliniate folosind un program computerizat. Scanarea secvenţelor şi alinierea acestora va fi făcută cu programul Fast A (Gen Bank DNA). Secvenţele transmise de secvenţiator în formă de text vor fi comparate cu electroforegramele corespunzătoare pentru a se detecta erorilor de citire şi transcriere ale aparatului.

Pentru reacţia PCR, efectuată pentru **amplificarea** fragmetului de 400 pb din gena leptinei, am utilizat următorul amestec PCR calculat pentru un volum final de 25 µl:

Apa sterilă	- 16,2 µl
Tampon	- 2,5 µl
dNTP	- 1 µl
Primeri	- P1-1 µl
	- P2-1 µl
$MgCl_2$	- 1 µl
Taqpolymeraza	- 0,3 µl
ADN	- 2 µl
Volum final: 25 µl	

Ciclurile termice pentru reacţia PCR, cu etapele predenaturare, denaturare, ataşare, elongaţie şi cu temperatura de ataşare a primerilor utilizată de această dată de 59^0 C :

1 x 95^0 C	- 5 minute
40 x 95^0 C	- 1 minut
59^0 C	- 1 minut
72^0C	- 1 minut
72^0C	- 10 minute

Reacţia PCR s-a efectuat în Termocycler, urmând ca apoi, produsul PCR, ce urmează a fi secvenţiat, să fie purificat, pentru ca secvenţierea să decurgă în condiţii bune şi să nu existe greşeli de secvenţiere. Secvenţa primerilor care au fost utilizaţi pentru amplificarea PCR înainte de secvenţiere a fost următoarea:

5'- TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT -3'

5'- GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT -3'

Pentru efectuarea reacţiei de secvenţiere şi obţinerea unor rezultate concludente este necesară o prealabilă purificare a produsului PCR amplificat. Pentru **purificarea produsului** PCR s-a folosit mai multe substanţe, iar etapele purificării, cuantificării şi ale pregătirii produsului PCR pentru secvenţiere vor fi descrise în continuare.

Etapele purificării produsului PCR pe coloane sunt următoarele:

- se trec 25 µl din produsul PCR în tuburile speciale fără a se atinge membrane
- se adaugă 375 µl apă ultra pură astfel încât volumul final să fie de 400 µl
- centrifugare 15 minute la 4000 rpm
- se repetă prima operaţiune de 2 ori
- se recuperează coloana într-un nou Eppendorf
- se adaugă 25 µl apă distilată pe membrană
- centrifugare 5 minute 4000 rpm

Etapele cuantificării ADN sunt următoarele:

- prelevarea a 5 µl produs PCR purificat
- adăugare 2 µl colorant pentru vizualizare
- migrarea pe gel de agaroză, de concentraţie 2%, în soluţie tampon TAE 1x pentru electroforeză, la voltaj de 50V, şi cu Smart Ladder în volum de 5 µl, folosit ca etalon. Preluarea imaginii s-a realizat cu un sistem de fotodocumentare Gel Doc.

Pregătirea produsului PCR pentru secvenţiere se face în prezenţa unui mix de secvenţiere, cu următoarea componenţă calculat pentru un volum final de 10 µl:

Big Dye Terminator	- 2 µl
Tampon Big DyeTerminator	- 2 µl
Primer (diluat de 10x)	- 0,3 µl
Concentraţia ADN	- 5 ng/2µl
Apă ultrapură	- 2,7 µl
Volum final: 10 µl	

Se face din nou o reacţie PCR pentru secvenţiere cu următoarele cicluri ce corespund etapelor denaturare, ataşare, elongaţie:

25 x 96^0 C	- 30 secunde
50^0 C	- 15 secunde
60^0C	- 4 minute

Purificarea cu etanol a produsului PCR, care va fi supus secvenţierii, a fost necesară să fie făcută pentru o bună calitate a produsului PCR care urmează a fi introdus în secvenţiator şi s-a făcut în următoarele etape:

- se adaugă 2µl de acetat de sodiu tampon (buffer) 3M pH 4,6 (NaAc), într-un tub Eppendorf de 1,5 ml
- se adaugă 10µl produs pentru secvenţiere
- se adaugă 50µl etanol 100%
- se vortexează încet
- se incubează 20 min la temperatura ambiantă, la întuneric
- se centrifughează 30 minute la 14000 rpm la temperatura camerei
- se elimină supernatantul
- se spală coloanele cu 250 µl etanol 70%
- se centrifughează 15 min la 14000 rpm la temperature camerei
- se elimină supernatantul
- se liofilizează 6 min în centrifugă cu vacuum şi apoi se conservă tuburile peste noapte la -20^0C
- coloanele se resuspendă în formamidă
- se introduc probele în aparatul de secvenţiere (Applyed Biosystem).

Toate aceste metode de purificare, în mai multe etape, nu fac decât să ofere o mai bună calitate a produsului PCR care urmează a fi supus secvenţierii şi totodată oferă o mai bună calitate a acesteia.

7.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII

7.2. RESULTS AND DISCUSSIONS

7.2.1. Amplificarea PCR a fragmentului de 400 pb pentru secvenţiere

7.2.1. The PCR amplification of the 400 bp fragment for sequencing

Pentru amplificarea fragmentului de 400 pb de baze, din gena leptinei atunci când s-au utilizat secvenţele de primeri propuşi de *Leiffers şi colab. (2002)* şi cu o temperatură de ataşare a primerilor de 59^0C, ce aparţine limitei inferioare de temperaturi de ataşare a acestor primeri în cadrul protocolului optimiza .

Rezultatele au fost bune, în sensul că s-a produs amplificarea fragmentului de 400 pb din gena leptinei, care urmează să fie supus secvenţierii, probele ADN provenind de la indivizi din rasa Brună de Maramureş, rasă la care a avut loc o digestie parţială a produsului restrictat cu enzima *Sau3AI*. Condiţiile de reacţie şi parametrii au rămas neschimbaţi faţă de protocolul optimizat , mai puţin temperatura de ataşare a primerilor.

7.2.2. Purificarea produsului PCR

7.2.2.The purification of the PCR product

Pentru obţinerea unei reacţii de secvenţiere de bună calitate, fără erori, a fost necesară purificarea produsul PCR obţinut prin amplificarea fragmentului de 400 pb.

Produsul PCR a fost purificat pe coloane (Microccon) şi cu etanol, pentru a se evita contaminarea lui cu proteine sau cu ARN.

Pentru a se verifica dacă purificarea a dat rezultate bune se va trece la cuantificarea ADN purificat. Rezultatele probelor de ADN amplificate, purificate şi cuantificate (figura 59), evidenţiind profilul electroforetic al fragmentului de 400 pb cuantificat şi migrat într-un gel de agaroză de concentraţie 2%, colorat cu bromură de etidiu (1 µl).

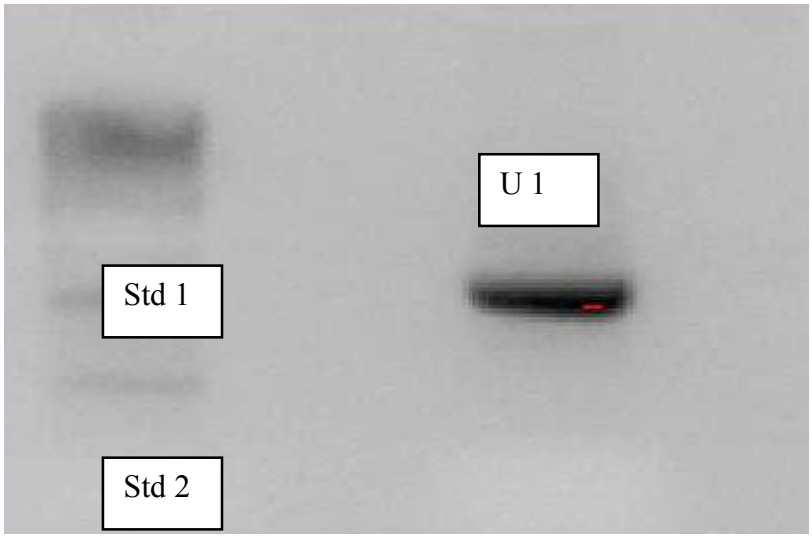


Fig.59 . Profilul electroforetic al produsului PCR purificat şi cuantificat la rasa Brună de Maramureş

Fig.59 . *The electroforetic profile of the purified and quantified PCR product in Brună de Maramureş*

Profilul electroforetic al ADN provenit de la indivizii rasei Brună de Maramureş, ADN a fost purificat pe coloane şi cuantificat (figura 60).

În aceeaşi figură este prezentat profilul electroforetic al fragmentului de 400 pb din gena leptinei, migrat într-un gel de agaroză de concentraţie 4% şi colorat cu bromură

de etidiu (1µl) la indivizii din rasa Brună de Maramureş corespunzător poziţiilor 1, 2, 3 şi 4 (figura 60).

Este necesară după fiecare operaţiune efectuarea unei noi electroforeze pentru a se putea observa calitatea profilului obţinut şi dacă se obţine fragmentul aşteptat.Am utilizat geluri de agaroză de concentraţii diferite 2%, respectiv 4%, deoarece un gel mai concentrat permite o migrare mai lentă a produsului, iar un gel mai puţin concentrat o migrare mai rapidă, dar nu întodeauna cu rezultatele dorite.

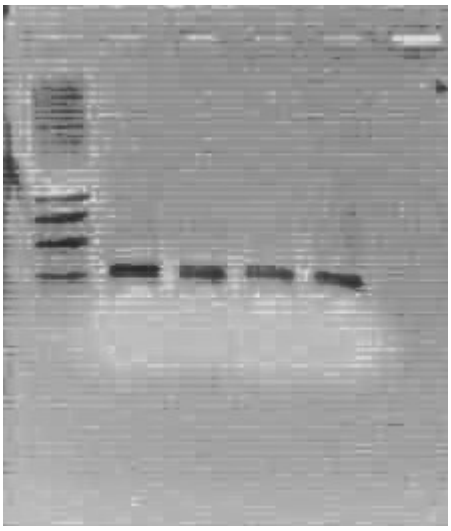


Fig.60. Profilul electroforetic al ADN purificat , cuantificat şi migrat într-un gel de agaroză de concentraţie 4%(original)

Fig.60.*The electroforetic profile of the purified and cuantified DNA migrated in 4% agarose gel(original)*

7.2. 3. Reacţia PCR în vederea secvenţierii fragmentului analizat

7.2.3.The PCR reaction for sequencing the analyzed fragment

Reacţia de secvenţiere are la bază replicarea *in vitro* a ADN monocatenar, produs prin PCR, în prezenţa a patru deoxinucleotidtrifosfaţi: dNTP (dATP, dGTP, dCTP şi dTTP) şi ¼ din analogii dNTP-urilor – dideoxinucleotidtrifosfaţi sau ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP şi ddTTP) (*Sanger, F., 1980)* .

Dimensiunea fragmentului de ADN purificat, necesară pentru reacţia de secvenţiere, în cazul nostru, este cuprinsă în intervalul 200 - 500 pb. În consecinţă, pentru produsul de 400 pb, concentraţia de ADN ce ar trebui să fie raportată la 2 µl este între 1,5 şi 5ng, în cazul în care proba de ADN utilizată nu a avut întotdeauna această concentraţie, s-a trecut la calcularea ei.

Produsul astfel prelucrat a fost introdus într-un secvenţiator Applied Biosystem, iar după terminarea programului de secvenţiere, a fragmentului de 400 pb din gena leptinei, s-a trecut la prelucrarea datelor şi interpretarea cromatogramelor obţinute la probele secvenţiate, provenite de la rasa Brună de Maramureş.

În urma prelucrării datelor cu un soft special al secvenţiatorului (Applyed Biosystem) s-a evidenţiat o mutaţie prin substituţia nucleotidelor **C – T,** în poziţia 309, care se presupune că ar fi cauza digestiei incomplete cu enzima *Sau 3 A I,* la situsul de scindare al enzimei 5’ GATC 3’ şi 3’ CTAG 5’.

Secvenţierea fragmentului de 400 pb din gena leptinei a fost efectuată cu sprijinul colectivului din laboratorul Progenus S.A., Gembloux (figura 61).

