

ASSOCIATION ANALYSIS OF GENE H-FABP IN A GROUP OF PIGS CZECH LARGE WHITE BREED TO MEAT QUALITY

Sedláčková T.¹, Urban T.¹, Gregor T.², Chalupová P.¹, Kaplanová K.¹, Sláma P.¹

¹Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

²Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: SedlacT@seznam.cz, xchalup1@mendelu.cz

ABSTRACT

Heart fatty acid-binding protein (*H-FABP*) belongs to the FABP family of genes. Fatty acid binding proteins (FABPs) play a crucial role in intracellular fatty acid transport by binding and properly targeting long-chain fatty acids to their correct metabolic sites (Chmurzynska, 2006). This gene is one important of candidate genes of intramuscular fat (IMF). Positioning of the gene is on the 6th chromosome of pig. A total of 44 pigs Czech Large White pigs were used. Localization of the first polymorphism is at the X98558:g.1321G>C, exon 1 and second is at Y16180:g.1811 G>C in intron 2. Both polymorphisms were detected by PCR-RFLP. The PCR products were digested with *HinfI* and *HaeIII*. Primers sequence. The frequencies of allele H and A of polymorphism of H-FABP determined by *HinfI* are 0.38 and 0.62, respectively. These polymorphisms of H-FABP determined by *HaeIII* have frequencies of allele D and G, 0.61 and 0.39, respectively. The *HinfI* polymorphism in H-FABP gene: *DG* genotype had higher with higher amounts of intramuscular fat ($P \leq 0.01$) compared to *GG* genotype. *DD* genotype in comparison to *DG* genotype associated with higher levels of stearic and oleic acid ($P \leq 0.01$). *DD* genotype was associated with higher amounts of stearic acid ($P \leq 0.05$) than *GG*.

Key words: H-FABP gene, PCR-RFLP, association analysis

Acknowledgments: This work was supported by a grant of IGA MENDELU (No. TP 9/2010) Brno, Czech Republic.

ÚVOD

Cílem této práce bylo vypracování asociační analýzy dvou polymorfismů genu *H-FABP* s množstvím intramuskulárního tuku (IMT) a obsahem mastných kyselin ve vepřovém masu. Gen *H-FABP* (Heart fatty acid-binding protein) patří do rodiny FABP a významně ovlivňuje ukládání intramuskulárního tuku. Tento gen vytváří vazebné proteiny mastných (FABPs) a ty hrají klíčovou roli v transportu intracelulárních mastných kyselin a jejich správné zařazení do metabolického cyklu (Chmurzynska, 2006). Tyto proteiny se podílí na přepravě mastné kyseliny z buněčné membrány do místa oxidace mastných kyselin a syntézy triglyceridů a fosfolipidů (Gerbens *et al.* 1999). U prasete je lokalizován na šestém chromozomu a je jedním z kandidátních genů pro intramuskulární tuk. IMT je jeden z hlavních faktorů ovlivňujících senzorickou a chuťovou kvalitu masa. Studium tohoto genu nám umožňuje zjistit, jakým způsobem je možné ovlivnit kvalitu a množství IMT ve svalu. Při správném poměru mastných kyselin a následně obsahu intramuskulárního tuku můžeme zvýšit senzorickou kvalitu a tím přispět k vyšší konkurenceschopnosti na trhu s vepřovým masem.

MATERIÁL A METODIKA

V této studii bylo použito cekem 44 jedinců prasat plemene bílé otcovské. První polymorfismus byl lokalizována na X98558: g.1321G> C, exonu 1 a druhý je na Y16180: g.1811 G>C v intronu 2 (Pang *et al.*, 2006). Oba polymorfismy byly detekovány pomocí PCR-RFLP. Sekvence primerů (Pang *et al.*, 2006) a velikost PCR produktu jsou uvedené v tabulce 1.

Složení reakční směsi: celkový objem 13,5 µl; 1 µl templátové DNA, 9,5 µl H₂O, 1,5 µl Taq Unis PCR buffer complete (Top-Bio), 0,25 µl 10 mM dNTP mixu, 0,25 µl primeru F (10 pmol/µl), 0,25 µl primeru R (10 pmol/µl), 0,1 µl Taq Unis DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio). Podmínky pro amplifikaci byly: 3 min. denaturace při 94°C, 94°C/1 min., 62°C/1 min., 72°C/2 min. a 72°C/10min. PCR produkty byly štěpeny pomocí *Hinf*I a *Hae*III endonukleázami. Fragmenty byly vizualizovány a výsledky analyzovány na 3% agarózovém gelu (Obr. 1 a 2).

