



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

# Εκτροφή μηρυκαστικών ζώων

## Εργαστήριο Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας

**Θεματική ενότητα 2:**  
Πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί.  
Δομικές πρωτεΐνες  
Ενζυμικές πρωτεΐνες

**Τμήμα: Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιε**

**Διδάσκοντες: Παναγιώτα Κουτσούλη**



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





# Αντικειμενικοί στόχοι του εργαστηρίου

- Η γνωριμία με τους πρωτεϊνικούς πολυμορφισμούς οι οποίοι αποτελούν ποιοτικά χαρακτηριστικά των οργανισμών και οι οποίοι με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης, μπορούν να διαχωριστούν, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα εκτίμησης της γενετικής παραλλακτικότητας σε πληθυσμούς ή φυλές των μικρών μηρυκαστικών.



# Επιδιωκόμενα μαθησιακά αποτελέσματα

- Με την ανάπτυξη του παρόντος εργαστηρίου επιδιώκεται αρχικά η γνωριμία με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια παρουσιάζονται οι δυνατότητες αξιοποίησης των πρωτεϊνικών πολυμορφισμών, που διαχωρίζονται με την βοήθεια της ηλεκτροφόρησης, στην ζωοτεχνική πράξη και ειδικότερα στη διερεύνηση της φυλογένειας των μικρών μηρυκαστικών.



# Μαθησιακοί στόχοι

Με το πέρας της μελέτης του παρόντος εργαστηρίου ο φοιτητής θα είναι σε θέση να γνωρίζει ότι:

- Οι πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί συνιστούν δομικές και ενζυμικές πρωτεΐνες και μπορούν να διαχωριστούν με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης.
- Οι πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί αποτελούν ένα ιδανικό εργαλείο, κατάλληλο για γενετικές μελέτες στους πληθυσμούς των ζώων επειδή κληρονομούνται με απλό τρόπο (συνήθως ελέγχονται από ένα γονιδιακό τόπο), δεν έχουν υποστεί επιλογή, δεν επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και εκφράζονται στο αίμα ανεξάρτητα από ηλικία και φύλο.
- Οι πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την εύρεση της φυλογένειας σε πληθυσμούς αγροτικών ζώων (εγχώριους πληθυσμούς προβάτων και αιγών).



# Πρωτεΐνη

**ορισμός: Jöns Berzelius (1838)**

Μερικές σημαντικές διαδικασίες στους ζωικούς οργανισμούς στις οποίες εμπλέκονται οι πρωτεΐνες:

- Ενζυμική κατάλυση
- Μεταφορά και αποθήκευση
- Μηχανική στήριξη
- Δημιουργία και μεταφορά νευρικών ώσεων
- Μηχανισμοί ανοσίας



# Πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί 1/2

- Με τον όρο «πρωτεϊνικός πολυμορφισμός» εννοούνται οι διαφορετικές μορφές των πρωτεϊνών στα άτομα ενός είδους που ενώ μπορούν να διαχωρισθούν ηλεκτροφορητικά, παρουσιάζουν παρόμοια λειτουργικότητα και φυσικοχημικές ιδιότητες.

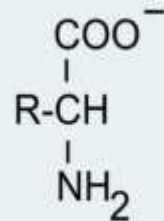


# Πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί 2/2

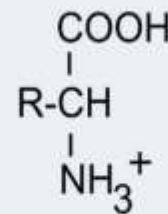
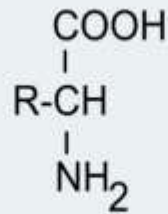
- Ποιοτικοί χαρακτήρες:
  - Διακριτοί φαινότυποι
  - Οι διαφορές μεταξύ των φαινοτύπων οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες,
  - Το περιβάλλον δεν επηρεάζει την έκφρασή τους.
- Προϊόντα ενός γονιδιακού τόπου.
- Τα διαφορετικά αλληλόμορφα ερμηνεύονται ως διαφορετικές μορφές μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας (αλλοένζυμα).



# Χημική δομή πρωτεΐνης

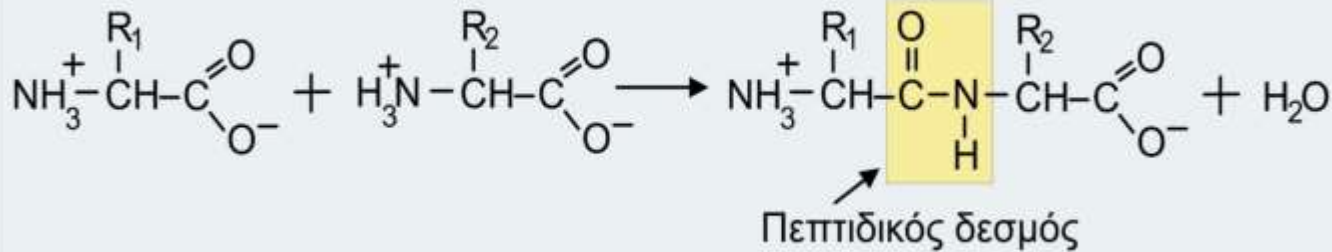


PH&gt;7,0



PH&lt;7,0

R: υδρόφιλες ή υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες



Οι πρωτεΐνες λόγω της χημικής δομής τους έχουν την ικανότητα να συμπεριφέρονται ως αμφολύτες δηλαδή ανάλογα με το pH του ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο βρίσκονται φορτίζονται αρνητικά ή θετικά.





# Δομή των πρωτεϊνών

- Πρωτοταγής δομή:
  - Πολυπεπτιδική αλυσίδα (αλληλουχία αμινοξέων που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς και η θέση των δισουλφιδικών δεσμών, αν υπάρχουν)
- Δευτεροταγής δομή:
  - αναδιπλώσεις της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, χωροδιάταξη των αμινοξέων, α-έλικα, β-πτυχωτή επιφάνεια, έλικα κολλαγόνου
- Τριτοταγής δομή:
  - στερεοδιάταξη των απομακρυσμένων μεταξύ τους αμινοξέων στη γραμμική αλληλουχία
- Τεταρτοταγής δομή:
  - διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες μιας πρωτεΐνης



# Πως ανιχνεύονται οι πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί

- Με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε συνδυασμό με εξειδικευμένες ιστοχημικές τεχνικές.
- Πριν την ανακάλυψη της τεχνικής η μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας περιοριζόταν σε λίγους ποιοτικούς χαρακτήρες που αφορούσαν μορφολογικά χαρακτηριστικά (π.χ. χρωματισμός τριχώματος, παρουσία κεράτων).
- Με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης δόθηκε η δυνατότητα για μία άμεση και γρήγορη εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας.



# Ηλεκτροφόρηση

- Είναι μία τεχνική που διαχωρίζει ογκώδη φορτισμένα μόρια, τα οποία κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου κινούνται προς τους πόλους αντίθετου φορτίου.
- Η μετακίνηση των φορτισμένων μορίων γίνεται μέσα σε κολλοειδή διαλύματα (πήκτωμα αμύλου, αγαρόζης, πολυακρυλαμίδης).



