
ANALYSIS OF *EEF1A2* GENE POLYMORPHISM IN PIGS

Pavelková M., Knoll A., Svobodová K.

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

E-mail: xpavelk7@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate association analysis between *EEF1A2* gene polymorphism and pig meat performance characteristics (backfat thickness, average daily gain and lean meat percentage). The polymorphism was analysed in a population of 69 Czech Large White pigs. Individual genotypes were detected using PCR and RFLP methods with use of restriction endonuclease *Hin6I*. Association analysis between genotypes and individual performance characteristics using the SAS 9.1.4 software was carried out after frequencies of genotypes and alleles were counted. The genotype frequencies were 26.09% GC and 73.91% CC. No GG genotype was observed. A low frequency of allele G (0.1304) and a high frequency of allele C (0.8696) were found. In the association analysis between individual genotypes (GC and CC) and meat performance characteristics there was no significant difference ($p \leq 0.05$) and no traits approached to significant level ($p \leq 0.1$)

Key words: *EEF1A2*, polymorphism, meat performance, Czech Large White

ÚVOD

Gen *EEF1A2* je v této práci zkoumán jako kandidátní gen ovlivňující parametry masné užitkovosti u prasat. Identifikace genů, které ovlivňují užitkovost hospodářských zvířat, přispívá k rozšíření znalostí o genetické podmíněnosti masné užitkovosti a nabízí perspektivu využití těchto poznatků ve šlechtění. Poznátky molekulární genetiky již přispěly a nadále mohou přispívat významnou měrou k úspěšnému naplnění nových cílů ve šlechtění prasat podle požadavků spotřebitelů a technologií a ke snížení doprovodných nedostatků.

MATERIÁL A METODIKA

Zkoumaný soubor tvořily prasnice plemene české bílé ušlechtilé. Do asociační studie bylo zahrnuto 69 vzorků. Výsledky testování parametrů masné užitkovosti jednotlivých zvířat byly získány z databáze Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metodika PCR i RFLP byla zpracována dle Svobodové et al. (dosud nepublikováno). Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v tabulce 1.

Byly použity primery:

11A: CTG AGG TGA AGT GGG TGG AGA TG přímý

11B: CGC TGC CTG GGA AGA CGG zpětný

Tab.1: Složení reakční směsi pro PCR o objemu 25 μ l

Chemikálie	Množství (μ l)
destilovaná H ₂ O	9,5
DNA	2
primer A	0,5
primer B	0,5
HotStar mix (Qiagen)	12,5

Podmínky pro amplifikaci zkoumaného úseku DNA:

Vlastní PCR probíhala v termálním cykleru PTC-200TM, MJ Research, Inc. Teplotní profil PCR byl dodržen přesně dle původní metodiky autorů: počáteční denaturace 95 °C / 15 min.;

MENDELNET 2010

vlastní PCR: 30 cyklů – denaturace 95 °C / 20s, annealing 64 °C / 20 s, elongace 72 °C / 10s; závěrečná elongace 72 °C / 10 min.

Po skončení PCR byla provedena kontrola kvality PCR produktu. Na 3% agarózový gel (Serva) s přísadkou ethidiumbromidu (0,1 µg na 1 ml gelu) bylo nanášeno 5 µl PCR produktu smíchaného s nanášecím pufrům (40% sacharóza a bromfenolová modř). PCR produkt byl následně vizualizován prostřednictvím transiluminátoru a fotografován. Byla hodnocena jeho kvalita, výskyt nespecifických fragmentů a množství amplifikované DNA.

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

PCR produkt byl štěpen v restrikční směsi skládající se z destilované vody, pufru a restrikční endonukleázy. Složení reakční směsi uvádím v tabulce 2. Štěpení probíhalo v termostatu při 37 °C po dobu 12 hodin.

Tab.2: Složení reakční směsi pro RFLP

Chemikálie	Množství (µl)
destilovaná H ₂ O	3,3
pufr Y ⁺ /Tango TM (Fermentas)	1,5
restrikční endonukleáza <i>Hin6I</i> (Fermentas)	0,2
PCR produkt	10

Následně byla provedena elektroforéza na 4% agarózovém gelu obsahujícím barvivo GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (FMC Corporation, Philadelphia), které se ukázalo být pro vizualizaci vhodnější než ethidiumbromid. Výsledek štěpení byl vizualizován pod UV světlem a fotografován. Po vizualizaci pod UV světlem byly odečteny jednotlivé genotypy.

