

MC4R, LPIN1 AND SERCA1 POLYMORPHISMS AND THEIR ASSOCIATION WITH MEAT QUALITY IN CZECH LARGE WHITE PIG BREED

Chalupová P.¹, Knoll A.¹, Urban T.¹, Gregor T.², Šulcerová H.², Sedláčková T.¹, Weisz F.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: pavla.chalupova@mendelu.cz

ABSTRACT

Meat quality parameters are important part of pork production effectiveness. These traits are influenced by many genes. *MC4R* (Melanocortin 4 receptor) plays role in metabolism regulation, food intake and obesity. *LPIN1* (Lipin1) has an influence to adipose tissue development and lipid metabolism. *SERCA1* (Sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1) affects i.a. skeletal muscle relaxation. Our objective was to analyze polymorphisms in *MC4R*, *LPIN1* and *SERCA1* and assess association with meat quality parameters (intramuscular fat and fatty acids content). In total, 44 Czech Large White pigs were genotyped. Samples were tested for polymorphisms previously described: G>A polymorphism in *MC4R* (codon 298), C93T (exon 2) in *LPIN1* and C66T (exon 8) in *SERCA1*. *MC4R* and *LPIN1* were genotyped by PCR-RFLP (*TaqI*). *SERCA1* was genotyped by sequencing. Moreover, two other polymorphisms in *SERCA1* were found: A56G and C180T (exon 8). Relative frequency of allele A and C (*MC4R*, *LPIN1*) was 0.7 and 0.84 respectively. Relative frequencies of *SERCA1* alleles G, C and C were following: 0.91; 0.89 and 0.66 (A56G, C66T and C180T respectively). No association was found between tested polymorphisms and intramuscular fat content. Non significant differences were found in *MC4R* and fatty acid content (stearic, oleic and linolic). Genotype *TT* was associated with higher stearic acid content when compared to *CC* ($P \leq 0.05$). and *CT* ($P \leq 0.05$). Results should be verified in other populations. Number of samples tested will be extended, research continues.

Key words: pig, *MC4R*, *LPIN1*, *SERCA1*, polymorphism, meat quality, association

Acknowledgments: This study was supported by the IGA TP 9/2010.

ÚVOD

Kvalita masa je limitujícím faktorem pro úspěch produktu na trhu.

Lze ji definovat jako součet nutričních (výživná hodnota), senzorických (barva, chuť a vůně, šťavnatost a křehkost), technologických (vhodnost masa ke zpracování, podíl masa, tuku) a hygienicko-toxických vlastností (škodlivé látky, celkový zdravotní stav a welfare) (Bečková *et Václavková*, 2009). Kvalita masa je ovlivňována genetickými faktory i vnějším prostředím.

Snahou o zvýšení podílu svaloviny došlo k výraznému snížení podílu tukové tkáně i k poklesu obsahu intramuskulárního tuku, který podstatně ovlivňuje právě senzorické vlastnosti masa (Bečková *et Václavková*, 2009). Dostatečné množství intramuskulárního tuku je pro zajištění poptávky po produktech z vepřového masa nezbytné. V současné době se na tuto vlastnost ve zvýšené míře zaměřují šlechtitelské programy (Schwab *et al.*, 2009).

Vlastnosti tuku z hlediska výživového i fyzikálního určuje zastoupení mastných kyselin, především pak vzájemný poměr nasycených (s vyššími body tání) a nenasyčených (s nízkými body tání). Z hlediska výživy je v tuku žádoucí vyšší obsah nenasyčených mastných kyselin (olejová, linolová, linolenová) (Bečková *et Václavková*, 2009).

Gen *SERCA1* (sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1) kódující kanál transportující Ca^{2+} , hraje klíčovou roli při relaxaci kosterních svalů prostřednictvím transportu cytosolického Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula. V exonu 8 byl nalezen SNP (C>T), který lze detekovat pomocí ARMS-PCR (amplification refractory mutation system). *SERCA1* má vliv na obsah intramuskulárního tuku (Chai *et al.*, 2010). Nachází se v oblasti 3p16-17 (Ciobanu *et al.*, 2002).

