

TNN1/XbaI polimorfizmus hatásának vizsgálata sertéshibridek vágott féltestének minőségére

Nyisalovits Andrea – Posta János – Czeglédi Levente – Babinszky László

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen
nyisalovits@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A troponin I 1 (TNN1) gén által kódolt kontraktilis fehérje a harántcsíkolt izom lassú izomrostjainak vékony filamentumában helyezkedik el. A troponin komplex kialakításában vesz részt, ami fontos szerepet tölt be az izomkontrakció szabályzásában azáltal, hogy megakadályozza a kalcium jelenléte nélkül létrejövő aktin-miozin kapcsolódást. Biológiai szerepe alapján potenciális marker gén lehet a hústermelő képességgel összefüggésbe hozható tulajdonságok tekintetében. Jelen kutatás célja annak meghatározása, hogy a korábban kínai fajtákban leírt – a gén 4. intronjában lévő – polimorfizmus (EU743939:g.5174T>C) milyen összefüggésben van a standard vágóhídi vágás során mért paraméterekkel az általunk vizsgált négy vonalas európai fajtahibrid esetében. A vizsgálat 404, két istállóban tartott, vegyes ivarú állat adatainak felhasználásával történt. A polimorfizmust XbaI restriktív enzimmel PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) módszerrel detektáltuk. Az allélgyakorosságok a következők szerint alakultak: C: 0,84, illetve 0,808; T: 0,16, illetve 0,192. A vizsgálat során nem tudtunk szignifikáns összefüggést igazolni a mért termelési paraméterek és a vizsgált mutáció között.

Kulcsszavak: TNN1, XbaI, SNP, RFLP, polimorfizmus, sertés, termelési paraméter

SUMMARY

The contractile protein, which is encoded by troponin I 1 (TNN1) gene, is located on the thin filaments of slow fibres in striated muscle. TNN1 protein is a part of the troponin complex which plays an important role in regulation of muscle contraction by preventing actin-myosin interaction in absence of calcium. According to biological role, this gene can be potential marker for meat production related traits. The aim of this study is to define whether the previously reported gene polymorphism (EU743939:g.5174T>C) is connected with the slaughter traits measured in a standard slaughterhouse of the examined four-line European hybrid. The study included data from 404 gilts and barrows from 2 different samples. The polymorphism was detected using PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method with XbaI restriction enzyme. In this study the allele frequencies were found as follows: C: 0.84 and 0.808; T: 0.16 and 0.192. Based on result of the present study no significant impact of polymorphisms on production parameters was found.

Keywords: TNN1, XbaI, SNP, RFLP, polymorphism, pig, production traits

BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedek jelentős változást hoztak az állati fehérje iránti igény tekintetében, a világszerte előállított hús mennyisége 30 év alatt a duplájára növekedett (FAO, 2013). Napjainkban a – fejlett világra – jellemző árubőség fenntartásához elengedhetetlenül szükséges a fajták fejlesztése, mely lehetővé teszi a folyamatosan növekvő igény gazdaságos kielégítését. A mennyiség mellett szem előtt kell tartani az előállított áru minőségét, mely vonzóvá teszi a terméket a fogyasztó számára, valamint népegészségügyi szempontból sem elhanyagolható. Az ideális termék előállításához megfelelő genetikai háttérrel rendelkező fajták, hibridek vagy egyedek kiválasztásában nagy segítséget nyújt napjaink molekuláris biológiájának eszköztára, mely segítségével végzett szelekció során nagyobb szelekciós előrehaladás érhető el (Tenke és Babinszky, 2012). A gazdaságilag fontos tulajdonságok – mint például ideális fehérje- és testzsír-arányok – többnyire poligénes öröklődést mutatnak, így a kialakításukban résztvevő gének ismerete kulcsfontosságú a szelekció során.

Korábbi tanulmányok alapján az izomrostok száma és összetétele erős korrelációt mutat a növekedési képességgel és a hús minőségével a hústermelő fajtáknál (Handel és Strickland, 1988; Maltin et al., 1997; Fonseca

et al., 2003), ezért az izomrostok tulajdonságait meghatározó gének potenciális markerek lehetnek a húsminőség és a hústermelő képességre végzett szelekció során.