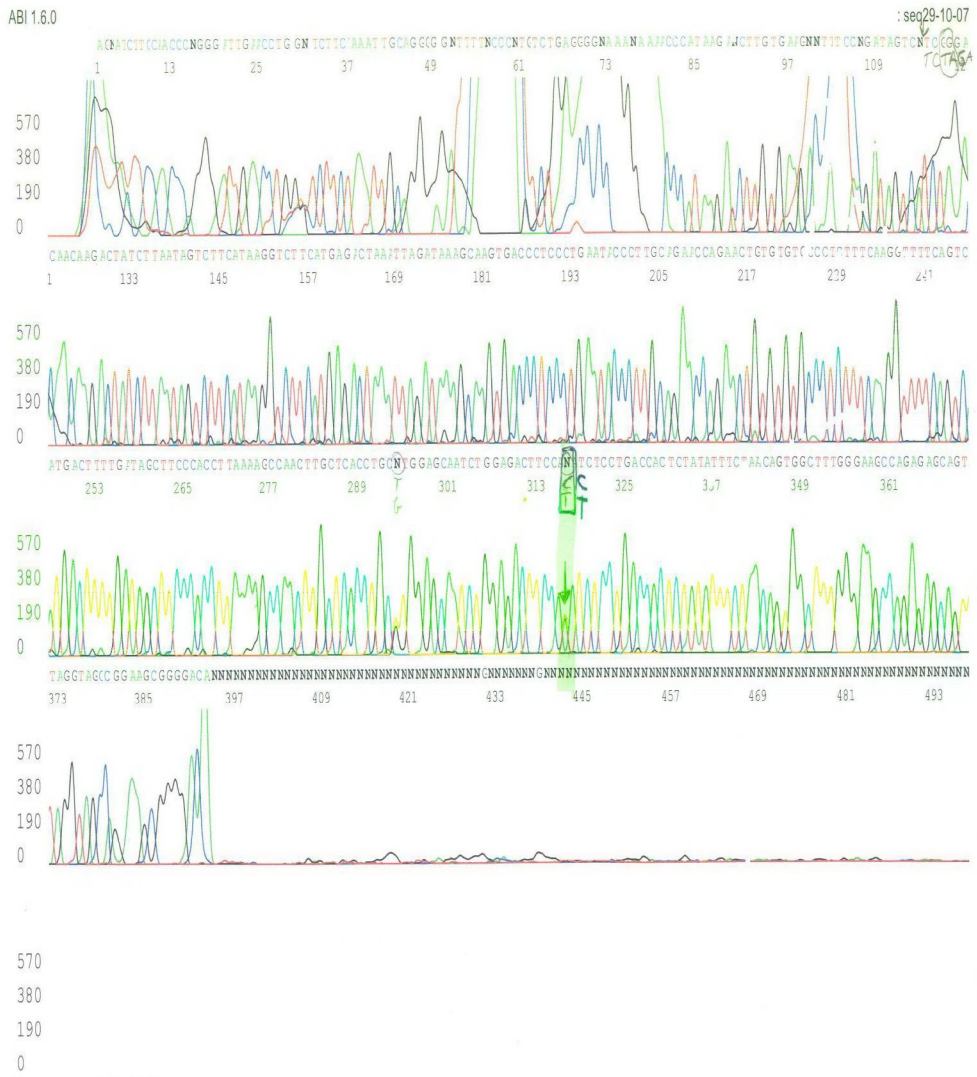


Fig.61. Secvenţierea fragmentului de 400 pb din gena leptinei şi evidenţierea mutaţiei C - T la rasa Brună de Maramureş

***Fig.61**. The sequencing of the 400bp fragment from the leptine gene and emphasizing the C – T mutation in Brună de Maramureş*

Se poate observa şi analiza imaginea rezultată în urma secvenţierii fragmentului de 400 pb din gena leptinei, imagine a cărei preluare s-a făcut cu un soft special al secvenţiatorului, în care, în poziţia de 300 pb se poate observa o mutaţie detectată în probele de ADN de la indivizii proveniţi din rasa Brună de Maramureş (figura 61).

Rezultatele secvenţierii, pentru o serie de probe de ADN provenite de la indivizi de la rasa Brună de Maramureş sunt ilustrate de chromatograma (figura 62) .

Fig.62. Secvenţierea fragmentului de 400 pb sens şi antisens din gena leptinei

***Fig.62**. The sequencing of the sense and antisense 400 bp fragment from the leptine gene*

7.3. CONCLUZII PARŢIALE

7.3. PARTIAL CONCLUSIONS

- Produsul PCR, provenit din probe de ADN, de la indivizi din rasa Brună de Maramureş, a fost secvenţiat pentru a se eluida cauza digestiei parţiale a fragmentului de 400pb din gena leptinei, cu enzima de restricţie *Sau3AI* .
- Pentru ca secvenţierea să decurgă în condiţii bune şi erorile de secvenţiere să nu fie înregistrate produsul PCR a fost purificat şi apoi cuantificat.
- Pentru amplificarea fragmentului de 400 pb din gena leptinei ce urmează a fi supus secvenţierii, s-au utilizat secvenţe de primeri sens şi antisens, iar ADN pentru teste provenite de la tineretul taurin din rasa Brună de Maramureş a avut o concentraţie de 50 ng/ µl.
- Produsul PCR, corespunzător fragmentului de 400 pb, a fost purificat pe coloane, cuantificat, migrat într-un gel de agaroză de concentraţie 4% şi 2%, colorat cu bromură de etidiu 1µl şi supus etapelor secvenţierii.
- În urma prelucrării datelor cu un soft prevăzut la secvenţiatorul (Applied Biosystem), s-a depistat o mutaţie prin substituţie, a nucleotidelor **C – T,** în poziţia 309.
- Se presupune că mutaţia **C – T** ar fi cauza digestiei incomplete a fragmentului de 400 pb din gena leptinei, cu enzima *Sau 3 A I,* la situsul de scindare al enzimei 5’ GATC 3’ şi 3’ CTAG 5.

CAPITOLUL VIII

CALCULUL FRECVENŢEI DE GENĂ ŞI GENOTIP ÎN POPULAŢIA STUDIATĂ

CHAPTER VIII
THE CALCULATION OF THE GENE AND GENOTYPES FREQUENCY IN STUDIED POPULATION

Markerii genetici care sunt de dorit să fie dezvoltaţi, sunt acei markeri care prezintă un polimorfism ridicat, caracterizat prin posesia a două sau mai multe alele diferenţiabile, codominante, care pot fi urmăriţi în descendenţă. Genele alele sunt acele gene care se află situate în acelaşi locus, pe cromozomii omologi.

Markerii de tip *RFLP,* sau markerii polimorfismului lungimii fragmentelor de restricţie, sunt markeri codominanţi care prezintă un polimorfism ridicat, aceşti markeri oferă avantajul că pot să fie urmăriţi în descendenţă, unul dintre aceşti markeri genetici s-a dovedit a fi leptina (gena obezităţii), care este un marker genetic asociat cu calitatea şi cantitatea cărnii, dar şi cu însuşirile de creştere şi indicii greutăţii corporale.

Structura genetică a unei populaţii la un anumit locus se exprimă matematic prin frecvenţele de genă şi de genotip şi arată modificările care intervin în decursul generaţiilor ca urmare a acţiunii unor procese sistematice cum sunt: mutaţia, selecţia şi migraţia şi a proceselor dispersive: driftul genetic şi consangvinizarea (*Coşier Viorica, A.Vlaic 2007).*

Studierea unei populaţii se poate face prin urmărirea unui anumit caracter cantitativ sau calitativ, în cazul nostru gena obezităţii - marker genetic asociat cu calitatea şi cantitatea cărnii la diferite rase şi pe care dorim să-l dezvoltăm pentru rasele autohtone (Bălţată românească şi Brună de Maramureş).

În prezentul studiu, am genotipizat la locusul genei leptinei un efectiv total de 152 capete de tineret taurin, din care 88 capete tineret taurin, proveneau din rasa Bălţată românească şi 64 capete tineret taurin proveneau din rasa Brună de Maramureş. Genotipizarea şi studierea polimorfismului la locusul genei leptinei a fost posibilă şi cu rezultate bune, prin utilizarea protocolului propus de *Leiffers şi colab., 2002*, protocol care a fost testat, optimizat şi utlizat pentru prima dată în laboratorul de Genetică Animală din cadrul Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca.

În continuare ne-am propus să determinăm structura genetică la acest locus prin determinarea frecvenţelor de genă şi de genotip pentru a vedea care din genele alele sunt în o proporţie mai mare şi care dintre genotipuri ocupă o proporţie mai mare în populaţia luată în studiu, în cadrul celor două rase genotipizate.

8.1. METODA MATEMATICĂ DE CALCUL A FRCVENŢEI GENELOR ŞI A GENOTIPURILOR

8.1. MATHEMATICAL METHOD OF CALCULATION OF THE GENE AND GENOTYPES FREQUENCIES

Vom folosi pentru calculul frecvenţelor genelor şi a genotipurilor, următoarele notaţii: frecvenţa genotipului homozigot AA va fi notat cu litera P, frecvenţa genotipului heterozigot AB va fi notat cu litera H , iar frecvenţa genotipul homozigot BB va fi notat cu litera Q.

Frecvenţa unei gene care se transmite codominant, se calculează după următoarea formulă:

$$p = (N_{AA}+1/2N_{AB}) /N, \quad q=(N_{BB}+1/2\ N_{AB}) / N$$

Rasa Bălţată românească

În cazul nostru: Frecvenţa genei (A) , p= (53+1/2. 32) /88

Frecvenţa genei (B), q=(3+1/2 .32) / 88

Rasa Brună de Maramureş

În cazul nostru: Frecvenţa genei (A), p= (4o+1/2 .24) /64

Frecvenţa genei (B), q= (0+1/2 .24) / 64

Frecvenţa unui genotip reprezintă proporţia ocupată de un anumit genotip din totalul populaţiei şi se calculează după următoarea formulă:

$P=N_{AA}/N$, $H=N_{AB}/N$, $Q= N_{BB}/ N$.

Rasa Bălţată românească

În cazul nostru: Frecvenţa genotipului (AA) ,P=53/88

Frecvenţa genotipului (AB), H=32/88

Frecvenţa genotipului (BB), Q= 3/ 88.

Rasa Brună de Maramureş

În cazul nostru: Frecvenţa genotipului (AA), P=40/64

Frecvenţa genotipului (AB), H = 24/64

Frecvenţa genotipului (BB), Q= 0/64.

8.2. REZULTATE ŞI DISCUŢII

8.2 RESULTS AND DISCUSSIONS

8.2.1. Calculul frecvenţei genelor la locusul leptinei

8.2.1.The calculation of the gene frequency at leptine locus

Locusul genei leptinei, cuprinde două gene alele notate cu A şi B a căror polimorfism se studiază cu tehnici *PCR-RFLP*. Aceşti markeri se transmit codominant şi prezintă un polimorfism ridicat. Frecvenţa unei gene reprezintă proporţia pe care o ocupă gena respectivă din totalul genelor existente la acel locus într-o populaţie.

În cazul nostru, având două gene alele, vom folosi următoarele notaţii şi anume frecvenţa genei A o vom nota cu litera p, iar frecvenţa genei B o vom nota cu litera q , cu N numărul total de indivizi din populaţia analizată, iar pentru frecvenţele celor trei genotipuri detectate: homozigot AA, heterozigot AB şi homozigot BB vom folosi notaţiile P, H şi respectiv Q .

În efectivul de 152 de capete de taurine studiate şi împărţite în două populaţii aparţinând la două rase diferite, 88 indivizi au fost din rasa Bălţată românească şi 64 de indivizi aparţinând rasei Brună de Maramureş.In urma testelor PCR efectuate, a stabilirii genotipurilor la locusul genei leptinei şi a studierii polimorfismelor la acest locus, s-a trecut la calculul frecvenţei de genă în cele două populaţii.

La rasa Bălţată românească, din cei 88 indivizi genotipizaţi cu protocolul *Leiffers şi colab., 2002* şi optimizat de noi, 53 indivizi aveau genotipul homozigot AA , 32 indivizi aveau genotipul heterozigot AB şi numai trei indivizi au fost detectaţi ca având genotipul homozigot BB.

Aceşti indivizi din rasa Bălţată românească provin din fermele: Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare), S.C.D.P. Jucu aparţinătoare Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară (Cluj – Napoca), şi din două ferme private din judeţul Cluj - ferma Corujan (Floreşti), şi ferma S.C. Crişan (Gherla).

Se vor prezenta frecvenţele de genă calculate la indivizii din rasa Bălţată românească, după formula descrisă mai sus (tabelul 14).

Tabelul 14

Frecvenţa de genă la locusul leptinei la indivizii din rasa Bălţată românească

Table 14

The gene frequency at the leptine locus in Bălţată românească individuals

Locusul genei *The gene locus*	Frecvenţa genei *The gene frequency (A)*	Frecvenţa genei *The gene frequency (B)*
Leptina *Leptine*	0,78 (78%)	0,22 (22%)

În urma analizei datelor din tabelul 14, se poate concluziona că gena (A) are o valoare de 0,78 sau că apare cu o frecvenţă de 78 % , iar gena (B) are o valoare de 0,22 deci apare cu o frecvenţă de 22% în populaţia de taurine studiată din rasa Bălţată românească. În concluzie alela (A) apare cu o frecvenţă net superioară la locusul genei leptinei faţă de alela (B) în populaţia studiată .

La rasa Brună de Maramureş, din cei 64 indivizi genotipizaţi cu acelaşi protocol (*Leiffers şi colab., 2002),* 40 indivizi au fost identificaţi cu genotipul homozigot AA şi 24 indivizi au fost identificaţi cu genotipul heterozigot AB. In această populaţie nu au fost detectaţi indivizii cu genotipul homozigot BB, iar aceşti indivizi, aparţinători rasei Brună de Maramureş proveneau din fermele, S.C. Agrozootehnica (Seini, Maramureş), S.C. Livada (Satu Mare) şi Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare).

În tabelul 15 vom prezenta frecvenţele de genă calculate la indivizii din rasa Brună de Maramureş după formula descrisă mai sus.

