

MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ

Agronomická fakulta

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



Genetické markery pro kvalitu masa u prasat a gen pro resistin

Bakalářská práce

Brno 2007

Vedoucí bakalářské práce:
doc. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:
Lenka Grochálová

Anotace

Genetické markery pro kvalitu masa u prasat a gen pro resistin

V současné době požaduje spotřebitel maso nejen libové, ale také kvalitní. Kvalitu masa ovlivňují intravitální a postmortální vlivy a genetické založení zvířete. Většina užitkových vlastností hospodářských zvířat je geneticky podmíněna polygeny. Existují však některé geny „velkého účinku“, které mají značný vliv na kvantitativní vlastnosti (*RYRI*, *RN*, *c-myc*, *MYF4*, *H-FABP*, *MC4R*, *LEP*, *IGF2*).

Gen *RETN* je nově zkoumaný gen, který je asociován s obsahem tuku u prasat. Celkem u 63 prasat plemen Přestické černostrakaté, Bílé ušlechtilé a Landrase byly zjišťovány genotypy polymorfizmu *MvaI*. Pro detekci genotypů byly použity metody PCR a RFLP. Bylo zjištěno, že zkoumaný soubor zvířat byl monomorfní. U všech jedinců byl určen genotyp BB, a proto nemohla být provedena asociační analýza.

Klíčová slova: *RETN*, prase, kvalita masa, genetický marker

Annotation

Genetic markers of meat quality in pigs and resistin gene

On the present consumer demands lean meat, but also high - quality. Meat quality is affected by intravital and post-mortal influences and genetic information of animal. Most of quantitative traits of livestock are genetically subjected to polygenes. However some major genes have significantly effect to quantitative traits (*RYR1*, *RN*, *c-myc*, *MYF4*, *H-FABP*, *MC4R*, *LEP*, *IGF2*).

RETN gene is recently surveyed gene that is associated with fattness traits in pigs. Genotypes of *MvaI* polymorphism were detected in 63 pigs of Black Pied Prestice, Large White and Landrace breeds. The PCR and RFLP metods were used for detection genotypes. It was found that studied group of animals was monomorphic. Genotype BB was found in all animals for which association analysis couldn't be performed.

Keywords: *RETN*, pig, meat quality, genetic marker

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky a rady při vypracování bakalářské práce. Velký dík také patří моým rodičům a příteli za všestrannou podporu při studiu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Genetické markery pro kvalitu masa u prasat a gen pro resistin vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém soupisu literatury.

Souhlasím, aby práce byla uložena v knihovně Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Brně, dne 20.4.2007

Lenka Grochálová

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod..... | 8 |
| 2 | Literární přehled | 9 |
| 2.1 | Vepřové maso a faktory ovlivňující jeho kvalitu..... | 9 |
| 2.1.1 | Intravitální vlivy | 10 |
| 2.1.2 | Postmortální vlivy..... | 12 |
| 2.1.3 | Genetické založení..... | 13 |
| 2.2 | Genetické markery | 13 |
| 2.3 | Kandidátní geny ovlivňující kvalitu vepřového masa | 14 |
| 2.3.1 | gen <i>RYR1</i> | 14 |
| 2.3.2 | gen <i>RN</i> | 17 |
| 2.3.3 | Gen <i>c-myc CM</i> | 17 |
| 2.3.4 | Gen <i>MYF4</i> | 18 |
| 2.3.5 | gen <i>H-FABP</i> | 18 |
| 2.3.6 | gen <i>MC4R</i> | 18 |
| 2.3.7 | gen <i>LEP</i> | 19 |
| 2.3.8 | gen <i>IGF2</i> | 19 |
| 2.4 | Gen pro resistin | 20 |
| 2.4.1 | Popis a funkce genu <i>RETN</i> | 20 |
| 2.4.2 | Lokalizace genu <i>RETN</i> | 21 |
| 2.4.3 | Polymorfismus genu <i>RETN</i> | 21 |
| 2.5 | Molekulárně-genetické metody pro detekci a testování polymorfizmů DNA.... | 24 |
| 2.5.1 | Elektroforéza (ELFO)..... | 24 |
| 2.5.2 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 25 |
| 2.5.3 | Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) | 26 |
| 2.5.4 | PCR-RFLP | 27 |
| 3 | Materiál a metody | 28 |
| 3.1 | Zvířata | 28 |
| 3.2 | Metody stanovení genotypů..... | 28 |
| 3.2.1 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 28 |
| 3.2.2 | Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)..... | 29 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 31 |
| 5 | Závěr | 33 |
| 6 | Seznam použité literatury | 34 |
| 7 | Seznam použitých zkratk | 38 |

Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1. Jakost masa jako výslednice devíti základních charakteristik a jejich vzájemných interakcí

Obr. 2. Vliv genotypů genu *RYRI* na produkci a kvalitu vepřového masa

Obr. 3. Metafázový chromozom prasete

Obr. 4. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) u resistinu

Obr. 5. Agarosový gel (2%) ukazující genotypy v prasečím genu *RSTN* po štěpení PCR produktů pomocí *HinfI* a *MvaI*

Obr. 6. Kontrola PCR produktu na agarózovém gelu

Obr. 7. Ukázka štěpení některých vzorků

Tab. 1. Frekvence alel *MvaI* a *HinfI* lokusů genu *RETN* u různých plemen prasat

1 Úvod

V současné době je chov prasat zaměřen na produkci vysoce kvalitního jatečného produktu za minimální cenu. Zároveň musí být zohledněny požadavky na bezpečnost potravin, životní prostředí a welfare zvířat.

K řešení tohoto úkolu přispívá také molekulární genetik a genetik populací. V minulosti se při šlechtění zvířat využívali poznatky z genetiky populací, ale progresivně se rozvíjející biotechnologické a molekulárně – genetické metody umožňují rychleji dosáhnout žádoucích genetických změn v porovnání s klasickými šlechtitelskými metodami. Molekulární genetik přináší už více než 20 let poznatky o genech, které mají určitý význam ve fenotypové proměnlivosti kvality vepřového masa. V posledních letech byla objevena řada kandidátních genů, které se staly genetickými markery pro kvalitu vepřového masa.

Cílem této bakalářské práce je kromě základního přehledu některých genů, které jsou asociovány s kvalitou vepřového masa, shrnutí poznatků o genu resistin (*RETN*) ovlivňujícím obsah tuku u prasat, o jeho struktuře, funkci a variabilitě. Dále se tato práce zabývá zpracováním laboratorní metodiky pro testování polymorfizmu genu. Praktická část práce je zaměřena na určení genotypu genu *RETN* a zvládnutí a ověření metodiky založené na agarózové gelové elektroforéze, polymerázové řetězové reakci a štěpení restrikcními endonukleázami (PCR-RFLP) na souboru 63 zvířat.

2 Literární přehled

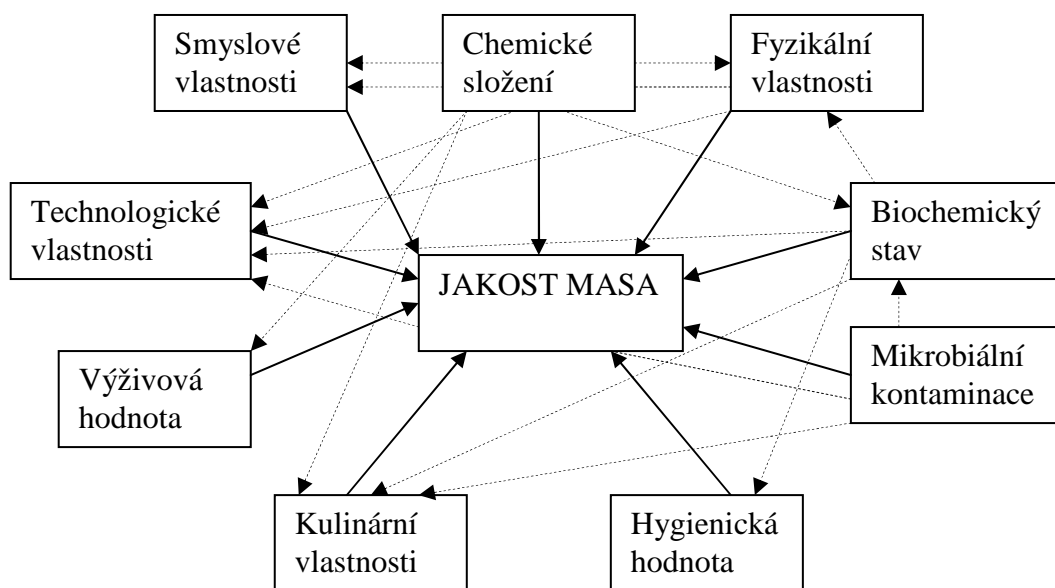
2.1 Vepřové maso a faktory ovlivňující jeho kvalitu

Obecně je maso definováno jako požitelná část jatečně zpracovaných zvířat. V užším smyslu je za maso považována kosterní svalovina jatečných zvířat. Maso je jednou ze základních potravin obyvatel rozvinutých a některých dalších zemí (Ingr, 1996).

Vepřové maso se podílí téměř čtyřiceti procenty na celkovém objemu vyrobeného masa a je od roku 1965 světově nejvíce produkovaným druhem masa. Po poklesu v devadesátých letech dochází k oživení produkce vepřového masa v zemích střední Evropy, které začíná být nejen po stránce cenové ale u řady podniků i po stránce kvalitativní, světově konkurence schopné (Steinhauser a kol., 2000). I když spotřeba vepřového masa v České republice mírně klesla, zabezpečuje 51 % podílu celkové spotřeby masa, což svědčí o přetrvávající oblibě tohoto druhu masa z pohledu chuťového, cenového, ale i z pohledu důvěry spotřebitele v bezpečnost této potravinu (Mze ČR, 2006).