# Η κινητικότητα ( $\mu$ ) φορτισμένου μορίου

σε ηλεκτρικό πεδίο δίνεται από τον τύπο:

- $\mu = Q \times D / 4 \pi R^2 \eta$

όπου

Q: φορτίο του πρωτεϊνικού μορίου,

D: απόσταση της διπλής ηλεκτρικής στιβάδας από το πρωτεϊνικό μόριο,

R: ακτίνα του μορίου,

$\eta$ : ιξώδες του μέσου.



# Q (φορτίο πρωτεϊνικού μορίου)

## ● Το καθαρό ηλεκτρικό φορτίο

- μιας πρωτεΐνης επηρεάζεται από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκεται.
- Το μόριο της πρωτεΐνης εμφανίζεται ηλεκτρικά ουδέτερο στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (pI) που είναι η τιμή του pH του διαλύματος στην οποία εξισορροπείται ο αριθμός των θετικών με τον αριθμό των αρνητικών φορτίων.



# Απόσταση (D) της διπλής ηλεκτρικής στιβάδας

- Δημιουργείται από το «νέφος» των φορτισμένων ιόντων του διαλύματος που έλκονται από το αντιθέτου φορτίου μόριο της πρωτεΐνης.
- Η απόσταση D εξαρτάται από το μέγεθος των ιόντων του διαλύματος και είναι αντιστρόφως ανάλογη της ιοντικής ισχύος του διαλύματος.



# ακτίνα $R$ του πρωτεϊνικού μορίου

- Η ακτίνα  $R$  του πρωτεϊνικού μορίου είναι ανάλογη του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης και εξαρτάται από το σχήμα του μορίου.
- Νηματοειδούς σχήματος πρωτεΐνες δεν συμπεριφέρονται με τον ίδιο τρόπο όπως σφαιρικές πρωτεΐνες του ίδιου μοριακού βάρους.



# η (ιξώδες του μέσου)

- Ο παράγοντας ιξώδες αναφέρεται στο είδος του μέσου που χρησιμοποιείται και μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθος των πόρων του πηκτώματος.
- Με τον παράγοντα αυτό διαφοροποιούνται μόρια όμοιου φορτίου αλλά διαφορετικού μεγέθους.





# Μελέτη πρωτεϊνικών πολυμορφισμών σε πρόβατα

- Ακολουθεί στη συνέχεια η διαδικασία που ακολουθείται για τη μελέτη και ανίχνευση των πρωτεϊνικών πολυμορφισμών σε έναν πληθυσμό προβάτων.
- Χρησιμοποιούνται εκχυλίσματα ιστών ή δείγματα αίματος από ερυθροκύτταρα ή ορό.



# Προετοιμασία δειγμάτων από ερυθροκύτταρα 1/2

- Αιμοληψία από τή σφαγίτιδα φλέβα του ζώου.
- Για τη λήψη ερυθροκυττάρων το αίμα συλλέγεται σε σωλήνες με αντιπηκτικό (ηπαρίνη).
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4°C.



**Ψυχόμενη φυγόκεντρος** (πηγή:  
Αρχείο Εργαστηρίου Γενικής &  
Ειδικής Ζωοτεχνίας).



# Προετοιμασία δειγμάτων από ερυθροκύτταρα 2/2

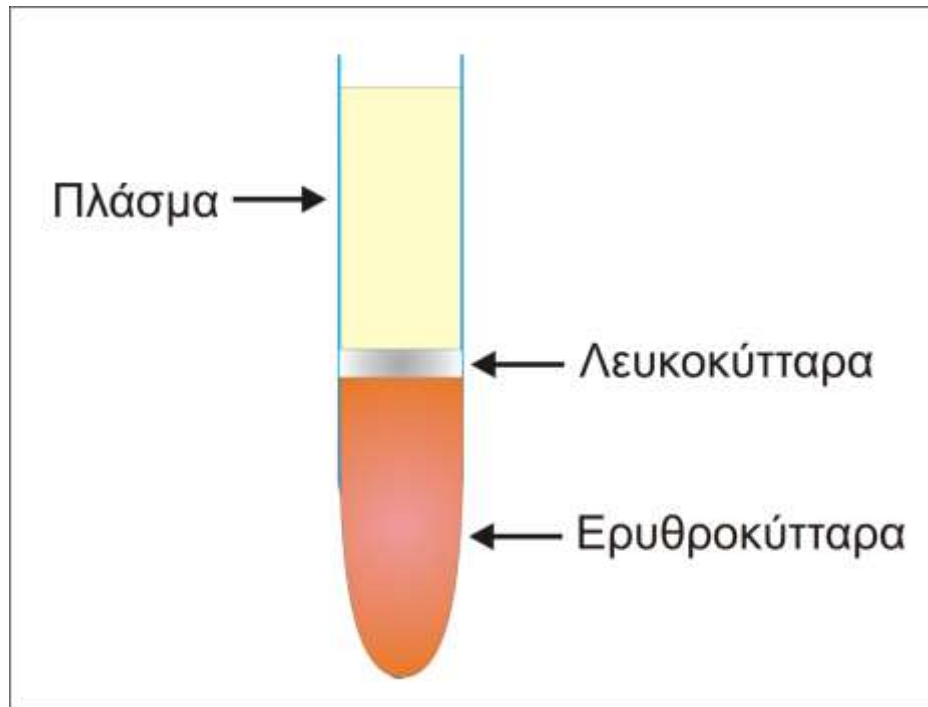
Μετά τη φυγοκέντρηση

- αφαιρείται το υπερκείμενο και το υπόλοιπο που παραμένει στο δοκιμαστικό σωλήνα ξεπλένεται με ισοτονικό διάλυμα 0,9% NaCl.
- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- Το δείγμα ερυθροκυττάρων από κάθε άτομο μοιράζεται σε σωληνάκια Eppendorf και φυλάσσεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .



# Συστατικά του πλήρους αίματος

## διαχωρισμός με φυγοκέντρηση

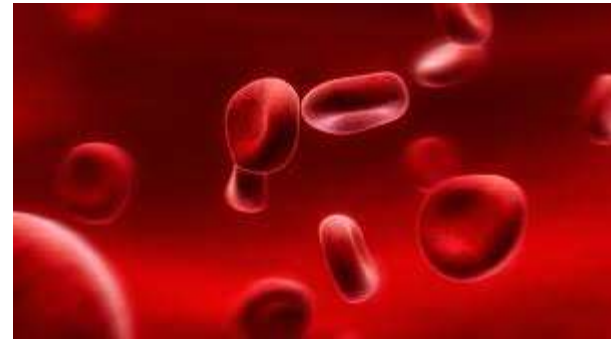


Διαχωρισμός των συστατικών του πλήρους αίματος μετά από φυγοκέντρηση στις 3000 στροφές ανά λεπτό επί 10 λεπτά (πηγή: προσωπικό αρχείο).



# Ερυθροκύτταρα 1/2

- Στην επιφάνεια τους φέρουν αντιγόνα (ομάδες αίματος - ABO σύστημα και Rh σύστημα) και ενζυμικές πρωτεΐνες
- Μεταφέρουν οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα
- Σύνθεση αιμοσφαιρίνης
- Πολυπληθή
- Διαφέρουν στα δύο φύλα



**Ερυθροκύτταρα** (πηγή:  
[https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRCe8PV6F4w4zIlo\\_UQIlanJmhhHVzSfdAuxWYkρA1TWg-KuUMMx\\_w](https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRCe8PV6F4w4zIlo_UQIlanJmhhHVzSfdAuxWYkρA1TWg-KuUMMx_w))



# Ερυθροκύτταρα 2/2

- Θήλεα άτομα: 4,8 εκατομμύρια/mm<sup>3</sup>
- Άρρενα άτομα: 5,4 εκατομμύρια/mm<sup>3</sup>
- Μετά από 120 ημέρες πέπτονται από φαγοκύτταρα σε συκώτι και σπλήνα.