În urma analizei datelor din tabelul 15, se poate concluziona că gena (A) are o valoare de 0,81 sau că apare cu o frecvenţă de 81 % , iar gena (B) are o valoare de 0,19 sau că apare cu o frecvenţă de 19% în populaţia de taurine studiată, la rasa Brună de

Maramureş. Alela (A) apare cu o frecvenţă mai mare la locusul genei leptinei decât alela (B), rezultate apropiate valoric cu rasa Bălţată românească.

Tabelul 15

Frecvenţa de genă la locusul leptinei la indivizii din rasa Brună de Maramureş

Table 15

The gene frequency at the leptine locus in Brună de Maramureş individuals

Locusul genei *The gene locus*	Frecvenţa genei *The gene frequency (A)*	Frecvenţa genei *The gene frequency (B)*
Leptina *Leptine*	0,81 (81%)	0,19 (19%)

Aceste rezultate, obţinute la cele două rase Bălţată românească şi Brună de Maramureş, în ceea ce priveşte frecvenţa cu care apar alelele A şi B în populaţie , sunt diferite de datele semnalate în literatura de specialitate citate de *Tessane, C., şi colab. (2007),* unde, la rasa de taurine Aberden Angus, alela A a apărut cu o frecvenţă de 0,44 şi alela B a apărut cu o frecvenţă mai mare şi anume de 0,56.

8.2.2. Calculul frecvenţei genotipurilor la locusul leptinei

8.2.2. The calculation of the genotypes frequency at leptine locus

Genotipurile detectate în prezentul studiu au fost următoarele: genotipul homozigot AA , genotipul heterozigot AB şi genotipul homozigot BB.

Frecvenţa unui genotip reprezintă proporţia pe care o ocupă genotipul respectiv din totalul genotipurilor existente la acel locus, într-o populaţie.

La rasa Bălţată românească la care din cei 88 indivizi genotipizaţi, 53 indivizi aveau genotipul homozigot AA, 32 indivizi aveau genotipul heterozigot AB şi trei indivizi au fost detectaţi ca având genotipul homozigot BB, frecvenţa genotipurilor este determinată după formulele descrise mai sus.

Valorile privind frecvenţele genotipurilor la rasa Bălţată românească sunt prezentate în continuare (tabelul 16).

Tabelul 16

Frecvenţa genotipurilor la locusul leptinei la indivizii din rasa Bălţată românească

Table 16

The genotypes frequency at the leptine locus in Bălţată românească individuals

Locusul genei *The gene locus*	Frecvenţa genotipului homozigot *The frequency of the homozigous genotype (AA)*	Frecvenţa genotipului heterozigot *The frequency of the heterozigous genotype (AB)*	Frecvenţa genotipului homozigot *The frequency of the homozigous genotype (BB)*
Leptina *Leptine*	0,60 (60%)	0,36 (36%)	0,04 (4%)

În urma analizei valorilor frecvenţelor genotipurilor (tabelul 16), la rasa Bălţată românească, se poate concluziona că, genotipul homozigot (AA) are o valoare de 0,60 sau reprezintă 60% din totalul genotipurilor, genotipul heterozigot (AB) are o valoare de 0,36 sau reprezintă 36 %, iar genotipul homozigot (BB) are valoarea cea mai mică, şi anume reprezintă 0,04 sau 4% din totalul genotipurilor existente.

La rasa Brună de Maramureş la care din cei 64 indivizi genotipizaţi, 40 indivizi aveau genotipul homozigot AA , 24 indivizi aveau genotipul heterozigot AB şi la care nu s-a înregistrat nici un genotip homozigot BB, frecvenţa genotipurilor este prezentată fiind determinată cu formulele de mai sus (tabelul 17).

Tabelul 17

Frecvenţa genotipurilor la locusul leptinei la indivizii din rasa Brună de Maramureş

Table 17

The genotypes frequency at the leptine locus in Brună de Maramureş individuals

Locusul genei *The gene locus*	Frecvenţa genotipului homozigot *The frequency of the homozigous genotype (AA)*	Frecvenţa genotipului heterozigot *The frequency of the heterozigous genotype (AB)*	Frecvenţa genotipului homozigot *The frequency of the homozigous geno (BB)*
Leptina *Leptine*	0,62 (62%)	0,38 (38%)	0 (0%)

În urma analzei valorilor frecvenţelor genotipurilor (tabelul 17), la rasa Brună de Maramureş, se poate concluziona că, genotipul homozigot (AA) are o valoare de 0,62 sau reprezintă 62% din totalul genotipurilor , genotipul heterozigot (AB) are o valoare de 0,38 sau reprezintă 38 %, iar genotipul homozigot (BB) are valoarea 0 deoarece la acestă rasă în cadrul prezentului studiu nu s-a semnalat prezenţa acestui genotip.

Rezultatele obţinute la cele două rase Bălţată românească şi Brună de Maramureş, în ceea ce priveşte frecvenţa cu care apar genotipurile homozigot: AA, heterozigot AB şi homozigot BB, sunt diferite de datele semnalate în literatura de specialitate, citate de *Fitzimmos şi colab.(1998)* unde la rasa de taurine Holstein-Friză, genotipul AA a apărut cu o frecvenţă de 0,581, genotipul heterozigot AB a apărut cu o frecvenţă de 0,329 şi genotipul homozigot BB a apărut cu o frecvenţă de 0,090, iar

Leiffers şi colab. (2002), au semnalat tot la aceeaşi rasă într-un alt studiu alte valori ale frecvenţelor genotipurilor la locusul leptinei şi anume: genotipul AA a apărut cu o frecvenţă de 0,813, genotipul heterozigot AB a apărut cu o frecvenţă de 0,185 şi genotipul homozigot BB a apărut cu o frecvenţă de 0,002. În toate cazurile se poate concluziona că genotipul homozigot BB apare cu o frecvenţă mai mică în populaţie la fel ca şi la rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş studiate.

8.3. CONCLUZII PARŢIALE

8.3.PARTIAL CONCLUSIONS

- La rasa Bălţată românească, din cei 88 indivizi genotipizaţi în urma optimizării protocolului *Leiffers şi colab., 2002*, 53 au avut genotipul homozigot AA, 32 genotipul heterozigot AB şi numai trei indivizi au fost detectaţi ca având genotipul homozigot BB (Societatea Agricolă Petreşti, Satu Mare). Aceşti indivizi din rasa Bălţată românească provin din fermele, Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare), S.C.D.P. Jucu aparţinătoare Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară (Cluj – Napoca) şi din cele două ferme private din judeţul Cluj - ferma Corujan (Floreşti), şi ferma S.C. Crişan (Gherla).
- În urma efectuării calculelor matematice în ceea ce priveşte frecvenţa de genă la locusul leptinei se poate concluziona că în populaţia de taurine studiată din rasa Bălţată românească, gena (A) are o valoare de 0,78 sau că apare cu o frecvenţă de 78 % , iar gena (B) are o valoare de 0,22 deci apare cu o frecvenţă de 22%. În concluzie, alela (A) apare cu o frecvenţă superioară la locusul genei leptinei faţă de alela (B).
- La rasa Brună de Maramureş, din cei 64 indivizi genotipizaţi în urma optimizării protocolului *Leiffers şi colab. 2002,* 40 au fost identificaţi cu genotipul homozigot AA şi 24 cu genotipul heterozigot AB. În această populaţie nu au fost detectaţi indivizii ca având genotipul BB. Indivizii aparţinători rasei Brună de

Maramureş au provenit din fermele, S.C. Agrozootehnica (Seini, Maramureş), S.C. Livada (Satu Mare) şi Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare).

- În urma efectuării calculelor matematice pentru determinarea frecvenţelor de genă la locusul leptinei în populaţia de taurine studiată, la rasa Brună de Maramureş se poate concluziona că gena (A) are o valoare de 0,81 şi apare cu o frecvenţă de 81 % , iar gena (B) are o valoare de 0,19 cu frecvenţa de 19%. Alela (A) apare cu o frecvenţă mai mare la locusul genei leptinei decât alela (B) în populaţie.
- În urma analizei valorilor frecvenţelor genotipurilor după calcule specifice, la indivizii proveniţi de la rasa Bălţată românească, se poate concluziona că, genotipul homozigot (AA) are o valoare de 0,60 şi ocupă 60% din totalul genotipurilor, genotipul heterozigot (AB) are o valoare de 0,36 ocupă 36 %, iar genotipul homozigot (BB) are valoarea 0,04 şi ocupă 4% din totalul genotipurilor existente la acest locus.
- La indivizii proveniţi de la rasa Brună de Maramureş, la care din cei 64 indivizi genotipizaţi, 40 indivizi aveau genotipul homozigot AA şi 24 indivizi genotipul heterozigot AB, nu s-a înregistrat nici un genotip homozigot BB.
- În urma analizei valorilor frecvenţelor de genotip la rasa Brună de Maramureş, genotipul homozigot AA reprezentând 62% din totalul genotipurilor, genotipul heterozigot (AB) are o valoare de 0,38 reprezentând 38 % iar genotipul homozigot (BB) are valoarea 0, deoarece la acestă în cadrul prezentului studiu nu s-a înregistrat prezenţa acestui genotip.

CAPITOLUL IX
CONCLUZII GENERALE ŞI RECOMANDĂRI

CHAPTER IX
GENERAL CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

1. În cazul metodei de extracţie ADN din sânge cu **kitul manual Wizard Genomic DNA Purification,** în urma prelucrării datelor privind puritățile şi cantităţile de ADN, extrase din probele provenite de la rasa Bălţată Românească din ferma Corujan (Floreşti), s-au obţinut valori medii ale cantităţii şi purităţii ADN de 351,96 ± 76,81 ng şi respectiv 1,33 ± 0,03, iar la rasa Brună de Maramureş (ferma S.C. Agrozootehnica Seini), s-a obţinut o cantitate medie de ADN de 234,43 ± 34,10 ng şi o puritate medie de 1,16 ± 0,01.

2. Această metodă de extracţie a ADN din sânge oferă rezultate bune în ceea ce priveşte calitatea şi cantitatea ADN extras. Diferenţa dintre această metodă şi celelalte, pe care le vom descrie în continuare, este reprezentată de avantajul că sângele nu trebuie să fie proaspăt recoltat, el poate fi congelat câteva zile, însă serul trebuie să fie bine separat de plasmă după care să fie supus tehnicii extracţiei ADN. Cantitatea şi puritatea ADN extras nu a prezentat diferenţe mari la cele două rase analizate.

3. În cazul **metodei de extracţie rapidă a ADN**, în urma prelucrării datelor privind puritățile şi cantităţile de ADN extras de la indivizi proveniţi din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş (S.A Petreşti, judeţul Satu-Mare), s-a obţinut

o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 209,79 ± 13,65 ng şi o puritate medie de 1,46 ± 0,02.

4. La prelucrarea datelor privind purităţile şi cantităţile ADN extras cu aceeaşi metodă din probele de sânge recoltate de la indivizii din rasa Bălţată Românească, S.C.D.P. Jucu, judeţul Cluj s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 393,85 ± 54,73 ng şi o puritate medie de 1,34 ± 0,02, iar la rasa Bălţată românească (S.C. Crişan din Gherla, judeţul Cluj)s-a obţinut o valoare medie a concentraţiei de ADN egală cu 185,72 ± 28,79 ng şi o puritate medie de 1,42 ± 0,04. Aceasta este una dintre cele mai des utilizate metode în laboratorul nostru deoarece cantitatea şi puritatea de ADN obţinută este foarte bună, metoda este puţin costisitoare şi manopera nu necesită mult timp de lucru.

5. Probele de ADN, obţinute prin extracţie cu **kitul MagnaPure LC automatizat,** sunt de foarte bună calitate, cu o greutate moleculară medie de aproximativ 50 kb nu prezintă urme de degradare şi sunt libere de contaminări cu ARN şi proteine. In urma prelucrării datelor privind purităţile şi cantităţile de ADN extras din probele de sânge recoltate de la rasa Brună de Maramureş(S.C. Agrozootehnica Seini) s-a obţinut o valoare medie de 50,54 ± 15,16 ng cu o puritate medie de 1,77 ± 0,03, iar la rasa Brună de Maramureş, S.C.Livada judeţul Satu – Mare s-a obţinut o valoare medie de 54,73 ± 9,09 ng cu o puritate medie de 1,76 ± 0,02.

6. Metoda de extracţie cu **kitul Magna Pure Lc** prezintă avantajul posibilităţii prelucrării de probe congelate pe perioade lungi de timp.

7. Din aplicarea acestor metode de extracţie a ADN din sânge se poate concliziona că puritatea ADN urmează o relaţie invers proporţională cu cantitatea de ADN.

8. La prelucrarea statistică a datelor, privitoare la cantităţile de ADN extras cu cele trei metode de extracţie, la cele două rase luate în studiu, în urma testării semnificaţiei diferenţelor dintre medii prin testul 't, se constată diferenţe foarte semnificative statistic (+ 207,81 ng/ µl ; $p < 0,001$) între metoda de extracţie a ADN din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi metoda automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3). De asemenea, tot o diferenţă foarte semnificativă statistic (+179,95 ng/ µl;$p < 0,001$) a fost înregistrată şi între metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine(M_2) şi metoda automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3) .