LPINI (Lipin1) hraje roli v metabolismu lipidů, rozvoji tukové tkáně a je asociován s množstvím intramuskulárního a útrobního tuku. *LPINI* je kandidátním genem lipodystrofie u člověka (He *et al.*, 2009).

MC4R (Melanocortin 4 receptor) ovlivňuje mj. metabolismus, příjem potravy, rychlost růstu a obezitu (Kim *et al.*, 2000).

Cílem práce je analyzovat polymorfismy v genech *MC4R*, *LPINI* a *SERCA1* na aktuálním souboru prasat plemene bílé otcovské a zhodnotit asociaci s ukazateli kvality masa.

MATERIÁL A METODIKA

Bylo analyzováno 44 prasat plemene bílé otcovské, pocházejících z jednoho chovu.

DNA byla izolována z periferní krve pomocí QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) v souladu s protokolem výrobce. Izolace byla provedena automaticky pomocí přístroje QIAcube (QIAGEN).

MC4R

Složení PCR reakční směsi

MC4R F: 5'- TACCCTGACCATCTTGATTG - 3'.

MC4R R: 5'- ATAGCAACAGATGATCTCTTTG - 3' (Kim *et al.*, 2000).

Celkový objem 12,5 µl

9,4 µl H₂O, 1,25 µl Taq PCR buffer complete (Top-Bio), 0,25 µl 10 mM dNTP mixu (Fermentas), 0,25 µl primeru MC4R F (10 pmol/µl), 0,25 µl primeru MC4R R (10 pmol/µl), 0,1 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio), 1 µl templátové DNA.

Teplotní profil PCR reakce

PCR reakce byla optimalizována pro termální cykler GeneAmp[®] PCR System 2400 (Applied Biosystems).

95 °C/2 min

35 × (95 °C/30 s; 58 °C/30 s; 72 °C/30 s)

72 °C/10 min

LPIN1

Složení PCR reakční směsi

LPIN1 F 5'- GTTTGTCACCGTGAAGGA - 3'

LPIN1 R 5'- AAGCCACAGTAATCAGAACA - 3' (He *et al.*, 2009).

Celkový objem 12,5 µl

9,4 µl H₂O, 1,25 µl Taq PCR buffer complete (Top-Bio), 0,25 µl 10 mM dNTP mixu (Fermentas), 0,25 µl primeru LPIN1 F (10 pmol/µl), 0,25 µl primeru LPIN1 R (10 pmol/µl), 0,1 µl Taq DNA polymerázy (5 U/µl) (Top-Bio), 1 µl templátové DNA.

Teplotní profil PCR reakce

PCR reakce byla optimalizována pro termální cykler GeneAmp[®] PCR System 2400 (Applied Biosystems)

95 °C/4 min

33 × (95 °C/35 s; 58 °C/35 s; 72 °C/25 s)

72 °C/3 min

Stanovení genotypů MC4R a LPIN1

PCR produkty byly následně štěpen přes noc restriční endonukleázou *TaqI* (1 U) při 37 °C (He *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2000). Fragmenty byly elektroforeticky separovány na 3% agarózovém gelu (TBE pufr). Vizualizace fragmentů proběhla pomocí ethidium bromidu za použití UV světla.

SERCA1**Složení PCR reakční směsi**

SERCA1 F 5' CAAGGGGCATCACCCGACT 3'

SERCA1 R 5' CTGGAATTGCAGCCACAGC 3' (Chai *et al.*, 2010).

Celkový objem 12,5 µl

4,75 µl H₂O, 0,25 µl primeru F (10 pmol/µl), 0,25 µl primeru R (10 pmol/µl), 6,25 µl Hot Star Taq™ Master Mix (QIAGEN), 1 µl templátové DNA.

