

ASOCIATION ANALYSIS IN *HMGCR*, *TCFL*, *H-FABP* AND *FTO* GENES WITH MEAT PRODUCTION OF PIGS

Kratochvílová L.¹, Pavelková M.¹, Vykoukalová Z.¹, Urban T.¹, Sláma P.¹, Šulcerová H.², Jůzl M.², Gregor T.², Rozíková V.², Knoll A.¹

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

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

E-mail: l.krat@seznam.cz

ABSTRACT

Our objective was to analyze polymorphisms in *HMGCR*, *TCFL*, *H-FABP* and *FTO* genes and assess association with meat quality parameters. Testing took place on a set of 104 pigs Large White breed. As the polymorphism detection methods were used PCR (polymerase chain reaction) and RFLP (restriction fragment length polymorphism). In the test group were calculated the frequency of genotypes and subsequently was performed association analysis of commercial properties. We observed influence of A>G polymorphism in *HMGCR* gene to color (yellowness b). We proved statistically significant differences between genotypes *DD* - *dd* ($P < 0.05$) and *Dd* - *dd* ($P < 0.05$) for meat color (yellowness b). Moreover, we found association between *HMGCR* and L (lightness) ($P < 0.05$). *AC* genotype was associated with higher lightness when compared to *CC* and *AA* genotypes. No association was found between *TCFL*, *H-FABP* and *FTO* genes and intramuscular fat (IMF), ultimate pH, ultimate electrical conductivity and color.

Key words: *HMGCR*, *CFL*, *H-FABP*, *FTO*, meat production, Czech large white pig.

Acknowledgement: This study was supported by the IGA TP 7/2010.

ÚVOD

Stále zvyšující se důraz na kvalitu potravin, nejen ze strany konzumentů, klade vysoké nároky na produkci vepřového masa. V chovu prasat již tedy nejde jen o zvýšení užitkových vlastností, ale o vlastnosti jako jsou barva masa, jeho pH, obsah mastných kyselin, obsah vody a intramuskulárního tuku a dalších vlastností. Cílem této práce je analyzovat možné asociace vybraných genů s těmito vlastnostmi. Byl vybrán soubor jedinců plemene bílé ušlechtilé, jež má v našem státě v chovech prasat majoritní zastoupení. Geny byly vybrány na základě vědeckých prací, ve kterých je právě tato problematika diskutována.

Gen *HMGCR* (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) je limitujícím enzymem pro biosyntézu cholesterolu. Ovlivňuje tedy vlastnosti související s obsahem tuků, ale také vlastnosti kvality masa a produkční vlastnosti prasat. V této práci byla studována mutace c.807A>C v exonu 9, převzata z Canovas et al. (2010).

Gen *TCFL* (*TCF7L2*, transcription factor 7-like 2) byl vybrán k testování na základě asociacních studií, které prokázaly jeho široký vliv na nejrůznější vlastnosti kvality vepřového masa. Byly prokázány asociace *TCF7L2* s výškou hřbetního tuku, procentem lipidů či s barvou masa a denním přírůstkem (Du et al., 2009; Fan et al., 2010).

Gen *H-FABP* (fatty acid binding protein 3) významně ovlivňuje ukládání intramuskulárního tuku. U prasete je gen *H-FABP* lokalizován na chromozomu 6. Pro tuto práci byl vybrán polymorfismus 1811G>C lokalizovaný v intronu 2. Metodiky PCR-RFLP a sekvence primerů byly převzaty z publikace Pang et al. (2006).

Gen *FTO* (fat mass and obesity associated) Pro tuto práci byl vybrán polymorfismus *FTO:g.276T>G*, u něhož Fontanesi et al. (2010) prokázal vliv alely *T* na vyšší úroveň intramuskulárního tuku a je asociována i s vyšším hřbetním tukem u populace italského duroca a komerčních linií prasat.

MATERIÁL A METODIKA

Testovaná skupina: Jednalo se o 104 prasnic plemene české bílé ušlechtilé pocházejících z jednoho chovu. Během porážky byla odebrána periferní krev, z níž byla vyzolována DNA pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN). Byly vybrány vhodné jednonukleotidové polymorfizmy.