**Ερυθροκύτταρα με το χαρακτηριστικό σχήμα φακού**  
(πηγή:  
<http://imgc.allpostersimages.com/images/P-473-488-90/30/3040/M6PBF00Z/posters/two-red-blood-cells-sem-erythrocytes.jpg>).



# Πλάσμα

Μετά τη φυγοκέντρωση του πλήρους αίματος στο οποίο έχει προστεθεί το αντιπηκτικό το υπερκείμενο υγρό υποκίτρινου χρώματος ονομάζεται «πλάσμα» και σε αυτό διαλύονται τα διάφορα κύτταρα του αίματος. Περιέχει:

- Νερό (92%)
- Πρωτεΐνες (6-8%)
- Άλατα (0,8%)
- Λιπίδια (0,6%)
- Γλυκόζη (0,1%).



# Προετοιμασία δειγμάτων ορού

1. Αιμοληψία από τή σφαγίτιδα φλέβα του ζώου.
2. Για τη λήψη ορού το αίμα συλλέγεται σε σωλήνες χωρίς αντιπηκτικό.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στους 4°C.
4. Συλλέγεται ο ορός.
5. Το δείγμα ορού από κάθε άτομο μοιράζεται σε σωληνάκια Eppendorf και φυλάσσεται στους -20°C.

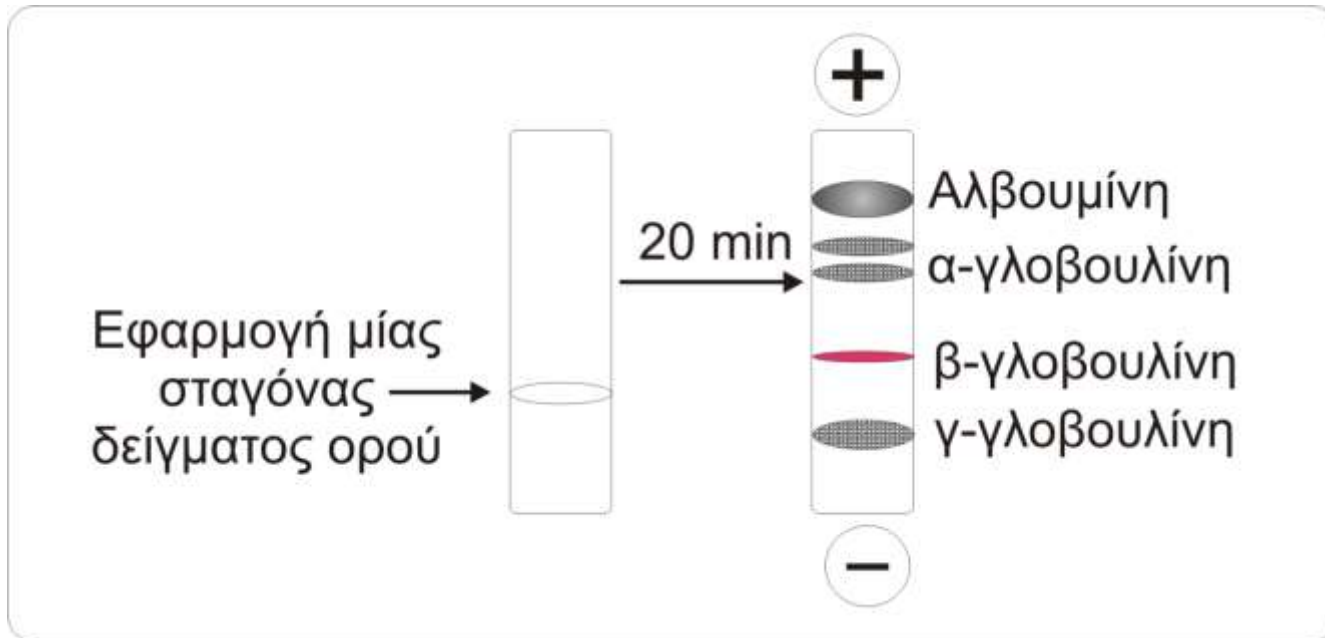




# Πρωτεΐνες του ορού

## διαχωρισμός με ηλεκτροφόρηση

- **Ορός** : το υποκίτρινο υγρό που εξέρχεται όταν το αίμα βρεθεί εκτός των αγγείων και αρχίζει και πήζει.
- Περιέχει αλβουμίνη και σφαιρίνες

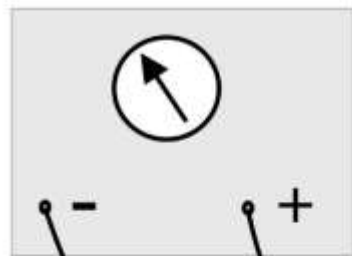


**Διαχωρισμός των πρωτεϊνών του ορού με ηλεκτροφόρηση**  
(πηγή: αρχείο Εργαστηρίου Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας).



# Διάταξη οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Τροφοδοτικό τάσης



Πήκτωμα αμύλου

Αρχή

+  
Άνοδος

-  
Κάθοδος

Δεξαμενή  
ρυθμιστικού  
διαλύματος

Διάταξη οριζόντιας ηλεκτροφόρησης που αποτελείται από τροφοδοτικό τάσης και συσκευή με δεξαμενή για ρυθμιστικό διάλυμα όπου τοποθετείται το πήκτωμα και ηλεκτρόδια (προσωπικό αρχείο).



# Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων

- Τα ρυθμιστικά διαλύματα ρυθμίζουν τις μεταβολές του pH που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης καθώς δημιουργείται οξύ στην άνοδο και άλκαλι στην κάθοδο.
- Σύνθεση των ρυθμιστικών διαλυμάτων
  - Οξύ: γλυκίνη, βορικό οξύ
  - Βάση: Tris, LiOH



# Τοποθέτηση των δειγμάτων ορού ή έρυθροκυττάρων

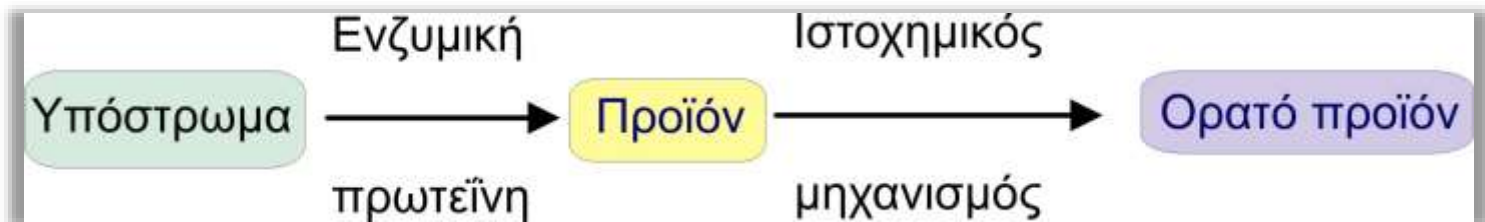
## στο πήκτωμα

- Σε κάθετη τομή και κατά μήκος του πηκτώματος τοποθετούνται απορροφητικά χαρτάκια εμποτισμένα με δείγμα από εκχύλισμα ιστού ή ορού ή αιμολυμένων ερυθροκυττάρων.
- Η λειτουργία της συσκευής της ηλεκτροφόρησης ξεκινάει «κλείνοντας» το κύκλωμα, χρησιμοποιώντας ένα τροφοδοτικό τάσης ώστε να δημιουργηθεί διαφορά δυναμικού και μετά από συγκεκριμένη ώρα με βάση το πρωτόκολλο για τον εκάστοτε πρωτεϊνικό πολυμορφισμό, σταματάει.