Teplotní profil PCR reakce

PCR reakce byla optimalizována pro termální cykly GeneAmp® PCR System 2400 (Applied Biosystems)

95 °C/15 min

33 × (95 °C/40 s, 56 °C/30 s, 72 °C/20 s)

72 °C/10 min

Složení sekvenační reakční směsi

Sekvenační reakce byla provedena v termálním cyklu GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

Celkový objem 10 µl. Modifikováno dle standardního protokolu. Ředěno 8krát.

7,09 µl H₂O, 0,5 µl reagentu (Sequencing RR-100), 1,75 µl 5x Sequencing Buffer, 0,5 µl PCR produktu, 0,16 µl primeru F

Teplotní profil sekvenační reakce

96 °C/1 min

25 × (96 °C/10 s; 50 °C/5 s; 60 °C/4min)

Purifikace sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla purifikována pomocí BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) v souladu s protokolem výrobce.

Analýza na automatickém sekvenátoru

Sekvence byla analyzována pomocí 4-kapilárového automatického sekvenátoru

ABI PRISM® 3100-Avant

Stanovení kvalitativních parametrů masa

Obsah intramuskulárního tuku - extrakce xylemem v Soxhletově extrakčním přístroji po dobu 3 h.

Stanovení mastných kyselin - celkové lipidy, metylestery MK – plynová chromatografie FISON 800.

Statistická analýza

Analýza byla provedena v programu SAS v 9.1.4 pomocí procedury GLM s pevnými efekty:

$$Y_{ijklmn} = \mu + MC4R_i + LPIN1_j + SERCA1_k + SERCA1_l + SERCA1_m + e_{ijklmn}$$

Y_{ijklmn} – fenotypová hodnota analyzovaného znaku

μ – průměr populace

$MC4R_i$ – pevný efekt genotypu *MC4R*

$LPIN1_j$ – pevný efekt genotypu *LPIN1*

$SERCA1_k$ – pevný efekt genotypu *SERCA1 A56G*

$SERCA1_l$ – pevný efekt genotypu *SERCA1 C66T*

$SERCA1_m$ – pevný efekt genotypu *SERCA1 C180T*

e_{ijklmn} – náhodná chyba pozorování

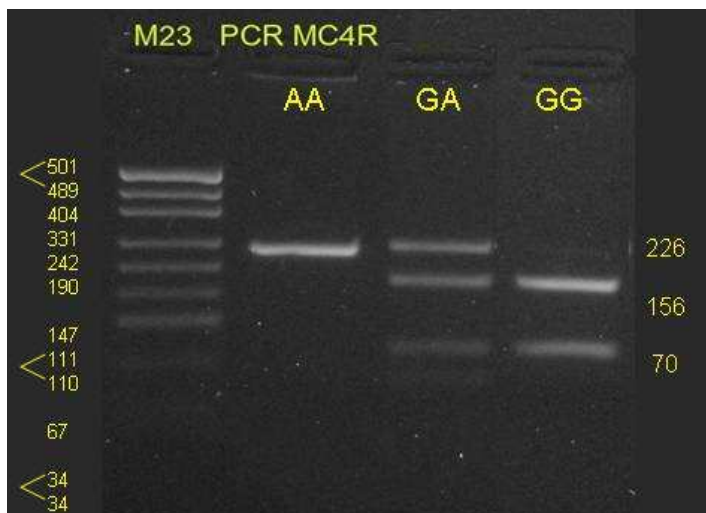
VÝSLEDKY A DISKUZE**Stanovení polymorfizmu *TaqI* v genu *MC4R***

PCR produkt (226 bp) tvoří po štěpení restriční endonukleázou *TaqI* dle genotypu fragmenty následujících velikostí:

AA – 226 bp (neobsahuje *TaqI* štěpné místo)

GA – 226, 156 a 70 bp

GG – 156 a 70 bp



Obr. 1 Stanovení genotypů – polymorfismus *TaqI* v genu *MC4R*.