Z nutričního hlediska je vepřové maso důležitým zdrojem živočišné bílkoviny, esenciálních mastných kyselin, vitamínů a minerálních látek.

V současné době jsou kladeny stále větší požadavky na kvalitu vepřového masa a z něj vyrobených masných výrobků. Kvalita masa může být hodnocena velkým počtem ukazatelů. Při analýzách kvality jsou obvykle sledována kritéria náležející do souborů charakterizovaných požadavky zpracovatelů a konzumentů (Steinhauser a kol., 2000). Kvalita masa je chápána jako výslednice nebo souhrn jednotlivých znaků a charakteristik jakosti konkrétní svalové tkáně nebo i masa v širším smyslu. Na jakost masa lze pohlížet jako na soubor devíti kvalitativních charakteristik a jejich vzájemných interakcí (Ingr, 1996).



Obr. 1 Jakost masa jako výslednice devíti základních charakteristik a jejich vzájemných interakcí (Ingr, 1996)

Na jakost masa působí vlivy intravitální, postmortální a genetické (Ingr, 1996).

2.1.1 Intravitální vlivy

Jakost masa je ovlivňována řadou intravitálních vlivů, působících na zvíře za života (*intra vitam*) tedy během výkrmu, při přepravě a v době před porážkou a zpracováním. Vliv na jakost a produkci masa má živočišný druh, plemeno, pohlaví, věk, ranost, kastrace, způsob výživy, úroveň výživy, nemoci, použití léků, únava, hladovění, podmínky při přepravě, stres (Pipek, 1993).

Dosažení nejvyšší kvality masa je výrazně podmíněno výživou prasat a odpovídající technikou krmení. Výživa zvířat je označována za nejdůležitější faktor vnějšího prostředí, který bezprostředně rozhoduje o stupni využití genofondu hospodářských zvířat (Steinhauser a kol., 2000). Důležitá je zejména úroveň výživy, plnohodnotnost diet, zdravotně hygienické parametry krmiv, výběr krmiv, technika a technologie krmení. Jednostranné krmení vede vždy ke zhoršení jakosti masa nebo tuku (Pipek, 1993). Aminokyseliny a jejich vzájemný poměr v dávkách pro prasata i jejich

adekvátní doplnění jsou významnými faktory ovlivňujícími podíl libové tkáně u rostoucích prasat (Šimek, 1998).

Vliv pohlaví na jakost je dán zejména rozdílným temperamentem a různou intenzitou metabolických procesů u samců a samic. Maso prasnic obsahuje obecně více tuku než maso kanců. Dalším rozdílem je také výskyt kančího pachu. Příčinou kančího pachu jsou androgenní sloučeniny, především 5-alfa-andro-16-sten-3-on (Ingr, 1996). Na pachu se podílí i chemické látky indol a skatol, které vznikají jako produkt metabolismu aminokyselin a ukládají se v tukové tkáni. Pro odstranění kančího pachu se praktikuje kastrace kanečků v raném věku. Z pohledu welfare se ale prosazují názory na nevhodnost kastrování.

Dalším faktorem ovlivňujícím kvalitu masa je věk. S věkem zvířete se mění chemické složení masa a po dosažení dospělosti se zvyšuje ukládání tuku. U starších zvířat bývá vyšší obsah barviv, maso je tmavší. Chuť masa mladých zvířat je méně výrazná v důsledku nízkého obsahu extraktivních látek, kterých s věkem přibývá. Z hlediska produkce masa je nejvýhodnější porážet zvířata v tzv. jatečné zralosti, ukončuje se vývoj svaloviny a začíná ve zvýšené míře produkce depotního tuku (Pipek, 1993). Maso zvířat poražených v jateční zralosti dosahuje znaků jakosti sensorických, technologických i kulinárních (Ingr, 1996).

Významný podíl na proměnlivosti kvality masa má i technologie chovu a ustájení zvířat. Při různých způsobech chovu je třeba respektovat nové etologické poznatky a zabezpečit dostatečný welfare neboli pohodu zvířat.

Welfare zvířat by se měl uplatňovat i při jakémkoliv zacházení se zvířaty, zejména pak při dopravě na jatka a porážení. Během dopravy i předporážkového ustájení je třeba přihlídnout k fyziologickým a psychickým nárokům zvířat a zabránit jejich týrání (Pipek, 1993). Během nakládání, vlastní přepravy, při vykládání i při předporážkovém ustájení působí na zvířata různé stresory, které ovlivňují jejich psychiku a v důsledku toho i jakost masa. U prasat se zvýšenou citlivostí ke stresu může nešetrné zacházení při nakládání, vykládce a před samotnou porážkou vést k různě výrazným projevům PSE vepřového masa. PSE maso (bledé, měkké, vodnaté) se vyznačuje mimořádně rychlou glykolýzou, která vede k rychlejšímu okyselení svaloviny poraženého zvířete v důsledku hromadění kyseliny mléčné. S tím souvisí i prudký pokles pH_1 masa (Kuciel, 2004). Při glykolýze a

rozkladu ATP dochází k uvolňování značného množství energie, což vede k zvýšení teploty masa až k teplotám 43°C a následné částečné denaturaci svalových bílkovin.

Tyto negativní změny ve svalovině zhoršují její schopnost poutat vodu. S unikající masnou šťávou odchází též část rozpustných bílkovin, spolu s vitamíny a minerálními látkami, což má za následek sníženou biologickou hodnotu PSE masa (Kuciel, 2004). PSE maso je pro kulinární úpravu nevhodné, protože se spéká, dochází k velkým ztrátám šťávy a maso je pak suché a tuhé. V masné výrobě způsobuje PSE maso obtíže zejména vzhledem k nízké vaznosti a vysokým ztrátám při tepelném opracování. PSE anomálie zasahuje zejména cenné partie masa (pečeně a kýta), které jsou jen zřídka určeny pro použití do mělněných výrobků (Pipek, 1993).

Odchylka DFD bývá častější u hovězího masa, než u vepřového. DFD maso (tmavé, tuhé, suché) má vlastnosti opačné, především zde dochází po smrti zvířete k velmi malému poklesu pH (v důsledku předporážkového stresu nebo vyčerpáním). Proto má toto maso vysokou vaznost, tkáň je tuhá a maso působí suchým, málo šťavnatým dojmem. Barva je ve srovnání s normálním masem tmavší. Vzhledem k vysoké hodnotě pH a absenci sacharidů na počátku posmrtných změn má DFD maso značně omezenou údržnost. Negativně bývá rovněž hodnocena nevýrazná chuť a aroma (Pipek, 1993).

2.1.2 Postmortální vlivy

Významnou veličinou pro kvalitu masa je technika porážky. Právě v této fázi se projevují negativní vlivy na kvalitu masa, protože regenerace metabolismu již není možná. Také průběh postmortálních změn ovlivňuje kvalitu masa a ve svých důsledcích se odráží i v ekonomice masného průmyslu. Vytváří se křehkost a údržnost masa, probíhají děje vytvářející extraktivní složky masa. Postmortální procesy probíhají ve čtyřech stádiích: období před rigorem (*prae-rigor*), rigor mortis, zrání masa a hluboká autolýza (Pipek, 1993).

Dalším důležitým aspektem pro dobrou kvalitu masa je jeho včasné a dostatečné zchlazení. V důsledku pomalého zchlazování dochází vlivem probíhajících postmortálních změn v mase k rychlému poklesu pH a vzniku PSE masa i u prasat, která nebyla vystavena stresu. Kvalita masa po porážce tedy závisí na rychlosti snížení teploty při klesajícím pH.

Zde je nutným předpokladem ukončení jatečného opracování do 30 minut od usmrcení zvířete a následné rychlé zchlazování (Ingr, 1996).

2.1.3 Genetické založení

Většina užitkových vlastností hospodářských zvířat je geneticky podmíněna polygeny (Kuciel a kol., 2004). Úseky DNA, které více či méně ovlivňují kvantitativní znaky neboli užitkové vlastnosti, se nazývají lokusy kvantitativních znaků QTL (Quantitative Trait Loci) (Dvořák, Vrtková, 2001). Většina QTL může být identifikována jen nepřímo, a to pomocí tzv. genových markerů. Zpravidla není možné zjistit přímo dědičnost QTL, ale je možné pozorovat dědičnost markerů, které jsou blízko QTL a jsou s nimi ve vazbě (Jakubec, 2002b).

2.2 Genetické markery

V poslední době je molekulární genetiky schopna odhalit a identifikovat tzv. genetické markery, které mohou zlepšit odhad genetického potenciálu zvířat vzhledem k tomu, že jsou spojeny s oblastí genů na chromozomech, které způsobují genetickou proměnlivost (Jakubec 2002a). V akademickém slovníku cizích slov je marker označen jako: „stabilní, dobře charakteristický znak, na němž může být sledován biochemický účinek i lokalizace příslušných genů v chromozomech“ (Dvořák, Vrtková, 2001).

