

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Evidenčné číslo 2118284

Stanovenie polymorfizmu leptínového génu *Bos taurus*

2010

Bc. Alžbeta BÁTOVSKÁ

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Stanovenie polymorfizmu leptínového génu *Bos taurus*

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Študijný program: Aplikovaná biológia
Študijný odbor: 4.2.1 Biológia
Školiace pracovisko: Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Školiteľ: prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.
Konzultant: RNDr. Vladimír Meluš, PhD.

Nitra 2010

Bc. Alžbeta BÁTOVSKÁ

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV
Katedra genetiky a plemenárskej biológie

Akademický rok: 2009/2010

ZADÁVACÍ PROTOKOL ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Študent: Bc. Alžbeta Bátovská

Študijný odbor: Biológia

Študijný program: Aplikovaná biológia

Fakulta: Fakulta biotechnológie a potravinárstva

**V zmysle ustanovení príslušných článkov študijného poriadku SPU
v Nitre Vám zadávam tému záverečnej práce:**

Stanovenie polymorfizmu leptínového génu *Bos taurus*

Cieľ práce:

- Naštudovať, pochopiť a zvládnuť molekulárno- biologické prístupy analýzy hospodárskych zvierat so zameraním na *Bos taurus*.
- Samostatné zvládnutie základných laboratórnych techník: izolácie DNA, PCR, RFLP, VNTR a testovanie konkrétnych znakov u plemien hovädzieho dobytká.
- Zhodnotenie výsledkov laboratórnych analýz vzhľadom ku špecifikám plemien.

Rámcová metodika práce:

Zvládnutie techník izolácie a purifikácie DNA z periférnej krvi. Získanie praktických zručností pri optimalizácii PCR a zvládnutie potenciálnych úskalí tejto metódy. Samostatná práca pri vyšetrovaní vzoriek hovädzieho dobytká na

prítomnosť jednotlivých SNP. Časový harmonogram vypracovania práce bude u presnený podľa konkrétneho harmonogramu teoretickej výuky v jednotlivých semestroch.

Rozsah grafických prác: 0

Rozsah textovej časti: 44

Literatúra: 45- 49

Vedúci diplomovej práce: prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.

Konzultant: RNDr. Vladimír Meluš, PhD.

Dátum zadania diplomovej práce: 18. november 2008

Dátum odovzdania diplomovej práce: 2010

prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.

prof. Ing. Daniel Bíro, CSc.

Vedúci katedry

Dekan

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Alžbeta Bátovská vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému: „Stanovenie polymorfizmu leptínového génu *Bos taurus*“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre, 14.4.2010

Alžbeta Bátovská

POĎAKOVANIE

Chcem vyjadriť vďaku mojim školiteľom prof. Ing. Alojzovi Kúbekovi, CSc. a RNDr. Vladimírovi Melušovi, PhD., za cenné rady a pomoc pri vypracovávaní mojej práce.

Poďakovanie patrí aj mojim rodičom, bez zázemia ktorých by nevznikla ani táto diplomová práca.

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo na základe poznatkov z odbornej literatúry a výsledkov našej experimentálnej práce zvládnuť molekulárno- biologické prístupy analýzy hospodárskych zvierat s dôrazom na hovädzí dobytok. Práca je zameraná na gén pre hovädzí leptín. Jednonukleotidový polymorfizmus tohto génu (substitúcia A→T v nukleotidovej pozícii 252 exónu 2) bol v predošlých prácach asociovaný so zvýšeným príjmom potravy (alela T). Pre laboratórne stanovenie bola použitá metóda PCR- RFLP (polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov), ktorá je dnes štandardným systémom genotypizácie hospodárskych zvierat. Na základe vyšetrenia 124 zvierat (plemien Charolais a Slovenské pinzgauské) môžeme usúdiť, že populácie sú v genetickej rovnováhe danej Hardyho- Weinbergovým zákonom.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: leptín, PCR- RFLP, genetické markéry, genotyp

ABSTRACT

The aim of our study was to master the molecular-biological approaches of livestock analysis on the ground of findings in literature and results of our experimental work, with the emphasis on the cattle. The work is focused on the bovine leptin gene. A single nucleotide polymorphism of the gene (substitution A →T at the nucleotide position 252 of the exon 2) has been associated in the previous studies with the increased feed intake (allele T). For laboratory analysis was used PCR-RFLP method (restriction fragments length polymorphism), which is today a standard system of the livestock genotyping. On the ground of the examination of 124 animals (Charolais and Slovakian Pinzgau breeds) we can deduce, that populations are in the Hardy-Weinberg genetic equilibrium.

KEY WORDS: leptin, PCR-RFLP, genetic markers, genotype

OBSAH

OBSAH9
ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK11
ÚVOD.12
1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY DOMA A V ZAHRANIČÍ	.13
1.1 Leptín13
1.1.1 Štruktúra leptínu13
1.1.2 Funkcia leptínu15
1.1.3 Mechanizmus účinku leptínu u ľudí15
1.1.4 Leptín u hovädzieho dobytku16
1.2 Hovädzí dobytok17
1.2.1 Pinzgauské plemeno.17
1.2.2 Charolais18
1.3 Genetické markéry19
1.3.1 Charakteristika genetických markérov19
1.3.2 Klasifikácia genetických markérov20
1.3.3 Využitie genetických markérov20
1.3.4 Mapovanie genómu hospodárskych zvierat21
1.4 Metódy analýz nukleových kyselín21
1.4.1 Izolácia DNA21
1.4.2 PCR22
1.4.3 RFLP23
2 CIEĽ PRÁCE25

3 MATERIÁL A METÓDY	.26
3.1 Materiál	.26
3.1.1 Oligonukleotidové primery	.26
3.1.2 Enzýmy	.26
3.1.3 Tlmivé roztoky	.26
3.1.4 Chemikálie	.27
3.1.5 Roztoky	.27
3.1.6 Prístroje	.28
3.2 Metódy	.28
3.2.1 Izolácia DNA	.28
3.2.2 Amplifikácia DNA	.29
3.2.3 Štiepenie DNA	.31
3.2.4 Elektroforetická separácia DNA	.33
3.2.5 Štatistické vyhodnotenie výsledkov	.33
4 VÝSLEDKY PRÁCE	.35
4.1 Stanovenie markéru A→T exónu 2 pre leptín	.35
4.2 Overenie genetickej rovnováhy v populácii zvierat	.37
5 DISKUSIA	.40
6 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV	.43
7 ZÁVER	.44
8 POUŽITÁ LITERATÚRA	.45
9 PRÍLOHY	.50

Zoznam použitých skratiek

- A-** adenín
- bp-** báзовý pár
- Clal***- reštrikčná endonukleáza
- C-** cytozín
- DNA-** deoxyribonukleová kyselina
- dNTP-** deoxyribonukleotid trifosfáty
- G-** guanín
- Lep-** leptín
- P-** štatistická významnosť testu
- PCR** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction)- polymerázová reťazová reakcia
- PCR- RFLP** (**R**estriction **F**ragment **L**enght **P**olymorphism)- polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
- T-** tymín
- QTL-** kvantitatívne genetické markéry

ÚVOD

V súčasnej dobe sú stále viac skloňované termíny výživa obyvateľstva, zdravotná bezpečnosť potravín, ich trvanlivosť a s tým spojené aj vlastnosti potravín. Tieto sú ovplyvňované ľudskou činnosťou a používaním neustále sa vyvíjajúcich metód biotechnológií, ktoré sú z hľadiska živočíšnej výroby orientované na využívanie živých organizmov pre modifikáciu živočíšnych produktov. Vlastnosti úžitkových zvierat sú kódované viacerými špecifickými génmi.

V roku 1950 začali skúmať účinky leptínu na zmutovaných obeznych myšiach v štáte Maine (Jackson Laboratory). Leptín bol identifikovaný v roku 1994 Jeffrey M. Friedmenom pomocou pozičného klonovania. Je dôležitý regulátor energie metabolizmu, obezity a reprodukcie a ovplyvňuje tiež kvalitu mäsa a jeho mramorovitost' (u hovädzieho dobytku). Na detekciu jednotlivých alel génu pre leptín v tkanivách sa využívajú molekulárne metódy, najmä polymerázová reťazová reakcia (PCR).

Vzhľadom na dôležitosť leptínu v metabolizme hospodárskych zvierat a ich konzumenta- človeka sme sa v našej práci zamerali na stanovenie jednonukleotidového polymorfizmu (substitúcia A→T v nukleotidovej pozícii 252 exónu 2) génu pre hovädzí leptín. Našou snahou bolo zvládnuť komplexný molekulárno- biologicko- genetický prístup od laboratórneho stanovenia polymorfizmu u vybraných jedincov po základné hodnotenie štatisticko- populačných parametrov nami vyšetrených jedincov.

1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY DOMA A V ZAHRANIČÍ

1.1 Leptín

Ob gén bol objavený v roku 1994 na základe pozičných klonovacích techník (Zhang *et al.*, 1994). 167 – aminokyselinový proteínový produkt *ob* génu bol pomenovaný ako leptín (odvodený z gréckeho výrazu „leptos“ čo znamená „chudý“). Gén leptínu sa skladá z troch exónov, z ktorých prvý exón nie je prepisovaný do proteínového produktu. U myši je prvý intrón viac ako 8kb dlhý a druhý intrón má dĺžku 1,6kb (He *et al.*, 1995; De la Brousse, *et al.*, 1996).