A troponin regulátor komplex a harántcsíkolt izom vékony filamentumához kapcsolódik, az izomkontrakció szabályzásában tölt be fontos szerepet azáltal, hogy megakadályozza a kalcium hiányában létrejövő kontrakciót. A komplexet 3 troponin alegység alkotja: troponin T, mely a komplexet a tropomiozinhoz rögzíti, troponin C, mely a kalcium ionok kötését teszi lehetővé és a troponin I, mely a vékony filamentumot alkotó aktin fehérjékhez kötődik, lehetetlenné téve ezzel a miozin kapcsolódását. A troponin I alegység 3 izoformája közül kettő a harántcsíkolt izomban, míg egy a szívizomban fejeződik ki, expressziójuk egy-egy izomrostra jellemző. A TNN1 alegység-izoforma a harántcsíkolt izom lassú izomrostjaiban fordul elő.

2010-ben sikerült a 3 TNN1 izoformát leírni sertésben (Yang et al., 2010b). Xu et al. (2010) 3 polimorfizmust azonosított a két harántcsíkolt izomban kifejeződő génben (TNN1, TNN2), melyek hatását vizsgálták a vágott féltestek tulajdonságai és húsminőségi paraméterekre (Yang et al., 2010a) nagy fehér és meishan fajták keresztezéséből származó állományánál.

Jelen kutatás célja annak meghatározása, hogy a korábban leírt TNN1 gén 4. intronjában lévő polimor-

fizmus (EU743939:g.5174T>C) összefüggésbe hozható-e a vágott féltesten mért paraméterekkel az általunk vizsgált négyvonalas hibridsertés állományban.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti állatok

A kísérletbe 500 végtermék tökesertés került beállításra 2 istállóban, 273 ártány és 227 emse ivararányban. A kísérletbe vont állatok 3 vonalas (nagy fehér, lapály és duroc) anyák és szintetikus stresszmentes pietraín apaállatok keresztezéséből származtak. A kísérleti állatokat átlagosan a 73. életnapjukon telepítettek be kettő, 650 férőhelyes hízó istállóba. Minden istállóban kutyaként 25–30 vegyes ivarú egyed került elhelyezésre. Az istállóban mélyalmos technológiát alkalmaztak, az etetés nedves abrakkeverék etetésére alkalmas önetetőkötőt történt, az ivóvíz szopókás önetetőkötőből ad libitum állt az állatok rendelkezésére. Az etetett takarmány táplálóanyag tartalma megfelelt az idevonatkozó ajánlásoknak (Magyar Takarmány Kódex, 2004).

A telepen alkalmazott technológiának megfelelően az állatok átlagos betelepítési súlya a két istállóba 29,3 kg, illetve 30,7 kg volt. A kísérlet zárásakor (111 és 118 napi hizlalás után) az állatok átlagos élősúlya 112±9,4 kg (1. istálló), illetve 120,6±9,2 kg (2. istálló) volt. A hizlalás alatti napi gyarapodás 745,9±84,7 g (1. istálló) illetve 761,8±77,6 g (2. istálló) volt.

Vágóhídi minősítés

A vizsgálat végén, a vágás során a vágott testek az SEUROP szerint kerültek minősítésre. A vágott testek minősítése szűrőszondás műszerrel történt. A szonda a vágott testen a szalonnastagságot és a karajátmérőt a 2–3. borda között, a hasítás síkjától 6 cm távolságra méri, mely alapján megállapításra kerül a színhús-százalék.

A minősítés során a mindkét istálló állatainál meghatároztuk a hátszalonna-vastagságot, a karaj-keresztmetszetet, a hidegsúlyt és a színhús-százalékot.

Mintavétel a genetikai vizsgálatokhoz

A genetikai vizsgálatokat a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karának Állattudományi Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézetének Állatgenetikai Laboratóriumában végeztük. A vérminta istállónként 250 vegyes ivarú egyedről steril tűvel (0,9×38 mm) a vena cava cranialisból S-monovett (4,9 ml) vérvételi csövekbe (Sarstedt AG&Co) került levételre. A vérminták tárolása a vizsgálatokig -20 °C-on történt.

A vérminták előkészítése

A vérminták feldolgozása során a genomi DNS-t Zsolnai és Orbán (1999) leírása alapján izoláltuk. Az előkészített DNS mintákat -20 °C-on tároltuk a további vizsgálatig.