9. Diferenţe statistic nesemnificative (+27,86 ng/ µl; $p > 0,05$) au fost obţinute între metoda de extracţie a ADN-ului din sânge de taurine cu kitul manual Wizard Genomic DNA Purification (M_1) şi metoda rapidă de extracţie ADN (M_2).

10. Diferenţe foarte semnificative statistic ($p < 0,001$) au fost înregistrate între toate valorile medii ale purităţilor ADN, obţinute pentru cele trei metode aplicate.

11. Dacă luăm în considerare comparaţia între valorile medii ale purităţilor de ADN obţinute în urma extracţiei cu metoda rapidă de extracţie a ADN din sânge de taurine (M_2) şi metoda automatizată de extracţie cu kitul Magna Pure LC DNA Isolation (M_3), diferenţele au fost în favoarea ultimei metode (M_3), ceea ce susţine superioritatea tehnică a acestei metode şi ne determină să o recomandăm pentru practicile de laborator de genetică moleculară unde este necesară obţinerea de ADN de puritate ridicată, necesară testelor PCR şi secvenţierii. Această metodă este adecvată scopului şi datorită rapidităţii cu care se extrage ADN din sânge.

12. Pentru studierea polimorfismului la locusul genei leptinei, în cazul testării protocolului propus de *Pomp şi colab.* (1997), utilizând în ciclurile PCR, temperatura de aliniere obţinută în gradient de temperatură, s-a constatat că

amplificarea a dat rezultate satisfăcătoare, obţinându-se produsul de amplificare aşteptat de 1820 pb, la probele de ADN de la indivizii proveniţi de la rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş. În urma rezultatului electroforezei se evidenţiază faptul că la rasa Bălţată românească, reacţia de amplificare nu se produce la fel ca la rasa Brună de Maramureş, datorită modificării amestecului de reacţie PCR în care se adaugă în plus şi $MgCl_2$ 1µl de concentraţie 10 mM

13. În urma efectuării testelor de determinare a temperaturii de aliniere a primerilor pentru fragmentul de 1820 pb, s-a determinat ca temperatură optimă de 64^0C valoare la care s-a obţinut produsul PCR.

14. În urma analizei computerizate a secvenţei întregi a genei leptinei, de 4067 pb, s-a constatat că există o eroare în protocolul lui *Pomp şi colab.(1997*), la nivelul unei nucleotide situate în primerii antisens, printr-o înlocuire de tipul Citozina -Timină.

15. Utilizând în ciclurile PCR, temperatura de aliniere obţinută în reacţia PCR în gradient de temperatură, s-a constatat că amplificarea a dat rezultate satisfăcătoare în cazul testării protocolului propus de *Pomp şi colab.*(1997), obţinându-se produsul de amplificare aşteptat, de 1820 pb, la probele de ADN provenite de la indivizii din rasele Bălţată românească şi Brună de Maramureş.

16. La rasa Bălţată românească, s-a constatat că, adăugarea în mixul de reacţie PCR a 1µl $MgCl_2$, de concentraţie 10 mM, a dus la rezultate mai bune ale amplificării produsului de 1820 pb, din gena leptinei.

17. În urma efectuării determinărilor PCR în gradient de temperatură pentru amplificarea fragmentului de 1820 pb, s-a determinat ca temperatură optimă de ataşare temperatura de 64^0C, la care s-a obţinut produsul aşteptat.

18. În urma analizei computerizate a secvenţei întregi a genei leptinei de 4067 pb, s-a constatat că există o eroare în protocolul lui *Pomp şi colab. (1997*), la nivelul unei nucleotide situate în primerii antisens, printr-o înlocuire de tipul Citozina -Timină.

19. Rezultatele obţinute în cazul electroforezei în gel de agaroză pentru evidenţierea fragmentului de 400 pb din gena leptinei, restrictat cu enzima de restricţie *Sau*3AI, cu protocolul propus de *Leiffers şi colab. (2002)* şi optimizat de noi, la probele de la rasele Bălţată Românească şi Brună de Maramureş, evidenţiază fragmentele de 400 pb, 300 pb şi 100 pb, ultima bandă având greutate moleculară mică, este dificil de evidenţiat în gel.

20. Profilul corespunzător indivizilor homozigoţi AA este un singur fragment de de 400 pb, această alelă nefiind digerată de enzimă, iar pentru indivizii heterozigoţi sunt evidenţiate trei fragmente de 400pb, 300pb şi 100pb, iar pentru indivizii homozigoţi BB sunt evidenţiate doar două fragmente de 300pb şi de 100 pb.

21. În urma efectuării amplificărilor comparative între rasele Bălţată Românească şi Brună de Maramureş, cu protocoalele utilizate de *Pomp şi colab.(1997) şi Leiffers şi colab.(2002),* au fost obţinute rezultate satisfăcătoare atât pentru rasa Brună de Maramureş cât pentru rasa Bălţată românească, în condiţiile utilizării protocolului *Pomp şi colab. (1997* optimizat şi rezultate bune la ambele rase cu protocolul propus de *Leiffers şi colab. (2002)* şi optimizat de noi.

22. Când restricţia fragmentului de 400 pb a fost realizată cu ajutorul enzimei *Sau 3AI* în cazul protocolului *Leiffers şi colab. (2002)*, s-a obţinut o digestie parţială la

indivizii heterozigoţi AB, care aveau trei fragmente de 400, 300 şi 100 pb, fragmentul de 100 pb nefiind suficient evidenţiat în gelul de agaroză.

23. Rezultate bune au fost obţinute şi atunci când restrictarea produsului PCR de 400 pb s-a făcut cu enzima *MboI,* folosită în diferite concentraţii.

24. În populaţiile studiate, aparţinătoare raselor Bălţată românească şi Brună de Maramureş, în urma genotipizării, au fost detectaţi indivizi cu genotipurile: homozigot AA, respectiv BB şi heterozigot AB, iar la unele probe provenite de la rasa Brună de Maramureş, s-a constatat că se produce o digestie parţială a produsului PCR de 400 pb.

25. Protocolul propus de *Lien şi colab.* (1997) a condus la obţinerea de rezultate foarte bune, obţinându-se profilele corespunzătoare indivizilor homozigoţi AA, heterozigoţi AB şi homozigoţi BB, în urma restricţiei cu enzima *BsaAI* , acest protocol fiind testat şi optimizat poate fi utilizat în viitoarele teste de stabilire a polimorfismelor la locusul leptinei.

26. În urma secvenţierii fragmentului de 400 pb de la rasa Brună de Maramureş şi a prelucrării datelor cu softul de secvenţiere, s-a depistat o mutaţie prin substituţie a nucleotidelor C - T, care se presupune că ar fi cauza digestiei incomplete cu enzima *Sau 3 I*, la situsul de recunoaştere al enzimei 5' GATC 3' şi 3' CTAG 5'.

27. La rasa Bălţată românească din cei 88 indivizi genotipizaţi cu protocolul *Leiffers şi colab. (2002)*, şi optimizat de noi, 53 au avut genotipul homozigot AA, 32 genotipul heterozigot AB şi numai trei indivizi au fost detectaţi ca având genotipul homozigot BB (Societatea Agricolă Petreşti, Satu Mare). Aceşti indivizi din rasa Bălţată românească, aparţin fermelor: Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare), S.C.D.P. Jucu aparţinătoare Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină

Veterinară (Cluj – Napoca) şi celor două ferme private din judeţul Cluj - ferma Corujan (Floreşti), şi ferma S.C. Crişan (Gherla).

28. În urma efectuării calculelor matematice, în ceea ce priveşte frecvenţa de genă la locusul leptinei, se poate concluziona că în populaţia de taurine de rasă Bălţată românească, gena (A) apare cu o frecvenţă de 78 % , iar gena (B cu o frecvenţă de

22%. În concluzie, alela (A) apare cu o frecvenţă superioară la locusul genei leptinei.

29. La rasa Brună de Maramureş din cei 64 indivizi genotipizaţi cu protocolul *Leiffers şi colab. (2002),* 40 au fost identificaţi cu genotipul homozigot AA şi 24 cu genotipul heterozigot AB. În această populaţie nu au fost detectaţi nici unul dintre indivizii luaţi în studiu ca având genotipul BB. Indivizii aparţinători rasei Brună de Maramureş au provenit din fermele, S.C. Agrozootehnica (Seini, Maramureş), S.C. Livada (Satu Mare) şi Societatea Agricolă Petreşti (Satu Mare).

30. În urma determinărilor frecvenţelor de genă la locusul leptinei la indivizii proveniţi din rasa Brună de Maramureş, se poate concluziona că gena (A) apare cu o frecvenţă de 81 % , iar gena (B) cu frecvenţa de 19%. În concluzie, alela (A) apare cu o frecvenţă mai mare la locusul genei leptinei decât alela (B).

31. În urma analizei valorilor frecvenţelor genotipurilor, după calcule specifice, la indivizii proveniţi de la rasa Bălţată românească, se poate concluziona că, genotipul homozigot (AA) reprezintă 60% din totalul genotipurilor, genotipul heterozigot (AB) reprezintă 36 % iar genotipul homozigot (BB) 4% din totalul genotipurilor existente.

32. La populaţia de rasă Brună de Maramureş, din cei 64 indivizi genotipizaţi, 40 indivizi aveau genotipul homozigot AA şi 24 indivizi genotipul heterozigot AB, nefiind înregistrat nici un genotip homozigot BB.

33. În urma analizei valorilor structurii genetice exprimată prin frecvenţa genotipurilor la rasa Brună de Maramureş, genotipul homozigot AA reprezentând 62%, din totalul genotipurilor, genotipul heterozigot (AB) ocupă 38%, iar genotipul homozigot (BB) are valoarea 0 deoarece în cadrul prezentului studiu nu s-a semnalat prezenţa acestui genotip în populaţia studiată.

34. În urma experimentelor efectuate, se recomandă utilizarea protocoalelor propuse de *Leiffers şi colab. (2002)* şi *Lien şi colab. (1997*) pentru evidenţierea polimorfismului la locusul genei leptinei şi genotipizarea la acest locus, deoarece s-a demonstrat că a dat rezultate superioare în comparaţie cu cele obţinute în cazul testării protocolului propus de *Pomp şi colab. (1997*) .

35. ***Gradul de noutate al tezei constă în faptul că rasele de taurine din România nu au mai fost până în prezent genotipizate la locusul genei leptinei, şi cele trei protocoale nu au mai fost testate şi optimizate în laboratorul nostrui.***

36. ***Prezentul studiu aduce informaţii noi atât pe plan naţional cât internaţional privind structura genetică la acest locus la rasele autohtone de taurine şi pune la dispoziţia cercetătorului interesat, două protocoale de genotipizare şi studiu de polimorfism genic, în laboratorul nostru.***

37. ***Importanţa locusului genei leptinei este evidenţiată prin studiul de polimorfism genic, care a permis identificarea timpurie a indivizilor predispuşi la îngrăşare cu risc crescut de obezitate – purtătorii alelei B (genotipul BB), precum şi a celor cu un conţinut crescut de carne slabă – purtătorii alelei A (homozigoţii AA), cu proprietăţi senzoriale superioare (ex. frăgezime, suculenţă, marmorare etc.) apreciată de către consumatori.***

38. ***Perfecţionarea protocoalelor de genotipizare la acest locus va permite implementarea selecţiei asistate de markeri (MAS) la taurinele din ţara noastră în scopul mai bunei valorificări a acestora pe piaţa cărnii şi în industria alimentară.***

39. ***Stabilirea de eventuale asocieri dintre genotipurile leptinei şi greutatea corporală, stratul de grăsime dorsală dar şi cu unele caracteristici ale carcasei, reprezintă o modalitate de a identifica animale distincte genetic şi de a optimiza regimul de hrănire în concordanţă cu acestea.***

40. ***Validarea unor astfel de metode de genotipizare reprezintă o potenţială aplicaţie în utilizarea informaţiei genetice, în selectarea animalelor pentru perfecţionarea deciziilor de marketing.***

41. ***Acest studiu aduce un grad înalt de noutate, prin aceea că România, deşi este o ţară cu tradiţie în creşterea taurinelor, progresul genetic în ameliorarea raselor autohtone s-a făcut într-un ritm lent unde tehnologia markerilor moleculari abia începe să fie aplicată, cu rezultate remarcabile.***

42. ***Utilizarea şi testarea unor protocoale de studiere a polimorfismului genic şi optimizarea acestora pentru genotipizare la locusul genei leptinei, contribuie la clarificarea aspectelor legate de structura genetică la acest locus a raselor de taurine Bălţată românească şi Brună de Maramureş, dezvoltă premisele testării de asocieri între polimorfism şi însuşirile producţiei de carne şi stabilirii genei ca marker în selecţia asistată la nivel molecular.***