# Χρώση του πηκτώματος

Οι σχετικές θέσεις των πρωτεϊνών πάνω στο πήκτωμα αποκαλύπτονται με τη βοήθεια ιστοχημικών μεθόδων. Χρησιμοποιείται το κατάλληλο υπόστρωμα για κάθε πρωτεϊνικό πολυμορφισμό.



Η χρώση του πηκτώματος (gel) είναι απαραίτητη για να γίνει ορατή η αντίδραση που έλαβε χώρα.



# Παράδειγμα: ανίχνευση του μηλικού ενζύμου (ME)

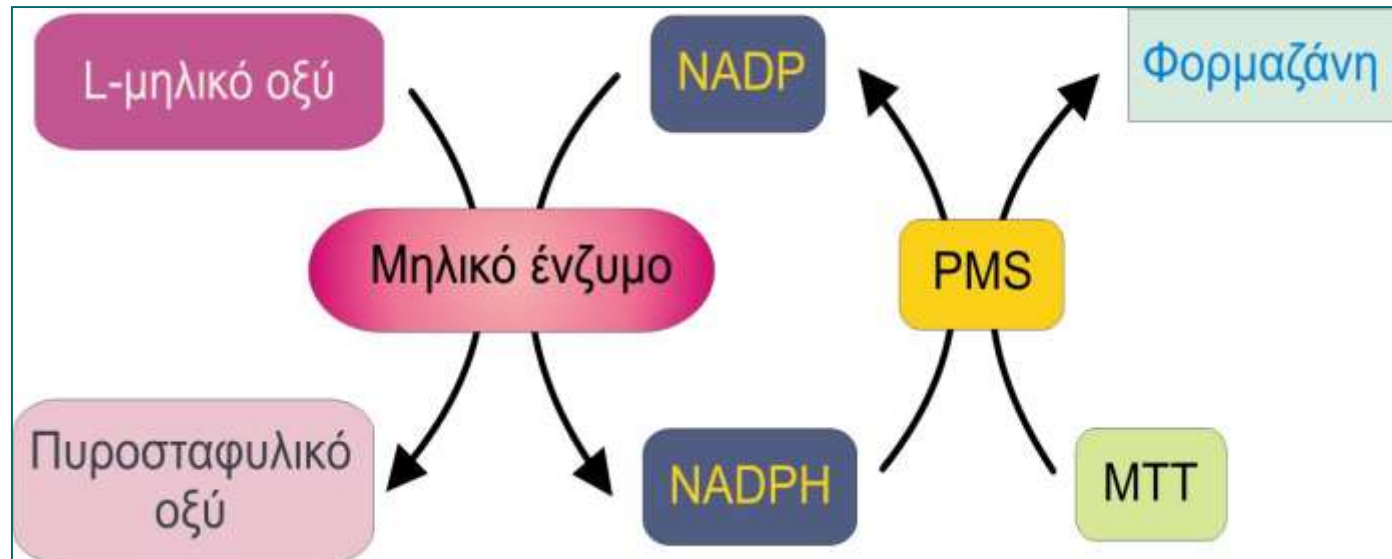
Αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα:

L-μηλικό οξύ + NADP  $\xrightarrow{\text{μηλικό ένζυμο}}$  πυροσταφυλικό οξύ + CO<sub>2</sub> + NADPH

NADPH + MTT  $\xrightarrow{\text{PMS}}$  NADP + ίζημα φορμαζάνης

NADP : Νικοτιναμίδιο Αδενινο Δινουκλεοτίδιο Φωσφορικό

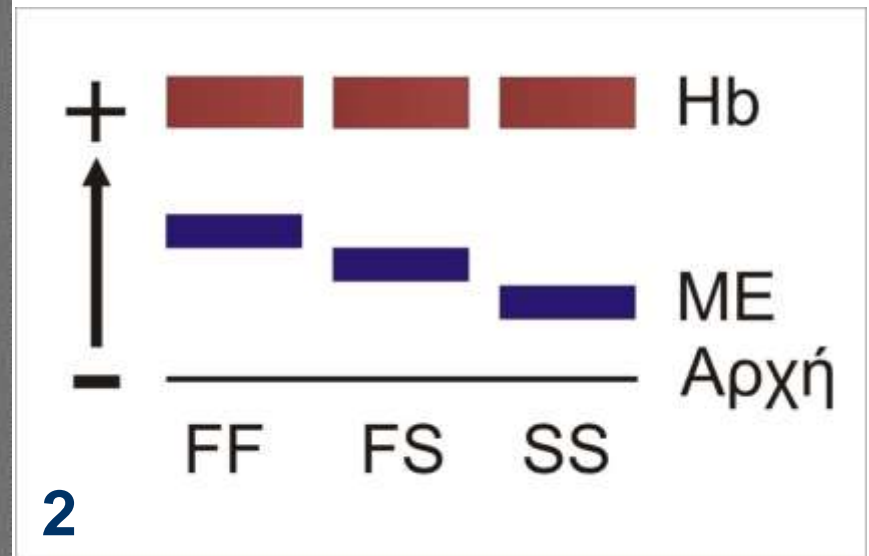
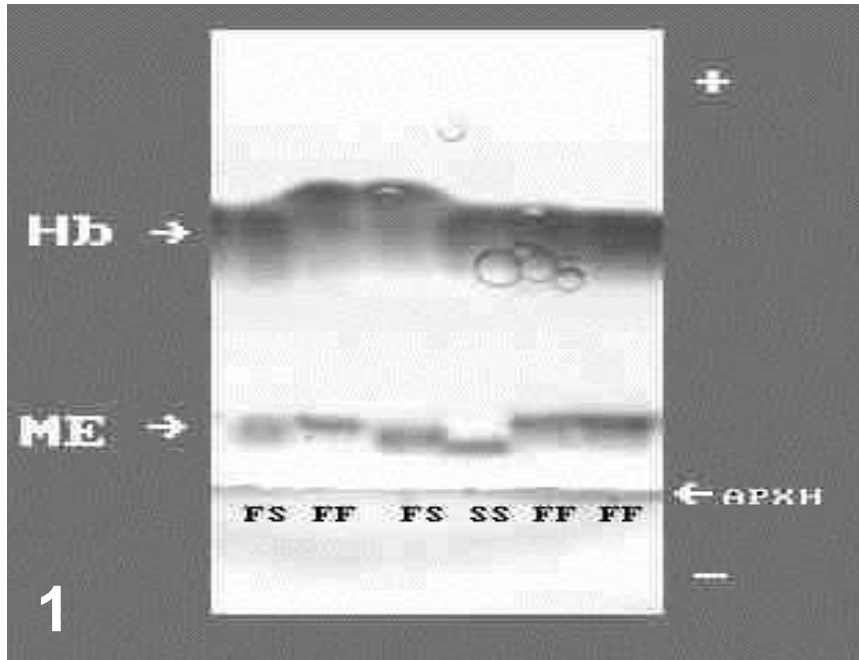
MTT : άλας του τετραζολίου, PMS: Phenazine Metho Sulfate



Μπλε χρώματος ταινίες (ίζημα φορμαζάνης) σχηματίζονται στο τέλος των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά την ανίχνευση του μηλικού ενζύμου το οποίο καταλύει την μετατροπή του L-μηλικού οξέως σε πυροσταφυλικό οξύ (πηγή: προσωπικό αρχείο).