Obecnými vlastnostmi genetických markerů jsou známý způsob dědičnosti a polymorfismus. Také musí být známé vhodné metody jejich zjištění; musí být zjistitelné v každém věku jedince, včetně embryí a to u obou pohlaví. Pro znaky produkce a kvality masa, které jsou hodnotitelné až po porážce a rozbourání, se mohou markery určit již u mladých zvířat (Steinhauser a kol., 2000). Je možné určit i jejich heterozygotní genotypy, neboť se vyznačují převážně kodominantním vztahem v rámci alelického páru (Kuciel a kol., 2004). Na základě znalostí genotypů markerů je možné záměrně vybírat rodiče, provádět plemenitbu a tak cíleně produkovat jedince s ekonomicky výhodnými genotypy.

Podle O'Brien (1991) můžeme rozeznávat tři typy markerů:

1. Markery I. typu - kódující exprimované geny, které mají nízkou hladinu polymorfismu a jsou málo použitelné pro studium diverzity rodin a populací.

2. Markery II. typu - vysoce variabilní nekódující sekvence (mini, mikrosatelity), nazývané také krátké tandemové repetice. Jsou vhodné pro informace o rodokmenech, populacích, QTL, diverzitě plemen atd. (Dvořák, Vrtková, 2001).
3. Markery III. typu – sem se řadí markery v kódujících i nekódujících sekvencích častěji v intronech a integrovaných genových oblastech, u kterých byl odhalen polymorfismus podmíněný mutací jedné báze v DNA. Tyto markery se označují jako tzv. jednonukleotidové polymorfizmy neboli SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Vyskytují se v genomu každých cca 500 až 1000 bazí. Poskytují informace o variabilitě genů v rodinách, liniích a populacích. Jsou to perspektivní genové markery produkčních vlastností rostlin a zvířat (Kuciel a kol., 2004).

Využití znalostí polymorfních genetických markerů je mnohostranné. Ve šlechtění zvířat je obecně možno je využít pro:

- konstrukci chromozomových map,
- porovnání různých plemen a linií zvířat,
- zjišťování genetické vzdálenosti mezi plemeny a liniemi,
- kontrolu rodičovství zvířat (Kuciel a kol., 2004).

2.3 Kandidátní geny ovlivňující kvalitu vepřového masa

Většina užitkových vlastností hospodářských zvířat je geneticky podmíněna polygeny. Existují však některé geny „velkého účinku“, které mají značný vliv na kvantitativní vlastnosti. Geny velkého účinku jsou přenášeny na potomstvo většinou mendelisticky. Pokud se ověřuje jejich asociace s množstvím nebo kvalitou produktů, pak se jedná o tzv. kandidátní geny genetických markerů I. nebo III. typu.

V následujících kapitolách jsou uvedeny některé významné geny, které jsou asociovány s kvalitou vepřového masa.

2.3.1 gen *RYS1*

Gen "stresu", halotanový gen (*HAL*); gen ryadinového receptoru (*RYS1*); gen vápníkového kanálu (*CRC*) - to všechno jsou označení pro jeden nejznámější v selekci prasat již využívaný genetický marker.

Na začátku 60. let minulého století byl u některých plemen prasat zjištěn značný výskyt snížení kvality masa v podobě PSE. Experimentálně bylo zjištěno, že výskyt PSE masa je do značné míry podmíněn geneticky. Nositelé PSE masa se rovněž vyznačovali zvýšenou citlivostí ke stresu, což se projevovalo zvýšením tělesné teploty, svalovou ztuhlostí a případně úhynem. Tento jev byl označen jako maligní hypertermie a později jako prasečí stresový syndrom – PSS. Jako genetický původ tohoto syndromu byla identifikována mutace genu, který kóduje uvolňování vápníku. Region umístění genu *RYRI* odpovídá lokalizaci takzvané halotanové vazebné skupině a genu zapříčiňující maligní hypertermii (MA *et al.*, 1988).

Výzkum tohoto genu probíhá už od 80.let minulého století. V roce 1974 byl popsán vznik stresu prasat na základě vdechování anestetického plynu (halotanu) a vyvolání příznaků podobných těm, které byly popisovány u stresového syndromu prasat. Gen odpovědný za vnímavost k halotanu byl nazván *HAL*, ale bylo možné určit pouze jeho vnímavé genotypy (recesivní homozygoty – nn) (Kuciel a kol., 2004). Později byl identifikován jako ryadinový receptor – *RYRI* a nejnověji je potvrzeno, že determinuje protein ve vápníkovém kanálu sarkoplazmatického retikula svalových buněk. Proto se značí *CRC* (Steinhauser a kol., 2000).

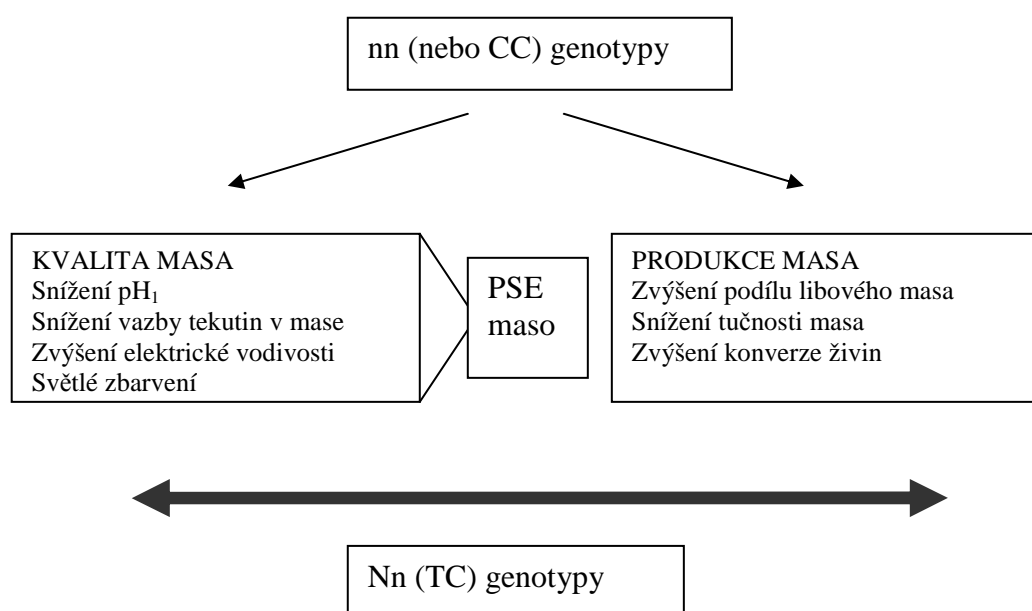
Zjištěním, že příčinou maligní hypertermie je abnormální zvýšení myoplazmatického Ca^{2+} uvolňovaného sarkoplazmatickým retikulem, byla v roce 1991 detekována bodová mutace v genu pro ryadinový receptor kosterních svalů (Kuciel a kol., 2004). Mutace byla detekována v 1843. nukleotidu, kde došlo k substituci cytosinu za tymin (Fujii *et al.*, 1991). Mutace měla za následek náhradu aminokyseliny arginin za cystein, což se ukázalo jako příčina citlivosti k maligní hypertermii. Toto zjištění umožnilo přímou detekci mutace na základě DNA testu (PCR-RFLP). S možností identifikace jednotlivých genotypů pomocí DNA testu se začala objevovat řada výzkumných prací o frekvencích genotypů a alel genu *RYRI* a jejich vlivu na kvalitu vepřového masa.

RYRI se nachází na šestém chromozomu a má dvě alely: dominantní N a recesivní n, citlivou ke stresu. Genotypy tohoto genu jsou v asociaci s několika významnými znaky produkce masa. Gen pro ryanodin- receptor proto představuje první plemenářsky využívaný major gen pro komplexní znak u prasat.

Mnoha výzkumy bylo ověřeno, že vyšší % libové svaloviny mají prasata homozygotně recesivních genotypů *nn*, na rozdíl od genotypů *NN* a *Nn*. Existuje ale pozitivní genetická vazba mezi náchylností ke stresu a podílem libové svaloviny.

Počátkem devadesátých let bylo zjištěno, že některé populace plemen vyznačující se vysokou zmasilostí (*pietrain*, belgická *landrase* a jiné) měly pouze genotypy recesivních homozygotů a vysoký podíl PSE masa (Kuciel *et al.*, 2004).

Obecný vztah genotypů *RYRI* k produkci a kvalitě masa uvádí obrázek č.2



Výskyt PSE masa u genotypů: *NN* = 1 až 5% *Nn* = 25% *nn* = 75 až 80%

Obr. 2. Vliv genotypů genu *RYRI* na produkci a kvalitu vepřového masa (Kuciel *et al.*, 2004)

Souvislosti genotypů *RYRI* s kvalitou masa jsou stále předmětem výzkumu. Byly popsány například difference v obsahu intramuskulárního tuku, v ploše kotlety. Z hlediska produkce a kvality masa jsou pro jateční účely nejvhodnější prasata s heterozygotním genotypem (Steinhauser a kol., 2000).

2.3.2 gen *RN*

Rendament Napole je gen s polymorfismem u plemene hampshire a jeho kříženců. Ve studiích francouzských výzkumníků byla kvalita masa hodnocena hodnotou „Napole“, která byla indikátorem technologické výtěžnosti při výrobě šunky francouzského typu. Zjistilo se, že uvedený gen významně snižuje Napole a tato vlastnost byla označena jako „kyselé maso“ (Kuciel, Lahucky, 1996). Kuciel a Lahucky (1996) uvádějí, že nevýhodná *RN* alela se projevuje vyšším obsahem glykogenu a nižším pH.