Genotipizálás

A *TNNI1* gén 4. introntjában lévő mutáció (EU743939:g.5174T>C) kimutatására alkalmas PCR-RFLP eljárást Xu et al. (2010) alapján végeztük. A forward és reverse primerek egy 190 bp hosszú szaszt szaporítanak fel.

A PCR kondícióinak optimalizálását gradiens PCR-rel végeztük. A PCR elegy 10 µl végtérfofogatban tartalmazott kb. 100 ng genomiális DNS-t, 0,2 mM dNTP-t (Fermentas), 1 µl 10x DreamTaq™ Green Buffer-t, 1 pmolt primerekből (Sigma-Aldrich Kft) továbbá 2U DreamTaq™ Green polimeráz enzimet (Fermentas). A puffer magnézium tartalmának (20 mM) kiegészítésére további magnézium-klorid oldatot (25 mM) használtunk, így a végkoncentráció a reakcióelegyben 3,75 mM volt.

A DNS felszaporítása során a reakció hőmérséklet-kondíciói a következők szerint váltakoztak: denaturáció 10 percig 95 °C-on, majd 35× ismételve a denaturáció (30 sec 95 °C) – feltapadás (30 sec 61 °C) – lánc-hosszabbítás (20 sec 72 °C) lépéseket. Ezt követte még 5 perc 72 °C-on, ami lezárta a folyamatot. A vizsgálatokat MJ PTC-200 PCR (ESCO) készülékkel végeztük.

A restrikciós analízist – T¹CTAGA felismerő helylyel rendelkező – *XbaI* (Fermentas) enzimmel végeztük. A 190 bp hosszú *HFABPI* terméket az enzim – a polimorfizmus függvényében (T¹CYAGA) hasítottá 111 és 79 hosszúságú szakaszokra.

A restrikciós analízishez 13 µl végtérfofogatban 10 µl PCR terméket, 2,5 U enzimet és 10x Tango Buffer-t használtunk. Az enzimátikus hidrolízist 4 órán keresztül 37 °C-os hőmérsékleten vízfürdőben végeztük.

Az allélok elkülönítését 2%-os agaróz (Lonza) gélen végeztük, a gélhez GelRed (Biotium Inc.) gélfestéket adtunk, a futtatás 1x-os TAE pufferben (Lonza) 90V feszültségen 30 percen keresztül történt.

Statisztikai analízis

Annak meghatározására, hogy vizsgált allélok hatással vannak-e valamelyik termelési tulajdonságra SAS 9.1 szoftverrel variancia analízist végeztünk, azon belül a GLM eljárást – Tukey-Kremer korrekcióval – használtuk (SAS, 2007). A modell a következő volt:

$$y_{ijk} = \mu + TNNI_i + I_j + (TNNI * I)_{ij} + e_{ijk}$$

ahol:

y_{ijk} – megfigyelt érték;

μ – főátlag;

$TNNI_i$ – a *TNNI1* gén alléljainak hatása (i = CC, TC, TT);

I_j – ivarhatás (i = ártány, emse);

$TNNI * I_{ij}$ – a *TNNI1* gén alléljainak és az ivar interakciójának hatása;

e_{ijk} – maradék hiba.

Fix hatásként figyelembe vettük az ivart. A vizsgált genotípus csoportokban az eltérő n szám miatt az adatok LS mean (a legkisebb négyzetek átlaga) értékkel kerültek megadásra. Az allélgyakoriságok vizsgálata során Kh² próbát alkalmaztunk.

EREDMÉNYEK**Genotipizálás**

A vizsgált állomány 497 egyedén sikerült elvégezni a genotipizálást, mely eredményét az 1. táblázat tartalmazza. Az allél- és genotípus-gyakoriságok vizsgálata során megállapítottuk, hogy mindkét mintában a genotípusok megoszlása Hardy-Weinberg egyensúlyban van ($\chi^2(2)=0,035$, illetve $\chi^2(2)=1,646$; $p<0,05$), mely alapján valószínűsíthetjük, hogy egyik allél sem volt a közelmúltban kitéve szelekciós nyomásnak. A két állományban a genotípusok megoszlása azonosnak tekinthető ($\chi^2(2)=2,442$; $p<0,05$). Xu et al. (2010) által végzett vizsgálat alapján megállapíthatjuk, hogy az európai fajtákra (nagy fehér, lapály és duroc) a C allél túlsúlya jellemző. Ez a trend az általunk vizsgált állományban is megfigyelhető volt.