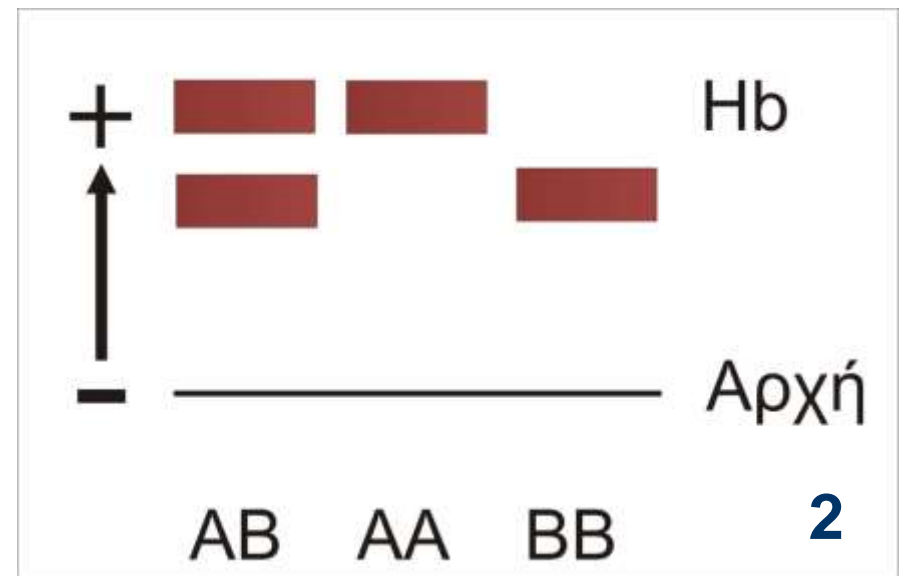
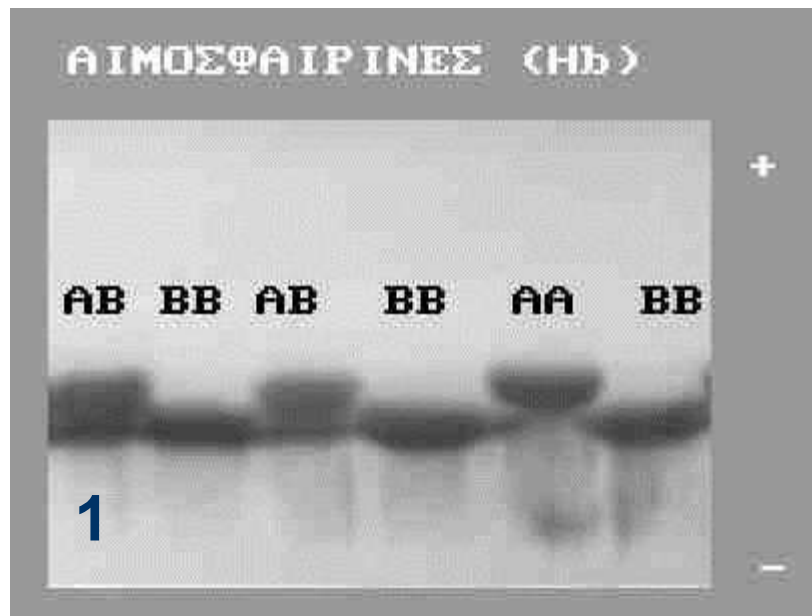
# Γονότυποι μηλικού ενζύμου (ME)



(1): Εικόνα του πηκτώματος ύστερα από την εφαρμογή χρώσης και στη συνέχεια επώασης στους 37° C για την ανίχνευση του μηλικού ενζύμου. Οι γονότυποι του μηλικού ενζύμου παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα (2). Οι γονότυποι FF & SS είναι ομοζυγωτοί, ενώ οι FS ετεροζυγωτοί (πηγή: προσωπικό αρχείο).



# Γονότυποι αιμοσφαιρινών (Hb)

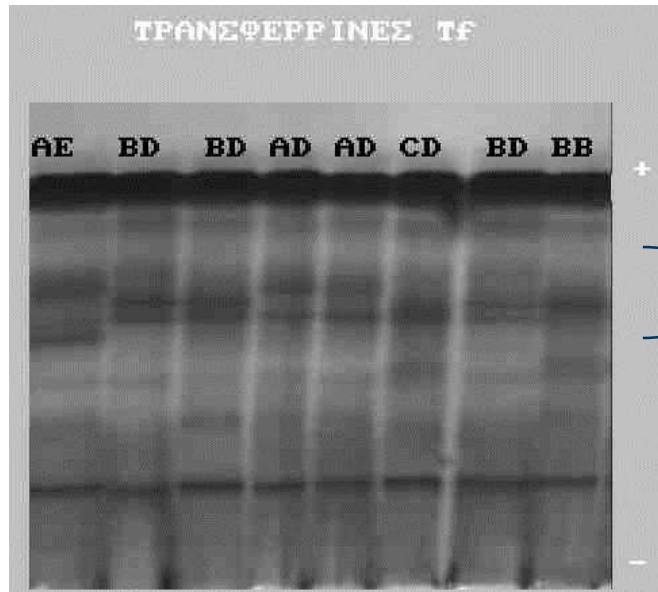


(1): Εικόνα του πηκτώματος μετά την εφαρμογή χρώσης για πρωτεΐνες για την ανίχνευση της αιμοσφαιρίνης. Οι γονότυποι της αιμοσφαιρίνης παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα (2). Οι γονότυποι AA & BB είναι ομοζυγωτοί, ενώ οι AB ετεροζυγωτοί (πηγή: προσωπικό αρχείο).