Tab. 1: PCR-RFLP, Primery sekvence, PCR produkt velikosti

PCR-RFLP	Primer	Velikost produktu (bp)
<i>Hinf</i> I	5'-GGACCCAAGATGCCTACGCCG-3'	693
	5'-CTGC AGCTTTGACCAAGAGG-3'	
<i>Hae</i> III	5'-ATTGCTTCGGTGTG'GAG-3'	816
	5'-TCAGGAATGGGAGTTATTGG-3'	

Statistická analýza

Analýza byla provedena v programu SAS v 9.1.4 pomocí procedury GLM:

$$Y_{ijk} = \mu + H - FABP_i + H - FABP_j + e_{ijk}$$

Y_{ijk} – fenotypová hodnota analyzovaného znaku

μ – průměr populace

$H-FABP_i$ – pevný efekt genotypu $H-FABP$ 1. polymorfismus

$H-FABP_j$ – pevný efekt genotypu $H-FABP$ 2. polymorfismus

e_{ijk} – náhodná chyba pozorování

VÝSLEDKY A DISKUZE

Polymorfismus G>C ($H-FABP$) na pozici 1321 bp byl štěpen pomocí restriktivního enzymu *Hinf*I na alelu H (339, 172, 98, 59, a 25 bp fragmentů) a alelu A (339, 231, 98 a 25 bp fragmentů). U prvního polymorfismu (1 321 bp G> C) bylo 27 zvířat homozygotních AA a u 17 byl zjištěn genotyp HH (obr. 1). Relativní frekvence alel H a A polymorfismu $H-FABP$ štěpeného *Hinf*I jsou 0,32 a 0,62 (tab. 3). Polymorfismus G>C ($H-FABP$) na pozici 1 811 bp byl štěpen pomocí *Hae*III endonukleázy. Alela G (405, 278, 117, a 16 bp fragmentů) a alela D (683, 117 a 16 bp). Relativní četnosti alely G a D byly vypočítány jako 0,39 a 0,61 (tab. 3). V polymorfismu *Hae*III G> C bylo

MENDELNET 2010

detekováno 15 prasat jak homozygoti *GG*, 23 heterozygoti *DG* a 6 jedinců bylo homozygotních *DD* (obr. 2).

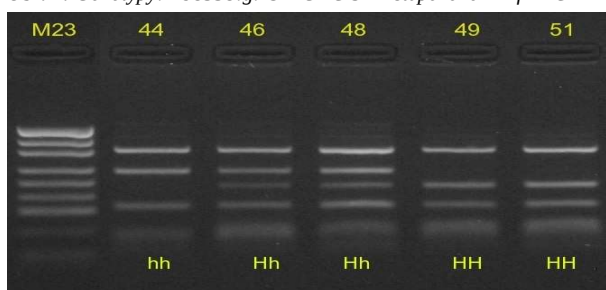
Tab. 2: frekvence genotypů: *H-FABP X98558: G.1 321 G>C* a *Y16180: G.1 811 G>C*

genotype frequency	<i>H-FABP</i> polymorphism 1 21 <i>G>C</i>			<i>H-FABP</i> polymorphism 1 811 <i>G>C</i>		
	<i>AA</i>	<i>AH</i>	<i>HH</i>	<i>GG</i>	<i>DG</i>	<i>DD</i>
absolute	27	0	17	15	23	6
relative	0.61	0.00	0.34	0.34	0.52	0.13

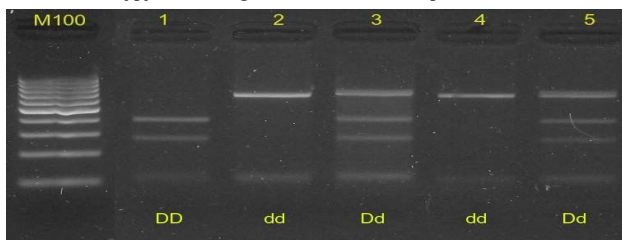
Tab. 3: Frekvence alel: *H-FABP X98558:g.1 321 G>C* a *Y16180:g.1 811 G>C*

allele frequency	<i>H-FABP</i> polymorphism 1 321 <i>G>C</i>		<i>H-FABP</i> polymorphism 1 811 <i>G>C</i>	
	<i>A</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>D</i>
absolute	54	34	53	35
relative	0.62	0.38	0.39	0.61

Obr. 1: Genotypy: *X98558:g.1321G>C* SNP štěpeného *Hinf* I PCR-RFLP



Vzorky :44: *hh*; 46, 48: *Hh*; 49, 51: *HH*;



Vzorky: 1: DD; 2,4: dd; 3,5:Dd;

Asociační analýza

Celkově bylo asociováno 44 jedinců plemene bílé ušlechtilé s intramuskulárním tukem a 31 jedinců téhož plemene s obsahem různých mastných kyselin (palmitic, stearic, oleic, linouc). Třináct jedinců muselo být vyřazeno pro nedostatek dat pro asociaci s kyselinami.

Tab.4: Asociace polymorfismu X98558:g.1321G>C SNP štěpeného Hinf I ($LSM \pm S_E$).

	AA(27)	HH(17)
IMT ¹	3,35 $\pm$ 0,19	3,19 $\pm$ 0,25
palmitic	27.226 $\pm$ 0.34	27.24 $\pm$ 0.44
stearic	14.38 $\pm$ 0.32	14.54 $\pm$ 0.41
oleic	52.32 $\pm$ 0.51	51.72 $\pm$ 0.65
linolic	6.03 $\pm$ 0.40	6.47 $\pm$ 0.52

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly:

**P $\leq$ 0,01, * P $\leq$ 0,05, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru.

IMT¹- bylo použito 31 jedinců; genotyp AH byl určen jen jeden, proto byl s asociací

Vliv polymorfismusu X98558:g.1321G>C v genu *H-FABP* nebyl statistický průkazný se žádnou z měřených vlastností (intramuskulární tuk, kyselina palmitová, sterová, olejová a linolová).