Byl zjištěn významný vliv genotypů *RN* genu na úroveň ztrát při zpracování masa. Hamilton et al. (2000) tvrdí, že nosiči *RN* alely měli výrazně nižší konečné pH, větší ztráty okapem a větší ztráty při vaření než jedinci s recesivní alelou. Alela *RN* snižuje i obsah bílkovin v mase a výtěžnost šunky (Kuciel, Lahucky, 1996).

V roce 2000 byly popsány společné efekty genů *RYRI* a *RN*. Tato studia prokázala negativní vliv obou genů na kvalitu čerstvého vepřového masa a naznačila, že kombinace nepříznivého vlivu jsou aditivní na konečném pH, barvě masa a kapacitě vázání tekutin (Kuciel *et al.*, 2004).

2.3.3 Gen *c-myc CM*

První informace o *c-myc* protoonkogenu, jako kandidátním genu pro produkci masa u prasat byly zveřejněny v roce 1999. Produkt *MYC* proto-onkogenu je jaderný fosfoproteid, který je nezbytným faktorem pro růst a diferenciaci buněk a apoptózu. Hraje důležitou roli nejenom v organogenezi, ale také v růstových procesech diferencovaných tkání a orgánů (Kuciel *et al.*, 2004). Aktivuje nebo naopak blokuje expresi cílených genů. Mutace v genu *CM*, které mění regulaci jeho exprese se mohou podílet na vzniku nádorů. *CM* protein také blokuje funkce *MYOD* rodiny a proto je považován za negativní regulátor svalové diferenciaci. Na referenčních rodinách prasat byly zjištěny průkazné rozdíly v % libové svaloviny, ploše kotlety a % masitých částí mezi genotypy *CM* (Steinhauser a kol., 2000). Nedávná studia naznačují existenci asociací mezi *MYC* genotypy a geny *RYRI* (Kuciel *et al.*, 2004).

2.3.4 Gen *MYF4*

Gen myogeninu patří mezi členy genové rodiny MYOD, která kontroluje myogenezi. Tato rodina se skládá u prasat z genu *MYF4* determinujícího myogenin, genu *MYOD1* pro determinaci proteinu myoblastů, genů *MYF5* a *MYF6* (nazvaného také jako herkulin), které jsou významné pro vývin myoblastů. Myogenin má ústřední význam uvnitř MYOD genové rodiny, jelikož exprese myogeninu ruší možnosti dělení myoblastů a reguluje tvorbu jaderných myoblastů do více jaderných myofibril (Kuciel *et al.*, 2004).

Z výsledků práce Holandských výzkumníků Soumillion *et al.* (1997) vyplývá, že gen *MYF4* plní klíčovou funkci svalové diferenciaci kontrolou počáteční fúze myoblastů a založení myofibril. Gen myogeninu má tedy hlavní vliv na počet svalových vláken. U plemene Large White bylo v recentních analýzách zjištěno, že genotypy *MYF4* jsou v asociaci s hmotností selat při narození, s růstem a jatečnou hmotností a s množstvím masa. U prasat pro jatečné účely je nejvhodnější genotyp BB (Steinhauser a kol., 2000).

2.3.5 gen *H-FABP*

První informace o *H-FABP* genu nazývaném také jako gen intramuskulárního tuku (IMT) jsou z roku 1996. Gerbens *et al.* (1997) lokalizovali *H-FABP* gen na šestém chromozomu. Malé proteiny H-FABP jsou členy rodiny, jejichž produkty jsou zapojené do transportu mastných kyselin ve směru od plazmatické membrány na místo jejich využití ve svalových buňkách (Kuciel *et al.*, 2004). Proteiny tohoto genu jsou zahrnuty do genetické proměnlivosti obsahu IMT a jejich polymorfismus může být využit při selekci podporované genetickými markery pro zlepšení obsahu IMT a tím i kvality masa prasat.

2.3.6 gen *MC4R*

Gen melanokortinového-4 receptoru ovlivňuje regulaci chování zvířat při krmení, s vlivem na hmotnost těla prasat. Interakce mezi melanokortiny a jejich receptory (MC3R a MC4R) na bazální části mezimozku je jedním z hlavních neuro-endokrinních spojení v kontrole energetické rovnováhy (Kuciel *et al.*, 2004). V USA studovali *MC4R* jako kandidátní gen pro kontrolu ekonomicky důležitých znaků růstu a užitkovosti prasat. Signifikantní asociace genotypů *MC4R* zjistili s hřbetním tukem a rychlostí růstu v některých liniích a s konverzí krmiva v jiných liniích (Dvořák, Vrtková, 2001).

2.3.7 gen *LEP*

V tukové tkáni je produktem genu tučnosti prasat protein leptin, který reguluje příjem krmiva a výdaje energie. Nejprve byl gen označován jako gen obezity (OB), neboť byla u člověka a myši prokázána souvislost s obezitou.

Polymorfismus genu *LEP* byl popsán v roce 1997 s využitím restriktivního enzymu *HinfI*. V dalším roce byly zjištěny asociace tohoto polymorfizmu, v informativních rodinách odvozených z berlínských miniaturních prasat a plemene durok, k poměru produkce masa a tuku (Kuciel *et al.*, 2004). Kennes *et al.* (2001) vyhodnocovaly čtyři polymorfizmy genu *LEP* u prasat plemene yorkshire, landrase a durok a zjistili, že tyto polymorfizmy byly v nízkých frekvencích nebo nebyly přítomny ve vyhodnocovaných populacích prasat. Dva polymorfizmy byly v asociaci s příjmem krmiva a rychlostí růstu u plemene landrase. Gen *LEP* je tedy kandidátním genem produkce masa, výšky hřbetního tuku, obsahu libového masa a poměru masa a tuku v jatečných půlkách.

2.3.8 gen *IGF2*

Inzulinový růstový faktor 2 spolu s inzulinovým růstovým faktorem 1 a inzulinem patří do rodiny homologních kmenů růstových faktorů IGF. *IGF2* byl popsán v mnoha studiích jako kandidátní gen kvality masa u prasat (Kolaříková *et al.*, 2003). Ovlivňuje zmasilost, rozložení tuku a postnatální růst prasat. Je to autokrinní regulátor buněčné proliferace. Pro výběr nejvhodnějších prasnic a kanců k produkci jatečných prasat je důležitý poznatek o paternálním imprintingu v projevu alel genu *IGF2* (Steinhauser *et al.*, 2000).

2.4 Gen pro resistin

Detekce a identifikace genů ovlivňujících ukládání tuku u prasat je rozhodujícího významu, protože může pomoci nejen zvýšit kvalitu libového vepřového masa za použití selekce pomocí markerů, ale také to může pomoci zlepšit znalosti genetického základu lidské obezity.

2.4.1 Popis a funkce genu *RETN*

Poprvé byl resistin objeven v roce 2001 v adipocytech myši. Tři vědecké týmy objevili resistin nezávisle na sobě používající moderních genomových přístupů s různými cíli. (Steppan a Lazar 2004)

Kim *et al.* (2001) identifikovali resistin pomocí microarray analýzy a označili ho ADSF (adipose secretory factor). Holcomb *et al.* (2001) nalezený resistin označili FIZZ3, pro jeho příbuznost s proteinem indukovaným během zápalu plic známým jako FIZZ1 (found in inflammatory zone 1). Skupina Claire Steppanové, která dala resistinu název pro jeho resistenci k inzulinu, zjistila, že sérový resistin a exprese resistinu v adipocytech byla zvýšená u obézních myši s hodně tučnou stravou.

Hormon byl také označen jako možný chybějící článek mezi obezitou a diabetem 2. typu (Steppan *et al.*, 2001). Nicméně studie u lidí neposkytli důkazy o tom, že resistin hraje klíčovou roli v resistenci k inzulinu nebo obezitě (Steppan, Lazar, 2004). Nedávno se ukázalo, že myši a lidský resistin se liší v mnoha aspektech (Ort *et al.*, 2005).

Resistin patří k resistin - like molekulám (RELMS) a je to hormon vylučovaný ze zralých adipocytů hlodavců a leukocytů člověka. U prasat byla zjištěna největší exprese genu resistinu v leukocytech a málo v tukové tkáni (Dai a kol., 2005). Sled aminokyselin prasečího resistinu se více shoduje s lidským resistinem (74% identita, 81 z 109 aminokyselin) než s resistinem myši (53% identita, 60 z 114 aminokyselin), což poukazuje na možné obdobné fyziologické funkce resistinu u prasat a lidí (Čepica *et al.*, 2006). Nicméně konečná funkce resistinu není plně objasněna a vyžaduje další výzkum.

Myší gen *Retn* a lidský gen *RETN* (alias *ADSF*; *RSTN*; *XCP1*; *FIZZ3*; *RETN1*) mají velikost 4509 a 1369 bp, zahrnují 5 a 4 exony a kódují 114 a 108 aminokyselin, v uvedeném pořadí. (Ghosh *et al.*, 2003). Oproti tomu prasečí gen resistin je složený ze čtyř exonů a má úplně stejnou strukturu exonů jako lidský gen resistinu (Dai *et al.*, 2005)

U lidí mutace *RETN* lokusu byla spojena s obezitou a inzulinovou resistencí (Engert *et al.*, 2002), zatímco u myši se ukázalo, že resistin hraje roli v regulaci

diferenciace tukových buněk (Kim *et al.*, 2001). Tyto výsledky ze studií u lidí a myší podporují spojitost mezi *RETN* a metabolismem tuku i u prasat.