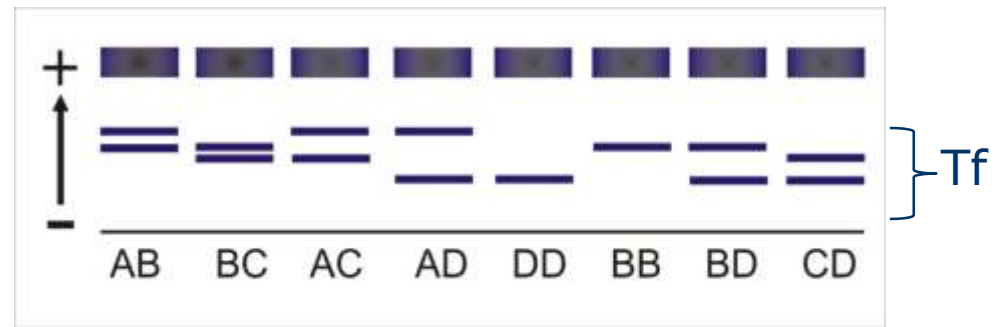




# Γονότυποι τρανσφερινών (Tf)



1

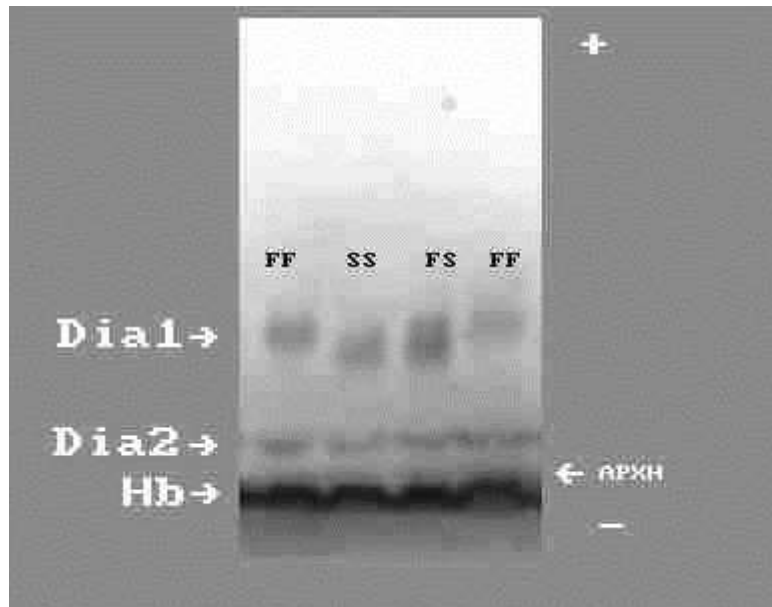


2

(1): Εικόνα του πηκτώματος με την εφαρμογή χρώσης και επώασης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για την ανίχνευση των τρανσφερινών (Tf). Οι γονότυποι των Tf παρουσιάζονται σχηματικά στην εικόνα (2) (πηγή: προσωπικό αρχείο).



# Γονότυποι διαφοράσης (Dia)



Εικόνα του πηκτώματος μετά την εφαρμογή χρώσης και επώασης στους 37° C για την ανίχνευση της διαφοράσης (πηγή: προσωπικό αρχείο).



# Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

- Οι διαφορετικές θέσεις μιας πρωτεΐνης στο πηκτώμα θεωρούνται διαφορετικά αλληλόμορφα ενός γονιδιακού τόπου με την προϋπόθεση ότι έχει γίνει έλεγχος του τρόπου κληρονόμησης των διαφορετικών ζωνών - θέσεων με τη διενέργεια συζεύξεων σε οικογένειες.
- Ακολουθεί:
  - Καταμέτρηση των γονοτύπων
  - Εκτίμηση της γονιδιακής συχνότητας



# Εκτίμηση γονιδιακής συχνότητας

- Παράδειγμα: Σε 100 πρόβατα της Καραγκούνικης φυλής βρέθηκαν για το μηλικό ένζυμο οι παρακάτω γονότυποι:

FF: 70 άτομα

FS: 25 »

SS: 5 »

- Έστω  $p_F$  : η συχνότητα του F αλληλόμορφου και  $q_S$  : η συχνότητα του S αλληλόμορφου.

Τότε:  $p_F = [(2 \times 70) + 25] / 2 \times 100 = 0,825$  και

$q_S = [(2 \times 5) + 25] / 2 \times 100 = 0,175$

- Ισχύει:  $p_F + q_S = 1$



# Πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί – ποιοτικοί χαρακτήρες

- η κληρονομικότητα τους ελέγχεται από ένα γονιδιακό τόπο (συνήθως με συγκυριαρχία),
- εκφράζονται στους ιστούς και το αίμα των ζώων ανεξάρτητα από ηλικία ή φύλο,
- θεωρούνται επιλεκτικά ουδέτεροι,
- δεν έχουν υποστεί ανθρώπινη επιλογή,
- δεν επηρεάζεται η έκφρασή τους από το περιβάλλον και
- δεν συσχετίζονται με παραγωγικά χαρακτηριστικά.



# Εκτίμηση των γενετικών διαφορών μεταξύ πληθυσμών

- Εκτιμώντας τις γονιδιακές συχνότητες των αλληλομόρφων για μια σειρά πρωτεϊνικών πολυμορφισμών σε μια ομάδα πληθυσμών, έχουμε μία έμμεση εκτίμηση των γενετικών διαφορών μεταξύ των πληθυσμών ή της γενετικής τους απόστασης.
- Με βάση τις γενετικές αποστάσεις μπορεί να κατασκευαστεί δενδρόγραμμα που να απεικονίζει τις γενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών.



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 1/10

- Μελέτη της γενετικής δομής των πληθυσμών ή φυλών (εκτίμηση γονιδιακών συχνοτήτων, έλεγχος γενετικής ισορροπίας, εκτίμηση συντελεστών ομομιξίας)
- Εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας
- Εκτίμηση της γενετικής συγγένειας μεταξύ πληθυσμών ή φυλών
- Έλεγχος πατρότητας
- Διερεύνηση συσχέτισης με παραγωγικές ιδιότητες



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 2/10



Εφαρμογή της μεθόδου για τη μελέτη του βαθμού γενετικής παραλλακτικότητας σε πρόβατα και την εκτίμηση της γενετικής συγγένειας μεταξύ 20 φυλών προβάτων (Κουτσούλη και συν., 2002<sup>α</sup>).





# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 3/10

## Μελέτη 20 γενετικών συστημάτων

20 γενετικά συστήματα (19 πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί+ πολυμορφισμός Καλίου)

ερυθροκυττάρων (erythrocytes)

ορού (serum)

μηλικό ένζυμο (ME)

αιμοσφαιρίνη (Hb)

διαφοράση<sub>1</sub> (Dia<sub>1</sub>)

διαφοράση<sub>2</sub> (Dia<sub>2</sub>)

καταλάση (Cat)

ανθρακική ανυδράση (CA)

αφυδρογονάση 6-φωσφορογλυκόζης (Gd)

αφυδρογονάση 6-φωσφορογλυκονικού  
(PGD)

NAD-αφυδρογονάση μηλικού(MDH)

ισομεράση 6-φωσφορογλυκόζης(GPI)

οξειδάση τετραζολίου (SOD)

X-πρωτεΐνη (X)

κάλιο (K)

εστεράση (EsA)

τρανσφερίνες (Tf)

αλβουμίνη (Alb)

σερουλοπλασμίνη (Cp)

αμινοπεπτιδάση λευκίνης (Lap)

πεπτιδάση γλυκίνης λευκίνης (Gly-leu Pep)

s-A<sub>2</sub> μακροσφαιρίνη (s-A<sub>2</sub>)