Odečítání genotypů v polymorfním místě bylo prováděno dle následujícího klíče:

212 bp dlouhý PCR produkt je štěpen na fragmenty 173 bp a 39 bp (alela C) či zůstává neštěpen (alela G)

Elektroforéza pro ověření výsledku PCR i RFLP probíhala v TBE pufru při napětí 100 V po dobu 30 až 40 minut. Pro ověření velikosti fragmentů byl použit marker M100 (GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder).

Statistické vyhodnocení asociační analýzy

Pro statistické vyhodnocení asociace mezi jednotlivými genotypy a masnou užitkovostí byl použit program SAS pro Windows 9.1.4. Byla hodnocena asociace mezi genotypy a jednotlivými ukazateli masné užitkovosti, mezi něž byl zahrnut přírůstek, výška hřbetního tuku a procento libové svaloviny.

Pomocí programu SAS pro Windows 9.1.4. byl vypočítán průměr nejmenších čtverců (least squares means) a střední chyba odhadu (standard error) pro jednotlivé parametry masné užitkovosti a genotypy.

Byla použita metoda odhadu REML (restringovaná metoda maximální věrohodnosti). Pro výpočet byla použita smíšená rovnice:

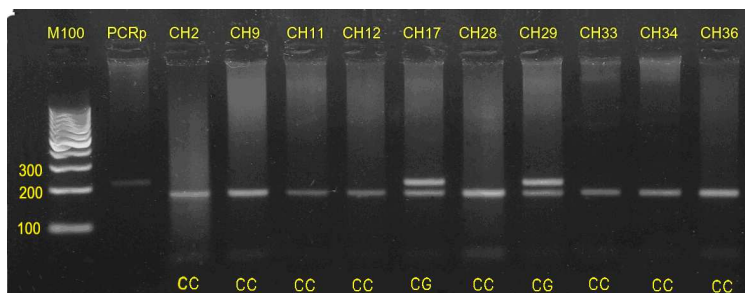
$$y_{ijkl} = \mu + G_i + O_j + M_k + e_{ijkl}$$

Kde:

- y_{ijkl} jsou pozorované úrovně znaků
- μ je průměrná hodnota u sledovaného znaku
- G_i je pevný efekt, genotyp zvířete v genu *EEF1A2*
- O_j je náhodný efekt j-tého otce
- M_k náhodný efekt k-té matky
- e_{ijkl} jsou náhodné reziduální efekty

VÝSLEDKY A DISKUZE

Po štěpení restriktivní endonukleázou *Hin6I* byla detekována alela G, která se něštěpí (212 bp), a alela C obsahující štěpné místo (173 a 39 bp), viz. obrázek 1.



Obr.1: Genotypy genu *EEF1A2* po štěpení 212 bp PCR produktu restriktivní endonukleázou *Hin6I*. (PCRp- neštěpený PCR produkt)

MENDELNET 2010

V souboru 69 prasnic byl genotyp GC zastoupen u 18 zvířat, genotyp CC u 51 zvířat, genotyp GG nebyl pozorován. Na základě těchto absolutních frekvencí genotypů byly vypočítány relativní frekvence genotypů a absolutní a relativní frekvence alel, které jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

Tab.3: Frekvence genotypů

Genotyp	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
GG	0	0
GC	18	0,2609
CC	51	0,7391
Σ	69	1

Tab.4: Četnosti alel

Alela	Frekvence absolutní	Frekvence relativní
G	18	0,1304
C	120	0,8696
Σ	138	1

V testu byly sledovány asociace genotypů v genu *EEF1A2* s následujícími parametry masné užitkovosti prasat: výška hřbetního tuku, průměrný denní přírůstek a podíl libové svaloviny. K tomu byl využit software SAS, metoda odhadu REML. Výsledky asociací analýzy jsou shrnuty v tabulce 5.

