

DETECTION OF SELECTED PORCINE MICROSATELLITE (OGN)

DETEKCE VYBRANÉHO MIKROSATELITU U PRASAT (OGN)

Filkuková J., Gazdová V., Knoll A.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat (ÚMFGZ), Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xfilkuk0@node.mendelu.cz, knoll@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Osteoglycin (mimecan, OGN, formerly known as OIF) belongs to the small leucine-rich proteoglycans (SLRPs) gene family, which are important for collagen fibrillogenesis, cellular growth, differentiation and migration. In total, 97 pigs of Prestice Black-Pied breed were involved to the test of the polymorphism of the OGN microsatellite. To determine whether the microsatellite polymorphism influence the selected efficiency characteristics, it was used GLM model SAS/STAT, version 8.02 for the association analysis. There were these selected characteristics of efficiency: daily weight gain, lean meat content and back fat thickness. Significant associations were found out between polymorphisms for daily weight gain whereas for lean meat content and back fat thickness no significant differences were found out.

Key words: osteoglycin, mimecan, microsatellite, pig

ABSTRAKT

Osteoglycin (mimecan, OGN, dříve OIF) patří ke skupině malých na leucin bohatých proteoglykanů (SLRPs), které jsou důležité pro kolagenní fibrilogenezi, buněčný růst, diferenciaci a migraci. Celkem 97 prasat plemene přeštické černostrakaté bylo testováno na polymorfismus mikrosatelitu genu OGN. Ke zjištění možných asociací mezi užitkovými parametry a polymorfismy byl použit GLM model SAS/STAT, verze 8.02. Sledovány byly tyto parametry: přírůstek, libové maso a výška hřbetního tuku. U libového masa a výšky hřbetního tuku nebyly nalezeny žádné průkazné rozdíly, nicméně u přírůstku byly mezi polymorfismy zjištěny statisticky průkazné rozdíly.

Klíčová slova: osteoglycin, mimecan, mikrosatelit, prase

ÚVOD

Gen mimecan (osteoglycin) patří do genové rodiny malých na leucin bohatých proteoglykanů (SLRPs), spolu s 20 dalšími vývojově konzervovanými intersticiálními proteoglykany. Bylo zjištěno, že několik členů SLRPs rodiny interaguje s jinými proteiny, jako fibrilárními kolageny, růstovými faktory, a receptory růstových faktorů, a tudíž ovlivňují

sestavování extracelulární matrix, buněčný růst a migraci. Předpokládá se, že GAG řetězce SLRPs mají svoji funkci v udržování normální tkáňové hydratace a interfibrilárního rozložení. Mimecan je jedním z hlavních komponent rohovky a je transkribován do nejméně 8 mRNA, z nichž všechny jsou přítomny v rohovce a všechny produkují identický protein, který je konzervovaný mezi myší, skotem a člověkem, což indikuje jeho důležitou funkci. Podle studií provedených *in vitro*, by mimecan mohl hrát roli v kontrole buněčného růstu, soudě podle schopnosti růstových faktorů a cytokinů modulovat expresi jeho mRNA v keratocytech rohovky a cévních hladkosvalových buňkách. Tento názor je dále podpořen pozorováním, že tumor supresorový protein p53 aktivuje transkripci bovinního a humánního mimecanu a že mimecan je nepřítomný ve většině rakovinových buněčných linií a tumorů (Tasheva *et al.*, 2002). Mimecan také hraje svou roli při ateroskleróze (kornatění tepen) a je základní součástí vaskulární extracelulární matrix všech orgánů (Fernández *et al.*, 2003).

Vlastní práce

Cílem této práce bylo detekovat vybraný mikrosatelit genu OGN, ověřit metodiku, zjistit frekvence genotypů a alel u 97 jedinců plemene přeštické černostrakaté a vyhodnotit možné asociace mezi těmito genotypy a konkrétními užitkovými parametry (přírůstkem, procentem libového masa a výškou hřbetního tuku).

MATERIÁL A METODIKA

Testováno bylo 97 jedinců plemene přeštické černostrakaté (PC). Fragменты genomové DNA specifické pro OGN (997 bp) byly získány amplifikací pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím primerů: forward: OIF-D: 5-TAG CTA CAG CTC TGA TTA GAC-3 (451 - 471 bp) a reverse: OIF-E: 5-TTT GGA ACA ACA GAC TAC TT-3 (700-719 bp) navržených Stratilem *et al.* (2006). Mikrosatelit je od 533 do 577 bp.