Měření barvy syrového vepřového masa proběhlo s využitím systému CIE L*a*b* pomocí spektrofotometru Konica Minolta CM-3500d (Konica Minolta, Osaka, Japan). pH bylo měřeno po 24 hodinách post mortem pomocí pH-metru Portamess® 911 Ph (Knick Elektronische Messgeräte,

Berlín, Německo). Pro stanovení elektrické vodivosti masa byl využit konduktometr Fleischtester LF 191/F (WTW, Germany). Toto bylo provedeno na Ústavu technologie potravin.

Výsledky byly zpracovány v programu SAS for Windows 9.1.4. lineárním modelem s pevnými efekty GLM (Tab.1, Tab.2).

Polymorfismus *HMGCR*: c.807A>C byl testován metodou PCR-RFLP. Primery a navržená metodika byly převzaty z Canovas *et al.* (2010).

Primery:

F: 5'-CAAATCCTGTTACTCAGAGAG-3'

F: 5CAGGAGCATAGCGTGTTATG-3'

Složení reakční směsi:

1x *Taq* pufr kompletní (Top-Bio, Prague, Czech Republic), 100 µM každého nukleotidu (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 µM každého primeru, 0,6 U *Taq* DNA polymerázy Unis (Top-Bio, Prague, Czech Republic) a 50 ng genomové DNA.

PCR byla provedena v termálním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Teplotní profil PCR reakce:

Celkový objem 12,5µl.

Počáteční denaturace: 95°C/5min,

35cyklů: (95°C/30s, 56°C/30s, 72°C/40s),

Závěrečná elongace 72°C/5min.

Získaný PCR fragment o velikosti 650 bp byl vizualizován na 3% agarózovém gelu pomocí ethidium bromidu pod UV světlem.

PCR fragment byl dále štěpen restrikčním enzymem *Hin6I* (izoschizomer *HhaI*). Podmínky restrikce byly následující: 1 U restrikčního enzymu *Hin6I* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) při 37°C po dobu 16 hodin (přes noc). Dále byla provedena agarózová elektroforéza. Výsledné genotypy byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Při přítomnosti alely *A* zůstává PCR fragment neštěpen (650 bp), je-li přítomna alela *C*, je PCR produkt štěpen na 2 fragmenty o velikostech 450bp a 200 bp.

Polymorfismus *TCFL*: c.646+154A>G byl testován metodou PCR-RFLP. Primery a navržená metodika byly převzaty z Fan *et al.* (2010). Oproti původní metodice byla upravena teplota annealingu na 62°C.

Primery:

F: 5'- AGAAAGGAAAGGGTGCAGGT - 3'

F: 5'- GCGATAACTTGTTCAGCACGA - 3'

Složení reakční směsi:

1x Taq pufr kompletní (Top-Bio, Prague, Czech Republic), 200 µM každého nukleotidu (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 µM každého primeru, 1,25 U Taq DNA polymerázy Unis (Top-Bio, Prague, Czech Republic) a 50 ng genomové DNA.

PCR byla provedena v termálním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Celkový objem byl 12,5µl.

Teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace: 95°C/5min,

35cyklů (95°C/30s, 62°C/40s, 72°C/40s),

Závěrečná elongace: 72°C/5min

PCR fragment o velikosti 314 bp byl štěpen restričním enzymem *Bse*NI . Podmínky restrikce byly následující: 1 U restričního enzymu *Bse*NI (Fermentas, Vilnius, Lithuania) při 65°C po dobu 16 hodin (přes noc). Genotypy byly určeny na 3% agarozovém gelu po elektroforéze pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Alela A zůstává neštěpena (314 bp), v případě přítomnosti alely G je PCR produkt štěpen na 2 fragmenty o velikostech 192 a 122 bp

Polymorfismus *FTO*:g.276T>G byl převzat z Fontanesi *et al.* (2010)

Primery:

F: 5'- ACAGGCCCTGAAGAGGAAAG - 3'

F: 5'- AGTAACCTGGAGTTCCTGTGG - 3'

Složení reakční směsi:

1x LA PCR pufr kompletní (Top-Bio, Prague, Czech Republic), 200 µM každého nukleotidu (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 µM každého primeru, 2 U LA DNA polymerázy mix (Top-Bio, Prague, Czech Republic), 3 % DMSO a 50 ng genomové DNA.

Teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace 95°C/2min,

40x (95°C/30s, 64°C/40s, 68°C/50s),

Závěrečná elongace 68°C/7min, celkový objem 12,5µl.