V asociční analýze mezi genotypy zjištěnými ve studovaném souboru (GC a CC) a parametry masné užitkovosti nebyla zjištěna statistická průkaznost ($p \leq 0,05$) ani statistický rozdíl blízký se průkaznosti ($p \leq 0,1$).

Tab.5: Asociace genotypů genu *EEF1A2* s parametry masné užitkovosti

Znak	Genotyp GC (n = 18) LMS±SE	Genotyp CC (n = 51) LMS±SE	Průkaznost GC-CC
PRIR (g)	593,35±15,08	594,66±13,54	0,8863
HRTUK (cm)	0,99±0,04	1,01±0,03	0,6714
LS (%)	59,37±0,48	59,01±0,37	0,4130

Kde PRIR je průměrný denní přírůstek, HRTUK je výška hřbetního tuku, LS je podíl libové svaloviny, n je počet zvířat, LMS \pm SE je průměr nejmenších čtverců (least squares means) \pm střední chyba (standard error).

V předkládané práci byly u souboru prasat plemene české bílé ušlechtilé zjištěny tyto frekvence genotypů: 26,09 % GC a 73,91 % CC. Genotyp GG nebyl u studovaných zvířat pozorován, tudíž byla zjištěna nízká frekvence alely G (0,1304) a vysoká frekvence alely C (0,8696).

Vliv polymorfizmu v genu *EEF1A2* na parametry masné užitkovosti prasat byl doposud studován pouze v jediné práci (Svobodová et al., dosud nepublikováno).

Ve zmíněné práci byly zkoumány frekvence alel celkem u osmi plemen, avšak zahrnuto bylo pouze 14 jedinců plemene české bílé ušlechtilé. Zaznamenané frekvence alel u tohoto plemene byly 0,14 pro alelu G a 0,86 pro alelu C. Nebyl přítomen žádný jedinec plemene české bílé ušlechtilé s genotypem GG, stejně jako v mnou testovaném souboru. Genotyp GG byl však zjištěn u zástupců jiných plemen prasat (duroc, meishan, hampshire) (Svobodová et al., dosud nepublikováno).

Vzhledem k úloze genu *EEF1A2* v metabolismu, k jeho funkcím popsaným u člověka (Knudsen et al., 1993), myši (Lee et al., 1994) a některých jiných druhů živočichů (Lee et al., 1993; Kahns et al., 1998) a také jeho lokalizaci na 17. chromozomu prasat (Svobodová et al., dosud nepublikováno), kde byly objeveny QTL pro vlastnosti masné užitkovosti prasat (Animalgenome), bychom mohli předpokládat jeho asociaci s masnou užitkovostí. V předkládané práci však nebyla v asociční analýze mezi jednotlivými zaznamenanými genotypy (GC a CC) a parametry masné užitkovosti (výška hřbetního tuku, průměrný denní přírůstek a podíl libové svaloviny) zjištěna statistická průkaznost ($p \leq 0,05$) ani statistický rozdíl blízký se průkaznosti ($p \leq 0,1$).

Součástí srovnávané práce (Svobodová et al., dosud nepublikováno) byla asociční analýza genu *EEF1A2* s parametry masné užitkovosti prasat. Do této analýzy bylo zahrnuto 313 prasat druhé filiální generace kříženců plemen meishan a pietrain. Mezi studované parametry masné užitkovosti, u nichž byl zjištěn průkazný rozdíl mezi genotypy, patřily: hmotnost vnějšího tuku nad kýtou (ham external fat weight), hmotnost hřbetního tuku (back fat weight), ořezy tuku (fat cuts), výška bederního tuku (loin fat depth), průměrná výška hřbetního tuku (average back fat depth), hmotnost kýty v poměru k jatečné půlce (weight of ham meat relative to half carcass) a hmotnost slaniny v poměru k libovým částem (weight of bacon meat relative to lean cuts).