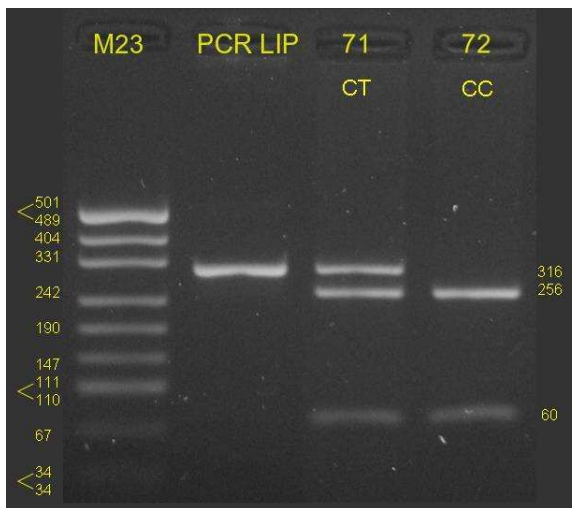
Stanovení polymorfismu *TaqI* v genu *LPIN1*

PCR produkt (316 bp) tvoří po štěpení restriční endonukleázou *TaqI* dle genotypu fragmenty následujících velikostí:

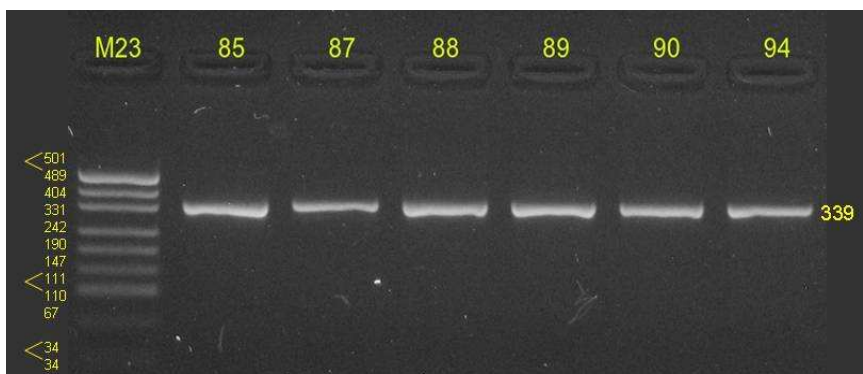
TT – 316 bp (genotyp nebyl v souboru detekován)

CT – 316, 256 a 60 bp

CC – 256 a 60 bp



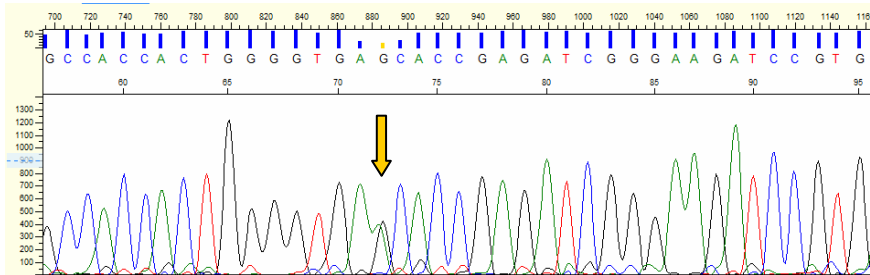
Obr. 2 Stanovení genotypů – polymorfismus *TaqI* v genu *LPIN1*.

Vizualizace PCR reakce *SERCA1*

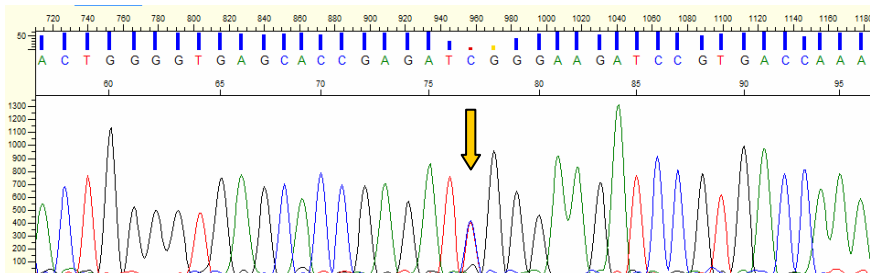
Obr. 3 Ověření kvality PCR produktu genu *SERCA1*.