BIBLIOGRAFIE

BIBLIOGRAPHY

1. ABBA M.C., GOMEZ M.A., GOLIJOW C.D. ,2001, HLA-DQA1 allele typing by nonizotopic PCR-LIS-SSCP, Brasilian Journal of Medical and Biological Research, 34, 867-869;
2. AHIMA R. S., DUSHAY J., FLIER S.N.,PRABAKARAN D., FLIER J.S. ,1997, Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. Published in volume 99, issue 3Volume 99 .J. Clin. Invest. 99(3): 391-395 doi:10.1172/JCI119172. The American Society for Clinical Investigation ;
3. ARNER P., WANNLUND A.,and OSTMAN S. ,1997, Regulation of lipolysis by human adipose tissue in hyperthyroidism. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, Vol 48, 415-419, Copyright by Endocrine Society ;
4. ASHWELL M., HEYEN D.,TASSEL V.,RON M., WELLER J., LEWIN H. ,2004, Detection of Quantitative Trait Loci Affecting Milk Production, Health, and Reproductive Traits in Holstein Cattle .J.Dairy Sci.87:468-475;
5. AUWERX, J., B. STAELS ,1998, Leptin Lancet. 351: 731-742;
6. BANKS W., COON A., ROBINSON M.,NAKAKOE R., MORLEY E.,2004, Triglycerides Induce Leptin Resistance at the Blood-Brain Barrier.Diabetes 53:1253-1260;
7. BARROSO A., SUSANA D., CANAO J.,1998, Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, şi E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR_SSCP), J. Animal Science, 76, 1535-1538;
8. BARENDSE W., VARVIO S., VELMALA S., WOMARCK J.S., ZARAGOSA P.,1997, A medium-density genetic linkage map of the bovine genome.Journal mamalian genome.ISSN 0938-8990, 21-28;
9. BASKIN D., SCHWAERTZ M**.,** SEELEY R., WOODS S., JR. D., BREININGER F., JONAK Z., SCHAEFER J., KROUSE M., BURGHARDT C., CAMPFIELD C.,

BURN P., and KOCHAN P ,1999, Leptin Receptor Long-form Splice-variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and Co-localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus. 27-2345-2349;

10. BÂLTEANU V.A, F.D POP , A. VLAIC , ANDA RALUCA RUSU , S. CREANGĂ, 2008, Molecular characterization of alpha S1 casein I^{RV} allele discovered in Romanian Grey Steppe cattle and it's frequencyin this breed. Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Zootehnie si Biotehnologii, Vol. 65 (1-2), 477, pISSN 1843-5262; eISSN 1843-536x;
11. BÂLTEANU V.A, F.D POP , A. VLAIC , ANDA RALUCA RUSU ,2008, Multiple mutations events are characterizing alpha S1 casein B^{RV} and beta casein C^{RV} alleles discovered in Romanian buffalo breed, Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Zootehnie si Biotehnologii, Vol. 65 (1-2), 478, pISSN 1843-5262; eISSN 1843-536x;
12. BÂLTEANU V.A., A. VLAIC , ANDA RALUCA RUSU , S. CREANGĂ , F.D. POP, ANTONIA ODAGIU , M.L. PANTEA, V. HANCU, 2007, Milk proteins polymorphism in Romanian Grey Steppe cattle studied by isoelectric focusing technique (IEF). Identification of a new allele αs1 I^{RV}, Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Zootehnie si Biotehnologii, Vol. 63-64, 304 – 310, ISSN 1843 – 5262;
13. BÂLTEANU V.A., A. VLAIC, F.D. POP, ANDA RALUCA RUSU , ANTONIA ODAGIU , V. CIGHI , S. CREANGĂ ,2007, αS1-casein alleles frequency in Carpathian goat, Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Zootehnie si Biotehnologii, Vol. 63-64, 527, ISSN 1843 – 5262;
14. BĂLTEANU V.A., VLAIC A., ANDA RALUCA RUSU, S. CREANGA , R.F. POP , V. CIGHI , 2007, Milk proteins polymorphism in Romanian cattle breeds, identified by isoelectric focusing technique (IEF), Lucrari Stiintifice seria Zootehnie, Iasi, Vol. 50, 173-181, ISSN 1454-7368;
15. BÂLTEANU V. A., A. VLAIC , ANDA RALUCA RUSU ,2005, Use of genetic markers in improving the quantity and quality of the milk in Romanian Simmental dairy breed, Vol. DOC'J Association des doctorants de Jouy, 8, INRA, Franta;

16. BÂLTEANU V.A., A. VLAIC, ANDA RALUCA RUSU, VIORICA COSIER, C. BOTEZ ,2004, Genetic polymorphism at the k-casein locus in Romanian Siemmental cattle, Bul. USAMV Cluj-Napoca, Seria ZB, Vol. 60, 381, ISSN 1454-2382;
17. BECKMAN J.S., 1983, Genetic polymorphism in varietal. identification and genetic improvement. Theor Appl Genet. 67: 25—33 ;
18. BIDWELL C.A., JI S., FRANK G.R., CORNELIUS S.G., WILLIS G.M. & SPURLOCK M.E. ,1997, Cloning and expression of the porcine obese gene. Animal Biotechnology 8, 191–206;
19. BOCQUIER, F., BONNET, M., FAULCONNIER, Y., GUERRE-MILLO, M., MARTIN. P.., CHILLIARD, Y.,1998, Effects of photoperiod and feeding level on perireal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovarectomized ewe, Reproduction, Nutrition, Development, 38, 489 - 498;
20. BROWN T.A. ,2002, Genomes, John Wiley /Sons Inc., New York, 65-64;
21. BRUNEAU, G., VAISE, C., CRATZ, A., MONGET, P.,1997, La leptine: une cle pour la reproduction, Synthese medicine, vol. 15, 191 – 196;
22. BUCHANAN, F.C., C.J. FITZSIMMONS, A.G. VAN KESSEL, T.D. THUE, D.C. WINKELMAN-SIM, S.M. SCHMUTZ, 2002, Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genet. Sci. Evol. 34: 105 / 116;
23. BUCHANAN-SMITH., 2001, Breed effects on growth performance, carcass characteristics, fatty acid composition, and palatability attributes in finishing steers. J. Anim. Sci. 79: 355–365;
24. BULLA, J., 1995, Application of the PCR Genotyping of Different Cattle Breeds for Kappa-Casein and Beta-Lactoglobulin Alleles. "IV International Symposium NEW TRENDS IN DEVLOPMENT OF ANIMAL HUSBANDRY" Beograd 11 (3-6);
25. CAETANO-ANOLLES G, BASSAM B.J., GRESSHOFF P.M., 1991, DNA fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotides. Biotechnol., 9, 553-557;

26. CAETANO-ANNOLES G., 1993, Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. PCR Methods, 3, 85-94;
27. CAETANO-ANOLLES G., 1994, MAAP : a versatile and universal tool for genome analisis. Plant Mol Biol, 25, 1011-1026;
28. CARŞAI CRINA, VLAIC. A., COŞIER VIORICA, ODAGIU ANTONIA, 2006, Identification of gene expression by RT-PCR and RIA, Lucrări Ştiintifice Zootehnie şi Biotehnologii, Timişoara, vol. 39(1), 11-16;
29. CARŞAI CRINA TEODORA, A. VLAIC, VIORICA COŞIER, ANTONIA ODAGIU, 2005, Leptine-Genetic marker associated with beef quality, Buletinul Universităţii de Ştinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, vol. 61/2005, 354-358, ISSN 1454-2382 ;
30. CARŞAI CRINA, VLAIC A., ODAGIU ANTONIA, 2007, Biometric approach to Romanian beef cattle and optimization of the protocol of emphasising the leptine gene. Proceedings of the 42nd Croatian 2nd International Symposium on Agriculture, 534 – 537,ISBN 978-953-6135-58-8;
31. CARŞAI CRINA, A. VLAIC, VIORICA COSIER, NICULINA ARMEANA, 2007, Comparativ testing concerning the possibility of empahsizing leptine gene polymorphism in cattle, International Symposium, Prospect for the 3rd Millenium Agriculture, Bul. USAMV-Cluj-Napoca, Vol. 64, 338-342, ISSN 1454-2382(cod CNCSIS 468 – B+);
32. CARŞAI CRINA TEODORA, A. VLAIC, VIORICA COŞIER, ANTONIA ODAGIU, 2005, Leptine-Genetic marker associated with beef quality, Buletinul Universităţii de Ştinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, vol. 61/2005, 354-358, ISSN 1454-2382 (cod CNCSIS 468- B) ;
33. CARŞAI, T. CRINA, A.VLAIC, VIORICA COŞIER, I.V.MAG, 2005, Selecţia asistată de markeri moleculari în ameliorarea efectivelor de taurine I – Producţia de lapte şi sexarea timpurie a embrionilor, Revista Agricultura, Nr. 1-2 (53-54), 53-61(cod CNCSIS 551- D) ;
34. CARŞAI, T. CRINA, A.VLAIC, VIORICA COŞIER, I.V.MAG, 2005, Selecţia asistată de markeri moleculari în ameliorarea efectivelor de taurine I – Producţia de

lapte şi sexarea timpurie a embrionilor, Revista Agricultura, Nr. 3-4 (55-56), 115-123. (cod CNCSIS 551-D) ;

35. CARŞAI CRINA, A.VLAIC, ANTONIA ODAGIU, CLAUDIA SOCOL, 2006,6-7 octombrie. Research concerning biometric parameters in Romanian Spotted Cattle from research station SCDP Jucu and private farms from the county of Cluj. Simpozionul international <Perspective ale agriculturii mileniului III> organizat de USAMV Cluj-Napoca vol. 62/2006,ISSN 1454-2390, 96-101 (cod CNCSIS 468-B);
36. CARŞAI CRINA TEODORA, AUGUSTIN VLAIC, VIORICA COSIER, ANTONIA ODAGIU, 2008, 29-30 Mai, Timisoara ,Testing of two protocols for genotyping the leptin gene locus and body measurement in Maramures Brown and Romanian breed cattle 2008, Lucrări ştiinţifice , vol.41 ISSN 1221-5287;
37. CARŞAI TEODORA- CRINA, AUGUSTIN VLAIC, VIORICA COSIER , 2008, 2-4 Octombrie ,Polimorfismele de tip RFLP / MBOI si RFLP / BSA AI la locusul genei leptinei la Rasele Baltata Romaneasca si Bruna de Maramures, ISSN , vol, ISSN 1454-2382 , vol.65.cat .B+;
38. CARŞAI, T. CRINA, A.VLAIC, VIORICA COŞIER, I.V.MAG, 2005, Selecţia asistată de markeri moleculari în ameliorarea efectivelor de taurine I – Producţia de lapte şi sexarea timpurie a embrionilor, Revista Agricultura, Nr. 1-2 (53-54), 53-61(cod CNCSIS 551- D);
39. CARŞAI, T. CRINA, A.VLAIC, VIORICA COŞIER, I.V.MAG, 2005, Selecţia asistată de markeri moleculari în ameliorarea efectivelor de taurine I – Producţia de lapte şi sexarea timpurie a embrionilor, Revista Agricultura, Nr. 3-4 (55-56), 115-123. (cod CNCSIS 551-D) ;
40. CHEBAB F. F., M. E. LIM, AND R. LU, 1996, Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. Natl. Genet. 12:318–320;
41. CHILLIARD, Y., BOCQUOIRER, F., DELAVAUD, C., FAULCONNIER, Y., BONNET, M., GUERRE-MILLO, M., MARTIN, P., FERLAY, A., 1999, La

leptine chez le ruminant. Facteurs de variation physiologiques et nutritionnels, INRA Production Animal, 225 - 237;

42. CHILLARD, C., DESPRES, J.P., 1998, La leptine: un peu beaucoup, passionnement, Les Selections de medecine/sciences, nr.11, 6-9;
43. CHUNG, H.Y., M.E. DAVIS, AND H.C. HINES, 2001, Relationship of two PCR-RFLP in the bovine calpastatin gene with calpastatin activity, meat tenderness, and carcass traits. Ohio State University Research and Reviews: Beef and Sheep 2001. Circ. 181-01;
44. COŞIER VIORICA**,** 2007, Inginerie genetică, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, ISBN 978-973-751-437-8;
45. COŞIER VIORICA, VLAIC AUGUSTIN, 2007, Abordarea practică a problemelor de genetică animală, Ed. Todesco, Cluj-Napoca, ISBN: 978-973-7695-28-4;
46. COŞIER VIORICA, VLAIC, A., OROIAN, T., DĂRĂBAN, S., CARŞAI CRINA, 2006, the Use of genome walking method for finding unknow sequence of genomic DNA, Lucrări Stiintifice Zootehnie si Biotehnologii, Timisoara, vol. 39 (1), 23-28 (cod CNCSIS 265 - B).
47. COŞIER VIORICA, A. VLAIC, J.L. BISTER, CECILE PIROTTE, S. DĂRĂBAN, T.OROIAN, CARŞAI CRINA, V. CIGHI, ANTONIA ODAGIU, SIMONA PASCALĂU, V. BÂLTEANU, 2005, Determining the level of expression of the leptine gene in adipose tissue, Buletinul Universităţii de Ştiinţe Agricole şi Medicină Veterinară Cluj-Napoca, vol. 61/2005, 411, ISSN 1454-2382 (cod CNCSIS 468- B) ;
48. COŞIER VIORICA, VLAIC A., OROIAN T., DĂRĂBANS., CARŞAI CRINA, 2006, the Use of genome walking method for finding unknow sequence of genomic DNA, Lucrări Stiintifice Zootehnie si Biotehnologii, Timisoara, vol. 39 (1), 23-28 (cod CNCSIS 265 - B) ;
49. DAHLMAN KARIN, CAVAILLES V., FUQUA S., V., MAGGI ADRIANA, MURAMATSU M., PARKER G., and GUSTAFSSON J, 2006, International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors.0031-6997/06/5804-773-781. Pharmacol Rev 58:773-781;