Leptínový gén má 67% sekvencií navzájom identických s viacerými druhmi ako človek, gorila, šimpanz, orangutan, pes, hovädzí dobytok, ošípané, potkan a myš (Zhang *et al.*, 1997). Leptínový gén u ľudí je lokalizovaný na chromozóme č. 7, v pozícii 7q31.3, myši leptínový gén je na šiestom chromozóme – 6q3.3 (www.ncbi.nlm.gov) a u hovädzieho dobytku je lokalizovaný na štvrtom chromozóme 4q32 (Pfister- Genskow *et al.*, 1996).

Gény pre leptín u každého druhu obsahujú niekoľko jednonukleotidových polymorfizmov. V exóne 2 hovädzieho génu pre leptín dochádza k substitúcii A za T v nukleotidovej pozícii 252, ktorá sa dá zistiť pomocou reštrikčnej endonukleázy *ClaI* v reštrikčnom mieste (AT[^]CGAT), genotyp sa dá určiť napr. pomocou techniky PCR- RFLP.

Tento polymorfizmus preukázal významnú asociáciu s fenotypovým prejavom v populáciách vyšetrených zvierat, jedinci s genotypom A/T mali o 19% väčší príjem potravy ako jedinci s genotypom A/A (Lagonigro *et al.*, 2003).

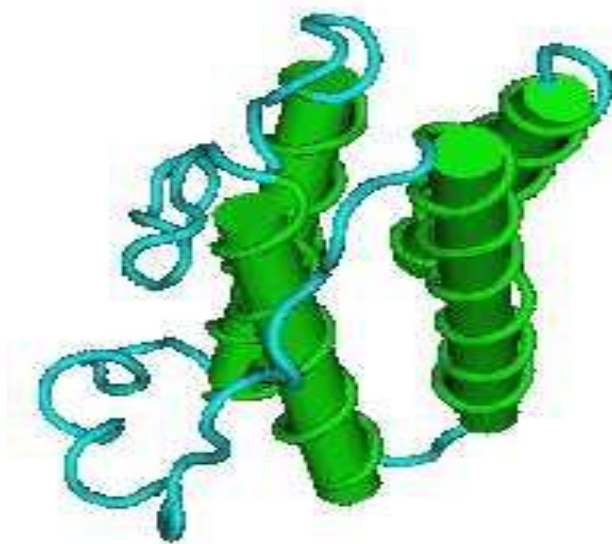
1.1.1 Štruktúra leptínu

Do dnešného dňa bolo identifikovaných niekoľko dôležitých transkripčných faktorov v oblasti promotora pre gén leptínu u ľudí, hlodavcov a prežúvavcov. Zahrňujú oblasti CAAT, ktoré slúžia na zosilnenie väzby bielkovín: (C/EBP) (Hwang *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 2002), adipocytárneho rozlišovacieho faktora 1, proteínu viažúceho sterol

regulačný element 1 (ADD1/SREBP1) (Kim *et al.*, 1998), peroxizómovou proliferáciou aktivovaného faktora γ (PPAR γ) (Hollenberg *et al.*, 1997), hypoxiou indukovaného faktora 1 (HIF- 1) (Grosfeld *et al.*, 2002; Meissener *et al.*, 2003), Sp1 a LP1 (Mason *et al.*, 1998).

Analýza nukleárnej magnetickej rezonancie kryštalickej formy leptínu odhalila, že leptín je štvor- hélíxový proteín (A-B-C-D), ktorý je štruktúrou podobný skupine cytokínov (obrázok 1) (Zhang *et al.*, 1997). Leptín obsahuje jednoduché disulfidické väzby ako spojenia dvoch cysteínov bez C a D špirály a práve táto väzba určuje stabilitu hormónu leptín (Rock *et al.*, 1996). Leptínové väzby a ich receptory prepájajú α - špirálu A a C (Hiroike *et al.*, 2000).

Prvých 21 aminokyselín leptínu tvorí peptid, vyštiepením ktorého vznikne 146 aminokyselinový proteín uvoľňovaný do krvi. Mutáciou v géne *ob/ob* myši (cytozín za tymín) vzniká zmena v kodóne pre aminokyselinu v pozícii 105 (arginín), čím vzniká STOP kodón. Tento proces spôsobuje v syntéze narušenie funkčnosti proteínu (Ozata *et al.*, 1999).



Zdroj: Zhang *et al.* 1997. Crystal structure of the obese protein leptin- E 100. In: *Nature*, vol. 387, 1997, p. 206-209.

Obrázok 1 Štruktúra leptínu

1.1.2 Funkcia leptínu

Hormóny zohrávajú dôležitú úlohu v plodnosti na základe mliečnej produkcie. Jedným z týchto hormónov môže byť leptín, 16 kDa proteín, ktorý je syntetizovaný tukovým tkanivom. Leptín je zapojený do regulácie príjmu potravy, vyrovnanie energie, plodnosti, a taktiež imúnnych funkcií (Fruhbeck *et al.*, 1998). Z toho dôvodu môže byť súčasná selekcia ovplyvnená hladinou leptínu, alebo môže byť nepriamo ovplyvnená aj polymorfizmami leptínu, negatívne ovplyvňujúcimi plodnosť. Pri genetike hlodavcov a človeka sa vyskytujú rozdiely v účinku leptínu. Napríklad nedostatok funkčného leptínu *ob/ob* u myši spôsobuje hyperfagizmus, obezitu a neplodnosť (Hamann, Matthaei, 1996).

Ak existuje polymorfizmus v géne leptínu dojníc spojený s energickou rovnováhou, plodnosťou, príjmom potravy alebo s produkciou mlieka, môže byť použitý pri selekcii dojníc.

Leptín je dôležitý regulátor energie metabolizmu, obezity a reprodukcie a ovplyvňuje tiež kvalitu mäsa a jeho mramorovitost'. Na detekciu leptínu v tukových tkanivách sa využívajú molekulárne metódy, najmä polymerázová reťazová reakcia (PCR).

Leptín bol charakterizovaný ako faktor, ktorý ovplyvňuje stav metabolizmu a tiež vplýva na reprodukciu. U ľudí je leptín dôležitým faktorom na začiatku dospievania. Toto je potvrdené faktom, že jedinci s mutáciami v leptínovom géne sú neplodní (Strobel *et al.*, 1998).

1.1.3 Mechanizmus účinku leptínu u ľudí

Hlavnou funkciou leptínu v ľudskom organizme je úloha periférneho signálu informujúceho hypotalamické centrum sýtosti o stave tukových zásob organizmu. Ako sa zdá, zníženie hladín leptínu vyvoláva uniformnú komplexnú neurohumorálnu reakciu, ktorej cieľom je maximálne šetrenie energetických zásob.

Zvýšenie percentuálneho zastúpenia tuku v organizme, resp. pozitívna energetická bilancia v adipocytoch vedie k zvýšeniu sérových koncentrácií leptínu.

Cirkulujúci leptín je aktívnym transportným mechanizmom prenášaným do hypotalamu, kde pôsobí prostredníctvom dlhej izoformy leptínových receptorov. Experimentálne štúdie svedčia o veľmi úzkom prepojení medzi leptínom a reguláciou expresie neuropeptidu- Y (najsilnejší orexigénny neuropeptid). Syntéza neuropeptidu- Y je zvýšením hladiny leptínu tlmená, tým dochádza k poklesu príjmu potravy a vyrovnaniu energetickej bilancie adipocytov s následným znížením koncentrácie cirkulujúceho leptínu. Zatiaľ čo u štíhlych jedincov je táto regulácia zrejme plne funkčná, u obéznych nevedie ani výrazná hyperleptinémia k poklesu nadmerného príjmu potravy.

Bližšie poznanie presných mechanizmov prestupu leptínu cez hematoencefalickú bariéru by mohlo priniesť významný pokrok aj vo využití leptínu ako lieku na obezitu. Jednou z možných príčin predpokladanej „leptínovej rezistencie“ u obéznych jedincov by mohla byť práve saturabilita transportného mechanizmu prenášajúceho leptín cez hematoencefalickú bariéru. Z klinických štúdií (Caro *et al.*, 1996) je známe, že pomer koncentrácie leptínu v mozgovomiechovom moku k periférnej koncentrácii je 5x vyššia u štíhlych, ako u obéznych jedincov.

1.1.4 Leptín u hovädzieho dobytku

Sekrécia leptínu je úzko spojená s množstvom telesného tuku u myší, ľudí a prežúvavcov. Je dokázané, že existuje pozitívny vzťah medzi cirkulujúcim leptínom a obsahom tuku u hovädzieho dobytku (Brockman *et al.*, 2000). Z tohto dôvodu vyššia koncentrácia leptínu u holštajnského dobytku súvisí s vyšším ukladaním tuku.

U hovädzieho dobytku je najvyššia hladina expresie *ob* génov v tuku okolo obličiek, stredná v podkožnom a medzisvalovom tuku a najnižšia vo vnútro svalovom tuku.

V poslednom období sa výskum zameriava na jednonukleotidové polymorfizmy (**SNP** – **S**ingle **N**ucleotide **P**olymorphisms) ktoré majú kľúčový význam pri markérovo asistovanej selekcii (podrobnejšie v kap. 1.3.4). Z tohto hľadiska sa javí ako veľmi zaujímavá práca Lagonigra *et al.* (2003), ktorý z viacerých kandidátskych polymorfizmov hovädzieho génu pre leptín identifikoval v exóne 2, nukleotidovej pozícii transverziu A→T. V zmienenej

práci jedince s genotypom A/T vykazovali o 19% vyšší príjem potravy než homozygoti A/A (bolo vyšetrených 166 zvierat, z toho zistili genotypy: 122 A/A, 43 A/T a 1 T/T).