Podmínky cyklování byly následující: úvodní denaturace 95°C/15s, 33x (denaturace 95°C/20s, annealing 58°C/30s, elongace 68°C/30s), závěrečná elongace 68°C/30min., 12°C. PCR produkty očekávané délky (997 bp) byly ověřeny na 3% agarózovém gelu a následně byla provedena jejich fragmentační analýza.

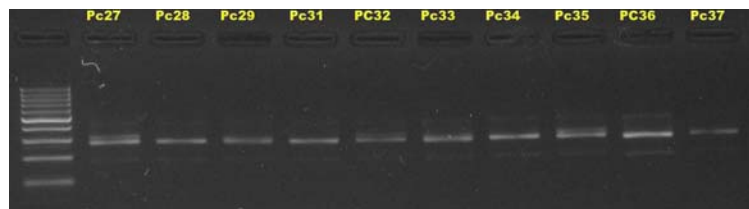
Fragmentační analýza byla provedena pomocí automatického genetického analyzátoru ABI PRISM 3100. Fragменты DNA pro fragmentační analýzu byly připraveny PCR reakcí, kdy jeden primer z páru (OIF-E FAM) byl fluorescenčně značený (příprava vzorku: 1µl PCR + 0,5 µl ROX500 + 11,5 formamidu, denaturace 95°C/5 min, na ledu 5 min). Při fragmentační analýze jsou jednotlivé fluorescenčně značené DNA fragменты elektroforézou v kapiláře rozděleny a postupně detekovány laserovým detektorem. Spolu s každým vzorkem běží interní délkový standard, který umožní přesnou kvantifikaci jednotlivých fragментů.

Statistická analýza byla provedena pomocí GLM modelu SAS/STAT, verze 8.02.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Získaný PCR produkt očekávané délky (997 bp) byl ověřen na 3% agarózovém gelu (Obr.1). Frekvence genotypů a alel jsou ukázány v Tab. 1 a Tab.2.

Obr. 1 Ověření velikosti PCR produktu



Tab. 1 Frekvence genotypů

genotyp	četnost	počet zvířat
269/269	42,3%	41
269/274	15,5%	15
269/279	28,9%	28
274/274	4,1%	4
274/279	6,2%	6
279/279	3,1%	3

Tab. 2 Frekvence alel

alela	četnost
269	0,64
274	0,15
279	0,21

Tab. 3 Průměrné hodnoty v jednotlivých genotypech u vybraných užitkových parametrů

	269/269	269/274	269/279	274/274	274/279	279/279
přírůstek (g)	535,08	516,51	540,80	575,92 ¹	535,29	514,88
libové maso (%)	55,11	55,29	55,01	54,67	55,22	54,09
výška hřbet.tuku (cm)	1,39	1,31	1,40	1,52	1,42	1,59

¹ P = ≤ 0,05

U procenta libového masa a výšky hřbetního tuku nebyly nalezeny žádné statisticky průkazné rozdíly. U přírůstku byly mezi genotypy zjištěny tyto rozdíly:

Vysoce průkazný statistický rozdíl byl zjištěn mezi genotypy 269/274 a 274/274. Průkazný statistický rozdíl byl zjištěn mezi genotypy 269/279 a 269/274, 269/279 a 274/274, 269/269 a 274/274 a mezi 274/274 a 279/279. Statistický rozdíl blízký se průkaznosti byl zjištěn mezi genotypy 269/269 a 269/274 a mezi 274/274 a 274/279. Přičemž nejvyšší přírůstek (575,92 g) měl genotyp 274/274.

ZÁVĚR

Výsledkem genotypování bylo zastoupení 6 genotypů, každý s různými hodnotami pro vybrané užitkové parametry, nicméně statistická analýza neprokázala žádné průkazné rozdíly mezi procentem libového masa a výškou hřbetního tuku. Průkazné rozdíly byly však zjištěny mezi genotypy u přírůstku. Detekovány byly 3 alely ze 4 existujících. Čtvrtá alela 259 v dané populaci detekována nebyla.

LITERATURA

Tasheva E., Koester A., Paulsen A., Garrett A., Boyle D., Davidson H., Song M., Fox N., Conrad G., 2002: Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities. *Molecular Vision*, 8: 407-415.

Fernández B., Kampmann A., Pipp F., Zimmermann R, Schaper W., 2003: Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 246: 3-11.

Stratil A., Van Poucke M., Bartenschlager H., Knoll A., Yerle M., Peelman L.J., Kopečný M., Geldermann H., 2006: Porcine OGN and ASPN: mapping, polymorphisms and use for quantitative trait loci identification for growth and carcass traits in a Meishan x Piétrain intercross. *Animal Genetics*, 37: 415-418.