Několik autorů objevilo na chromozomu 2 prasete QTL ovlivňující ukládání tuku. Paternálně exprimovaný QTL ovlivňující svalový růst, uložení tuku a velikost srdce u prasat byl mapován v oblasti genu *IGF2* (Nezer *et al.* 1999, Jeon *et al.* 1999). Z tohoto důvodu může být považován gen *RETN* za poziční kandidátní gen (Čepica *et al.*, 2002). Otieno *et al.* (2005) nedávno mapovali geny související s diabetem u prasat. Asociační analýza ukázala významnou asociaci *RETN* s mramorováním a procentem celkových lipidů v musculus longissimus dorsi.

2.4.2 Lokalizace genu *RETN*

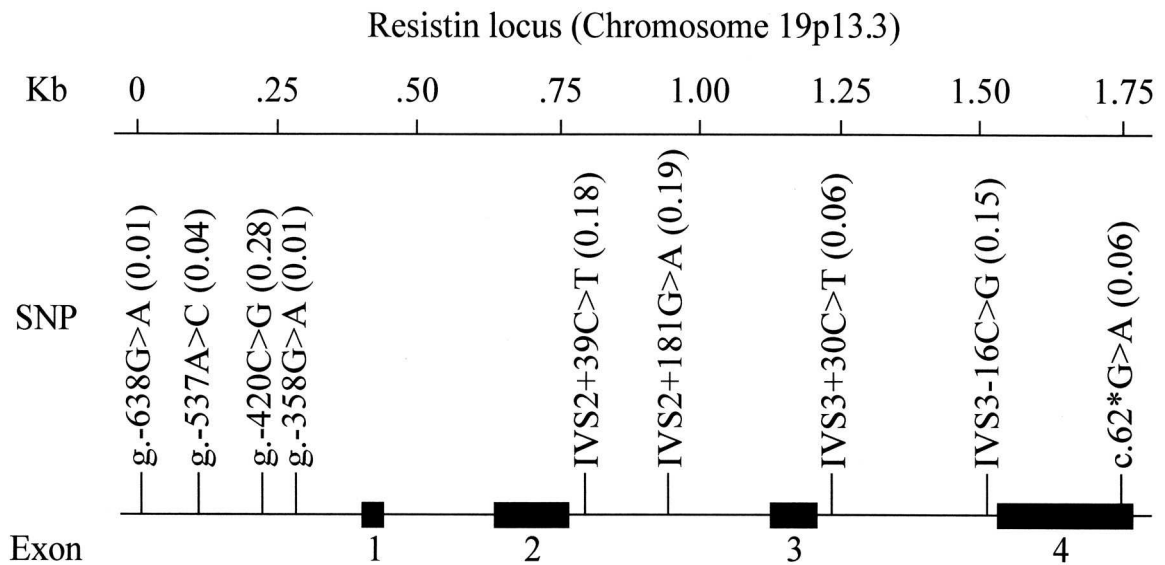
Prasečí gen *RETN* byl cytogeneticky mapován (Čepica *et al.*, 2002). Gen byl nalezen na q-raménku chromozomu 2 a lokalizován do pozice 2q 2.1



Obr. 3. Metafázový chromozom prasete. Dvě značky odpovídající *RETN* se nachází na 2. chromozomu v pozici 2q21. V pravo na obrázku je zobrazen ideogram (Čepica *et al.*, 2002).

2.4.3 Polymorfismus genu *RETN*

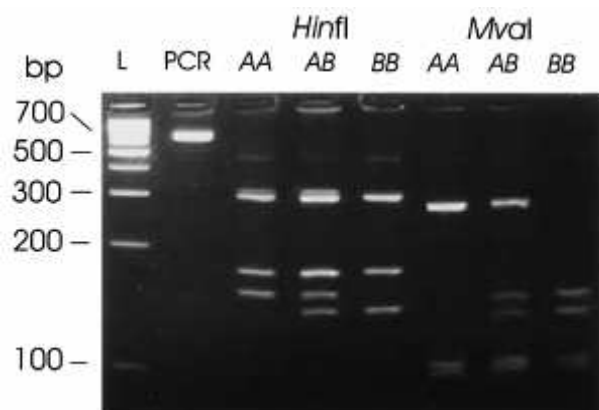
Engert *et al.* (2002) detekovali celkem devět jednonukleotidových polymorfizmů v nekódující oblasti lidského genu *RETN* a zkoumali jejich asociace s obezitou a diabetem u lidí. Zjistili, že u osob, které neměli diabetes byl polymorfismus g.-537 významně asociován se zvýšeným BMI.



Obř. 4. Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) u resistinu. Schématické znázornění lidského *RETN*, struktura exonů a umístění osmi SNP (Engert *et al.*, 2002).

Čepica *et al.* (2002) detekovali u genu *RETN* prasat bialelicky polymorfizmus pomocí restrikčních enzymů *HinfI* and *MvaI*. Zjistili, e restrikční endonukleáza *HinfI* ˇstepı PCR produkt na dva fragmenty o priblizne délce 300 a 190 bp, které jsou přıtomny ve všech genotypech tohoto lokusu. Alela A, u které polymorfní restrikční místo chybí se vyznačuje přıtomnostı třetıho zlomku dlouhego přiblizne 160 bp, zatímco alela B, která obsahuje polymorfní restrikční místo se ˇstepı na fragmenty dlouhé asi 140 a 20 bp (poslední fragment je přilıˇskratky a není na gelu viditelný). Alela A *MvaI* lokusu, v které polymorfní restrikční místo chybí je představovana jedním zlomkem s přibliznou délkou 290 bp, dvěma fragmenty o velikosti 100 bp a několika krátkými zlomky, které nejsou na gelech viditelne, zatímco u alely B, která mí polymorfní restrikční místo, je nejdelıˇı zlomek ˇstepen na dva fragmenty o délce asi 150 bp a 140 bp. Frekvence alel obou polymorfismů zjiıˇstovali u jedinců různých plemen.

Pozdejı Čepica *et al.* (2006) provedli asociační analýzu *HinfI* polymorfismu, která ukázala, e alela *HinfIA* ve srovnání s alelou *HinfIB* je vyznamne asociovaná s vyıˇımi hodnotami u vlastností souvisejících s uložením tuku (tuk na desátém žebru, vyıˇka hřbetnıho tuku na 13/14 žebru, bederní tuk, přumerna vyıˇka hřbetnıho tuku, hmotnost hřbetnıho tuku, hmotnost podkožního tuku na kyte, plocha tuku na 13/14 žebru, hmotnost podkožního tuku na pleci, hloubka tuku na pleci) rychlostí růstu, spotřebou krmiva od 110. do 210. dne a počtem struků.



Obr. 5. Agarosový gel (2%) ukazující genotypy v prasečím genu *RSTN* po štěpení PCR produktů pomocí *HinfI* a *MvaI* (Čepica *et al.*, 2002).

| Breed | Number of animals | Locus | | | |
|---------------------|-------------------|-------------|------|--------------|------|
| | | <i>MvaI</i> | | <i>HinfI</i> | |
| | | A | B | A | B |
| Landrace | 12 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 1.00 |
| Large White | 14 | 0.00 | 1.00 | 0.11 | 0.89 |
| Czech Meat Pig | 15 | 0.00 | 1.00 | 0.03 | 0.97 |
| Black Pied Prestice | 7 | 0.07 | 0.93 | 0.07 | 0.93 |
| Meishan | 7 | 0.79 | 0.21 | 0.79 | 0.21 |
| Hampshire | 6 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 1.00 |
| Piértrain | 6 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 1.00 |
| Duroc | 2 | 0.00 | 1.00 | 0.00 | 1.00 |

Tabulka 1: Frekvence alel *MvaI* a *HinfI* lokusů genu *RETN* u různých plemen prasat (Čepica *et al.*, 2002).

Otieno *et al.* (2005) našli u genu *RETN* polymorfismus pomocí restričního enzymu *SmlI*. Asociační analýza odhalila významný vliv *SmlI* polymorfismu na vlastnosti související s rozložením tuku, růstem, pH bederní svaloviny, WHC a tuhostí masa u rodiny BxY. Zjistili, že genotyp 11 se v porovnání s genotypem 12 vyznačuje vyššími hodnotami mramorování, celkových lipidů, větší pevností masa.

2.5 Molekulárně-genetické metody pro detekci a testování polymorfizmů DNA

Molekulárně-genetické metody slouží především k identifikaci genetických markerů, konstrukci genetických map a lokalizaci genů podílejících se na užitkovosti (QTL-quantitative trait loci, ETL- economic trait loci, kandidátní geny).

Metody jsou popsány podle Knolla a Vykoukalové (2002).

2.5.1 Elektroforéza (ELFO)

Elektroforéza (ELFO) je nejdůležitější technika na separaci (dělení) nukleových kyselin. Je to fyzikálně chemická metoda pro dělení látek v elektrickém poli. Zařízení se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrům; vlastního držáku gelu, ve kterém k separaci dochází; a externího zdroje stejnosměrného napětí. Gelový přípravek se nalije do vaničky (agarózová ELFO) nebo mezi skla (polyakrylamidová ELFO) a nechá se ztuhnout. Jamky (starty) pro umístění vzorků se tvoří pomocí tzv. hřebenů s definovanou šířkou, které se vsunou do gelu před zatuhnutím. DNA migruje směrem k anodě (+ pólu). Rychlost pohybu DNA závisí jednak na jejích vlastnostech (molekulová hmotnost, elektrický náboj, prostorové uspořádání), vlastnostech nosiče (gelu), prostředí (pufru) a na přivedeném napětí. Obecně platí, že molekuly větší velikosti a složitější prostorové struktury prochází gelem pomaleji, tj. zůstávají blíže místu nasazení vzorků (startu). Pro separaci molekul o určité velikosti je třeba volit správnou koncentraci gelu.