Tento polymorfizmus v exóne 2 spôsobuje zámenu aminokyseliny tyrozín (alela A) za fenylalanín (alela T). Mechanizmus ovplyvnenia produktu na molekulovej úrovni však ostáva nejasný.

1.2 Hovädzí dobytok

Vzhľadom na zámer vyšetriť prítomnosť polymorfizmu hovädzieho génu pre leptín je nutné priniesť stručnú charakteristiku plemien, z ktorých nami vyšetrení jedinci pochádzali.

1.2.1 Pinzgauský hovädzí dobytok

Pôvod a čas vzniku

Slovenský pinzgauský dobytok vznikol prevodným krížením plemien pôvodne chovaných na území severného Slovenska (hnedého, resp. šedo-hnedého karpatského dobytká a červeného dobytká, tzv. červienky typu *brachyceros*) pinzgauským plemenom dovázaným z Rakúska. Začiatok šľachtenia pinzgauského plemena, písomne doloženými záznamami z jeho rozšírenia v najsevernejších župách starého Uhorska, je z rokov 1870 až 1880. Výraznejšie sa začalo pinzgauské plemeno formovať koncom 19. a začiatkom 20. storočia. Dlhodobým šľachtením vzniklo plemeno kombinovaného úžitkového typu, vhodné pre horské oblasti s tvrdšími podmienkami chovného prostredia, s pevnou konštitúciou a dobrou prispôbivosťou. Pritom populácia slovenského pinzgauského plemena zostala s väčšou alebo menšou intenzitou napojená na pinzgauský dobytok chovaný v Rakúsku.

Opis exteriéru

Typické sfarbenie pre toto plemeno je gaštanovočervené až červenohnedé s typickou kresbou- biely pás od brucha cez chrbát, bedrá, kríže,

zadok, medzinožie, spodok brucha až po prsia, biely pás v oblasti lakt'a a nad päťovým kíbom. Mulec je bridlicovo- sivý, špičky rohov a paznechty tmavo pigmentované (obrázok 2).



Zdroj: www.pinzgau.sk/img/1997.jpg

Obrázok 2 Dojnica Slovenského pinzgauského dobytka

1.2.2 Charolais

Povôd a čas vzniku

Charolais je plemeno mäsového úžitkového typu, ktoré patrí medzi svetové plemená dobytka s najvyššou rastovou schopnosťou do vysokého veku a živej hmotnosti. Pôvod tohto mäsového plemena pochádza z oblasti Charolias v Burgundsku, z oblasti riek Seina a Loire vo Francúzsku. Plemenná kniha bola založená v roku 1864. Má pomerne dobré aklimatizačné a adaptačné schopnosti. Dlhodobým šľachtením vzniklo plemeno mäsového úžitkového typu, ktoré má výbornú zmasilosť na najcennejších mäsových častiach- stehno, panva, chrbát, plece (<http://www.cattle.com/>).

Opis exteriéru

Typické sfarbenie pre toto plemeno je krémovo alebo smotanovo biele, koža a sliznice bez pigmentácie, mulec ružový, rohy a paznechty voskovožlté (obrázok 3).



Zdroj: <http://www.cattle.com/BreedsOfCattle/Images/charolais.jpg>

Obrázok 3 Býk plemena Charolais

1.3 Genetické markéry

1.3.1 Charakteristika genetického markéru

Ako genetický markér označujeme polymorfný znak, ktorého varianty vykazujú mendelistickú dedičnosť a môžu byť asociované s variabilitou úžitkových vlastností.

Genetické markéry môžeme rozdeliť do dvoch skupín:

1. **Genetické polymorfné znaky (fenotypové)** – pri ktorých je, ale často aj nie je, známa lokalizácia ich génov na chromozóme. K tomuto typu markérov patria: polymorfné bielkoviny, enzýmy, antigény a protilátky.

2. **Molekulárno – genetické markéry na úrovni DNA**, pri ktorých sú rozlišované kódujúce a nekódujúce sekvencie:
- Kódujúce sekvencie sa prostredníctvom proteínov podieľajú na prejave znaku. Markérom sú teda alelické varianty v exónoch génov tzv. markéry I. typu - exprimované gény, ktoré môžu byť z hľadiska fyziologickej funkcie kandidátnymi génmi pre QTL.
 - Nekódujúce sekvencie predstavujú mikrosatelity DNA, ktoré sami o sebe nemajú žiadnu fyziologickú funkciu, ale označujú segmenty chromozómov, ktoré sú ďalej analyzované. Takéto sekvencie sú označované ako markéry II. typu (Příbyl *et al.*, 1997).

1.3.2 Klasifikácia genetických markérov

Podľa charakteru možno genetické markéry klasifikovať na:

- morfologické
- biochemické
- sekundárne metabolity (monoterpény, sesquiterpény, fenolické látky)
- izoenzýmy
- molekulárne
- založené na reštrikčných fragmentoch
- založené na amplifikácii PCR (<http://www.tuzvo.sk/>)

1.3.3 Využitie genetických markérov

Brascamp *et al.* (1995) definovali podmienky pre praktické využitie genetických markérov v šľachtení zvierat:

- kodominantná dedičnosť,
- jednotková heritabilita - $h^2 = 1$,
- stanovenie genotypu markéru môže byť prevedené kedykoľvek bez ohľadu na vek a pohlavie zvierat'a,
- metóda detekcie markéru by mala byť jednoduchá, s malou pravdepodobnosťou chyby, automatizovateľná a čo najlacnejšia.

1.3.4 Mapovanie genómu hospodárskych zvierat

Umelo vytvorená, alebo prirodzene vyskytujúca sa genetická variabilita je primárnym predpokladom šľachtenia hospodárskych zvierat. Kvantitatívne znaky sú determinované alelami väčšieho počtu génov – lokusov kvantitatívnych znakov (**QTL – Quantitative Trait Loci**) a sú ovplyvnené faktormi vonkajšieho prostredia. Zatiaľ nemáme jasnú predstavu o počte, lokalizácii a pôsobení lokusov kvantitatívnych znakov. Hlavným cieľom štúdia je nájdenie takého markéru, ktorý môže byť zaradený do šľachtiteľského programu – v rámci selekcie podporovanej markéromi (**MAS – Marker Assisted Selection**) (Příbyl *et al.*, 1997).

1.4 Metódy analýz nukleových kyselín

1.4.1 Izolácia DNA

Princíp: Z periférnej krvi či už zvierat alebo človeka pomocou fenol-chloroformového odstránenia proteínov- po lyzovaní erytrocytov lyzačným hypotonickým pufrom ostanú celistvé iba leukocyty, ktoré sa premyjú a rozrušia špecifickým lyzovacím pufrom s detergentom. Proteíny a ich fragmenty sa vyzrážajú zmesou fenol- chloroform a následne sa odstránia. DNA sa premyje, rozpustí v tlmivom roztoku a používa sa na ďalšie aplikácie.

Postup: Všetky metódy izolácie genómovej DNA z tkanív živočíchov a rastlín sú založené na troch základných krokoch:

1. šetrnej lýze buniek,
2. odstránení proteínov a ostatných vysokomolekulárnych zložiek bunky okrem DNA (tzv. čistenie – purifikácia DNA),
3. skoncentrovaní DNA najčastejšie zrážaním.

Nevyhnutným predpokladom kvalitnej extrakcie DNA je dôkladné rozrušenie buniek a ich súčastí, ktoré prebieha obvykle v prostredí príslušného extrakčného média. Pri izolácii nukleových kyselín sa používajú extrakčné médiá, ktoré sa zvyčajne skladajú zo základného tlmivého roztoku, ku ktorému sa pridávajú deproteinizačné činidlá, detergenty s hlavnou úlohou uvoľniť nukleové kyseliny z ich väzby na bielkoviny, inhibítory nukleóz a ďalšie špecifické zlúčeniny. Uvoľnenie väzby medzi nukleovou kyselinou a bielkovinou sa dá šetrne previesť pomocou viacerých, zväčša aniónových detergentov, pridaných do extrakčného média.

Dôkladné prečistenie preparátov nukleových kyselín od bielkovinových prímiesí, sa dá uskutočniť viacerými postupmi, v ktorých použité činidlá denaturujú prítomné bielkoviny a nukleové kyseliny zostávajú rozpustené vo vodnej fáze bez toho, aby sa porušila ich štruktúra. Z deproteinizačných prostriedkov sa na izoláciu nukleových kyselín používajú najčastejšie fenol, chloroform, guanidinchlorid, chloristan sodný .

1.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction – Polymerázová reťazová reakcia)

Polymerázová reakcia (**PCR- Polymerase Chain Reaction**) patrí k najprogressívnejším molekulárno- biologickým metódam so širokým spektrom využitia v rôznych oblastiach biologického výskumu, ktorá umožnila rozvoj takých vedných disciplín ako humánna a veterinárna medicína, genetika človeka, rastlín a mikroorganizmov, archeológia, kriminalistika a pod. Mimoriadny význam metódy podporuje aj skutočnosť, že je považovaná za najvýznamnejší objav 20. storočia (Bauerová *et al.*, 2004).

Autorom metódy je Karry Mullis z firmy Cetus, pričom do komerčnej podoby bola prepracovaná kolektívom vedeným Henry Erlichom. Princíp metódy bol prvýkrát publikovaný v práci Saiki *et al.* (1985), kde sa autori zaoberali amplifikáciou ľudského 5- globínového génu a prenatalnou diagnostikou kosáčikovitej anémie. Autori boli vďaka tomuto objavu ocenení v roku 1993 Nobelovou cenou.