A vágóhídon 494 állat adatai kerültek rögzítésre, 404 állat esetében tudtuk a fenó- és genotípus adatokat egyértelműen azonosítani. A hizlalási időből adódó különbség miatt 210, illetve 194 egyedben külön végeztük a varianciaanalízist, mely eredményét a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

A TNNI1 gén mutációinak genotípus és allélgyakoriság megoszlása

	TNNI1	CC	CT	TT	C	T
1 istálló(1)	n	176	68	6		
		0,704	0,272	0,024	0,84	0,16
2 istálló(2)	n	158	83	6		
		0,652	0,311	0,037	0,808	0,192

Table 1: Genotype and allele frequencies of mutations of TNNI1 Barn1(1), Barn2(2)

2. táblázat

Az ivar és a TNNI1 gén polimorfizmusának hatása a vizsgált paraméterek átlagára

		1. istálló (minta)(1)					2. istálló (minta)(2)						
		n	HSZV* (mm)	KKm (mm)	SZHús (%)	ÉSúly (kg)	ÁNGy (g)	n	HSZV (mm)	KKm (mm)	SZHús (%)	ÉSúly (kg)	ÁNGy (g)
Ivar(3)	Ártány(4)	119	16,2	60,2	57,6	110,5	731,8	102	17,4	63,5	57	120,1	756,9
	Emse(5)	91	19,2	61,7	55,5	113,1	754,9	92	17,5	65	57,1	123,7	787,7
	P		0,0567	0,5370	0,0906	0,4858	0,4858		0,3715	0,4697	0,4645	0,6538	0,6538
TNNI1	CC	146	16,8	61,3	57,3	112,0	745,7	126	17,1	63,8	57,3	120,5	760,6
	CT	59	17,5	60,7	56,7	112,2	747,1	64	16,6	64,1	57,8	120,6	761,8
	TT	5	18,9	60,8	55,6	111,1	737,3	4	18,3	66,5	56,7	129,3	835,3
	P		0,3600	0,7975	0,3289	0,9777	0,9777		0,5066	0,6471	0,5309	0,1939	0,1939
TNNI1*Ivar	P		0,3805	0,5162	0,3956	0,9668	0,9668		0,1859	0,3354	0,1415	0,5026	0,5026
RMSE			4,0	6,3	3,2	9,5	85,2		3,6	5,2	2,9	9,1	77,1

Megjegyzés: HSZV (mm) – hátszalonna-vastagság, KKm (mm) – karaj-keresztmetszet, SZHús (%) – színhús%, ÉSúly (kg) – élősúly, ÁNGy (g) – hizlalás alatti átlagos napi gyarapodás, * – legkisebb négyzetek átlaga

Table 2: The effect of gender and polymorphism of TNNI1 gene on average of examined traits

Barn1 (Sample)(1), Barn2 (Sample)(2), Gender(3), Barrow(4), Gilt(5), Note: HSZV (mm) – backfat thickness measured between the 2nd and 3rd ribs, KKm (mm) – diameter of loin measured between the 2nd and 3rd ribs, SZHús (%) – lean meat%, ÉSúly (kg) – live weight at slaughter, ÁNGy (g) – average daily gain during fattening, * – least square means

A TNNI1 gén 4. intronjában lévő mutációját 2010-ben írták le, összesen 3 publikáció vizsgálta a polimorfizmus hatását sertések esetében (Xu et al., 2010; Yang et al., 2010b; Ngu és Nhan, 2012). Mindhárom szerző kínai fajtán (mongcai) vagy kínai és európai fajtahibriden (nagy fehér x meishan) végezte a vizsgálatot, így európai fajtahibrid esetében jelen publikáció az első ilyen jellegű tanulmány ismereteink szerint.

A vizsgált genotípusok esetében nem tudunk szignifikáns ($P<0,05$) különbséget kimutatni a mért termelési paraméterekben, melynek oka lehet az állományban tapasztalt nagymértékű heterogenitás, ami a vizsgálat nagyobb egyedszámú populáción történő ismétlését indokolja. A korábbi tanulmányok alapján a polimorfizmus összefüggésbe hozható a zsírszázalékkal és a hátszalonna-vastagsággal (Xu et al., 2010), mindkét tulajdonság esetében a C allél volt kedvezőbb. A hús minőségével kapcsolatos vizsgálatok szintén a

C allélt tartják kedvezőbbnek, mely magasabb márványozottsági értékkel, pH értékkel, valamint intramuszkuláris zsírtartalommal hozható összefüggésbe (Yang et al., 2010a).