50. DAKIN , E.E. & AVISE J.C., 2004, "Microsatellite null alleles in parentage analysis". Heredity 93: 504 – 509;
51. DARIUS H. T.,DAUGA C.,GRIMONT PAD,CHUNGE E.,MARTIN PMV, 1998, Diversity in symbiotic denoflagelattes (Pyvlaophyta) from 7 scleratinian coral species testriction enzyme analysis of small subunit ribosome RNA genes .I.Eukaryot Microbiol.45:619-627;
52. DELAVAUD, C., BOCQUIER, F., CHILLIARD, Y., KEISLER, D.H., GERTLER, A., KANN, G., 2000, Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep, 165, 519 – 526;
53. DENISE E. ABBOT , COLIN PRITCHARD , NIGEL J CLEGG, CAMARI FERGUSON , RUTH DUMPIT, ROBERT A .SIKES AND PETER S. NELSON ,2003, Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research .Laboratory for Cancer Ontogeny and Therapeutics, Department of Biological Sciences, University of Delaware, Newark, DE 19716, USA.. Division of Clinical Research. Genome Biology pg. 12-79;
54. DYER, C.J., SIMMONS, J.M., MATTERI, R.L., KEISER, D.H., 1997, Leptin receptor mrna is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes, Domestic Animal Endocrinology, 14, 119 – 128;
55. EDWARDS A., CIVITELO A., HAMMOND H. A., and CASKEY C. T., 1991, DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet. 1991 October; 49(4): 746–756;
56. FABRICE DAVID , 2002, "Utiliser les proprietes topologiques de l ʿADN une nouvelle arme contre les agents pathogenes". Fusion.(in French) 89-90;
57. FALAKI, M., N. GENGLER, M. SNEYERS, A. PRANDI, S. MASSART, A. FORMIGONI, A. BURNY, D. PORTETELLE, AND R. RENAVILLE, 1996, Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. J. Dairy Sci. 79:1446–1453;

58. FAVRE D. , 1996, Gene, 178, 46-49;
59. FEZUS L.,ZSOLNAI A., 1997, : Use of Molecular Genetic Markers in Animal Breeding in Hungary. Ist Yugoslav International Congress on Animal Husbandry, Biotechnologija u Stocarstvu, Beograd, 13. 3-4. 41-5;
60. FITZSIMMONS, C.J., S.M. SCHMUTZ, R.D. BERGEN, AND J.J. MCKINNON, 1998, A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. Mamm. Genome 9:432- 434;
61. FLISIKOWSKI K., ZWIERZCHOWSKI L., 2002, Single-strand conformation polymorphism within exon 7 of the bovine STAT5A gene. Animal Science Papers and Reports 20, 133-137;
62. FRIEDMAN, J.M., HALAAS, J.L., 2000, Leptin and the regulation of body weight in mammals, Nature, vol. 395, 763 -769;
63. FRUHBEK G., S.A. JEBB AND A. M. PRENTICE, 1998, Leptin: Physiology and pathophysiology.Clin.Physol.18:399-419;
64. FUTEROVÁ, J., SABLIKOVÁ, L., STIPKOVÁ, M., 1999, Association between β-lactoglobulin genotypes and its content in milk, Book of Abstracts EAAP, 50 th Annual Meeting, Zürich, 19-99;
65. GEARY , T. W., E. L. C FADIN , D. M. MAC NEIL , E. E. GRIGS , R. E. SHORT , R. N. FUNSTON , AND D. H. KEISLER, 2003, Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. J. Anim. Sci. 81;
66. GEORGES IMBERT, SAOUDAU F., YVERT G., DIDIER DEVYS , YVON TROTTIER , ALEXIS BRICE, 1996, Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats N ature Genetics 14, 285 - 291 doi:10.1038/ng1196-285;
67. GIOVANNELLI J.L., FARNHAM MARK W., WANG M., ALLAN E., 2002, Development of sequence characterized amplified region (SCAR) markers linked to downy mildew resistance in broccoli. Proceedings of 13th Crucifer Genetics Worksop. March 23-26, 2002, Davis, CA. p. 84;
68. HAEGEMAN, A., VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J., 2000,: New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. Anim. Genet. 31: 79;

69. HAGER J.K., K.CLEMENT , S.FRANCKE, C.DINA, J.RAISON, N.LAHLOU N.RICH, V.PELLOUX, A.BASDEVANT, B. GUYGRAND, M. NORTH, P.FROGUEL, 1998, Polymorphism in the 5' untranslated region of the human ob gene is associated with low levels.Int.J.obes.Relat.Metab.Disorord.22:200-205;
70. HALAAS. J.L., K.S.GAJIWALA, M.MAFFEI, S.L .CEHEN, B.T. CHAIT, D. RABINOWITZ, R.L.LALLONE, S.K.BURLEY, AND J.M. FRIEDMAN, 1995, Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene., Science 269:543-546;
71. HALE, C.S., HERRING, W.O., JOHNSON, G.S., SHIBUYA, H., LUBAHN, D.B., KEISLER, D.H., 1999, Evaluation of the Leptin Gene as a Possible Marker of Carcass Traits in Angus Cattle, Journal of Ecology, 163, R1 – R14;
72. HALEY S.D., GELLNER J.L., JIN Y., LANGHAM M.A.C., STYMIEST C., RICHERSTEN J., RUDEN B.E., KALSBECK S., CHUNG O.K., SEABOURN B.W., McVey D.V., HATCHET J.H., 1998, Registration of Crimson wheat. Crop Sci. 38:1722;
73. HARDIE W.D., KERLAKIAN D., HARDIE W.D., BRUNO M., and KORFHAGEN T., 1996, Reversal of lung lesions in transgenic transforming growth factor alpha mice by expression of mutant epidermal growth factor receptor. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., Vol 15, No. 4, Oct 1996, 499-508;
74. HAVEL J.P.,1999, Mechanisms regulating leptin production: implications for control of energy balance. American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 70, No. 3, 305-306, American Society for Clinical Nutrition American Society for Clinical Nutrition;
75. HEYEN D. W., J. I.WELLER , M. RON , M. BAND , J. E. BEEVER , E. FELDMESSER , Y. D A , G. R. WIGGANS , P. M. VAN RADEN , AND H. A. LEWIN, 1999, A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. Physiol. Genomics 1:165–175;
76. HEATON M.P., HARHAY G.P., BENNETT G.L. ., 2002, Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle, Animal Genetics, 36, 5, 426-431;

77. HOGGARD, N., K. CALLAGHAN, A. LEVY, and J.R.E. DAVIS, 1993, Expression of Pit-1 and related proteins in diverse human pituitary adenomas. J. Mol. Endocrinol. 11:283;
78. HOUSEKNECHT, K. L.; PORTOCARRERO, C. P., 1998, Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. Domestic Anim. Endocrinol. 15: 457–475;
79. HUBERT R., WEBER J. L., SCHMITT K., ZHANG L., and ARNHEIM N., 1989, A new source of polymorphic DNA markers for sperm typing: analysis of microsatellite repeats in single cells.Department of Molecular Biology, University of Southern California, Los Angeles 90089-1340 Am J Hum Genet. 1992 November; 51(5): 985–991;
80. IQBAL, J., POMPOLO, S., CONSIDINE, R.V, CLARKE, I.J., 2000, Localization of leptin receptor – like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary, Endocrinology, vol.141, no. 4., 1515 - 1519;
81. ISSAD, T., STROBEL, A., CAMOIN, L., OZATA, M., STROSBERG, A.D., 1998, la leptoine: un signal poul le declenchement de la puberte dans l'espece humaine ?, Les selections de medecines, no.11, 17 -19;
82. JANDUROVÁ, O.M., SÁBLIKOVÁ, L., STIPKOVÁ, M., 1999, Relationships Between Milk Proteine Genotype and Milk Production Traits in Jersey Breed, Book of abstacts, EAAP, 50 th Annual Meeting, Zürich, 63;
83. JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN,S.L., 1991, Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature, 314, 67-73;
84. JIANG, Z. H. AND J.P.GIBSON, 1999, Genetic polymorphism in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds.Mamm.Genome 10:191-193;
85. JOLANTA OPRZADEK, KRZYSZTOFF FLISIKOWSKI, LECH WIERZCHOWSKI, EDWARD DYMNICKI, 2003, Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. Polish Academy of Sciences Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, 05-552;

86. KATSILAMBROS, N., 2000, New developments in obesity, European Journal of Internal Medicine, 11, 65 -74;
87. KENNEDY GC.,1953, The role of depot fat in the hypotalamic control of food intake in the rat.vol.140, issue.901, pages 578-952.ISSN 0962-8452;
88. KENNES, Y. M. 1; MURPHY, B. D. 2; POTHIER, F. 3; PALIN, M., 2001, Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits Short Communications Animal Genetics. 32(4):215-218;
89. KLAUZINSKA M., ZWIERZCHOWSKI L., SIADKOWSKA E., SZYMANOWSKA M., GROCHOWSKA R., ZURKOWSKI M., 2000, Comparison of selected gene poluymorphisms in Polish Red and Polish Black-and-White cattle. Animal Science papers and Reports 18, 107 – 116;
90. KOCH B., and LUTZ B., 1995, Multifactorial regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)-induced production of cyclic AMP in AtT-20 corticotrophs: Major involvement of Rolipram-sensitive and insensitiv phosphodiesterases. Mol Cell Endocrinol 112: 27-34;
91. KONONOFF P.J., DEOBALD M. H.,SREWARD E., LAYCOK A., MARQUESS F., 2005, The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle . J. Anim. Sci. 2005. 83:927-932;
92. LAGONIGRO, R., P. WIENER, F. PILLA, J. A. WOOLLIAMS, AND J. L. WILLIAMS, 2003, A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. Anim. Genet. 34:371–374. Mantel, N. 1980. Assessing laboratory evidence for neoplastic activity. Biometrics 36:381–399;
93. LANDEGREN U., 1996, The challengers to PCR: a proliferation of chain reactions. Curr Opin Biotechnol 1996, 7:95-97;
94. LARSSON H., ELMSHAL S., BERGLUND G., AHREN B., 1998, Evidence for Leptin Regulation of Food Intake in Humans . The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 83, No. 12 4382-4385;
95. LAUDE H., GELFI J., LAVENANT L., CHARLEYB., 1992, Single amino acid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. J Virol.;66(2):743–9;

96. LIEFERS, S.C., TE. PAS, M.F.W., VEERKAMP, R.F., VAN DER LENDE, T., 2002, Associations between leptin gene polymorphism and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertilita in Holstei heifers, Journal of Dairy Science, 85, 1633 – 1638;
97. LIEN S., SUNDVOLD H., KLUNGLAND H. & VAGE D.I., 1997, Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (OBS). Animal Genetics 28, 238–46;
98. LINDERSON, M., L.ANDERSON-EKLUND, D.J.DE KONING, A. LUNDEN, A. MAKI-TANILA, AND L. ANDERSON., 1998, Mapping of serum amylase -1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome 4.J.Dairy Sci.81:1454-1461;
99. LORRAINE, S.L., DOVČ, P., MEDRANO, J.F., 1997, Polymorphism of Bovine β-lactoglobulin Promoter and Differences in the Binding Affinity of Activator Protein – 2 Transcription Factor Genetics and Breeding, J. Diary Sci., vol. 80 (7);
100. LUCY, M. C, S. D. HAUSER, P. J. EPPARD, G. G. KRIVI, AND R. J.COLLIER, 1991, Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. J. Dairy Sci. 74 (Suppl. 1): 284;
101. LUSK J., 2007, Association of single nucleotide polymorphism in the leptine gene with body weight and bakfat growth curve for beef cattle.Journal of Animal Science doi:10-2527,2665;
102. MARGETIC, S., GAZZOLA, G.G. PEGG ; R.A. HILL, 2002, Leptin: a review of its periperpheral actions and interactions. Inter. J OBES: 1407 – 1433;
103. MASUZAKI, H., Y. OGAWA, N. ISSE, N. SATOH, T. OKAZAKI, M. SHIGEMOTO, K. MORI, N. TAMURA, K. HOSADA, Y. YOSHIMASA, H. JINGAMI, T. KAWADA, ANDK. NAKAO, 1995, Human obese gene expression: Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. Diabetes 44:855-858;
104. MAXAM ALLAN, GILBERT WALTER M., 1977, A new method for sequencing DNA,Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 74, 560-564;