U všech zmíněných parametrů byl zjištěn průkazný rozdíl ($p \leq 0,05$) mezi genotypy GG a CC. Ve všech těchto ukazatelích byl také zjištěn průkazný rozdíl mezi genotypy GG a GC, vyjma hmotnosti vnějšího tuku nad kýtou (ham external fat weight), kde nebyl průkazný rozdíl zjištěn, a hmotnosti hřbetního tuku (back fat weight) a ořezů tuku (fat cuts), kde byl zjištěn rozdíl blízký se průkaznosti ($p \leq 0,1$). Pouze u parametru hmotnost vnějšího tuku nad kýtou (ham external fat weight) byl zjištěn rozdíl blízký se průkaznosti také mezi genotypy GC a CC.

Je důležité zmínit fakt, že gen *EEF1A2* leží 8,8 cM distálně od *GNAS* complex locus (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating complex locus) (Svobodová et al., dosud nepublikováno). Gen *GNAS* kóduje extracelulární transportní protein, který přenáší informační molekuly z transmembránových receptorů k cílovým proteinům (efektorům) (Carel et al., 1999). Tento gen byl popsán a je nadále zkoumán v souvislosti se vznikem obezity a ukládáním tuku (Carel et al., 1999; Weinstein et al., 2010). Vazba mezi geny *EEF1A2* a *GNAS* by mohla ovlivňovat průkaznost asociačních studií *EEF1A2* ve vztahu k masné užitkovosti. Bylo by vhodné provést další studie, které prozkoumají vliv vazby s genem *GNAS*.

ZÁVĚR

V asociační analýze mezi jednotlivými genotypy (CG a CC) a parametry masné užitkovosti nebyla zjištěna statistická průkaznost ($p \leq 0,05$) ani statistický rozdíl blízkící se průkaznosti ($p \leq 0,1$). Přesto nemůžeme zavrhnout *EEF1A2* jako kandidátní gen pro masnou užitkovost, neboť výsledky této práce jsou patrně ovlivněny malým souborem prasat použitým pro analýzu. Nepřítomnost genotypu GG ve studovaném souboru znemožnila vzájemné srovnání asociační analýzy pro jednotlivé genotypy, ve studii byly srovnány pouze genotypy GC a CC, výsledky jsou tudíž neúplné. Proto by bylo vhodné provést další testování vlivu genu *EEF1A2* na ukazatele masné užitkovosti s větším souborem zvířat a vyrovnanějším zastoupením genotypů.

LITERATURA

Animalgenome, Pig QTL Database, National animal genome research program, [cit. 2010-03-21], dostupné z WWW: <<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>>.

Carel, J.,C., Le Stunff, C., Condamine, L., Mallet, E., Chaussain, J., L., Adnot, P., Garabedian, M., Bougneres, P. (1999): Resistance to the lipolytic action of epinephrine: a new feature of protein GS deficiency. J. Clin. Endocr. Metab., 84, p. 4127-4131.

Kahns, S., Lund, A., Kristensen, P., Knudsen, C., R., Clark, B., F., C., Cavallius, J. and Merrick, W., C. (1998): The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein, Nucleic Acids Research, vol. 26, no. 8, p. 1884-1890.

Knudsen, S., M., Frydenberg, J., Clark, B., F., C., Leffers, H. (1993): Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1a isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1a. Eur. J. Biochem., vol.215, p. 549-554.

Lee, S., Wolfraim, L.,A.,Wang, E. (1993): Differential expression of S1 and elongation factor-1 alpha during rat development. J. Biol. Chem., vol.268, p. 24453-24459.

Lee, S., Ann, D., K., Wang, E. (1994): Cloning of humane and mouse brain cDNAs coding for S1, the second member of the mammalian elongation factor-1 alpha gene family: analysis of a possible evolutionary pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun, vol.203, p. 1371-1377.

MENDELNET 2010

Svobodová, K., Horák, P., Stratil, A., Knoll, A., Van Poucke, M., Bartenschlager, H., Chalupová, P., Peelman, L., J., Knorr, C., and Geldermann, H., Comparative analysis of porcine *EEF1A1* and *EEF1A2* genes: structure, polymorphism, mapping and expression, dosud nepublikováno, citováno na základě osobního sdělení

Weinstain, L., S., Xie, T., Qasem, A., Wang, J., Chen, M. (2010): The role of GNAS and other imprinted genes in the development of obesity. Intern. J. of Obesity, vol 4, p.6-17.