Získaný PCR fragment o velikosti 397 bp byl vizualizován na 3% agarózovém gelu pomocí ethidium bromidu pod UV světlem a dále štěpen restričním enzymem *TaiI*. Podmínky restrikce byly následující: 1 U restričního enzymu *TaiI* (Fermentas, Vilnius, Lithuania) při 65°C po dobu 16 hodin (přes noc). Genotypy byly determinovány na 3% agarozovém gelu po elektroforéze pomocí ethidium bromidu pod UV světlem. Alela *T* zůstává neštěpena (397 bp), v případě alely *G* je PCR produkt štěpen na 2 fragmenty o velikostech 275 a 122 bp.

Polymorfismus H-FABP Y16180: g.1811G>C byl převzat z Pang *et al.* (2006).

Primery:

F: 5'- ATT GCT TCG GTG TGT TTG AG- 3'

F: 5'- TCA GGA ATG GGA GTT ATT GG - 3'

Složení reakční směsi:

1,1x *Taq* pufr kompletní (Top-Bio, Prague, Czech Republic), 1,4 mM Mg²⁺ (Top-Bio, Prague, Czech Republic), 216 μM každého nukleotidu (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 0,2 μM každého primeru, 0,5 U *Taq* DNA polymerázy Unis (Top-Bio, Prague, Czech Republic) a 50 ng genomové DNA.

PCR byla provedena v termálním cykleru GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Celkový objem byl 12,5μl.

Teplotní profil PCR reakce:

Počáteční denaturace: 94°C/3min,

32 cyklů (94°C/1min, 62°C/1min, 72°C/2min),

Závěrečná elongace: 72°C/10min.

Statistická analýza:

Výsledky byly zpracovány v programu SAS for Windows 9.1.4. lineárním modelem s pevnými efekty GLM. Do výpočtu byla aplikována Bonferroniho korekce.

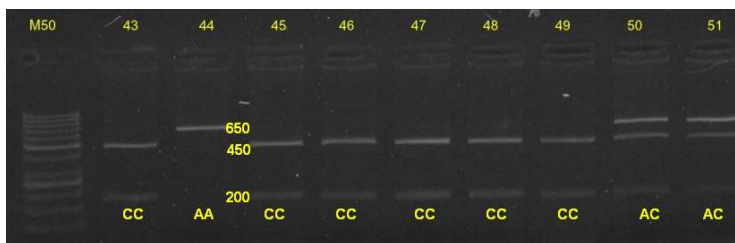
VÝSLEDKY A DISKUZE

Stanovení polymorfizmu v genu *HMGR*: c.807A>C:

PCR produkt (650 bp) tvoří po štěpení restriční endonukleázou *Hin6I* podle genotypu na fragmenty následujících velikostí:

Alela A - 650 bp (neobsahuje štěpné místo pro Hin6I)

Alela C - 450 a 200 bp



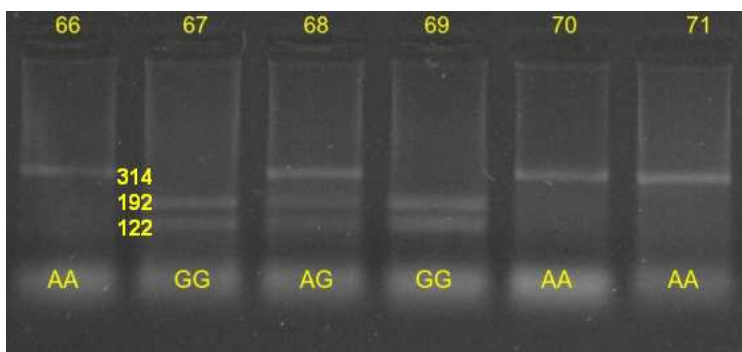
Obr. 1, Stanovení genotypů v genu *HMGCR*, vizualizace na 3% agarózovém gelu

Stanovení polymorfizmu v genu *TCFL*: c.646+154A>G:

PCR produkt tvoří po štěpení RE *Bse*NI podle genotypu fragmenty následujících velikostí:

Alela A - 314 bp (neobsahuje štěpné místo pro *Bse*NI)