2.5.1.1 Agarózová elektroforéza

Prostředím pro dělení je gel z agarózy (polysacharid izolovaný z mořských řas). Přípravuje se rozvařením práškové agarózy v elektroforetickém pufru, tuhne za pokojové teploty. Gely se většinou sestavují jako horizontální (separace na vodorovné ploše). Koncentrace agarózy určuje velikost pórů a tím prostupnost pro DNA určité velikosti. Homogenita a rozlišovací schopnost je nižší než u PAGE, ale špičkové vysoce kvalitní agarózy se vlastnostem polyakryl amidu přibližují. Velmi snadná příprava gelů však tuto nevýhodu vyváží.

Jako elektroforetické pufrů se používají TAE (trisacetátový pufr), což je nejpoužívanější elektroforetický pufr, jeho pufráční kapacita je však nízká, tudíž je vhodný

pro větší fragmenty DNA, a TBE (trisborátový pufr), který má lepší pufrální schopnost než TAE a je vhodný pro menší fragmenty.

Vizualizace elektroforetických gelů se provádí nejčastěji pomocí ethidiumbromidu (EtBr). Využívá se vlastnosti fluorescenční molekuly EtBr interkalovat (vmezeřovat se) do vlákna nukleových kyselin. Detekuje dvouřetězcové i jednořetězcové molekuly, ale citlivost k jednořetězcům je výrazně nižší. EtBr je silný mutagen a toxická látka, proto je nutné dodržovat bezpečnostní opatření.

2.5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda byla poprvé popsána v roce 1985 (Saiki a kol. 1985). Je to základní molekulárně-genetická metoda, která slouží k získání dostatečného množství specifické DNA pro další analýzy a v některých svých modifikacích může sloužit k identifikaci polymorfizmů.

Metoda je založena na extenzi primerů a geometrické amplifikaci (namnožení) molekul DNA za cyklického opakování tří kroků lišících se pouze teplotními podmínkami. Syntézu DNA řízenou templátem (matricovou DNA) katalizuje teplotně resistantní DNA polymeráza (např. *Taq*). PCR umožňuje současnou syntézu obou komplementárních vláken extenzí dvou primerů (jednořetězcových oligonukleotidů) připojených ke komplementárním řetězcům na protilehlých koncích templátu. Umístění obou primerů tak ohraničuje amplifikovaný úsek DNA. Každý cyklus PCR zahrnuje teplotní denaturaci DNA, připojení primerů (annealing) a syntézu DNA (elongace). V každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí a tím se zdvojnásobí množství templátu pro následující cyklus. V důsledku toho dochází k exponenciální amplifikaci, tj. z každé molekuly původního templátu bude vytvořeno 2^n kopií, kde n je počet cyklů. Například po 30 cyklech by mělo dojít zhruba k 10^{10} násobnému namnožení DNA.

V praxi je však amplifikace limitována koncentrací substrátů a aktivitou enzymu. Obecně $10^5 - 10^6$ násobné amplifikace může být dosaženo v 30 až 50 cyklech. Účinnost amplifikace je odhadována mezi 60 a 85%, může být snížena přítomností většího množství templátu (Saiki *et al.*, 1988). Zvyšuje se totiž pravděpodobnost hybridizace templátu s komplementárním řetězcem DNA, místo s primerem. Na účinnost amplifikace má také vliv nespecifická hybridizace primerů s jinými sekvencemi na celkové DNA.

Složení reakční směsi:

Kromě DNA obsahuje reakční směs pufr pro DNA polymerázu, směs nukleotidů (dNTP), pár primerů specifických pro cílovou sekvenci, termostabilní DNA polymerázu a různá aditiva zvyšující účinnost a specifiku reakce.

Teplotní a časový průběh reakce:

PCR probíhá inkubací vzorků při třech teplotách odpovídajících třem krokům v amplifikačním cyklu: denaturaci, annealing a elongaci. Obvykle je dvouvláknová DNA denaturována krátkým zahřátím vzorku na 90-95°C, primery jsou schopny nasedání na své komplementární sekvence při krátkém ochlazení na 40-60°C (annealing) a následuje zahřátí na 72°C, kdy se prodlužují připojené primery pomocí *Taq* polymerázy (elongace).

Většina teplotních profilů, které poskytují dobré výsledky je složena z denaturace při 93-95°C 15-30 sekund, annealing při 55-65°C 15-30 sekund a extenze při 72°C po dobu 30-60 sekund.

Díky komplexu interakcí mezi jednotlivými složkami v PCR směsi (hlavně mezi primery a vzorky DNA) a široké různorodosti využití této techniky, je nemožné specifikovat jednu sadu reakčních podmínek, které by byly optimální ve všech situacích, ale je nutno optimalizovat každou PCR reakci zvlášť.

Využití PCR pro detekci mutací:

Ve specifických případech může být pomocí PCR přímo stanoven polymorfismus DNA (různá délka amplifikovaného produktu vlivem delecí). Bylo vyvinuto mnoho modifikací PCR, které umožňují detailní stádium sekvencí DNA. Pro další analýzy mutací, případně polymorfizmů (a to buď v celé genomové DNA nebo jen v získaném PCR fragmentu) je možné využít další metody, jako např. PCR-RFLP.

2.5.3 Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

Pomocí RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restričního místa. Genomová DNA je štěpena příslušnou restriční endonukleázou, separována elektroforézou na agarózovém gelu a přenesena (blotována) na pevnou membránu pomocí tzv. Southernova přenosu (Southern, 1975). Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizací lze zjistit

polymorfizmus ve velikosti vzniklých restrikčních fragmentů DNA. Metoda je vhodná pro vazbové i komparativní mapování a odhalení variability v kandidátních genech pro ekonomicky významné znaky. Vzhledem k relativní pracnosti metody se dnes dává přednost její modifikaci vzniklé spojením s PCR (PCR-RFLP).

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které se specificky vážou na DNA a štěpí ji ve specifických místech nacházejících se uvnitř, nebo blízko rozpoznávací sekvence. Tyto enzymy jsou rozděleny do tří skupin: endonukleázy I, II a III. Endonukleázy I a III nemají přesnou polohu štěpení vzhledem k rozpoznávací sekvenci a proto se běžně nepoužívají. V molekulární genetice se používají endonukleázy typu II, které štěpí vždy ve stejném místě nacházejícím se v rozpoznávací sekvenci a nebo v její těsné blízkosti. Rozpoznávací sekvence jsou dlouhé čtyři, pět nebo šest nukleotidů a jsou oboustranně symetrické. Je jich známo kolem 3000 a tvoří 250 různých restrikčních míst.

2.5.4 PCR-RFLP

Pomocí PCR se na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí panelem restrikčních endonukleáz. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém gelu. Vizualizace DNA se provádí pomocí ethidiumbromidu. Výhodou metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost mutace (polymorfizmu) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. Metoda je vhodná pro geny s větším polymorfizmem nebo nekódující sekvence (analýzy intronů).

3 Materiál a metody

3.1 Zvířata

Pro identifikaci genotypů genu *RETN* byly použity vzorky DNA pocházející od 63 prasat z celkem jedenácti šlechtitelských chovů v ČR. Nejvíce bylo zastoupeno plemeno Přeštické černostrakaté a to v počtu 39 zvířat z těchto šlechtitelských chovů: ZD Dřevěč-Kožlany (chov Černíkovice), Dolní Lukavice (chovy Libákovice, Řenče, Předenice), ZD Hvozd u Plas (chov Dražeň), Karlovická zemědělská a.s.(chov Výrov), ZD Merklín (chov Buková), ZD Mladotice, Respo s.r.o. Tachov (chov Částkov) a Žihelský statek a.s. (chov VČ Hať). Dále plemeno Bílé ušlechtilé v počtu 18 zvířat z chovů Višňová a Frahelž. Nakonec bylo ještě genotypováno 6 zvířat plemene Landrase pocházejících z chovu Frahelž.

3.2 Metody stanovení genotypů

Stanovení genotypů genu *RETN* zahrnovalo PCR reakci s následnou kontrolou PCR produktu, štěpení PCR produktu restriční endonukleázou (RFLP) a vlastní vyhodnocení výsledného RFLP produktu pomocí gelové elektroforézy (ELFO) na agarózovém gelu.

Metodika testace byla použita dle publikace Čepica *et al.*(2002).

3.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Původní parametry PCR byly modifikovány z důvodu použití jiné DNA polymerázy (LA Taq) a také proto, aby se snížila doba trvání reakce. Byly použity primery RSTN P-A a RSTN P-B odpovídající v publikaci páru B. Reakce PCR probíhala v termocykleru PTC-100 (MJ Research, Inc.)

Kontrola PCR produktu byla provedena pomocí ELFO na 2 % agarózovém gelu obsahujícím ethidiumbromid, který byl přidáván v množství 1 μ l u znovu používaného gelu. PCR produkt byl po ukončení elektroforézy zkontrolován na transluminátoru a poté vyfotografován.

Použitý marker: M100 - Gene Ruler 100bp DNA Ladder, firma Fermentas, jednotlivé délky fragmentů (bp) - 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100. Délka PCR produktu : 653 bp.