PCR je metóda využívaná na množenie (amplifikáciu) úseku DNA do takého množstva, ktoré je detekovateľné súčasnou laboratórnou technikou (Knoll, 2002). Uskutočňuje sa formou opakujúcich sa cyklov (25-35), pri ktorých sa v závislosti od meniacej sa teploty reakčnej zmesi striedajú tri kroky (Gálová *et al.*, 2007):

1. Denaturácia dvojvláknovej DNA (92- 98°C)
2. Hybridizácia primerov k oddeleným reťazcom DNA (annealing) (50- 60°C)
3. Polymerizácia (biosyntéza) DNA (65- 75°C)

Enzymatická reakcia prebieha v termocykleri, ktorý umožňuje účinné rýchle striedanie rôznych teplôt v naprogramovaných časových intervaloch. V prvom kroku denaturácie sa pôvodne dvojvláknová DNA rozdelí- denaturuje na jednotlivé vlákna DNA pri 92- 98°C. Znížením teploty na špecifickú hodnotu (50- 60°C), ktorá závisí od zloženia použitých primerov, tieto selektívne hybridizujú s denaturovanou jednovláknovou DNA len na miestach ich komplementarity. V treťom kroku sa zmenou teploty (65- 75°C) zabezpečia optimálne podmienky pre *Taq* polymerázu, ktorá syntetizuje dvojvláknovú DNA medzi primermi, identickú s pôvodnou DNA. Počet molekúl sa za optimálnych podmienok v každom nasledujúcom cykle približne zdvojnásobí, čo pri 25- 35 cykloch znamená ich 10^5 - 10^8 násobné rozmnoženie.

Tejto metóde predchádzal klasický spôsob klonovania spočívajúci vo vpravení DNA do plazmidu, inkorporácie plazmidu do baktérie a klonovania DNA baktérie (Knoll, 2002).

1.4.3 Polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov (PCR- RFLP)

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) je jednou z najjednoduchších metód využívaných na študovanie polymorfizmu i na mapovanie génov (Knoll, 2002). Metóda RFLP je založená na špecifickom štiepení DNA enzýmami nazvanými reštrikčné endonukleázy miestami nazvaných palindromické sekvencie. RFLP má v populácií nízku úroveň

polymorfizmu, pretože väčšinou ho predstavujú iba dve alely určené prítomnosťou alebo neprítomnosťou reštrikčného miesta (Souther, 1979). PCR –RFLP v kombinácii s hybridizáciou reštrikčných fragmentov bola prvou metódou využívanou ku génovému mapovaniu (Knoll, 2002).

K zmene dĺžky reštrikčných sekvencií môže dôjsť tiež inzerciou alebo deléciou nukleotidov DNA v amplifikovenej oblasti. Zmeny dĺžky reštrikčných fragmentov spôsobené vplyvom rôzneho počtu opakujúcich sa tandemových sekvencií využíva metóda VNTR (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats) (Knoll, 2002).

2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo na základe poznatkov z odbornej literatúry a výsledkov experimentálnych prác zvládnuť molekulárno- biologické a genetické prístupy analýzy jednonukleotidových polymorfizmov génov hospodárskych zvierat so zameraním na plemená *Bos taurus* – Charolais, Slovenské pinzgauské. Na príklade polymorfizmu A/T v pozícii 252 exónu 2 génu pre leptín:

- vykonať izoláciu DNA z periférnej krvi zvierat
- vykonať amplifikáciu DNA a posúdiť možnosti optimalizácie metódy
- posúdiť prítomnosť genetickej rovnováhy v populácii
- navrhnúť využitie poznatkov v ďalšej plemenárskej praxi

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Materiál

DNA analýzu sme vykonali u trinástich plemien hovädzieho dobytku. Bola vyzolovaná purifikáciou z periférnej krvi pomocou setu NucleoSpin® Blood (Macherey- Nagel).

3.1.1 Oligonukleotidové primery

Primery boli dodané buď v lyolizovanom stave (Invitrogen), alebo ako vodný roztok s presne určenou koncentráciou (Promega). Lyofilizované primery sme rozpustili v sterilnej vode do výslednej koncentrácie $400 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Koncentrácia pracovného roztoku všetkých primerov bola $20 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Sekvencie primerov (Konfortov *et al.*, 1999):

LA-F: 5'-GAT TCC GCC GCA CCT CTC-3'

LA-R: 5'-CCT GTG CAA GGC TGC ACA GCC-3'

3.1.2 Enzýmy

Na syntézu požadovaných DNA- fragmentov ohraničených primermi počas PCR sme použili rekombinantnú *Taq* polymerázu (Fermentas). V ďalšom spracovaní DNA sme použili reštrikčnú endonukleázu *Clal* (Fermentas). Teplotné optimum enzýmu je 37°C .

3.1.3 Tlmivé roztoky

- **Reakčný tlmivý roztok pre *Clal* (10x koncentrovaný):**

33 mmol/dm ³	Tris- acetátová (pH 7,9 pri 37°C)
10 mmol/dm ³	acetátu magnézia

66 mmol/dm³ acetátu draselného
 0,1 mg/ml BSA

o **Reakčný tlmivý roztok pre Taq polymerázu (10 x koncentrovaný):**

100 mmol/dm³ Tris- HCl (pH 8,8 pri 25°C)
 500 mmol/dm³ KCl,
 0,8% Nonidet P40

3.1.4 Chemikálie

Na prípravu roztokov sme použili chemikálie od dodávateľov:

tris (hydroxymetyl) aminometán (Tris)	Merck
kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA)	Merck
akrylamid	Serva
bis- akrylamid	Serva
H ₃ BO ₃	Pliva-Lachema
tetrametyletyléndiamín (TEMED)	Merck
etídiumbromid	Merck
veľkostný DNA- marker á50 bp (1 g.dm ⁻³)	Fermentas

3.1.5 Roztoky

Tlmivé roztoky a nanášaciu zmes sme pripravovali podľa manuálu Sambrook *et al.*, 2001.

- o **dNTP mix:** zásobná koncentrácia 0,012 mmol/dm³ (BioLabs)
- o **etídiumbromid:** zásobná koncentrácia 1g/dm³ (vodný roztok) (Merck)
- o **TBE roztok 10 x koncentrovaný:**
 - Trishydroxymetylaminometán 0,89 mmol/dm³
 - H₃BO₃ 0,89 mmol/dm³
 - EDTA 20 mmol/dm³ (pH= 8,0)

o **Nanášacia zmes- 5 x koncentrovaná:**

brómfenolová modrá	0,05%
glycerol	16,0%
EDTA	0,1 mmol/dm ³
rozpustené v 5 x koncentrovanom TBE	

3.1.6 Prístroje

analytické váhy	Chyco Balance Com MP- 300
mikrocentrifúga	BIOSAN Multi- spin MSC 6000
elfo- komora	SCIEPLAST- HU 10
termocykler	MJ Mini- BIO RAD
termostat	BINDER- BD 53
transiluminátor	UV- transiluminator UPV- UPLAND
vortex	MS1- miniskaler KA

3.2 Metódy

3.2.1 Izolácia DNA

DNA je integrálnou súčasťou väčšiny ľudských buniek. Ak sa má teda vykonať jej bližšia analýza, nevyhnutne sa musí najskôr získať DNA v dostatočnom množstve a čistote z buniek. Potom nasledujú vlastné postupy analýzy, ktoré sa aplikujú podľa povahy skúmaného genetického javu. Keďže izolácia DNA je spojená s deštrukciou bunky, musí sa bunečný materiál odobrať takým spôsobom, ktorý by pre tkanivo predstavoval najmenšiu možnosť ďalšieho poškodenia, ktoré by mohlo „znehodnotiť“ vzorku. Preto najbežnejšie používaným spôsobom je izolácia z periférnej krvi.

Postup:Lýza:

- k objemu krvnej vzorky (200 μ l) sme napipetovali 25 μ l proteínázy K,
- pridali sme 200 μ l lyzovacieho tlmivého roztoku B3 a vzorku sme dôrazne premiešali (10- 20 sekúnd),
- vzorku sme inkubovali pri 70 °C, 10- 15 minút,
- pridali sme 210 μ l etanolu (96- 100%) a vzorku opäť dôkladne premiešali.

Väzba DNA na silikátový povrch:

- centrifugovali sme 1 minútu (11,000 x g).

Premytie DNA :

- do kolónky sme pridali 500 μ l premývacieho roztoku B5 a opäť sme centrifugovali 1 minútu (11,000 x g),
- následne sme použili novú zbernú skúmavku a do kolónky sme pridali 600 μ l roztoku BW a rovnako ako pri prvom premytí sme centrifugovali (1 min.; 11,000 x g).

Vysušenie silikátovej membrány :

- vysušenie silikátovej membrány sme uskutočnili pomocou centrifugácie, ktorá trvala 1 minútu (11,000 x g), počas tohto kroku sa odstránil reziduálny etanol.

Vymývanie čistej DNA:

- kolónku so silikátovou membránou sme preniesli a zasunuli do novej sterilnej eppendorfovej mikroskúmavky s viečkom,
- pridali sme 100 μ l elučného tlmivého roztoku BE (70°C) a nechali stáť 1 minútu pri laboratórnej teplote,
- následne sme vzorku centrifugovali (1 min.; 11000 x g) a získali sme DNA v požadovanej čistote a kvantite pre ďalšiu analýzu.