Alela G - 192 a 122 bp



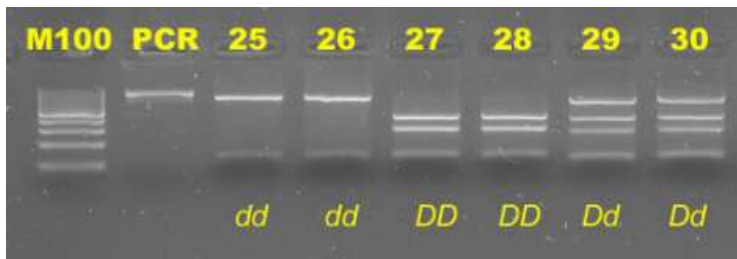
Obr. 2, Stanovení genotypů genu *TCFL*, vizualizace na 3% agarózovém gelu

Stanovení polymorfismu v genu H-FABP g.1811G>C

PCR produkt tvoří po štěpení RE *Hae*III dle genotypů následující fragmenty:

Alela *D* - 405, 278, 117 a 16 bp

Alela *d* - 683, 117 a 16 bp



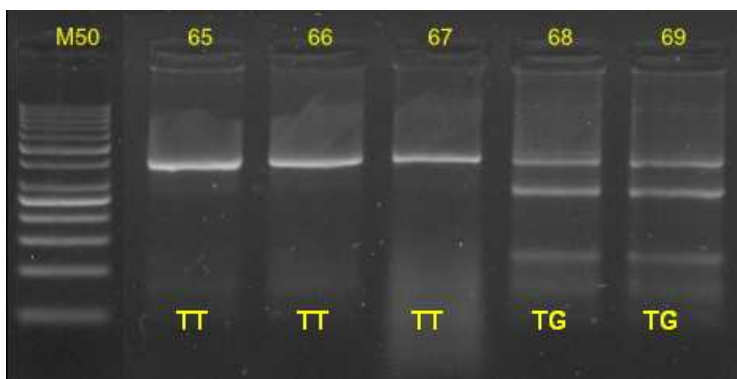
Obr.3, Stanovení genotypů genu *H-FABP*, vizualizace na 2% agarózovém gelu

Stanovení polymorfismu *FTO*:g.276T>G

PCR produkt tvoří po štěpení RE *Tai*I dle genotypu následující fragmenty:

Alela *T* - 397 bp (neobsahuje štěpné místo)

Alela *G* - 275 a 122 bp



Obr.4, Stanovení genotypů genu *FTO*, vizualizace na 3% agarózovém gelu

Po stanovení genotypů jednotlivých genů byly vypočítány frekvence genotypů a alel (Tab.3). Pro gen *HMGCR* byl stanoven genotyp u všech 104 vzorků, u genu *TCFL* to bylo 102 vzorků. Rovněž u genu *H-FABP* byly frekvence genotypů a alel počítány ze 100 vzorků a pro gen *FTO* tvořil soubor 99 jedinců. U genu *FTO* nebyl nalezen genotyp GG.

Tab.1 Porovnání genotypů genu *HMGCR* a *TCFL* metodou nejmenších čtverců (GLM)

Gen		Genotypy		
<i>HMG</i>	<i>Sledované</i>	AA	AC	CC
	<i>L lightness</i>	166,33±1	166,70±	153,58±3
	<i>a redness</i>	62,93±2,	60,83±0	153,58±3
	<i>b yellowness</i>	1,58±0,9	2,13±0,	1,74±0,2
	<i>pH_{ult}</i>	12,77±0,	12,42±0	12,36±0,
	<i>EV₂₄</i>	5,40±0,1	5,58±0,	5,52±0,0
	%sušiny	30,25±1,	29,24±0	29,83±0,
	<i>tuk</i> v	1,44±0,3	1,25±0,	1,31±0,6
	<i>tuk</i> v %	4,63±089	3,68±0,	3,87±0,2
	<i>TCF</i>		AA	AG
<i>L lightness</i>		160,53 ±	154,41±	161,93±5
<i>a redness</i>		61,68±0,	61,52±0	60,68±0,
<i>b yellowness</i>		1,92±0,2	1,70±0,	2,09±0,3
<i>pH_{ult}</i>		12,46±0,	12,34±0	12,32±0,
<i>EV₂₄</i>		5,50±0,3	5,56±0,	5,58±0,0
%sušiny		29,43±0,	29,76±0	29,65±0,
<i>tuk</i> v		1,28±0,0	1,28±0,	1,30±0,0
<i>tuk</i> v %		3,77±0,2	3,78±0,	3,93±0,3