Sekvence primerů (Čepica a kol., 2002):

RSTN P-A: 5'-TCA AGC CAG CCC CAG TCT C-3'

RSTN P-B: 5'-GTG GGT GGT GGG GCA GTT G-3'

Obsah reakční směsi:

| Složka | Množství [μl] |
|------------------|---------------|
| H ₂ O | 10,8 |
| pufř 10x LA | 2,5 |
| dNTP | 0,5 |
| primer RSTNP-A | 0,5 |
| primer RSTNP-B | 0,5 |
| LA DNA Pol. | 0,2 |
| Celkem | 15 |

Podmínky cyklování:

původní - 95°C/ 2min, 30 x (95°C/45min, 63°C/45min, 72°C/30min), 72°C/7min

modifikace – počáteční denaturace 95°C/2min

| | | |
|------|---|-------------------------------|
| 30 x | { | denaturace 95°C/20min |
| | | annealing 65°C/20min |
| | | elongace 68°C/30min |
| | | závěrečná elongace 68°C/7 min |

3.2.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

PCR produkt (653 bp) byl štěpen pomocí restrikční endonukleázy *Mva*I. Na základě polymorfního místa se odlišují 2 alely. Alela A, v které polymorfní restrikční místo chybí je představována jedním zlomkem s přibližnou délkou 290 bp, dvěma fragmenty o velikosti 100 bp a několika krátkými zlomky, které nejsou na gelech viditelné, zatímco u alely B, která má polymorfní restrikční místo, je nejdelší zlomek štěpen na dva fragmenty o délce asi 150 bp a 140 bp. Existují tedy 3 genotypy: AA, AB, BB. Použitý marker: M100 - GeneRuler 100bp DNA Ladder od firmy Fermentas, jednotlivé délky fragmentů (bp) - 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100; M50 - GeneRuler 50bp DNA Ladder

od firmy Fermentas, jednotlivé délky fragmentů (bp) - 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 a 50.

RFLP analýza:

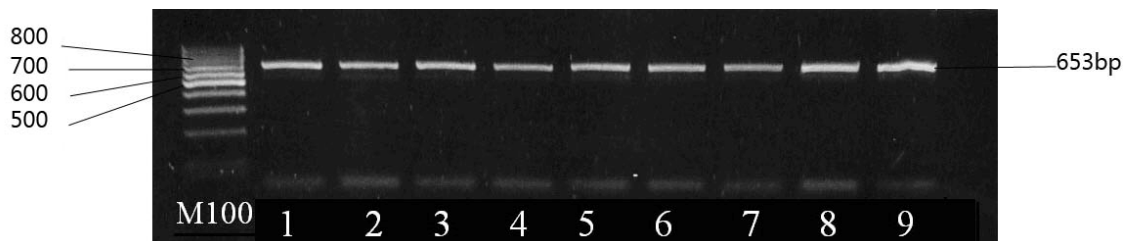
15 μ l: tj. 10 μ l PCR produktu + 5 μ l MM (Master Mixu)

MM obsahoval: 3,4 μ l H₂O + 1,5 μ l pufr R+ + 0,1 μ l *Mva*I

Takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc při 37°C. Pro vizualizaci jednotlivých genotypů byla provedena ELFO na 2 % agarózovém gelu obsahujícím ethidiumbromid. Výsledek PCR-RFLP byl po ukončení elektroforézy zjišťován na transluminátoru a poté vyfotografován.

4 Výsledky a diskuze

U všech vzorků byla úspěšně provedena PCR reakce, příklad výsledku je zobrazen na obr. 6.

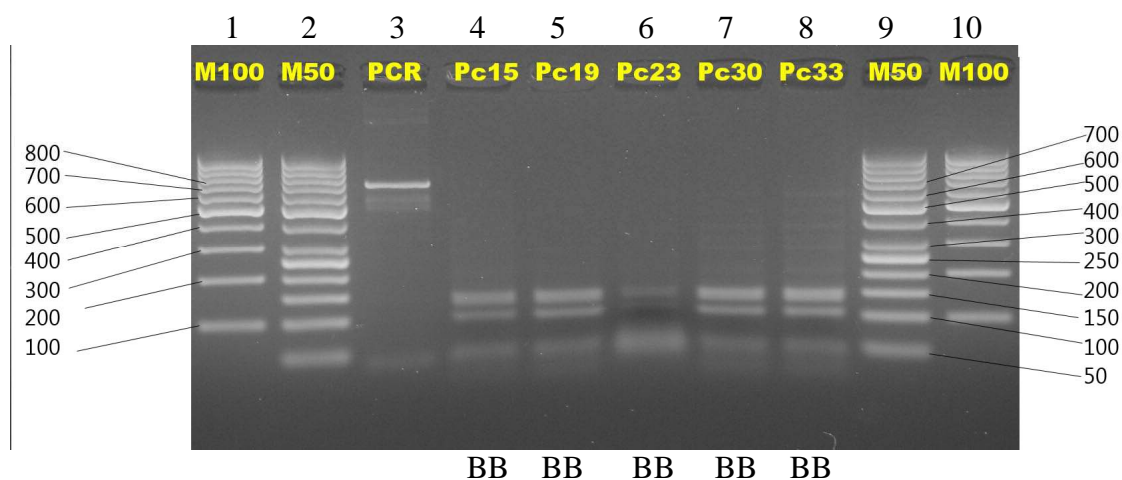


Obr. 6. Kontrola PCR produktu na agarózovém gelu.

(M100)- velikostní marker: GeneRuler 100bp DNA Ladder, firma Fermentas.

(1- 9) – PCR produkty délka 653bp,

Pomocí metody PCR-RFLP byly stanoveny genotypy genu *RETN* celkem u 63 prasat z 11 komerčních chovů. U všech testovaných zvířat byl stanoven genotyp BB, viz obr. 7.



Obr. 7. Ukázka štěpení některých vzorků: (1, 10) velikostní marker: GeneRuler 100bp DNA Ladder, firma Fermentas, jednotlivé délky fragmentů (bp) - 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 a 100; (2, 9) velikostní marker: GeneRuler 50bp DNA Ladder, firma Fermentas, jednotlivé délky fragmentů (bp) - 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 a 50; (3) PCR produkt délka 653bp; (4-8) ukázka vzorků po RFLP, genotypy BB, délka fragmentů 150 bp a 140 bp .

Nejprve bylo testováno 39 jedinců plemene přeštické černostrakaté a to z důvodu předpokládané frekvence výskytu alel podle Čepici *et al.* (2002), jak ukazuje tabulka 1. U vzorku číslo 33 byl nejprve stanoven genotyp AB, ale po kontrolním opakování PCR-RFLP byl určen genotyp BB. V prvním případě šlo zřejmě o nedoštěpení vzorku. Dále bylo genotypováno 24 jedinců plemene Bílé ušlechtilé a Landrase pocházejících z chovů Višňová a Frahelž, ale ani u toho souboru zvířat nebyla stanovena alela A, což vyloučilo asociační analýzu genu. Z výsledků vyplývá, že sledovaný soubor testovaných prasat je monomorfní.

Čepica *et al.* (2002) uvádí u 7 jedinců plemene Pc tyto frekvence alel: A = 0,07 a B = 0,93; u 12 zkoumaných jedinců plemene L uvádí pouze výskyt alely B. Z uvedeného vyplývá, že u plemene Přeštické černostrakaté se tedy pravděpodobně alela A vyskytuje pouze ve velmi nízké frekvenci a náhodnost výběru způsobila, že se alela A vyskytla i u tak malého počtu zkoumaných jedinců.

Tato velmi nízká frekvence výskytu alely A přesto neposkytuje možnost provádět asociační analýzu genu, neboť výsledky takovéto analýzy by nebyly statisticky průkazné. U sledovaného souboru je tedy tento polymorfismus nepoužitelný, proto by bylo lepší dále tento polymorfismus netestovat.

Bylo by vhodné testovat u daného souboru zvířat jiný polymorfismus. Vzhledem k současným znalostem o genu *RETN* a jeho polymorfizmech se jeví jako nejvhodnější řešení nové genotypování zvířat pomocí PCR-RFLP za použití restričního enzymu *HinfI*. Tato restriční endonukleáza detekuje u genu *RETN* 14 bp inzerci.

V budoucnu je třeba dalšího testování jednotlivých polymorfizmů genu *RETN* a zkoumání jejich asociací s obsahem tuku u prasat.

5 Závěr

Gen *RETN* kóduje hormon resistin, který byl poprvé objeven v roce 2001 v adipocytech myši. V současné době je gen *RETN* zkoumán jako kandidátní gen asociovaný s obsahem tuku u prasat.

Pomocí metody PCR-RFLP byly stanoveny genotypy genu *RETN* u souboru 63 zvířat. Bylo provedeno štěpení PCR produktu pomocí restriční endonukleázy *MvaI*. U všech testovaných zvířat byl však stanoven pouze genotyp *RETN* BB. Z toho lze usuzovat na to, že soubor prasat je monomorfní, a není tedy možné provádět asociační analýzu genu *RETN*. Bylo by vhodné testovat u daného souboru zvířat jiný polymorfismus, jako je například *HinfI* (detekuje 14 bp inzerci).

Gen pro resistin byl objeven teprve před několika lety. Znalosti o tomto genu nejsou tedy ještě zcela úplné. Do budoucna je tedy určitě významné sledovat vliv polymorfizmů tohoto genu na obsah tuku u prasat.