Sekvenování PCR produktu – detekce polymorfismů

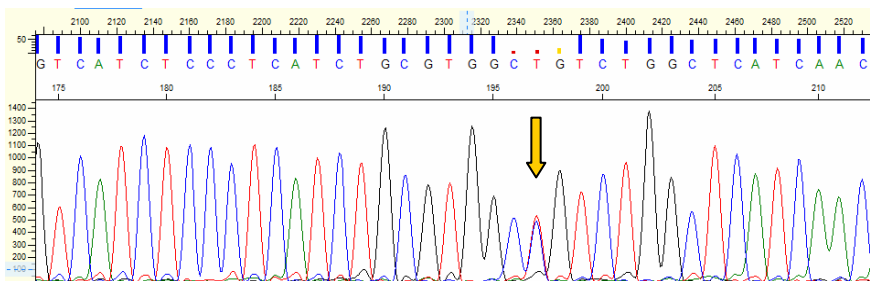
Kromě polymorfismu C66T v exonu 8, který popisují Ciobanu *et al.*, 2002 a Chai *et al.*, 2010 byly sekvenováním objeveny další dva SNP (A56G a C180T v exonu 8). Nelze vyloučit, že jsou shodné s polymorfismy uvedenými Ciobanu *et al.*, 2002 – nejsou označeny konkrétní SNP ani pozice.



Obr. 4 Výsledek sekvence – polymorfismus A56G v exonu 8 (Sequence Scanner v1.0).



Obr. 5 Výsledek sekvence – polymorfismus C66T v exonu 8 (Sequence Scanner v1.0).



Obr. 6 Výsledek sekvence – polymorfismus C180T v exonu 8 (Sequence Scanner v1.0).

Výpočet frekvence genotypů a alelTab. 1 Frekvence genotypů *MC4R* a *LPIN1*.

	MC4R			LPIN1		
genotyp	AA	GA	GG	TT	CT	CC
četnost absolutní	23	16	5	0	14	30
četnost relativní	0,52	0,36	0,11	0	0,32	0,68
Σ	44			44		

Tab. 2 Frekvence genotypů *SERCA1*.

	SERCA1 A56G			SERCA1 C66T			SERCA1 C180T		
genotyp	AA	AG	GG	CC	CT	TT	CC	CT	TT
četnost absolutní	0	8	36	35	8	1	17	24	3
četnost relativní	0	0,18	0,82	0,80	0,18	0,02	0,39	0,55	0,06
Σ	44			44			44		

Tab. 3 Frekvence alel *MC4R* a *LPIN1*.

	MC4R		LPIN1	
alela	A	G	C	T
četnost absolutní	62	26	74	14
četnost relativní	0,70	0,30	0,84	0,16
Σ	88		88	

Tab. 4 Frekvence alel *SERCA1*.

	<i>SERCA1 A56G</i>		<i>SERCA1 C66T</i>		<i>SERCA1 C180T</i>	
alela	A	G	C	T	C	T
četnost absolutní	8	80	78	10	58	30
četnost relativní	0,09	0,91	0,89	0,11	0,66	0,34
Σ	88		88		88	

Genotyp *TT* polymorfismu *SERCA1 C66T* byl v souboru detekován pouze u jednoho vzorku, proto byl tento jedinec z následné asociační analýzy vyloučen. V případě asociace s obsahem intramuskulárního tuku je tedy kalkulováno se 43 jedinci.

Hodnoty mastných kyselin jsou prozatím k dispozici jen u 30 zvířat, z tohoto důvodu je asociace s MK na tyto vzorky omezena.