* $P \leq 0,05$ statisticky průkazný rozdíl

L lightnes – světlost masa, *a redness* –barva masa (červená/zelená souřadnice), *b yellowness* – barva masa (žlutá/modrá souřadnice), *pH_{ult}*, *EV₂₄* (elektrická vodivost) měřené 24 hod. post mortem

Tab.2 Porovnání genotypů genu *H-FABP* a *FTO* metodou nejmenších čtverců (GLM)

<i>H-</i>		<i>DD</i>	<i>Dd</i>	<i>dd</i>
	<i>L lightness</i>	162,54 ±	158,96±4,	154,733±8
	<i>a redness</i>	61,53±0,	60,99±0,7	60,81±1,5
	<i>b yellowness</i>	1,76±0,2	1,83±0,23	2,92±0,0,4
	<i>pH_{tit.}</i>	12,43±0	12,38±0,2	12,33±0,5
	<i>EV₂₄</i>	5,51±0,3	5,54±0,03	5,67±0,0,0
	%sušiny	28,87±0,	30,02±0,4	30,75±0,1,
	tuk v gramech	1,29±0,0	1,29±0,07	1,68±0,01
	tuk v %	3,69±0,2	3,89±0,22	3,83±0,47
<i>FT</i>		<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>
	<i>L lightness</i>	155,03±	169,08±5,	x
	<i>a redness</i>	61,26±0,	60,68±1,0	x
	<i>b yellowness</i>	1,98±0,1	1,81±0,32	x
	<i>pH_{tit.}</i>	12,45±0,	12,21±0,3	x
	<i>EV₂₄</i>	5,54±0,0	5,56±0,03	x
	%sušiny	29,81±0,	29,12±0,6	x
	tuk v gramech	1,29±0,0	1,25±0,10	x
	tuk v %	3,85±0,1	3,67±0,31	x

* $P \leq 0,05$ statisticky průkazný rozdíl

L lightnes – světlost masa, *a redness* –barva masa (červená/zelená souřadnice), *b yellowness* – barva masa (žlutá/modrá souřadnice), *pH_{tit.}*, *EV₂₄* (elektrická vodivost) měřené 24 hod. post mortem

Tab. 3 Frekvence genotypů a alel

<i>Gen</i>	<i>absolutní frekvence genotypů</i>			<i>absolutní frekvence alel</i>	
<i>HMGC</i>	<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	<i>A</i>	50
	3	44	56	<i>C</i>	156
	<i>relativní frekvence genotypů</i>			<i>relativní frekvence alel</i>	
	<i>AA</i>	<i>CA</i>	<i>CC</i>	<i>a</i>	0,25
	0,0	0,4	0,5	<i>c</i>	0,75
<i>TCFL</i>	<i>absolutní frekvence genotypů</i>			<i>absolutní frekvence alel</i>	
	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	111
	36	39	27	<i>G</i>	93
	<i>relativní frekvence genotypů</i>			<i>relativní frekvence alel</i>	
	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>a</i>	0,54
	0,3	0,3	0,2	<i>g</i>	0,46
<i>H-</i>	<i>absolutní frekvence genotypů</i>			<i>absolutní frekvence alel</i>	
	<i>DD</i>	<i>Dd</i>	<i>dd</i>	<i>D</i>	130
	41	48	11	<i>d</i>	70
	<i>relativní frekvence genotypů</i>			<i>relativní frekvence alel</i>	
	<i>DD</i>	<i>Dd</i>	<i>dd</i>	<i>D</i>	0,65
	0,4	0,4	0,1	<i>d</i>	0,35
<i>FTO</i>	<i>absolutní frekvence genotypů</i>			<i>absolutní frekvence alel</i>	
	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	<i>T</i>	172
	72	28	0	<i>C</i>	28
	<i>relativní frekvence genotypů</i>			<i>relativní frekvence alel</i>	
	<i>TT</i>	<i>CT</i>	<i>CC</i>	<i>t</i>	0,86
	0,7	0,2	0	<i>c</i>	0,14

Canovas *et al.* (2010) studovali mutaci *HMGCR:c.807A>C* v exonu 9 a našli průkaznou asociaci alely *A* s vyšším obsahem intramuskulárního tuku, s vyšším obsahem olejové kyseliny a naopak s nižším obsahem linolové kyseliny v tuku u komerční populace prasat plemene duroc. V našem studovaném souboru byla nalezena asociace tohoto polymorfismu se světlostí masa (*L lightnes*). Byl prokázán statisticky průkazný rozdíl mezi genotypy *AC* a *CC* ($P \leq 0,05$), vyšší hodnotu vykazoval genotyp *AC* (Tab.1).