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 4/10

## Γονιδιακές συχνότητες 4 πρωτ. πολυμορφισμών σε 7 φυλές προβάτων

Γονιδιακές συχνότητες 4 πρωτεϊνικών πολυμορφισμών  
σε 7 φυλές προβάτων

ΓΟΝ.  
ΤΟΠΟΙ

Μηλικό  
Ένζυμο

	ΠΗΛΙΟ	ΑΓΡΙΝ	ΚΑΛΑ	ΑΡΓΟΥ	ΜΥΤΙΑ	ΖΑΚΥΝ	ΚΑΤΣ
A	.909	.748	.733	.864	.784	.789	.660
B	.091	.252	.267	.136	.216	.211	.340

Αιμοσφαιρίνη

	ΠΗΛΙΟ	ΑΓΡΙΝ	ΚΑΛΑ	ΑΡΓΟΥ	ΜΥΤΙΑ	ΖΑΚΥΝ	ΚΑΤΣ
A	.192	.035	.000	.024	.181	.216	.030
B	.808	.965	1.000	.976	.819	.784	.970

Διαφοράση1

	ΠΗΛΙΟ	ΑΓΡΙΝ	ΚΑΛΑ	ΑΡΓΟΥ	ΜΥΤΙΑ	ΖΑΚΥΝ	ΚΑΤΣ
A	.832	.653	.812	.680	.848	.745	.595
B	.168	.347	.188	.320	.152	.255	.405

Καταλάση

	ΠΗΛΙΟ	ΑΓΡΙΝ	ΚΑΛΑ	ΑΡΓΟΥ	ΜΥΤΙΑ	ΖΑΚΥΝ	ΚΑΤΣ
A	.543	.960	.891	.806	.765	.907	.720
B	.457	.040	.109	.194	.235	.093	.280



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 5/10

- Ο υπολογισμός των γονιδιακών συχνοτήτων προσφέρει στη συνέχεια τη δυνατότητα να εκτιμηθούν τα επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας εντός των φυλών και μεταξύ των φυλών.



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 6/10

## Εκτιμήσεις της γενετικής παραλλακτικότητας εντός των φυλών

φυλές	N	P	H	H'	Na
(1) Καραγκούνικη	100	0,4	0,157 ± 0,053	0,093 ± 0,045	1,7 ± 0,35
(2) Ορεινή Ηπείρου	109	0,4	0,155 ± 0,053	0,082 ± 0,039	1,65 ± 0,3
(3) Σκοπέλου	175	0,4	0,152 ± 0,049	0,108 ± 0,048	1,6 ± 0,26
(4) Φλώρινας	104	0,4	0,124 ± 0,043	0,074 ± 0,032	1,55 ± 0,21
(5) Σφακίων	105	0,4	0,176 ± 0,054	0,091 ± 0,038	1,65 ± 0,3
(6) Κύμης	101	0,4	0,151 ± 0,052	0,109 ± 0,046	1,65 ± 0,25
(7) Χίου	104	0,45	0,119 ± 0,043	0,078 ± 0,037	1,55 ± 0,17
(8) Σερρών	105	0,4	0,137 ± 0,048	0,096 ± 0,041	1,7 ± 0,31
(9) Άρτας	98	0,45	0,166 ± 0,051	0,093 ± 0,04	1,7 ± 0,3
(10) Πηλίου	104	0,35	0,13 ± 0,05	0,089 ± 0,043	1,6 ± 0,3
(11) Αγρινίου	101	0,4	0,138 ± 0,049	0,076 ± 0,041	1,6 ± 0,26
(12) Καλαρρύτεκη	101	0,35	0,128 ± 0,048	0,076 ± 0,039	1,6 ± 0,3
(13) Άργους	103	0,35	0,129 ± 0,05	0,086 ± 0,045	1,7 ± 0,35
(14) Λέσβου	102	0,35	0,137 ± 0,049	0,089 ± 0,041	1,65 ± 0,3
(15) Ζακύνθου	102	0,4	0,144 ± 0,048	0,092 ± 0,042	1,65 ± 0,3
(16) Κατσικά	100	0,4	0,153 ± 0,052	0,095 ± 0,044	1,6 ± 0,3
(17) Ανωγείων	100	0,4	0,188 ± 0,055	0,105 ± 0,043	1,7 ± 0,35
(18) Αστερουσίων	100	0,4	0,194 ± 0,057	0,109 ± 0,044	1,7 ± 0,35
(19) Κεφαλλονιάς	100	0,4	0,157 ± 0,055	0,112 ± 0,049	1,7 ± 0,35
(20) Καρύστου	100	0,4	0,132 ± 0,048	0,104 ± 0,047	1,7 ± 0,35

Δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των εκτιμήσεων της γενετικής παραλλακτικότητας (P: βαθμός πολυμορφισμού, H: βαθμός ετεροζυγωτίας, H': αμερόληπτη εκτίμηση βαθμού ετεροζυγωτίας και Na: δραστικός αριθμός αλληλομόρφων)(Κουτσούλη και συν. 2002<sup>α</sup>).



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 7/10

- Η εκτίμηση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των φυλών προϋποθέτει τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων μεταξύ των φυλών ανά δύο και στη συνέχεια με κατάλληλο αλγόριθμο την απεικόνιση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των φυλών.



# Εφαρμογές στη Ζωική παραγωγή 8/10

Γενετική απόσταση  $D_N$  μεταξύ δύο φυλών

$$D_N = -\ln\left(\frac{\sum_r \sum_i p_{1ri} p_{2ri}}{\left[\sum_r \sum_i p_{1ri}^2\right]^{1/2} \left[\sum_r \sum_i p_{2ri}^2\right]^{1/2}}\right)$$

όπου :

$p_{1ri}$  και  $p_{2ri}$  : γονιδιακή συχνότητα του  $i$  αλληλομόρφου στον  $r$  γονιδιακό τόπο στη φυλή 1 και 2 αντίστοιχα