Asociační analýzaTab. 5 Asociace polymorfizmů v genech *MC4R*, *LPIN1* a *SERCA1* s obsahem intramuskulárního tuku (LSM ± SE).

MC4R	AA(23)	GA(16)	GG(4)
% intramuskulárního tuku	3,43 ± 0,33	3,74 ± 0,43	3,91 ± 0,57
LPIN1	TT(0)	CT(14)	CC(29)
% intramuskulárního tuku	–	3,99 ± 0,42	3,40 ± 0,37
SERCA1 A56G	AA(0)	GA(8)	GG(36)
% intramuskulárního tuku	–	3,87 ± 0,52	3,52 ± 0,30
SERCA1 C66T	TT(1)	CT(8)	CC(36)
% intramuskulárního tuku	–	3,88 ± 0,49	3,50 ± 0,29
SERCA1 C180T	TT(3)	CT(25)	CC(16)
% intramuskulárního tuku	3,55 ± 0,67	3,71 ± 0,35	3,82 ± 0,33

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

**P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05, ^a blíží se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru.

Chai *et al.*, 2010 uvádí, že jedinci genotypu *CC* (*SERCA1* C66T) vykazovali nižší obsah intramuskulárního tuku a vyšší obsah vody než *CT* a *TT*. Alela *T* vykazuje asociaci se zvýšeným obsahem intramuskulárního tuku a sníženým obsahem vody.

He *et al.*, 2009 popisuje průkazně nižší obsah intramuskulárního tuku u prasat genotypu *CC* oproti *CT* (*LPIN1*).

V námi zkoumaném souboru nebyly u obsahu intramuskulárního tuku mezi uvedenými genotypy *MC4R*, *LPIN1* a *SERCA1* zjištěny průkazné rozdíly.

Tab. 6 Asociace polymorfizmů v genech MC4R, LPIN1 s obsahem mastných kyselin (LSM ± SE).

	MC4R			LPIN1		
	AA(17)	GA(10)	GG(3)	TT(0)	CT(11)	CC(19)
kyselina palmitová	27,72 ± 0,55	28,01 ± 0,68	28,40 ± 0,84	–	28,29 ± 0,62	27,80 ± 0,56
kyselina stearová	15,57 ± 0,49	15,87 ± 0,60 ^a	14,39 ± 0,74 ^a	–	15,33 ± 0,55	15,22 ± 0,49
kyselina olejová	49,91 ± 0,85 ^a	49,71 ± 1,06 ^b	52,55 ± 1,31 ^{ab}	–	50,75 ± 0,97	50,70 ± 0,87
kyselina linolová	6,81 ± 0,63 ^a	6,39 ± 0,78	4,68 ± 0,97 ^a	–	5,61 ± 0,72	6,31 ± 0,64

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

**P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05, ^a blíží se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru

Tab. 7 Asociace polymorfizmů v genu SERCA1 s obsahem mastných kyselin (LSM ± SE).

	SERCA1 A56G			SERCA1 C66T			SERCA1 C180T		
	AA(0)	GA(7)	GG(23)	TT(0)	CT(5)	CC(25)	TT(2)	CT(17)	CC(11)
kyselina palmitová	–	28,07 ± 0,73	28,02 ± 0,46	–	28,40 ± 0,76	27,69 ± 0,43	28,01 ± 1,07	27,94 ± 0,51	28,18 ± 0,55
kyselina stearová	–	15,20 ± 0,65	15,35 ± 0,41	–	14,96 ± 0,67	15,59 ± 0,38	16,71 ± 0,95 ^{*112}	14,58 ± 0,45 ^{*2}	14,54 ± 0,49 ^{*1}
kyselina olejová	–	50,81 ± 1,14	50,64 ± 0,72	–	50,48 ± 1,19	50,97 ± 0,67	48,93 ± 1,66	51,68 ± 0,79	51,56 ± 0,87
kyselina linolová	–	5,95 ± 0,85	5,98 ± 0,54	–	6,15 ± 0,88	5,77 ± 0,50	6,39 ± 1,24	5,78 ± 0,58	5,72 ± 0,64