105. MAXAM ALLAN M., GILBERT WALTER , 1980, Sequencing end-labelling DNA with base-specific chemical cleavages, Methods in Enzimology 65, 499-560;
106. MEARS, G.J., P.S. MIR, D.R.C. BAILEY, AND S.D.M. JONES, 2001, Effect of Wagyu genetics on marbling, backfat, and circulating hormones in cattle. Can. J. Anim. Sci. 81:6573;
107. MEDRANO, J.F., AGUILAR-COORDOVA, E., 1990, Genotyping of bovine k-caseine loci following DNA sequence amplification. Biotechnol. 8, 144-146;
108. MOLENAAR A., WHEELER T.T., MCCRACKEN J.Y., SEYFERT H-M., 2000, The STAT3-encoding gene resides within the 40 kbp gap between the STAT5A- and STAT5B-encoding genes in cattle. Animal Genetics 31, 333-346;
109. MONTALDO, H.H., MEZA-HERRERA, C.A., 1998, Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Animal Biotechnology, 2, 61-65;
110. MOODY D.E. POMP D., BEREBDSE W., 1995, Restriction fragment length polymorphism in amplification products of bovine PIT 1 gene and assigment of PIT 1 to bovine chromosome1. Animal Genetics 26, 45 – 47;
111. MUELLER U.G and. WOLFENBARGER L.,1999, AFLP genotyping and fingerprinting. Trends in Ecology and Evolution 14: 389-394;
112. MULLER F., IVICS Z., ERDELY F., PAPP T., VARADI L., HORVATH L., MACLEAN N., and ORBAN L., 1992, Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carried. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 1, 276 – 281;
113. MULLIS, K., FERRE, F. and GIBBS, R., 1993, The Polymerase Chain Reaction. Edit. Birkhausen, Boston 68,23-30;
114. MYRICK KV, GELBART WM., 2002, "Universal Fast Walking for direct and versatile determination of flanking sequence". Gene 284: 125–131;
115. NEWTON C.R., GRAHAM A. AND HEPTINSTAL L.E., 1989, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucl. Acids Res. 17, 2503-2516;
116. NKRUMAH J.D., C.LI., J.YU, C.HANSEN,D.H., D.H KEISLER, S.S. MORE, 2005, Polymorphism in the bovine leptin promoter associated with serum leptin

concentration,growth , feed intake, feeding behaviour, and measures of carcass merit.American Society of Animal Science 65221;

117. OPRZADEK, J., K. FLISIKOWSKI, L. ZWIWRCHOWSCHI, AND E. DYMNICKI, 2003, Polymorphisms at loci of leptin (LEP), Pit1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black and White bulls. Anim. Sci. Papers and Rep. 21:135–145;
118. ORBAK, Z., M. COKER, S. DARCAN, AND D. GOKSEN, 2001, Association between serum leptin and anthropometric parameters at birth and at 15th day of life in infants born asymmetrically small for gestational age. J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 14:185–192;
119. OROIAN E. TEOFIL, AUGUSTIN VLAIC, 2004, Ameliorarea animalelor, Ed. AcademicPres Cluj –Napoca;
120. OSHIRO N., FUKATA Y, and KAIBUCHI K., 1998, Phosphorylation of moesin by Rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. J. Biol. Chem. 273:34663–34666;
121. PARISET L.,CAPPUCCIO I., BRUFORD M.,DUNNER S.,CORTES O., ERHADT G.,GUTSCHER K.,JOOST S., LENSTRA J., VALENTINI A., and ECONOGENE CONSORTIUM , 2006, Characterization of 37 Breed-Specific Single –Nucleotide Polymorphisms in Sheep.Brief Communications 39-48 ;
122. PARK DJ., 2004, "3'RACE LaNe: a simple and rapid fully nested PCR method to determine 3'-terminal cDNA sequence". Biotechniques 36: 586–588,590;
123. PIERCE KE AND WANGH LJ., 2007, "Linear-after-the-exponential polymerase chain reaction and allied technologies Real-time detection strategies for rapid, reliable diagnosis from single cells". Methods Mol Med. 132: 65–85;
124. POMP D., ZOU T., CLUTTER A.C., BARENDSE W., 1997, Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. Journal of Animal science 75, 1427;
125. RAHMOUNI, K., HAYNES, W.G., 2003, Leptin and the cardiovascular system, Rhamouni & Haynes Ed., 225 -239;

126. REN, M.Q., WEGNER, J., BELLMANN, O., BROCKMANN, G.A., SCHNEIDER, F., TEUSCHER, F., ENDER, K., 2002, Comparing mRNA levels of genes encoding leptin, leptin receptor, and lipoprotein lipase between dairy and beef cattle, Domestic Animal Endocrinology, 23, 371 – 381;
127. RENAVILLE, R., GENGLER, N., VRECH, E., PRANDI, A., MASSART, S., CORRADINI, C., BERTOZZI C., MORTIAUX, F., BURNY, A., PORTETELLE, D., 1997, Pit-1gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein Friesian bulls. Journal of Dairy Science, 80, 3431-3438;
128. RENAVILLE, R., GENGLER, N., VRECH, E., PRANDI, A., MASSART, S., CORRADINI, C., BERTOZZI, C., MORTIAUX, F., BURNY, A., PORTETELLE, D., 1997, PIT-1 Gene Polymorphism, Milk Yield, and Conformation Traits for Italian Holstein-Friesian Bulls. J. Dairy Sci., 80 (12), 3431-3438;
129. ROACH J.R., V. THORSON , AND A. F. SIEGL PARKING , 2000, Strategies for Genome SequencingGenome Res. 2000 10:1020-1030;
130. ROACH J. C. , CECILIE BOYSEN, KAI WANG ,LEORY HOOD, 1995, Pairwise end sequencing: a unified approach to genomic mapping and sequencing. Genomics ,vol.26,2, 343-353;
131. ROGER H., WILMING L., RAND V.,WAIN M.,ZIEGLER A.,BECK S., 2004, Gene map of the extended human MHC.Nature Rewiews Genetics 5,889-899.doi 10.1038-nrg1489;
132. ROHRER SUSAN , ROHRER P., ELIZABETH T., BIRZIN R., SCHAEFFER M., 1996, Rapid Identification of Subtype-Selective Agonists of the Somatostatin Receptor Through Combinatorial Chemistry Science October 1996.Vol.282.no.5389,pp.737-740.doi 10.1126-science.282.5389.737;
133. SABLIKOVA L.,JANDUROVA O.,STIPKOVA M., 1999, Relationships between milk protein genotype and milk productio traits in Jersey breed. Book of abstracts 5. 50 th Annual Meeting of EAAP, Genetics section, Zurich, 63;
134. SALADIN R., FAJAS L., AUWERX J.,BRIGGS M., 1999, Differential Regulation of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ1 (PPARγ1) and

PPARγ2 Messenger RNA Expression in the Early Stages of Adipogenesis. Cell Growth & Differentiation Vol. 10, 43-48;

135. SANGER F., COULSON A.R., BARELL B.G., SMITH A.J.H., ROE B.A., 1980, J. Mol. Biol., 143, 161;
136. SATOH N., 1999, Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. Diabetes. ;48:1787–1793;
137. SAVELL J.W., CROSS H.R., 1998, The role of fat in the palatability of beef, pork, and lamb. In: Designing Foods, Animal Product Options in the Marketplace, pp. 345–55. National Academic Press;
138. SAEZ R., SANZ Y., TOLDRA F, 2004, Instituto de Agroquímica y Tecnologia de Alimentos (C.S.I.C.), Apartado 73, 46100 Burjasot, Valencia, ESPAGNE vol. 66, no3, pp. 659-665 [7 page(s) (article)] (24 ref.) ;
139. SAEZ R., KREMLING A., 2004, CONZELMAN H., BETTENBROCK K., and GILLES E. D. Modular analysis of signal transduction networks. IEEE Contr. Syst. Mag., 24(4):35-52;
140. SCHENKEL F. S., S. P. MILLER, X. Ye, S. S. MOORE, J. D. NKRUMAH, C. LI, J. YU, I. B. MANDELL, J. W. WILTON, AND J. L. WILLIAMS ,2005, Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. University of Guelph, Guelph, Canada N1G-2W1; University of Alberta, Edmonton, Canada T6G-2P5 78-89;
141. SCHNKEL F. S. , S. P. MILLER , X. Ye, S. S. MOORE , J. D. NKRUMAH , C. LI , J. YU, I. B. MANDELL , J. W. WILTON i, AND J. L. WILLIAMS, 2005, Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. University of Guelph, Guelph, Canada N1G-2W1; University of Alberta, Edmonton, Canada T6G-2P5; and Roslin Institute, Roslin, United Kingdom EH25 9PS, 2009-2020;
142. SCHROOTEN, C., H. BOVENHUIS, W. COPPIETERS, AND J. A. VAN ARENDONK, 2000, Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. J. Dairy Sci. 83:795–806 ;

143. SCHRODER A., MILLER J.R., THOMSEN P.D., ROSCHLAU K., AVERY B., POULSEN P.H., SCHMIDT M., SCHWERIN M., 1990, Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. Animal Biotechnology, 1-10 (2);
144. SEAN M. CUSICK AND DANIEL J. O'SULLIVAN, 2000, Use of a Single, Triplicate Arbitrarily Primed-PCR Procedure for Molecular Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria Department of Food Science and Nutrition and Department of Microbial Engineering, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55-108 ;
145. SEYFERT H., PITRA C., MEYER L., BRUNNER R.M., WHEELER T.T., MOLENAAR A., McCRACKEN J.Y., HERRMANN J., THIESEN H., SCHWERIN M., 2000, Molecular characterization of STAT5A- and STAT5B-encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees of divergent evolution of various domains. Journal of Molecular Evolution 50, 550-561;
146. SMITH, J.L., SHEFFIELD, L.G., 2002, Production and regulation of leptin in bovine mammary epithelial cells, Domestic Animal Endocrinology, 22, 145 – 154;
147. SMALLA K., and SOBECKY P., 2002, The prevalence and diversity of mobile genetic elements in environmental bacteria assessed with new tools. FEMS Microb. Ecol. 42:165-175;
148. SPELMAN, R. J., A. E. HUISMAN , S. R. SINGIREDDY , W. COPPIETTERS, J. ARRANZ, M. GEORGES, AND D. J. GARRICK, 1999, Short communication: quantitative trait loci analysis on 17 nonproduction traits in the New Zealand dairy population. J. Dairy Sci. 82:2514–2516;
149. STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; BEATTIE, C. W., 1996, Five polymorphic trinucleotide (CCA) bovine microsatellites. Anim. Genet. 27: 216;
150. STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; BEATTIE, C. W., 1996, The bovine homology of the obese gene maps to chromosome 4. Mammalian Genome 7: 399–400;
151. STONE R.T., KAPPES S.M. & BEATTIE C., 1996, Two polymorphism microsatelites within an 18 kb genomic clone containing the bovine ob gene.ANIMAL GENETIC 27.(SUPPL.2), 64;

152. STONE R.T., KAPPES S.M. & BEATTIE C., 1996a, The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. Mammalian Genome 7, 399–400;

153. STONE R.T., KAPPES S.M. & BEATTIE C., 1996b, Two polymorphic microsatellites within an 18 kb genomic clone containing the bovine ob gene. Animal Genetics 27(Suppl. 2), 64;

154. TANIGUCHI Y., T. YAMADA, AND Y. SA SASAKI , 2002, Genomic structure and promter analysis of the bovine leptin gene. IUBMUB Life 53:131-135;

155. TARTAGALIA G., PELLARIN R., CAVALI A., (2005). Organism complexity anti-correlates with proteomic β-aggregation propensity . Protein Science, 2005, 14:2735-2740. Department of Biochemistry, University of Zürich, CH-8057 Zürich, Switzerland;

156. TASSEL C.P., WIGGANS R., MISZAL I., 2003, Implementation of a Sire-Maternal Grandsire Model for Evaluation of Calving Ease in the United States. J. Dairy Sci. 86:3366-3373;

157. TESSANE K.,H.C.HINES AND M.E.DAVIS, 1999, Relationship of polymorphism in the leptin gene with differences in beef carcass traits.Research and Reviews. Special Circular 170-99;

158. TUGLLE, C.K., TRENKLE, A., 1996, Control of growth hormone synthesis. Domestic Animal Endocrinology, 13,11-33;

159. UNANIAN, M. M., S. K. DENISE, H. M. ZHANG, AND R. L. AX., 1994, Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in the bovine growth hormone gene. J. Anim. Sci. 72:2203;

160. VEERKAMP R. F., AND G. C. EMMANS, 1995, Sources of genetic variation in energetic efficiency of dairy cows. Livestock Prod. Sci. 44:87–97;

161. VEERKAMP, R. F., J. K. OLDENBROEK, H. J. VAN DER GAAST, AND J. H. VAN DER WERF, 2000, Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. J. Dairy Sci. 83:577–583;

162. VIEIRA J., MESSING J., 1982, The pUC plasmid, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, 19, 259-268;

163. VIKKI R., JIAQI H., TIM S., CRAIG J., STRAUSSBERG R., 2005, Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations iglioblastomas. Cancer Res. 66:3987-3991; doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0127;

164. VINTILĂ I., CORNELIA VINTILĂ, DANIELA ROXANA VINTILĂ, 2005, Imunogenetică şi imunomodularea producţiilor animale. ISBN 973-638-202-8, Timişoara.