3.2.2 Amplifikácia DNA

Ciel': Pri molekulárno- biologickom vyšetrení patogénnych alel génov, sa tieto nachádzajú pri izolácii DNA spolu so sekvenciami, ktoré nie sú objektom daného stanovenia. PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) je optimálna metóda pre selektívne zmnoženie tých DNA- sekvencií, ktoré potrebujeme.

Princíp: PCR je založená na dvoch kľúčových poznatkoch :

1/ Schopnosť reasociácie DNA - ak sa DNA zahrieva na dostatočne vysokú teplotu (okolo 60 - 80 °C), dochádza k denaturácii DNA. Komplementárne reťazce sa oddelia, pretože vodíkové väzby už nedokážu udržať spolu jednotlivé páry báz. Ak však teplota klesne pod bod denaturácie, dochádza k opätovnému spojovaniu - reasociácii komplementárnych reťazcov DNA párovaním komplementárnych báz. Pri tomto deji dochádza k rýchlejšiemu pripojeniu kratších oligonukleotidov (18 - 28 bp) ku komplementárnym reťazcom v dôsledku vyššej sekvenčnej komplexity.

2/ Termostabilné DNA polymerázy - existujú enzýmy syntetizujúce DNA (DNA - polymerázy), stabilnejšie pri teplotách okolo 90°C. Boli získané z termofilných baktérií (*Thermophilus aquaticus*), žijúcich v termálnych prameňoch pri extrémnych teplotách. Princípom metódy sú cyklické zmeny teploty vzorky, pri vyššej sa vzorka DNA denaturuje, pri nižšej sa deje syntéza nových vláken DNA pomocou *Taq* - polymerázy, dvojice oligonukleotidov (chemicky vopred syntetizované, slúžia na ohraničenie amplifikovaného úseku DNA ako 5' - primery pre syntézu nových vláken), zásoby dNTP, a Mg²⁺ iónov. Vďaka týmto objavom sa môže uskutočniť *in vitro* syntéza dostatočného množstva DNA úsekov zo vzoriek obsahujúcich nepatrné množstvo DNA.

Postup:

Rozpis reakčnej zmesi (master mix) udáva tabuľka č. 1. Objem je počítaný pre 16 vzoriek s objemom 20 µl. Časovo-teplotný priebeh reakcie znázorňuje tabuľka č 2.

Tabuľka č. 1 Zloženie reakčnej zmesi pre PCR amplifikáciu jednotlivých úsekov DNA

Zložka	Koncentrácia zložky (zásobný roztok)	Pipetovaný objem (μl)	Výsledná koncentrácia (mmol/dm^3)
voda	–	243	–
ThermoPol pufor	10x koncentrovaný	32	1x koncentrovaný
MgCl_2	$25 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	19,2	1,5
dNTP - mix	$10 \text{ mmol}/\text{dm}^3$	6,4	200
LA-R	$20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$	8	0,5
LA-F	$20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$	8	0,5
<i>Taq</i> -polymeráza	5 U/ μl	3,2	1 U/jednu vzorku
Výsledný objem		320	-

Tabuľka č. 2 Časovo- teplotný profil PCR amplifikácie

KROK	TEPLOTA $^{\circ}\text{C}$	ČAS (min)	Počet cyklov
úvodná denaturácia	94	2:00	-
denaturácia	94	0:20	5
hybridizácia primerov	64	0:20	
syntéza DNA	72	1:00	
denaturácia	94	0:20	5
hybridizácia primerov	62	0:20	
syntéza DNA	72	1:00	
denaturácia	94	0:20	20
hybridizácia primerov	60	0:20	
syntéza DNA	72	0:20	
dosyntetizovanie nekompletných DNA produktov	72	5:00	-
zastavenie reakcie ochladením	10	10:00	-

3.2.3 Štiepenie DNA

Objem reakčnej zmesi pre štiepenie reštrikčnou endonukleázou *ClaI* bol 20 μl , pozostával z 15 μl PCR- amplifikátu a 5 μl vopred pripravenej reakčnej zmesi (4x koncentrovanej), obsahujúcej pufor pre *ClaI* (Buffer 4), vodu a enzým *ClaI* v koncentrácii 0,63 U/ μl (tabuľka 3).

Tabuľka č. 3 Zloženie reakčnej zmesi (4x koncentrovanej) pre štiepenie *ClaI*

Zložka (koncentrácia)	Pipetovaný objem (μl)	Výsledná koncentrácia
<i>ClaI</i> (5U/ μl)	10	0,63U/ μl
Pufor (10x koncentrovaný)	32	4 x koncentrovaný
H ₂ O	38	-

Postup:

- do eppendorfovej skúmavky sme pripravili reakčnú zmes pre šesťnásť vzoriek, bez prídavku amplifikátu, obsahujúcu:
 - ⇒ sterilnú vodu
 - ⇒ 10- krát koncentrovaný reakčný pufor
 - ⇒ reštrikčný enzým,
- zmes sme premiešali a ekvivalentne rozpipetovali (á 5 μl) do sterilných 8-mikroskúmavkových stripov,
- pridali sme amplifikát v objeme 15 μl ,
- inkubovali sme pri teplote 37 °C, 3 hodiny,
- reakciu sme zastavili ochladením zmesi.

3.2.4 Elektroforetická separácia DNA

Elektroforéza štiepených fragmentov prebehla v 3% agarózovom géli v prostredí 0,5x koncentrovaného tlmivého roztoku TBE ($0,89 \text{ mmol/dm}^3$ Tris-hydroxymetylaminometán; $0,89 \text{ mmol/dm}^3$ H_3BO_3 ; 20 mmol/dm^3 EDTA; pH= 8,0).

Separácia fragmentov génu pre leptín prebiehala pomocou elektroforézy pri 140 V, 30 minút.

Nasledovalo farbenie vodným roztokom etídiumbromidu po dobu 20 minút a jeho opakované premytie v destilovanej vode. Vizualizácia sa vykonala pomocou UV svetla (300 nm) na transiluminátore.

Postup:

- zostavili sme aparáturu na prípravu agarózového gélu,
- pripravili sme 100 ml zmesi, obsahujúcej:
 - 3g agarózy
 - TBE tlmivý roztok 0,5x koncentrovaný
 - čistou vodou doplniť do 97 ml a dôkladne rozpustiť,
- pridali sme etídiumbromid (EtBr),
- zmes sme opatrne naliali medzi sklá do pripravenej aparatúry, vložili sme hrebeň tak, aby sme pod ním zamedzili vzniku vzduchových bublín a nechali spolymerizovať (2 hodiny),
- zo spolymerizovaného gélu sme vybrali hrebeň. Gél sme vložili do elektroforetickej komory, prevrstvili TBE- tlmivým roztokom (0,5x koncentrovaným), ktorým sme vypláchli aj nanášacie jamky,
- pripravené vzorky sme naniesli do jamiek a zapli napätie (140 V),
- po skončení elektroforézy sme gél ponorili na 30 min. do vodného roztoku etídiumbromidu, niekoľkokrát sme premyli deionizovanou vodou a vizualizovali pod UV svetlom.

3.2.5 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Na základe vzniknutých fragmentov DNA rozdelených podľa veľkosti elektroforézou, a tým získaných frekvencií alel sme mohli pomocou chí-kvadrátového testu určiť, či zistené frekvencie zodpovedajú teoreticky očakávaným frekvenciám.

Chí- kvadrátový test nám pomáha pomocou testovateľnej hypotézy porozumieť odchýlkam, ktoré v experimente vznikli.

Pearsonov Chí- kvadrát test dobrej zhody vychádza z frekvenčnej tabuľky a testuje nulovú štatistickú hypotézu, ktorá tvrdí, že početnosti v jednotlivých kategóriách sa rovnajú očakávaným (teoretickým) početnostiam (<http://vz.truni.sk/>).

Vzorec na výpočet X^2 hodnoty:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(e - t)^2}{t}$$

n = celkový počet fenotypových tried,

e = experimentálna frekvencia i -tej triedy,

t = teoretická frekvencia i -tej triedy (<http://www.bioweb.genezis.eu/>)

Ak je pravdepodobná hodnota nižšia ako zvolená hladina významnosti (tradične 5% = 0,05), nulová hypotéza sa zamietne. Znamená to, že rozdiel medzi početnosťami zistenými vo vzorke a očakávanými početnosťami je príliš veľký na to, aby bol iba dôsledkom náhodného výberu, teda je štatisticky významný.

Ak je pravdepodobná hodnota rovná alebo vyššia ako zvolená hladina významnosti, nulovú hypotézu nemožno zamietnuť. Znamená to, že rozdiel medzi početnosťami zistenými vo vzorke a očakávanými početnosťami môže byť dôsledkom náhodného výberu, teda nie je štatisticky významný (<http://vz.truni.sk/>).