Dále byl nalezen statisticky průkazný rozdíl pro barvu masa (*b yellowness*) ($P \leq 0,05$) v genu *H-FABP*. Rozdíl byl mezi genotypem *dd*, který vykazoval nejvyšší naměřené hodnoty oproti genotypům *Dd* a *DD* (Tab.2). Nebyl nalezen žádný vliv polymorfismu *807A>C* na obsah tuku ani další testované vlastnosti.

ZÁVĚR

Na základě provedených analýz byla potvrzena asociace genu *H-FABP* s barvou masa (b yellowness). Statisticky průkazný rozdíl byl mezi genotypy *DD* a *dd*, dále také mezi genotypy *Dd* a *dd*. Pro gen *HMGCR* byl nalezen statisticky významný rozdíl mezi genotypy *AC* a *CC*, vyšší hodnoty udával genotyp *AC*. Pang et al.,(2006), Li et al., (2010) popsali asociaci genu pro obsah intramuskulárního tuku (IMT). Chalupová et al., (2011) popsala vliv alely *DD* na obsah IMT, toto nebylo na námi testovaném souboru prokázáno.

Chalupová et al., (2011) též našla vliv genotypu *AC* genu *HMGCR* na vyšší obsah IMT, oproti alele *CC*. V našem studovaném souboru byla nalezena asociace tohoto polymorfismu se světlostí masa (*L lightnes*).

U ostatních testovaných genů a jejich polymorfismů nebyla stanovena žádná asociace s vybranými vlastnostmi masné užitkovosti. Tato studie je součástí rozsáhlejší práce, jež bude dokončena a publikována v roce 2012. Soubor zvířat čítající 104 jedinců je pro tuto práci dostačující, do testování bude zahrnuto větší množství genů, u nichž byl již v odborných publikacích prokázán vliv na dané vlastnosti vepřového masa.

LITERATURA

Canovas A., Quinranilla R., Gallardo D., Diaz I., Noguera J.L., Ramirez O., Pena R.N. Functional and association studies on the pig *HMGCR* gene. a cholesterol-synthesis limiting enzyme. *Animal*, 2010, vol.4, no.2, p.224-233.

Du Z.Q., Fan B., Zhao X., Amoako R., Rothschild M.F. Association analyses between type 2 diabetes genes and obesity traits in pigs. *Obesity*, 2009, vol.17, no.2, p.323-9.

Fan B., Lkhagvadorj S., Cai W., Young J., Smith R.M., Dekkers J.C.M., Huff-Lonergan E., Lonergan S.M., Rothschild M.F. Identification of genetic markers associated with residual feed intake and meat quality traits in the pig. *Meat Science*, 2010, vol.84, p.645-650.

Pang W.-J., Bai L., Yang G.-S. Relationship Among H-FABP Gene Polymorphism, Intramuscular Fat Content, and adipocyte Lipid Droplet Content in Main Pig Breeds with Different Genotypes in Western China. *Acta Genetica Sinica*, 2006, vol. 33, no.6, p. 515-524.

Fontanesi L., Scotti E., Buttazzoni L., Dall'Olio S., Bagnato A., Fiego D.P.L., Davoli R., Russo V. Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the *FTO* gene and obesity-related traits in heavy pigs. *Molecular Biology Reports*, 2010, vol.37, p.461-466.

Li, X., Kim, S.W., Choi, J.S., Lee, Y.M., Lee, Ch.K., Choi, B.H., Kim, T.H., Choi, Y.I., Kim,J.J., Kim, K.S. (2010) Investigation of porcine *FABP3* and *LEPR* gene polymorphisms and mRNA expression for variation in intramuscular fat content. *Molecular Biology Reports*, 37,3931–3939.

Chalupová, P., Sedláčková, T., Kaplanová K., Weisz F., Bryndová, M., Vykoukalová Z., Jůz M., Šulcerová H., Gregor T., Urban T., Sláma P.,Knoll A. Associations of 15 candidate genes with meat quality traits in Czech Large White pigs, 2011, nepublikováno