165. VINTILĂ I., Transferul de embrioni şi biotehnologii asociate, 2005, ISBN 973-638-206-0, Timişoara.

166. VINTILĂ I., 1998, Bazele ameliorării genetice a populaţiilor de animale domestice, Ed.Facla, Timişoara;

167. VINTILĂ I., 1976, Curs de genetică animală, Lito Institutul Agronomic Timişoara;

168. VLAIC, A., VIORICA COŞIER, ANTONIA ODAGIU, T. OROIAN, V. BÂLTEANU, 2005, Analysis of genetic diversity in five cattle breeds from Romania, Buletinul USAMV Cluj-Napoca, Seria Zootehnie şi Biotehnologii, Vol. 61, 332, ISSN 1454-2382;

169. VLAIC, A., VIORICA COŞIER, B. VLAIC, 2005, Contribuţii privind evaluarea polimorfismului unor markeri genetici asociaţi cu unele însuşiri ale producţiei de lapte la taurine, Lucr. Şt. „Zootehnie şi Biotehnologii animaliere”, Univ. Agrară de Stat din Moldova, Chişinău, 13, 35 – 40, ISBN 9975-64-025-7;

170. VLAIC, A., D.C. Pamfil, Ioana Gaboreanu, B. Vlaic, R. Renaville, 2003, Increasing milk production in cattle using DNA marker assisted selection (Pit-1), Buletin USAMV Cluj-Napoca, Seria ZB, Vol. 59, 188-191, ISSN 1454-2382;

171. VLAIC, A., CIOBANU, D.C., OROIAN, T., 2001, Preliminary Research Concerning the Association Between the Genotypes at the Kappa – Caseine Locus and Milk Production Traits in Cattle, J. Agric. Sci., Debrecen, Hungary, 1, 45-48;

172. VLAIC, A, D. CIOBANU, ANTONIA ODAGIU, 2001, Use of molecular genetic markers in the cattle selection, 37th Croatian Symposium on Agriculture with International Participation, Collection of Summaries, 322;

173. VLAIC, A., T. OROIAN, SIMONA PAŞCALĂU, 2001, Genotypisation of bulls used for artificial insemination at k-casein and β-lactoglobulin, Buletin USAMV – CN, 55-56/2001, 112-117, ISSN 1454-2382;

174. VLAIC, A, A. PETRE, T. OROIAN, D. CIOBANU, V. CIGHI, 2001, Reserch concerning the kappa-caseine and β-lactoglobulin genetic polymorphism established at DNA level and its use for genetic marker assisted selection in catle, Buletin USAMV-ZMV, Cluj-Napoca, nr. 55-56/2001, ISSN-1454-2382;

175. VLAIC, A., CIOBANU, D.C., OROIAN,T., ELENA HANDOCA, VLAIC, B.A., 2000, Stabilirea genotipurilor K-cazeinei din lapte utilizând tehnica PCR-RFLP şi a relaţiilor dintre acestea şi însuşirile producţiei de lapte la taurinele din rasa Brună, Lucrările Simpozionului Naţional „Realizări şi perspective în Zootehnie şi Biotehnologii", vol. XXVI (1), 42-45;

176. VLAIC, A., T. OROIAN, ELENA HANDOCA, 2000, Varianţele genetice ale K-cazeinei determinate prin tehnica PCR-RFLP şi asocierea acestora cu însuşirile producţiei de lapte la rasa Brună, Rezumatul lucrărilor celui de-al XXI-lea Simpozion Naţional de Genetică vegetală şi animală, I.C.C.P.T. Fundulea şi USAMV Cluj-Napoca, 65-66;

177. VLAIC, A., D. CIOBANU, T. OROIAN, ELENA HANDOCA, B. VLAIC, 2000, Stabilirea genotipurilor K-cazeinei din lapte utilizând tehnica PCR-RFLP şi a relaţiilor dintre acestea şi însuşirile producţiei de lapte la taurinele din rasa Brună, Lucrările Simpozionului Naţional "Realizări şi perspective în Zootehnie şi Biotehnologii", vol. XXVI (1), 42-45, USAMV Cluj-Napoca ;

178. VLAIC, A., D.C. CIOBANU, AL. MARINA, RODICA VLAIC, 1999, Use of Molecular Genetic Markers in the Cattle Selection for the Traits of Economic Interest. Buletinul U.S.A - Z.M.V. Cluj – Napoca Nr. 53

179. VLAIC, A., 1997, Inginerie genetică. Realizări, speranţe şi nelinişti. Ed. Promedia Plus, Cluj-Napoca;

180. VLAIC, A., A. PETRE, V. MĂRGINEANU, I. HAIDUC, V. MUREŞAN, D. CIOBANU , 1995, Rezultate privind interacţiunea genotip-mediu la unele însuşiri

care determină producţia de carne la taurine. Buletinul U.S.A - Z.M.V. Cluj - Napoca nr. 49, 115 – 119.

181. VLAIC, A., A. PETRE, V. MĂRGINEANU, I. HAIDUC, V. MUREŞAN, FR. MOSZER, 1994, Results on genotype - environment interaction with certain traits which determine meat in cattle. Lucrările Simpozionului ”125 ani de învăţământ agronomic la Cluj-Napoca l869-1994”, U.S.A., p. 119, Cluj-Napoca.
182. VLAIC, A. , A. PETRE, 1994, Studiul interacţiunii genotip-mediu la taurinele din rasa Bălţată românească. Lucrările Simpozionului ”125 ani de învăţământ agronomic la Cluj-Napoca l869-1994”, p. 54-58, U.S.A. Cluj-Napoca.
183. VLAIC, A., A. PETRE, D. CIOBANU , 1993, Rezultate privind polimorfismul proteic din sânge la populaţii de taurine şi ovine din Transilvania. Simpozionul “Realizări şi perspective în Zootehnie”, U.S.A., vol.XIX, p.176-181, Cluj-Napoca.
184. VLAIC, A., A. PETRE, T. OROIAN, 1992, Caracteristicile morfo-productive ale rasei Bălţată austriacă provenită din import. Nota II : Populaţia selecţionată (vacile mame de tauri). Simpozionul “Realizări şi perspective în Zootehnie”, U.S.A., p. 215-221,Cluj-Napoca.
185. VLAIC, A., V. MĂRGINEANU, V. MUREŞAN, 1991, Corelaţia şi analiza de varianţă, metode de estimare a interacţiunii genotip-mediu la taurine. Sesiunea de referate şi comunicări şt. ale Fac.de Zootehnie, U.S.A., p.34-41, Cluj-Napoca.
186. VLAIC, A., A. PETRE, I. SPEIANU, ST. RIMILI, 1989, Rezultate privind crearea de linii genetice la taurine din rasa Bălţată românească. Seminarul “Actualităţi în tehnologia şi patologia animalelor domestice”. I.A.C.N., vol.XV, p. 40-50, Cluj-Napoca..
187. VLAIC, A., A. PETRE, MARIOARA POP, A. ALEXOIU, C. DRUME, I. SLĂVESCU, V. MĂRGINEANU , 1988, Rezultate privind aplicarea programului de formare a liniilor şi a efectelor consangvinizării la taurine din rasa Bălţată Simmental. Simpozionul “Actualităţi în tehnologia şi patologia animalelor domestice”, .I.A.C.N., vol. XIV, p.119-129, Cluj-Napoca .
188. VLAIC, A., A. PETRE, I. HAIDUC, V. MUREŞAN, 1986, Repetabilitatea unor însuşiri de producţie la taurinele de rasă Bălţată austriacă. Al 11-lea Seminar

"Ameliorarea, tehnologia şi patologia rumegătoarelor", vol.XI, I.A.C.N., p.47-50, Cluj-Napoca.

189. VLAIC, A., A. PETRE, V. MUREŞAN , 1985, Valorile parametrilor genetici ale principalelor însuşiri morfofuncţionale la populaţia de taurine Bălţată austriacă din Transilvania. Seminarul "Tehnologia,reproducţia şi patologia animalelor de fermă", I.A.C.N., p.139-144, Cluj-Napoca.
190. VLAIC, A., A. PETRE, MARIOARA POP, V. MĂRGINEANU, GH. ANTON ,1985, Cercetări privind realaţiile dintre tipurile de hemoglobină şi principalele însuşiri de producţie şi reproducţie la ovinele din rasa Corriedale. Seminarul "Tehnologia, reproducţia şi patologia animalelor de fermă", I.A.C.N., p. 251-256,Cluj-Napoca.
191. VLAIC, A., A. PETRE, IRINA MIKLOS, V. MĂRGINEANU, V. MUREŞAN ,1982, Fundamentarea aprecierii timpurii a producţiei de lapte la primipare. Seminarul "Ameliorarea,tehnologia şi patologia rumegătoarelor", I.A.C.N. p. 267-272, Cluj-Napoca.
192. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., MIRANDA HORNES, FRIJTERS, A., JERINA POT, PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res., 23 (21), 4407-4414;
193. VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VAN DE LEE T., MIRANDA H., FRIJETERS A., JERINA POT , PELEMAN J., KUIPER M., ZABEAU M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res., 23 (21), 4407-4414;
194. ZANAGIHARA, N., UTSUNOMYA, K., CHEAH, T.B., HIRANO, H., KAJIWARA, K., HARA, K., NAKAMURA, E., TOYOHIRA, Y., UEZONO, Y., UENO, S., IZUMI, F., 2000, Characterization and functional role of leptin receptor in bovine adrenal medullary cells, Biochemical Pharmacology, vol. 59, 1141 - 1145;
195. ZHANG, H. M., D. R. BROWN, S. K. DENISE, and R. L. AX., 1993, A novel allele of the bovine somatotropin gene detected by PCR/RFLP analysis. J. Anim. Sci. 71:2276;

196. ZHANG, Q., D. BOICHARD, I. HOESCHELE, C. ERNST, A. EGGEN, B. MURKVE, M. PFISTER-GENSKOW, L. A. WITTE, F. E. GRIGNOLA, P. UIMARI, G. THALLERR, AND M. D. BISHOP, 1998, Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. Genetics 149:1959–1973;
197. ZWIERZCHOWSKI L., KRZYŻEWSKI J., STRZAŁKOWSKA N., SIADKOWSKA E., RYNIEWICZ Z., 2002, Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage, and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and- White cows. Animal Science Papers and Reports 20 (4), 213-227;
198. YUEN B. S. J., P. C. OWENS, B. S. MUHLHAUSLER, C. T. ROBERTS, M. E. SYMONDS, D. H. KEISLER, J. R. MCFARLANE, K. G. KAUTER, Y. EVENS and I. C. MCMILLEN, 2003, Leptin alters the structural and functional characteristics of adipose tissue before birth (The FASEB Journal. 2003;17:1102-1104) ;
199. YANAGIHARA N., TOYOHIRA Y., UENO S., TSUTSI M., UTSUNOMYA K., LIU M., and TANAKA M., 2005, Stimulation of Catecholamine Synthesis by Environmental Estrogenic Pollutants . Endocrinology, doi:10.1210/en.2004-0556. Endocrinology Vol. 146, No. 1 265-272;
200. YANG G., , GE H., BOUCHER A., Yu X., and Li C., 2007, Modulation of Direct Leptin Signaling by Soluble Leptin Receptor. Molecular Endocrinology, doi:10.1210/me.2007-0027. 18 (6): 1354-1362;
201. YANG DONGZING, H.CHEN, X. WANG, Y. TIAN, L. TANG., 2006, Association of polymorphism of leptin gene with body weight and body sizes indexes in Chinese Indigenous Cattle.Recived: 2006-03-12;
202. WAKAO H., GOUILLEUX F., GRONER B., 1994, Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine-regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. EMBO Journal 13, 2182-2191;
203. WATSON N., 1988, A new revision of the sequence of plasmid pBR322, Gene 70, 399-403;

204. WELSH J, MCCLELLAND M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acid Res, 19, 861-866;

205. WELSH, J., PETERSEN, C., MCCLELLAND, M., 1991, Polymorphism generated by AP-PCR in the mouse: applications to strain identification and genetic mapping. Nucl. Acid. Res., 19, 303-306;

206. WENGER, J., HUFF, P., XIE, C.P., SCHNEIDER, F., TEUSCHER, F., MIR, P.S., MIR, Z., KAZALA, E.C., WESELAKE, R.J., ENDER, K., 2000, Relationship of plasma leptin concentration to intramuscular fat content in beef from crossbred Wagyu cattle, Journal of Animal Science, 81, 451 – 457;

207. WILLIAMS, I., 1990, Fingerprinting with RADP markers, Hort. Science, 45 (2), 112-117;

208. WILLIAMS, G.L., AMSTALDEN, M., GARCIA, M.R., STANKO, R.L., NIEZIELSKI, S.E., MORRISON, C.D., KEISLER, D.H., 2002, Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle, Domestic Animal Endocrinology 5345, 1 -11;

209. WOODSIDE , B., A. ABIZAID, AND S. JAFFERALI, 1998, Effect of acute food deprivation on lactational infertility in rats is reduced by leptin administration. Am. J. Physiol. 274:1653–1658;

*.www.inra.fr./Internet/Produits

**.www.ncbi.nih.gov/mapview/maps.cgi

***.www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/sts/sts

****.www.sask.usask.ca

**** MULTI – SPECIES LEPTIN RIA KIT, Cat. XL – 85K),XL-85 Rev. 10/15/01

******.http/www.ncbi.

*******.www.scholar google.