Tab.5: Asociace polymorfizmu Y16180:g. 1 811 G>C SNP štěpeného *Hae*III ($LSM \pm S_E$).

	DD(6)	DG(23)	GG(15)
IMT ¹	3,03 $\pm$ 0,41	3,01 $\pm$ 0,20**	3,91 $\pm$ 0,24**
palmitic	26.56 $\pm$ 0.87	27.68 $\pm$ 0.29	27.46 $\pm$ 0.34
stearic	12.98 $\pm$ 0.80**/*	15.27 $\pm$ 0.27**	15.12 $\pm$ 0.31*
oleic	54.04 $\pm$ 1.29**	50.38 $\pm$ 0.43**	51.64 $\pm$ 0.50
linolic	6.37 $\pm$ 1.02	6.64 $\pm$ 0.34	5.74 $\pm$ 0.40

Hodnoty se stejnými exponenty v řádku vykazují následující statisticky významné rozdíly:

**P $\leq$ 0,01, * P $\leq$ 0,05, ^a blížíci se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru.

IMT¹- bylo použito 31 jedinců

Výsledky ukazují, že polymorfismus genu *H-FABP* Y16180:g. 1 811 G>C je asociován s množstvím intramuskulárního tuku u souboru prasat plemene bílé otcovské. Tyto zjištěné výsledky jsou v souladu s ostatními asociačními studiemi u prasat, týkajících se genů ovlivňujících ukládání tuku v těle prasete (Gerbens *et al.* 1999; Nechtelberger *et al.* 2001; Urban *et al.* 2002; O'Vilo *et al.* 2002, Switonski *et al.* 2010). U polymorfizmu *Hinf* I v genu *H-FABP* (tab.5), vykazovali jedinci s genotypem *DG* vyšší množství intramuskulárního tuku (P $\leq$ 0,01) v porovnání s genotypem *GG*. Genotyp *DD* byl oproti genotypu *DG* asociován s vyšším obsahem kyseliny stearové a olejové (P $\leq$ 0,01). Genotyp *DD* byl asociován s vyšším množstvím kyseliny stearové (P $\leq$ 0,05), než-li genotyp *GG*.

ZÁVĚR

U souboru 44 jedinců prasat plemene české bílé ušlechtilé byly testovány metodou PCR-RFLP dva polymorfizmy: X98558:g.1321G>C SNP štěpeného *Hinf* I a Y16180:g. 1 811 G>C SNP štěpeného *Hae*III. U polymorfizmu Y16180:g. 1 811 G>C SNP štěpeného *Hae*III genu *H-FABP* byly zjištěny vysoce průkazné rozdíly (P $\leq$ 0,01) u intramuskulárního tuku, množstvím kyseliny stearové a olejové. U dalších námi zkoumaných parametrů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Rovněž u polymorfizmu genu X98558:g.1321G>C SNP *Hinf* I nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Pro více vypovídající analýzu by bylo vhodné soubor zkoumaných jedinců rozšířit a ověřit výsledky na dalších populacích. Výzkum stále pokračuje a výsledky budou rozšířeny.

Gerbens F, Rettenberg G, Lenstra JA, Veerkamp JH, te Pas MFW. : Characterization, chromosomal localization and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. *Mamm Geonome*, 1997; 8:328–332.

Gerbens F., van Erp A.J.M., Harders F.L., Verburg F.J., Meuwissen T.H.E., Veerkamp J.H., te Pas M.F. Effect of genetic variants of the heart fatty acid-binding protein gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. 1999, *J. Anim. Sci.*, 77, 846–852.

Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure, and polymorphism. *J Appl Genet*, 2006; 47:39–48.

Nechtelberger D., Pires V., Solkner J., Stur I., Brem G., Mueller M., Mueller S. intramuscular fat kontent and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *J. Anim. Sci.*, 79, 2001, 2798–2804.

O`vilo C., Oliver A., Noguera J.L., Clop A., Barragan C., Varona L., Rodriguez C., Toro M., Zanchez A., Perez- Enciso M., Silio L. Test for positional candidate genes for body composition on pig chromosome 6. *Genet. Sel. Evol.*, 2002, 34, 465–479.

Switonski M., Stachowiak M., Cieslak J., Bartz M., Grzes M.: Genetics of fat tissue accumulation in pigs: a komparative approach. *Appl Genet* 51(2), 2010, 153–168

Urban T., Mikolasova R., Kuciel J., Ernst M., Ingr I. A study of association of the FABP3 genotypes with fat and meat production of pigs. *J. Appl. Genet.*, 2002, 43, 505–509.

Yang X, Deignan JL, Qi H, Zhu J, Qian S, Zhong J, et al.. Validation of candidate causal genes for obesity that affect shared metabolic pathways and networks. *Nat Genet*, 2009, 41: 415–423.