6 Seznam použité literatury

- ČEPICA, S.; ROHRER, G.A.; MASOPUST, M.; KUBÍČKOVÁ, S.; MUSILOVÁ, P. & RUBEŠ, J. Partial cloning, cytogenetic and linkage mapping of the porcine resistin (RSTN) gene. *Animal Genetics*, 2002, no. 33, p. 381-3.
- ČEPICA, S.; KNOLL, A.; MASOPUST, M.; VYKOUKALOVÁ, Z.; BANTERSCHLAGER, H.; NONNEMAN, D.; ROHRER, G.A.; GELDERMANN, H. Allelic variation in porcine resistin (*RETN*) gene is associated with fatness traits in a Wild Boar x Meishan reference family. In Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Brazil. August 20-25, 2006, CD ISBN: 85-85584-03-3
- DAI, M.H.; XIA, T.; CHEN, X.D.; GAN, L.; FENG, S.Q.; QIU, H.; PENG, Y.; YANG, Z.Q. Cloning and characterization of porcine resistin gene. *Domestic animal endocrinology*, 2006, vol.30, no. 2, p. 88-97
- DVOŘÁK, J.; VRTKOVÁ, I. *Malá genetika prasat II.*, MZLU v Brně, 2001, 91s.
- GERBENS, F.; RETTENBERGER, G.; LENSTRA, J.A.; VEERKAMP, J.H.; te PAS, M.F. Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mamm Genome*, May 1997, vol.8, no. 5, p. 328-32.
- GHOST, S.; SINGH, A.K.; ARUNA, B.; MUKHOPADHYAY, S.; EHTESHAM, N.Z. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene*, 2003, no. 305, p. 27-34.
- FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; de LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MacLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 1991, vol. 253, no. 5018, p. 448-51.
- HAMILTON, D. N.; ELLIS, M.; MILLER, K. D.; McKEITH, F.K.; PARRETT, D.F. The effect of Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs, *J. Anim. Sci.*, 2000, no. 78, p. 2862 – 2867.
- HOLCOMB, I.N.; KABAKOFF, R.C.; CHAN, B.: FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*, 2000, vol. 19, no. 15, p.4046–55.

- INGR, I.: *Technologie masa*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1996. 290 s.
- JAKUBEC, V.: Molekulární genetika ve šlechtění II. – úloha markerů ve šlechtění. *Náš chov*, 2002a, č. 8, s.39-41
- JAKUBEC, V.: Molekulární genetika ve šlechtění III. – využití markerů ve šlechtění. *Náš chov*, 2002b, č. 9, s. 45-46
- JEON, J-T.; CARLBORG, O.; TORSTENN, A.; GIUFFRA, E.; AMARGER, V.; CHARDON, P.; ANDERSON-EKLUND, L.; ANDERSSON, K.; HANSSON, I.; LUNDSTRON, K. & ANDERSSON, L.: A paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle mass in pigs maps to the *IGF2* locus. *Nat Genet*, 1999, no. 21, p.157-8.
- KENNES, Y.M.; MURPHY, B.D.; POTHIER, F.; PALIN, M.F.: Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits. *Anim Genet.*, 2001 Aug, vol. 32, no. 4, p. 215-8.
- KIM, K-H.; LEE, K.; MOON, Y.S.; SUL, H.S.: A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2001; vol. 276, p. 11252–6.
- KOLAŘÍKOVÁ, O.; PUTNOVÁ, L.; URBAN, T.; ADÁMEK, J.; KNOLL, A.; DVORÁK, J. Associations of the *IGF2* gene with growth and meat efficiency in Large White Pigs. *Journal of Applied Genetics*, 2003, 4 (44), p. 509-513.
- KUCIEL, J.; BEDNÁŘ, J.; URBAN, T.: *Genetika zemědělských produktů*, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2004. 137 s.
- KUCIEL, J.; LAHUCKY, R.: Genes with major effect on pork quality. *Živoč. výr.*, 1996, roč. 41, č. 10, s. 475 – 480.
- MA, J.; FILL, M.; KNUDSON, C.M.; CAMPELL, K.P.; CORONADO, R.: Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction – type channel. *Science*, 1988, vol. 242, p. 99 – 102.
- Ministerstvo zemědělství České republiky: Vepřové maso. *Situační a výhledová zpráva*. Srpen 2006, 67 s.
- NEZER, C.; MOREAU, L.; BROUWERS, B.; COPPIETERS, W.; DETILLEUX, J.; HANSET, R.; KARIM, L.; KVASZ, A.; LEROY, P. & GEORGES, M. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the *IGF2* locus in pigs. *Nat Genet*, 1999, no. 21, p. 155-156.

- O'BRIEN, S. J. Mammalian genome mapping: lesson and prospects. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1991, vol. 1, no. 1, s. 105-111. ISSN 0959-437X.
- ORT, T.; ARJONA, A.A.; MacDOUGALL, J.R.; NELSON, P.J.; ROTHENBERK, M.E.; WU, F.; EISEN, A. & HALVORSEN, Y-D. C.: Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. *Endocrinology*, 2005, vol. 146, p. 2200-9.
- OTIENO, C.J.; BASTIAANSEN, J.; RAMOS, A.M. & ROTHCHILID, M.F.: Mapping and association studies of diabetes related genes in the pig. *Anim Genet*, 2005, vol. 36, p. 36-42.
- PIPEK, P.: Technologie masa 1. 3., preprac. vyd Praha : VŠCHT, 1993. 210 s., ISBN: 80-7080-174-3.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A.; Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, vol. 239, no. 4839, p. 487-491
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, M.: Enzymatic Amplification of beta- globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sidole cell aneamia. *Science*, 1985, vol. 230, p. 1350-1354
- SOUMILLION, A.; ERKENS, J.H.; LENSTRA, J.A.; RETTENBERGER, G.; te PAS, M.F.: Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. *Mamm Genome*, 1997, vol. 8, no. 8, p. 564-568.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 1975, vol. 98, p. 503-518
- STEINHAUSER, L.; BEŇOVSKÝ, R.; BYSTRICKÝ, P.; CABADAJ, R.; ČERNÝ, H.; DVOŘÁK, J.; INGR, I.; KEREKRÉTY, J.; KUBÍČEK, K.; MÁTÉ, D.; MINKS, J.; NAGY, J.; NOVÁK, P.; PIPEK, P.; SIMEONOVÁ, J.; SOVJAK, R.; STEINHAUSEROVÁ, I.; STRAKOVÁ, E.; SUCHÝ, P.; ŠUBRT, J.; ŠVICKÝ, E.; VEČEREK, V.; VRCHLABSKÝ, J.; ZABLOUDIL, F.: *Produkce masa*, Last, 2000, 464 s. ISBN 80-900260-7-9.

STEPPAN, C.M.; BAILEY, S.T.; BHAT, S.; BROWN, E.J.; BANERJEE, R.R.; WRIGHT, C.M.; PATEL, H.R.; AHIMA, R.S.; LAZAR, M.A.: The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 2001, 409(6818), p.307-312.

STEPPAN CM, LAZAR MA. The current biology of resistin. *Journal of internal medicine*, 2004, 255(4), p.439-47. Review.

ŠIMEK, M.; ZEMANOVÁ, D.; DVOŘÁK, J.: *Produkce kvalitního vepřového masa s vysokou nutriční hodnotou. Metodika pro zemědělskou praxi*, UZPI Praha, 1998, 24 s., ISBN 80-86153-82-7.

7 Seznam použitých zkratek

ADSF (adipose secretory factor) –syn. *RETN*, hormon resistin

ATP – adenosintrifosfát

bp (base pair) - pár bazí, označuje velikost molekuly DNA

BxY – rodina kříženců plemen Berkshire a Yorkshire

CRC – calcium release channel, syn. *RYR* ryadinový receptor nebo *HAL* halotanový gen

DFD (dark firm dry) – vada masa; tmavé, tuhé a suché

DNA (deoxyribonucleic acid) – deoxyribonukleotidová kyselina

ELFO (electrophoresis) – elektroforéza

EtBr – ethidium bromid

ETL (economic trait loci) – lokusy ekonomických znaků

FIZZ1(found in inflammatory zone 1) - protein indukovaný během zápalu plic

FIZZ3 - syn. *RETN*, hormon resistin

HAL – halotanový gen

H-FABP (heart fatty acid-binding protein) – gen proteinu vážícího mastné kyseliny

IGF-2 (insuline growth like factor 2) – inzulinu podobný růstový faktor 2

L- plemeno Landrase

LEP – gen pro leptin

MC4R – gen pro receptor melanocyty stimulujícího hormonu

MYF- 4 – myogenic factor 4, syn. *MYOG*, gen myogeninu

MYF- 5 – myogenic factor 5

MYF- 6 – myogenic factor 6

MYOD – rodina myogenetických faktorů

MYOD-1 – myogenetický faktor 3, syn. *MYF-3*

PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)- polyakrylamidová gelová elektroforéza

Pc – plemeno Přestické černostrakaté

PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism)

PCR (polymerase chain reaction) – polymerázová řetězová reakce

PSE (pale soft exudative) - bledé, měkké a vodnaté maso, vada masa

QTL (quantitative trait loci) – lokusy kvantitativních znaků

RETN- gen pro resistin

RN – Rendement Napole

RSTN – syn. *RETN* , gen pro resistin

RFLP (restriction fragment length polymorphism) – polymorfizmus délky restričních fragmentů

RFLP (restriction fragment length polymorphism) - polymorfizmus délky restričních fragmentů

SNP (single – nucleotide polymorphism) – jednonukleotidový polymorfizmus

TAE – trisacetátový pufr

Taq - DNA polymerázy izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*

TBE – trisborátový pufr

WHC (water-holding capacity) – vaznost masa