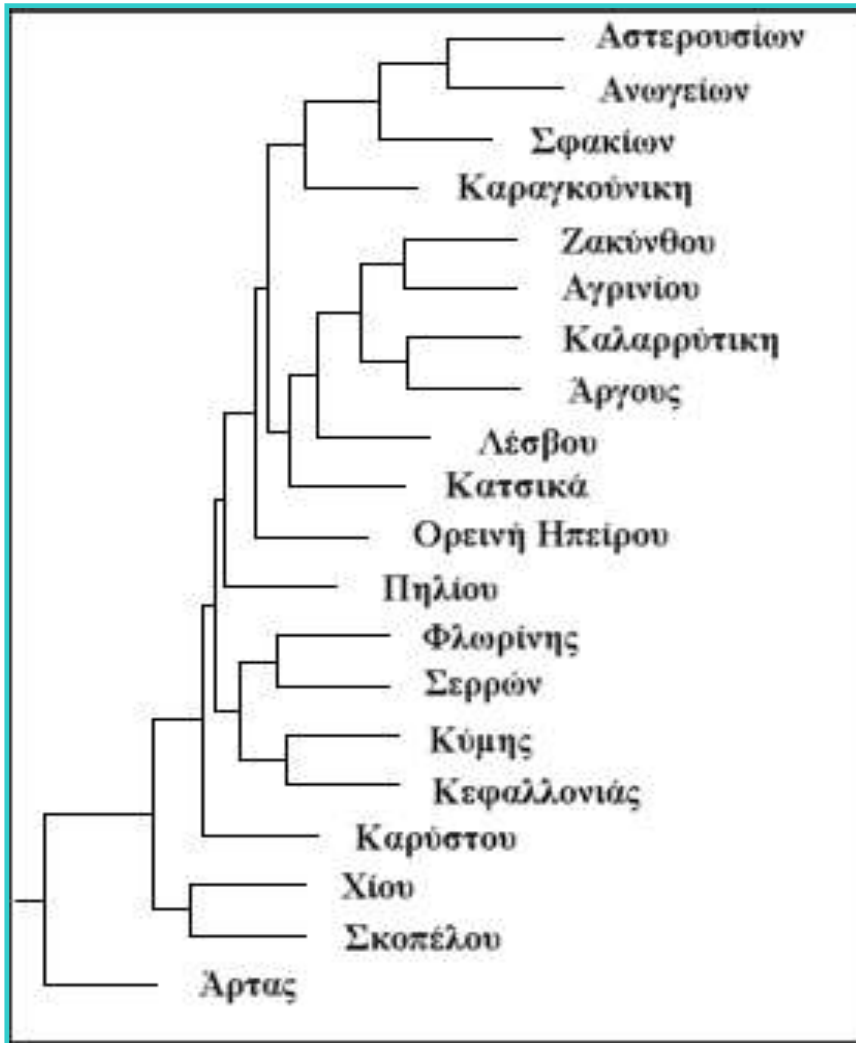
και

$r$  : ο αριθμός των γονιδιακών τόπων που εξετάστηκαν.



# Εφαρμογές στη Ζωική Παραγωγή 9/10

## Φυλογένεια των ελληνικών προβάτων



Φυλογένεια των ελληνικών προβάτων χρησιμοποιώντας τη γενετική απόσταση Nei (1972) και τον αλγόριθμο της μεθόδου Neighbor-Joining (Κουτσούλη & Ρογδάκης, (2002γ)).



# Εφαρμογές στη Ζωική

## Παραγωγή 10/10

### Φυλογένεια των ελληνικών αιγών

- Η εξέταση παρόμοιου αριθμού πρωτεϊνικών πολυμορφισμών σε πληθυσμούς ελληνικών αιγών από 10 περιοχές είχε ως αποτέλεσμα το παρακάτω δενδρόγραμμα:



Δενδρόγραμμα χωρίς ρίζα που προέκυψε από την εφαρμογή της μεθόδου Neighbor-joining και των αποστάσεων μεταξύ των περιοχών. Οι πληθυσμοί της Κρήτης, της Σκοπέλου και της Νότιας Εύβοιας διαφοροποιούνται από τους υπόλοιπους στην ηπειρωτική Ελλάδα οι οποίοι παρουσιάζουν μεταξύ τους μεγαλύτερη γενετική συγγένεια (Γκουργκούλης, 1999).





# Πλεονεκτήματα & μειονεκτήματα

## της ηλεκτροφορητικής μεθόδου

- Πλεονεκτήματα:
  - Εξέταση μεγάλου αριθμού γονιδιακών τόπων
  - Εφαρμογή σε όλα τα είδη των οργανισμών
  - Συγκυριαρχία, αναγνώριση ετεροζυγωτών
- Μειονεκτήματα:
  - Η παραλλακτικότητα των πρωτεϊνικών πολυμορφισμών συνιστά ένα σχετικά μικρό τμήμα της παραλλακτικότητας του DNA.



# Λέξεις – έννοιες κλειδιά

- Πρωτεϊνικοί πολυμορφισμοί, ηλεκτροφόρηση, αλλοένζυμα, ποιοτικοί χαρακτήρες, δομικές πρωτεΐνες, ενζυμικές πρωτεΐνες, ιστοχημικός μηχανισμός, γενετική παραλλακτικότητα, αλληλόμορφα, γονότυπος, γενετική απόσταση, φυλογένεια, δενδρόγραμμα
- Protein polymorphisms, electrophoresis, allozymes, qualitative traits, structural proteins, enzymatic proteins, histochemical mechanism, genetic variation, alleles, genotype, genetic distance, phylogeny, dendrogram



# Βιβλιογραφία 1/2

- Γκουργκούλης Μ. (1999): Γενετική δομή των εγχώριων πληθυσμών αιγών (*Capra aegagrus forma hircus*). Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Κουτσούλη Π., Ι. Μπιζέλης, Ε. Πανοπούλου & Εμμ. Ρογδάκης (2002α): Γενετική δομή των ελληνικών φυλών προβάτων: 1. Γονιδιακές συχνότητες. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης* 30, 3-14.
- Κουτσούλη Π. & Εμμ. Ρογδάκης (2002γ ): Γενετική δομή των ελληνικών φυλών προβάτων: 3. Γενετική παραλλακτικότητα εντός και μεταξύ των φυλών. *Επιθεώρηση Ζωοτεχνικής Επιστήμης* 30, 29-44.
- Ρογδάκης Εμμ. (1993): Γενετική Βελτίωση των Αγροτικών Ζώων, Αθήνα, ΓΠΑ.



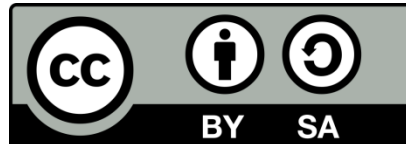
# Βιβλιογραφία 2/2

- Harris & Hopkinson (1976): A Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Richardson B. J., Baverstock P. R. and M. Adams (1986): Allozyme electrophoresis, A Handbook for Animal Systematics and Population studies. Academic press Australia.



# Άδειες Χρήσης

- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons.
- Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδεια χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.





# Χρηματοδότηση

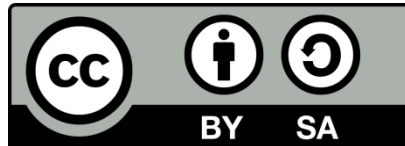
- Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στο πλαίσιο του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα.
- Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο την αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.
- Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.





# Σημείωμα Αδειοδότησης

Το παρόν υλικό διατίθεται με τους όρους της άδειας χρήσης Creative Commons Αναφορά, Παρόμοια Διανομή 4.0 [1] ή μεταγενέστερη, Διεθνής Έκδοση. Εξαιρούνται τα αυτοτελή έργα τρίτων, π.χ. φωτογραφίες, διαγράμματα κ.λ.π., τα οποία εμπεριέχονται σε αυτό και τα οποία αναφέρονται μαζί με τους όρους χρήσης τους στο «Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων».



Η άδεια αυτή ανήκει στις άδειες που ακολουθούν τις προδιαγραφές του Ορισμού Ανοικτής Γνώσης [2], είναι ανοικτό πολιτιστικό έργο [3] και για το λόγο αυτό αποτελεί ανοικτό περιεχόμενο [4].

[1] <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

[2] <http://opendefinition.org/okd/ellinika/>

[3] <http://freedomdefined.org/Definition/EI>

[4] <http://opendefinition.org/buttons/>



# Σημείωμα Αναφοράς

- Copyright Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, Γκολιομύτης Μιχάλης, Κουτσούλη Παναγιώτα, «Εκτροφή Μηρυκαστικών Ζώων». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://mediasrv.aua.gr/eclass>





# Διατήρηση Σημειωμάτων

Οποιαδήποτε αναπαραγωγή ή διασκευή του υλικού θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει:

- το Σημείωμα Αναφοράς
- το Σημείωμα Αδειοδότησης
- τη δήλωση Διατήρησης Σημειωμάτων
- το Σημείωμα Χρήσης Έργων Τρίτων (εφόσον υπάρχει)

μαζί με τους συνοδευόμενους υπερσυνδέσμους.