A vizsgált gén biológiai jelentősége vitathatatlan. Azonban meglehetősen valószínűtlen, hogy a hátszalonna-vastagsággal és az intramuszkuláris zsírtartalommal közvetlen módon kapcsolatban állna. Mindazonáltal nem zárható ki, hogy valamilyen indirekt kapcsolat áll fenn a vizsgált mutáció és az említett, zsírdepozícióhoz köthető tulajdonságok között.

KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgált gén alléljainak előfordulási gyakorisága a két istállóban tartott állatoknál nagyjából azonos volt. Az eddigi kutatások alapján a C allél jelenléte jellemző az európai fajtákra. A vizsgált állományban nem tudtuk

kimutatni a *TNN1* gén alléljainak hatását a standard vágóhídi minősítés során mért termelési paraméterekre.

A termelési paraméterek vizsgálatakor – melyek kialakításában számos gén vesz részt – minden esetben figyelembe kell vennünk, hogy az egyes génekben lévő polimorfizmusok hatását nehézkes vizsgálni a többi

gén hatása miatt. A gén további vizsgálatát javasoljuk, mert biológiai szerepe miatt elképzelhető, hogy a jövőben olyan polimorfizmusát fogják feltárni, mely a *RYR1* génben leírt polimorfizmushoz (Fujii et al., 1992) hasonló jelentőséggel bír.

IRODALOM

- FAO (2013): <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>
- Fonseca, S.–Wilson, I. J.–Horgan, G. W.–Maltin, C. A. (2003): Slow fiber cluster pattern in pig longissimus thoracis muscle: implications for myogenesis. *J. Anim. Sci.* 81. 4: 973–983.
- Fujii, J.–Otsu, K.–Zorzato, F.–de Leon, S.–Khanna, V. K.–Weiler, J. E.–O'Brien, P. J.–MacLennan, D. H. (1992): Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253. 5018: 448–451.
- Handel, S. E.–Strickland, N. C. (1988): Catch-up growth in pigs: relationship with muscle cellularity. *Animal Production*. 47. 2: 291–295.
- Magyar Takarmány Kódex (2004): Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet. Budapest.
- Maltin, C. A.–Warkup, C. C.–Matthews, K. R.–Grant, C. M.–Porter, A. D.–Delday, M. I. (1997): Pig muscle fiber characteristics as a source of variation in eating quality. *Meat Sci.* 47. 3–4: 237–248.
- Ngu, N. T.–Nhan, N. T. H (2012): Analysis of troponin I gene polymorphisms and meat quality in Mongcai pigs. *South African Journal of Animal Science*. 42. 3: 288–295.
- SAS Institute Inc. (2007): SAS OnlineDoc® 9. 2. Cary NC: SAS Institute Inc.
- Tenke J.–Babinszky L. (2012): A molekuláris genetika alkalmazásának lehetőségei a hizósertések takarmányozásában. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 134. 3: 179–188.
- Xu, Z. Y.–Yang, H.–Xiong, Y. Z.–Deng, C. Y.–Li, F. E.–Lei, M. G.–Zuo, B. (2010): Identification of three novel SNPs and association with carcass traits in porcine *TNN1* and *TNN2*. *Mol. Biol. Reprod.* 37. 7: 3609–3613.
- Yang, H.–Xu, Z. Y.–Lei, M. G.–Li, F. E.–Deng, C. Y.–Xiong, Y. Z.–Zuo, B. (2010a): Association of 3 polymorphisms in porcine troponin I genes (*TNN1* and *TNN2*) with meat quality traits. *J. Appl. Genet.* 51. 1: 51–57.
- Yang, H.–Xu, Z. Y.–Ma, Z. X.–Xiong, Y. Z.–Deng, C. Y.–Zuo, B. (2010b): Molecular cloning and comparative characterization of the porcine troponin I family. *Anim. Biotechnol.* 21. 1: 64–76.
- Zsolnai A.–Orbán L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 20. 7: 1462–1468.