Literatúra uvádza, že použitie Chí- kvadrátového testu vyžaduje splnenie nasledujúcich podmienok:

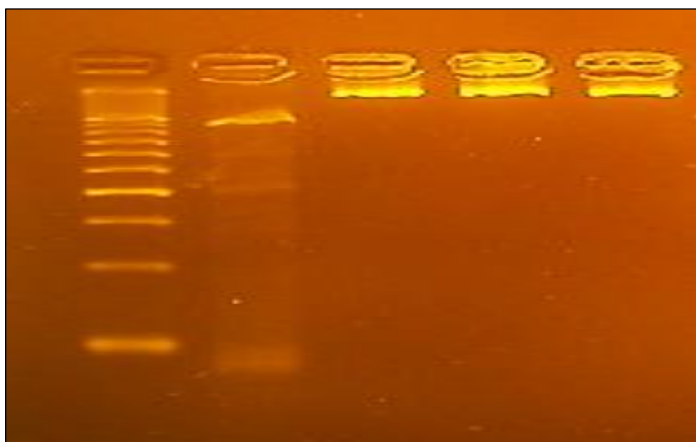
1. celkový počet pozorovaných početností $n \geq 10$
2. počet kategórií $n \geq 3$
3. všetky očakávané hodnoty $e_{ij} \geq 0,25$ (<http://vz.truni.sk/>)

4 VÝSLEDKY PRÁCE

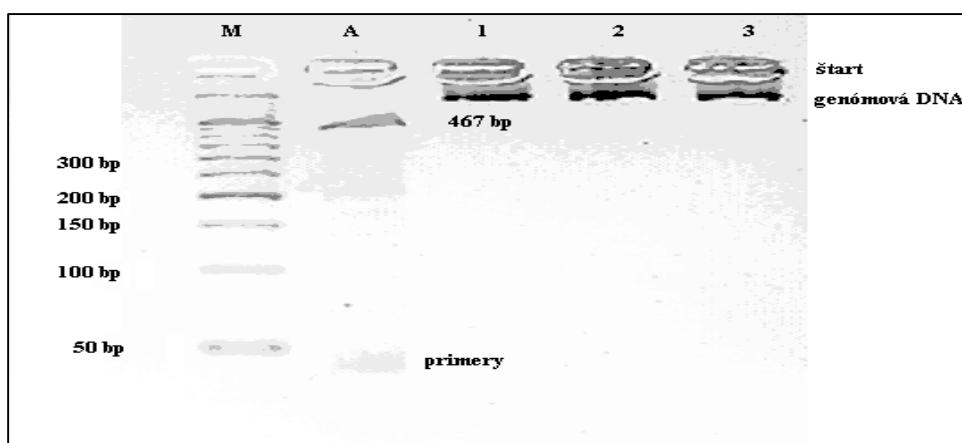
4.1 Stanovenie markéru A →T exónu 2 génu pre leptín

Štúdium polymorfizmu génu pre leptín sa uskutočnilo pomocou metódy PCR- RFLP, metódy založenej na polymorfizme dĺžky restričných fragmentov. Prvú testovanú skupinu tvorilo 12 samíc plemena Charolais spolu s 56 býkmi, druhú skupinu tvorilo 56 volov pinzgauského plemena.

Na obrázku 4 môžeme vidieť reprezentatívne výsledky vyizolovanej a naamplifikovanej DNA. Jej schematické znázornenie a popis zobrazuje obrázok 5.



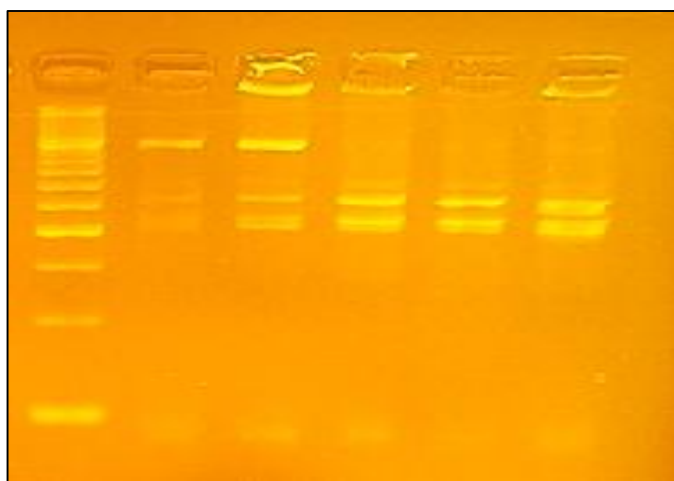
Obrázok 4 Izolovaná a amplifikovaná DNA génu pre leptín



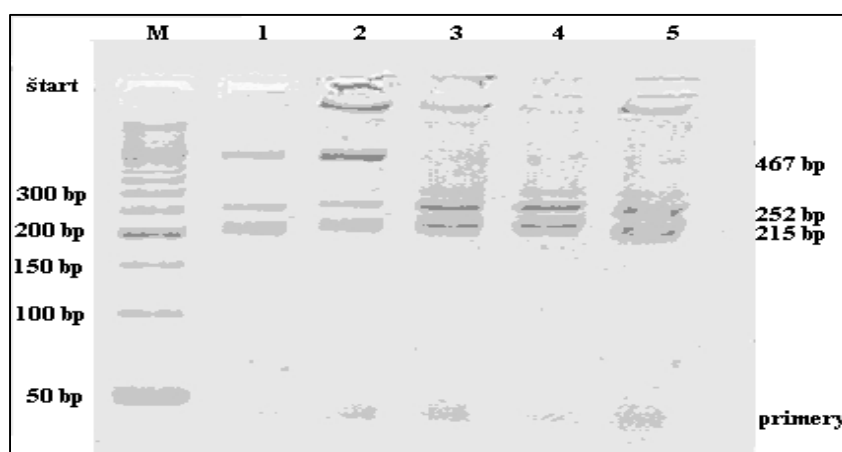
Obrázok 5 Schematické znázornenie izolovanej a amplifikovanej DNA

Vysvetlivky: M- veľkostný markér á 50 bp, A- amplifikovaná DNA (467 bp), 1-3 izolovaná genómová DNA

V populácii hovädzieho dobytká boli pomocou reštrikčnej endonukleázy *Clal* zistené prevažne dva genotypy (obrázok 6) a to heterozygotný genotyp A/T (467 bp), homozygotný genotyp A/A (252 bp a 215 bp), tvorený dvomi fragmentami, vzniknutými po štiepení restriktčnou endonukleázou *Clal*. Homozygot T/T bol veľmi vzácny. Na obrázku 7 je schematické znázornenie dvoch genotypov C/A polymorfizmu génu pre leptín na 3 % agarózovom géli detegovaných pomocou metódy PCR- RFLP vzniknutých genotypov.



Obrázok 6 Reprezentatívne výsledky PCR- RFLP metódy markéru *Clal* génu leptín



Obrázok 7 Schématické znázornenie dvoch genotypov markéru *Clal* génu leptín detegovaných pomocou metódy PCR- RFLP
Vysvetlivky: M- veľkostný markér, 1,2 heterozygoti A/T, 3-5 homozygoti A/A

4.2 Overenie genetickej rovnováhy v populácii zvierat

Otestovali sme celkovo 12 kráv plemena Charolais, 56 býkov toho istého plemena a 56 volov plemena Slovenské pinzgauské. Výsledky (alelové frekvencie) nám udáva tabuľka 4. Ako je prehľadne znázornené na grafe č. 1, najvyššia frekvencia alely T bola zistená u býkov plemena Charolais.

Tabuľka č. 4 Frekvencie alel testovaných plemien

Alela	Charolais		Slovenské pinzgauské
	♀	♂	♂
A	0,8482	0,7919	0,8036
T	0,1518	0,2083	0,1964

Následne sme testovali prítomnosť genetickej rovnováhy vo vyšetrených populáciách zvierat. Ako ukazujú výsledky Chí- kvadrátového testu (tabuľky 5 až 7) ani v jednom prípade nebola zistená štatisticky významná odchýlka od Hardyho- Weinbergovho zákona.

V tabuľke 4 sú znázornené genotypové frekvencie leptínu u samíc plemena Charolais.

Tabuľka č. 5 Genotypové frekvencie Lep génu u samíc plemena Charolais

Genotyp	Počty		χ^2 - test	
	Pozorované	Očakávané	d.f	p
A/A	8	7,5	1	0,76
A/T	4	4,5		
T/T				
Spolu	12			

Ďalšiu skupinu tvorilo 56 samcov plemena Charolais a tretiu 56 samcov Pinzgauského plemena.

Tabuľky 5 a 6 znázorňujú genotypové frekvencie leptínu u samcov plemena Charolais a samcov Slovenského pinzgauského plemena. Na grafe 1 môžeme vidieť odlišnosti u pozorovaných plemien.

Z testovania prítomnosti genetickej rovnováhy v zmysle dikcie Hardyho-Wienbergovho zákona môžeme konštatovať, že ani jedna zo sledovaných populácií sa výrazne neodchyľuje od očakávaných početností. Samozrejme, v prípade kráv plemena Charolais sú výsledky iba informatívne, keďže počet testovaných jedincov bol malý.

U ostatných dvoch kategórií sme mohli brať do úvahy všetky tri kategórie genotypov.