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

**P ≤ 0,01, * P ≤ 0,05, ^a blíží se průkaznosti, LSM – průměrný nejmenší čtverec, S_E – střední chyba průměru

MENDELNET 2010

V případě genu *MC4R*, jedinci genotypu *GA* vykazovali vyšší obsah kyseliny stearové oproti zvířatům *GG* (blíží se průkaznosti). Genotyp *GG* je asociován s vyšším zastoupením kyseliny olejové (oproti *GA* a *AA*; blíží se průkaznosti). Vyšší obsah kyseliny linolové byl zjištěn u jedinců *AA* oproti *GG* (blíží se průkaznosti).

U genu *LPINI* nebyly zjištěny mezi genotypy průkazné rozdíly. Genotyp *TT* nebyl v souboru detekován.

Genotyp *TT* (*SERCA1* C180T) je asociován s vyšším obsahem kyseliny stearové oproti *CT* a *CC* ($P \leq 0,05$). U polymorfismů A56G a C66T (*SERCA1*) nebyly mezi genotypy zjištěny průkazné rozdíly.

ZÁVĚR

V souboru prasat plemene bílé otcovské byly testovány polymorfismy v genech *MC4R*, *LPINI* (PCR-RFLP) a *SERCA1* (sekvenování). Byla provedena asociční analýza s vybranými parametry kvality masa – obsahem intramuskulárního tuku a mastných kyselin (palmitová, stearová, olejová, linolová). V našem souboru nebyla zjištěna asociace obsahu intramuskulárního tuku s žádným z testovaných polymorfismů. U genu *MC4R* byly zjištěny rozdíly (blíží se průkaznosti) v obsahu mastných kyselin (stearová, olejová, linolová). Detekovaný polymorfismus C180T v exonu 8 genu *SERCA1* je asociován s obsahem kyseliny stearové. Zastoupení genotypů bylo v nerovnoměrné. Soubor zvířat bude rozšířen, výzkum pokračuje.

LITERATURA

Bečková, R., Václavková, E. *Vepřové maso* [online] 2009 [cit. 2010-10-03] © AGROVENKOV

Dostupné z: <<http://www.agrovenkov.cz/default.asp?ids=3069&ch=445&typ=1&val=91865>>.

Ciobanu, D.C., Zhang, Y., Rothschild, M.F. Rapid communication: Mapping of the Ca²⁺ ATPase of fast twitch 1 skeletal muscle sarcoplasmic reticulum (ATP2A1) gene to porcine chromosome 3. *J. Anim. Sci.*, 2002. Vol. 80. p. 1386-1387.

He, X. P., Xu, X. W., Zhao, S. H., Fan, B., Yu, M., Zhu, M. J., Li, C. C., Peng, Z. Z., Liu, B. Investigation of *Lpin1* as a candidate gene for fat deposition in pigs, *Mol. Biol. Rep.*, 2009. Vol. 36. p. 1175-1180.

Chai, J., Xiong, Q., Zhang, P. P., Shang, Y. Y., Zheng, R., Peng, J., Jiang, S. W. Evidence for a new allele at the *SERCA1* locus affecting pork meat quality in part through the imbalance of Ca²⁺ homeostasis, *Mol. Biol. Rep.*, 2009.

MENDELNET 2010

Kim, S.K., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., Rothschild, M.F. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth and feed intake traits. *Mammalian Genome*, 2000. Vol. 11, p. 131-135.

Schwab, C.R., Mote, B.E., Du, Z.Q., Amoako, R., Baas, T.J., Rothschild, M.F. An evaluation of four candidate genes for use in selection programmes aimed at increased intramuscular fat in Duroc swine, *J. Anim. Breed. Genet.*, 2009. Vol. 126, p. 228-236.