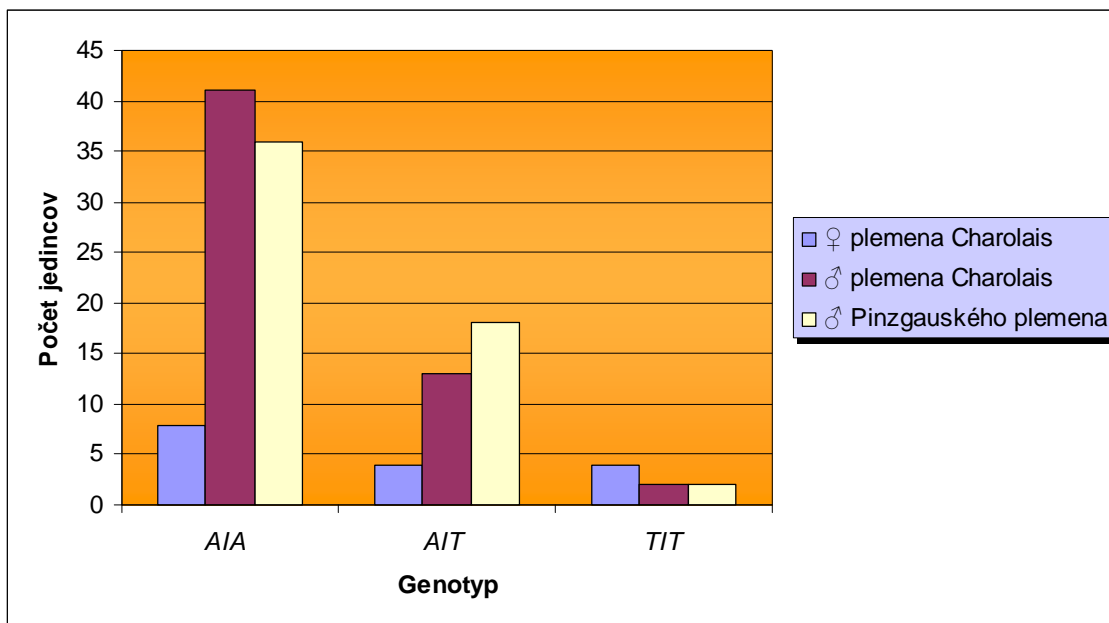
Tabuľka č. 6 Genotypové frekvencie Lep génu u samcov plemena Charolais

Genotyp	Počty		χ^2 - test	
	Pozorované	Očakávané	d.f	p
<i>A/A</i>	41	40,3	2	0,77
<i>A/T</i>	13	14,4		
<i>T/T</i>	2	1,3		
Spolu	56			

Tabuľka č. 7 Genotypové frekvencie Lep génu u samcov Slovenského pinzgauského plemena

Genotyp	Počty		χ^2 - test	
	Pozorované	Očakávané	d.f	p
<i>A/A</i>	36	36,1	2	0,99
<i>A/T</i>	18	17,7		
<i>T/T</i>	2	2,2		
Spolu	56			

Graf č. 1 Grafické znázornenie odlišností genotypovej frekvencie u jednotlivých plemien hovädzieho dobytku



5 DISKUSIA

A/ DNA analýza

Pre genotypizáciu 124 jedincov (12 kráv a 56 býkov plemena Charolais a 56 volov plemena Slovenské pinzgauské) sme použili časovo-teplotný režim PCR reakcie, aký popísali Lagonigro *et al.* (2003) vo svojej práci. Významnejšia optimalizácia profilu DNA - amplifikácie nebola potrebná. Naše podmienky (tabuľka 2) sa v porovnaní s podmienkami uvedených autorov líšili iba v treťom type cyklov, kde po hybridizácii primerov pri 60°C počas 20 sekúnd nasledovala syntéza DNA trvajúca takisto 20 sekúnd (v literatúre 1 minútu) pri štandardnej teplote 72°C. Ďalším rozdielom bol počet cyklov tohto typu – iba 20 (tabuľka 2), literatúra uvádza 25. Dôvodom zníženia počtu cyklov bolo dostatočné množstvo naamplifikovanej DNA.

Zaujímavosťou nami použitej amplifikácie DNA bolo postupné znižovanie teploty hybridizácie primerov (64°C – 62°C – 60°C) počas prvých cyklov. Dôvodom takéhoto časovo- teplotného profilu reakcie býva snaha o redukciu redundantných fragmentov a tým aj zvýšenie výťažku želaného fragmentu DNA s veľkosťou 467 bp. Vzhľadom na použitie takéhoto členenia reakcie v práci hore uvedených autorov sme predpokladali, že mali isté problémy s výskytom nešpecifických redundantných fragmentov, a že sa im ich nedarilo odstrániť iba zmenou koncentrácií jednotlivých zložiek PCR- reakčnej zmesi. Aj v našich výsledkoch sa objavovali občas redundantné fragmenty DNA, hoci s oveľa nižšou koncentráciou v porovnaní so želaným fragmentom DNA s veľkosťou 467 bp (obrázok 2, dráha A), ktoré nebránili jednoznačnému určeniu genotypov vyšetrených zvierat.

Koncentrácie zložiek reakčnej PCR- zmesi boli rovnaké, aké použili aj Lagonigro *et al.* (2003).

B/ Overenie prítomnosti genetickej rovnováhy

Molekulárno- genetické analýzy sú iba prvým krokom k využitiu poznatkov v plemenitbe. Predošlé práce ukázali, že genotyp A/T polymorfizmu 2. exónu génu pre hovädzí leptín (nukleotidová pozícia 252) pozitívne koreluje s vyšším príjmom potravy zvieratami. Je prirodzené predpokladať, že to môže mať priaznivý vplyv na úžitkovosť zvierat, otázkou však ostáva overenie genetickej rovnováhy v populácii, teda overenie toho, či bol alebo nebol v súvislosti s nami sledovaným znakom na populáciu vyvíjaný (najmä) selekčný tlak. Naše zistenia sú síce iba orientačné (vzhľadom na nižšie počty zvierat a reprezentatívnosť ich výberu), no u týchto plemien na našom území sú prvé svojho druhu (lebo práce zahraničných autorov boli popísané na iných plemenách, resp. špecifických krížencoch).

Pri overovaní genetickej rovnováhy v populácii sme vychádzali z Hardyho- Weinbergovho zákona platiaceho pre rovnovážne populácie s prevládajúcou panmixiou a neprítomnými výraznejšími rušivými faktormi rovnováhy (selekcia, migrácia, ...).

V prípade nášho jednonukleotidového polymorfizmu s dvoma alelami (A, T) bude platiť:

$$(p_A + q_T)^2 = p_A^2 + 2p_A q_T + q_T^2 = 1$$

V tomto vzťahu predstavujú p_A a q_T frekvencie alel A a T a vzťah určuje početnosti genotypov, aké možno očakávať v prípade, ak je prítomná genetická rovnováha v testovanej populácii.

Nami zistené alelové frekvencie znázorňuje tabuľka 4. Vyplýva z nej, že približne 80% početnosti pripadá na alelu A a to u oboch plemien. Pri overovaní zhody pozorovaných genotypových početností s teoretickými hodnotami danými Hardyho- Weinbergovým vzťahom (tabuľky 5 – 7) sa ukázalo, že testované zvieratá oboch plemien vykazujú prítomnosť genetickej rovnováhy. Znamená to, že populácie môžu mať selekčný potenciál pre ďalšiu plemenitbu vzhľadom k tomuto znaku. Pre seriózne hodnotenie by však bolo vhodné vykonať

vyšetrenie reprezentatívneho počtu zvierat plemien Charolais aj Slovenského pinzgauského a pomocou populačno- štatistických modelov určiť významnosť tohto polymorfizmu pre ďalšiu plemenitbu.

6 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV

Metódy molekulárnej genetiky, medzi ktoré patrí aj analýza, ktorá je založená na špecifickom štiepení DNA enzýmov (PCR- RFLP) nazvanými reštrikčné endonukleázy miestami nazvanými palindromatické sekvencie, je možné uplatniť v praxi v oblasti genetiky a šľachtenia zvierat:

- § mapovanie genómu
- § analýza genetického polymorfizmu
- § markérovo- asistovaná analýza QTL

Naše výsledky prinášajú informáciu o alelových a genotypových frekvenciách vyšetreného jednonukleotidového polymorfizmu génu pre leptín, čo je možné využiť v ďalšej plemenitbe. Takéto informácie sú obzvlášť cenné v prípade ohrozených plemien, ako napr. Slovenské pinzgauské.

7 ZÁVER

Metóda PCR- RFLP je jednou z najjednoduchších metód využívaných na študovanie polymorfizmu aj na mapovanie génov. Jej použitím bolo možné zachytiť rozdiely medzi pozorovanými a očakávanými početnosťami u jednotlivých plemien.

V populácií 124 zvierat boli zistené prevažne dva genotypy a to heterozygotný genotyp A/T (467 bp), homozygotný genotyp A/A (252 bp a 215 bp), tvorený dvomi fragmentami, vzniknutými po štiepení restriktčnou endonukleázou *Cla*I. Homozygot T/T bol veľmi vzácny.

Na základe optimalizácie metódy PCR- RFLP pre primery LA- F a LA- R stanovujúce jednonukleotidový polymorfizmus A/T exónu 2 génu pre hovädzí leptín sa uskutočnila genotypizácia vzoriek plemena Charolais a Slovenského pinzgauského plemena. Polymorfizmus bol študovaný v skupine 12 kráv plemena Charolais, 56 býkov toho istého plemena a 56 volov plemena Slovenského pinzgauského plemena. V populácií Slovenského pinzgauského dobytky bol detegovaný genotyp A/A s frekvenciou 36,12 % a genotyp A/T s frekvenciou 17,70 %. Genotyp T/T s genotypovou frekvenciou 2,18 %. Frekvencia alely T bola 19,64 % a frekvencia A bola 80,36 %. V populácií plemena býkov Charolais bol detegovaný genotyp A/A s frekvenciou 40,3 %, genotyp A/T s frekvenciou 14,40 % a genotyp T/T s frekvenciou 1,30 %. Frekvencia alely T bola 15,18 % a frekvencia alely A bola 84,82 %. V populácií plemena kráv Charolais bol detegovaný genotyp A/A s frekvenciou 7,50 %, genotyp A/T s frekvenciou 4,50 % a genotyp T/T s genotypovou frekvenciou 0,50 %. Frekvencia alely T bola 79,17 % a frekvencia alely A bola 20,83 %. V prípade kráv plemena Charolais sú výsledky iba informatívne, keďže počet testovaných jedincov bol malý.

Z testovania prítomnosti genetickej rovnováhy v zmysle dikcie Hardyho-Weinbergovho zákona môžeme konštatovať, že ani jedna zo sledovaných populácií sa výrazne neodchyľuje od očakávaných početností.

8 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. BAUEROVÁ, M. – TURČÁNI, M. – OMELKA, R. 2004. Princíp a využitie polymerázovej reťazovej reakcie. In: *Polymerázová reťazová reakcia* [CD- ROM]. Nitra: FPV UKV, 2004.
2. Beef Cattle Breeds. 2010 [online] aktualizované 2010. [cit. 2009-08-04]. Dostupné na: <<http://www.cattle.com/BreedsOfCattle/Images/charolais.jpg>>.
3. BRASCAMP, E. W. – HALEY, C. S. – GROENEN, M. A. M. – JANSS, L. G. 1995. In: *Pig News and Information*, vol. 16, 1995, p. 41 – 46.
4. BROCKMANN, G. A – KRATZSCH, J. – HALEY, C. S. 2000. Single QLT effects, epistasis and pleiotropy account for two- thirds of the phenotypic F(2) variance of growth and obesity in DUGi x DBA/2 mice. In: *Genome Res.*, vol. 2, 2000, p. 1941- 1957.
5. CARO, J. – KOLACZYNSKI, J. – NYCE, M. – OHANNESIAN, J. – OPENTANOVA, I. –GOLDMAN, W. – LYNN, R. – ZHANG, P. – SINHA, M. – CONSIDINE, R. 1996. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. In: *The Lancet*, vol. 348, 1996, p. 159- 161.
6. DE LA BROUSSE, F. C. – SHAN, B. – CHEN, J. L. 1996. Identification of the promoter of the mouse obese gene. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 9, 1996, p. 4096- 4101.
7. FRUHBECK, G. – JEBB, S. A. – PRENTICE, A. M. 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. In: *Clin. Physiol.*, vol. 18, 1998, p. 399- 419.

8. GÁLOVÁ, Z. – SALAJ, J. – MATUŠÍKOVÁ, I. 2005. *Molekulárna biológia*. 1. vyd. Nitra: SPU, 2005. 165 s. ISBN 978-80-8069-951-2.
9. Genetika 2010 [online] aktualizované 2010. [cit. 2009-09-12]. Dostupné na: <http://www.tuzvo.sk/files/3_3/katedry_lf/kf/skripta.cvicenia.tl1.pdf>.
10. GROSFELD, N. M. – ANDRE, J. – HAUGUEL- DE MOUZON, S. – BERRA, E. – POUYSSEGUR, P. – GURRE- MILLO, M. 2002. Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. In: *J. Biol. Chem.*, vol. 277, 2002, p. 42953- 42957.
11. HAMMAN, A. – MATTHAEI, S. 1996. Regulation of energy balance by leptin. In: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 104, 1996, p. 293- 300.
12. HE, Y. – CHEN, H. – QUON, M. J. – REITMAN, M. 1995. The mouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer- binding protein alpha. In: *J. Biol. Chem.*, vol. 270, 1995, p. 28887- 28891.
13. HIROIKE, T. – HIGO, J. – JINGAMI, H. – TOH, H. 2000. Homology modeling of human leptin/leptin receptor complex. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 275, 2000, p. 154- 158.
14. HOLLENBERG, A. N. – SUSULIC, V. S. – MADURA, J. P. – ZHANG, B. – MOLLER, D. E. – TONTONOZ, P. – SARRAF, P. – SPIELGELMAN, M. – LOWELL, B. B. 1997. Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein- alpha and peroxisome proliferator- activated receptor- gamma on the leptin promoter. In: *J. Biol. Chem.*, vol. 272, 1997, p. 5283- 5290.
15. HWANG, C. S. – MANDRUP, S. – MACDOUGALD, O. A. – GEIMAN, D. E. – LANE, M. D. 1996. Transcriptional activation of the mouse obese (*ob*) gene by CCAAT/ enhancer binding protein alpha. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 93, 1996, p. 873- 877.

16. Chi- Square test dobrej zhody. 2010 [online] aktualizované 2010. [cit. 2009-11-2]. Dostupné na: <<http://vz.truni.sk/Prednasky/analyza%20dat/aed2chisquare.html>>.
17. KIM, J. B. – SARRAF, P. – WRIGHT, M. YAO, K. M. – MUELLER, E. – SOLANES, G. – LOWELL, B. B. – SPIEGELAMN, B. M. 1998. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. In: *J. Clin. Invest.*, vol. 83, 1998, p. 1-9.
18. KNOLL, A. ET. AL. 2002. *Molekulárni genetika zvierat (Metódy detekce polymorfizmů DNA genů)*. Brno : MZLV. 2002, 168 s. ISBN 80-7154-616-6.
19. KONFORTOV, B. A. – LICENCE, V. E. – MILLER, J. R. 1999. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. In: *Mamm. Genome.*, vol. 10, 1999, p. 1142 – 1145.
20. LAGONIGRO, R. – WIENER, P. – PILLA, F. – WOOLLIAMS, J. A. – WILLIAMS, J. L. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. In: *Anim. Genet.*, vol. 34, 2003, p. 371- 374.
21. Leptin, Lep. 1995 [online] aktualizované 2009. [cit. 2009-08-04]. Dostupné na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=164160>>.
22. MASON, M. M. – HE, Y. – CHEN, H. – QUON, M. J. – REITMAN, M. 1998. Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. In: *Endocrinology*, vol. 139, 1998, p. 1013- 1022.
23. MEISSNER, T. H. E. – OSTREICHER, I. – ALLABAUER, I. – RASCHER, W. – DOTSCH, J. 2003. Synergistic effects of hypoxia and insulin are regulated by different transcriptional elements of the human

- leptin promoter. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 303, 2003, p. 707- 712.
24. MILLER, S. G. – VOS, P. DE. – GUERRE- MILLO, M. – WONG, K. – HERMANN, T. – SATAELS, B. – BRIGGS., M. R. – AUWERX, J. 1996. The adipocyte specific transcription factor C/EBP alpha modulates human ob gene expression. In: *Proc. Natl. Acad. U S A*, vol. 93, 1996, p. 5507- 5511.
25. OZATA, M. – OZDEMIR, I. C. – LICINIO, J. 1999. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin- mediated defects. In: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 84, 1999, p. 3686- 3695.
26. PFISTER- GENSKOW, M. – HAYES, H. – EGGEN, A. – BISHOP, M. D. 1996. Chromosomal localization of the bovine obesity (OBS) gene. In: *Mamm Genome*, vol. 7, 1996, p. 398- 399.
27. PŘYBIL, J. – FLÁK, P. – JAKUBEC, V. 1997. Aktuální poznatky z populační a kvantitativní genetiky ve šlechtění hospodářských zvířat. In: *Živočišná výroba*, vol. 42, 1997, č. 6, s. 277 – 285.
28. ROCK, F. L. – ALTMAN, S. W. – HEEK, M. – KASTELEIN, R. A. – BAZAN, J. F. 1996. The leptin haemopoietic cytokine fold is stabilized by an intrachain disulfide bond. In: *Horm. Metab. Res.*, vol. 28, 1996, p. 649- 652.
29. SAIKI, R. K. – SCHARF, S. – FALOONA, F. – MULLIS, K. B. – HORN, G. T. – ERLICH, H. A. – ARHNEM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta – globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Science*, vol. 230, 1985, p. 1350 – 1354.

30. SAMBROOK, J.E. – RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3. rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001. ISBN 0-87969-577-3.
31. SOUTHERN, E. 1979. Gel electrophoresis of restriction fragments. In: *Methods Enzymol*, vol. 68, 1979, p. 152 - 176.
32. STROBEL, A. – ISSAD, T. – CAMOIN, L. – OZATA, M. – STROBERG, A. D. 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. In: *Nat. Genet.*, vol18, 1998, p. 213- 215.
33. TANIGUCHI, Y. – ITOH, H. – YAMADA, T. – YADA, T. OKA, Y. 2002. Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. In: *IUBMB Life*, vol. 53, 2002, p. 131- 135.
34. χ^2 – test. 2003 [online] aktualizované 2009. [cit. 2009-08-13]. Dostupné na: <http://www.bioweb.genezis.eu/print.php?cat=7&file=chi_kvadrat>.
35. ZHANG , Y. – PROENCA, R. – MAFFEI, M. – BARONE, M. – LEOPOLD, L. – FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In: *Nature*, vol. 372, 1994, p. 425- 432.
36. ZHANG, F. – BASINSKI, M. B. – BEALS, J. M. – BRIGGS. S. L. – CHURGAY, L. M. – CLAWSON, D. K. – DIMARCHI, R.D. – FURMN, T. C. – HALE, J. E. – HSIUNG, H. M. – SCHONER. B. E. – SMITH, D. P. – ZHANG, X. Y. – WERY, J. P. SCHEVITZ, R. W. 1997. Crystal structure of the obese protein leptin- E 100. In: *Nature*, vol. 387, 1997, p. 206- 209.
37. Zväz chovateľov pinzgauského dobytku. 2004 [online] aktualizované 2010. [cit. 2009-08-04]. Dostupné na: <www.pinzgau.sk/img/1997.jpg>.

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Stanovenie polymorfizmu leptínového génu *Bos taurus*

9 PRÍLOHY

Študijný program:	Aplikovaná biológia
Študijný odbor:	4.2.1 Biológia
Školiace pracovisko:	Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Školiteľ:	prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.
Konzultant:	RNDr. Vladimír Meluš, PhD.

Príloha A: CD médium – diplomová práca v elektronickej podobe, prílohy v elektronickej podobe.