



Gen stearoyl – CoA desaturáza a jeho asociace se znaky
kvality masa u skotu

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Anna Schmidtová

Zadání

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Gen stearoyl-CoA desaturáza a jeho asociace se znaky kvality masa u skotu vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za věnovaný čas a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Elišce Horecké a Ing. Čěňku Horeckému za jejich čas a pomoc v laboratoři a doc. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za pomoc při zpracovávání statistických údajů. Zároveň mé poděkování patří Ing. Elišce Dračkové, Ph.D. za zpracování vzorků do databáze.

Diplomová práce vznikla v rámci CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.

ABSTRAKT

Kvalita masa u skotu je ovlivňována mnoha geny, jedním z nich je i gen *SCD1* (stearoyl – CoA desaturáza). Tento gen je asociován se složením mastných kyselin v mase a mléce a potenciálně ovlivňující množství intramuskulárního tuku. V rámci této diplomové práce byl stanovován genotyp u 260 býků plemene Český strakatý skot u genu *SCD1* pomocí metody PCR – RFLP. Následně byly provedeny výčty frekvence alel a genotypů pomocí programu SAS u daného souboru a vyhodnotila se asociační analýza sledovaných znaků a genotypů. Byla pozorována vysoce průkazná asociace s variabilitou polymorfismu a kyselinou myristoolejovou (C14:1) u všech uvedených genotypů, ale nejvyšší odhadnutá střední hodnota byla u genotypu *CC*. Vliv genotypu na množství intramuskulárního tuku nebo jiných znaků kvality masa nebyl prokázán.

Klíčová slova: Český strakatý skot, kvalita masa, mastné kyseliny, SCD1

ABSTRACT

The quality of meat in cattle is influenced by many genes, one of them is *SCD1* gene (stearoyl – CoA desaturase). This gene is associated with composition of fatty acids in meat and milk and can influence the level of intramuscular fat. In this diploma thesis, the total of 260 bulls of Czech Fleckvieh breed was genotyped using the PCR – RFLP method. The frequencies of alleles and genotypes were determined in this population by the SAS software and the association analysis between traits and genotypes was performed. Association with variability of all mentioned genotypes and myristoleic acid (C14:1) was found, with high significant value ($p < 0,0001$), but *CC* genotype had a higher median value. The genotype effect on intermuscular fat and other traits was not proved.

Keywords: Czech Fleckvieh breed, meat quality, fatty acids, SCD1

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL PRÁCE.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1	Mastné kyseliny.....	11
3.2	Funkce desaturázy	11
3.2.1	Stearoyl – CoA desaturáza	11
3.3	Izoformy genu <i>SCD</i>	13
3.3.1	Exprese <i>SCD1</i> ve svalech.....	14
3.3.2	Ovlivnění exprese <i>SCD1</i> proteinu dietou.....	15
3.4	<i>SCD</i> u skotu	15
3.4.1	Výskyt <i>SCD</i> u skotu	16
3.4.2	Vliv <i>SCD</i> na kvalitu mléka.....	17
3.4.2.1	Italské Holštýnské plemeno	18
3.4.2.2	Komerční kříženky.....	18
3.4.3	Kvalita hovězího masa	19
3.4.3.1	Marbling.....	19
3.4.3.2	Mastné kyseliny	21
3.4.4	Vliv <i>SCD</i> na kvalitu masa plemen skotu.....	21
3.4.4.1	Japonský černý skot	21
3.4.4.2	Plemena Wagyu a limousin	22
3.4.4.3	Plemeno Strakatého skotu.....	23
3.4.4.4	Plemeno Český strakatý skot	24
4	MATERIÁL A METODIKA	25
4.1	Materiál	25
4.1.1	Analyzované vzorky.....	25

4.1.2	Použité přístroje.....	25
4.2	Metodika.....	25
4.2.1	PCR – RFLP.....	25
4.2.2	Agarózová gelová elektroforéza.....	28
4.2.3	Sekvenování	29
4.2.4	Stručný popis chemických analýz	30
4.2.4.1	Stanovení obsahu sušiny v mase.....	30
4.2.4.2	Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase	30
4.2.4.3	Stanovení obsahu tuku v mase	31
4.2.4.4	Stanovení obsahu popelovin	31
4.2.4.5	Stanovení pH masa	31
4.2.4.6	Stanovení barvy masa	31
4.2.4.7	Stanovení obsahu mastných kyselin v mase	31
4.2.5	Matematicko – statistické zpracování	32
4.2.5.1	Výpočet frekvencí alel a genotypů.....	32
4.2.5.2	Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy – Weinbergova zákona.....	33
4.2.5.3	Asociační analýza	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	PCR	35
5.2	RFLP	35
5.3	Sekvenování	37
5.4	Matematicko – statistické vyhodnocení	39
5.4.1	Výpočet frekvencí alel a genotypů.....	39
5.4.2	Stanovení genetické rovnováhy podle Hardy – Weinbergova zákona.....	40
5.4.3	Asociační analýza.....	43
6	ZÁVĚR.....	48
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	49

8	SEZNAM ZKRATEK	58
9	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
10	SEZNAM TABULEK.....	60

1 ÚVOD

V poslední době se lidé začínají čím dál více zajímat o kvalitu a složení jídla. K tomu patří i množství nasycených a nenasycených mastných kyselin v mase, kdy nasycené mastné kyseliny jsou asociovány s rizikem srdečních onemocnění a s vysokým cholesterolem. Proto je v zájmu chovatelů masného dobytku produkovat taková zvířata, jejichž masné produkty budou atraktivní pro spotřebitele. Zároveň obsah intramuskulárního v mase zvyšuje jeho šťavnatost a chutnost při úpravě.

Tyto vlastnosti hovězího masa jsou asociovány s enzymem stearyl – CoA desaturázou (*SCD*), která modifikuje nasycené mastné kyseliny na nenasycené vnesením dvojné vazby do molekuly. V genu *SCD1* kódující jednu izoformu této desaturázy se nachází substituční mutace způsobující záměnu aminokyselin v bílkovině a ovlivňující funkčnost enzymu, kdy mutovaný enzym je spojován s vyšším obsahem nenasycených mastných kyselin jak v mase, tak v mléce u skotu.

V této diplomové práci byl zkoumán Český strakatý skot, plemeno rozšířené v České republice, využívající se jak k masné, tak k mléčné produkci. Původně mělo být zkoumáno 150 jedinců, ale počet analyzovaných vzorků byl rozšířen na 260 jedinců zahrnující celý soubor pro přesnější asociační analýzu. Poznatky z této diplomové práce mohou sloužit chovatelům jako doporučení ke šlechtění a produkci produktů atraktivních pro spotřebitele.

2 CÍL PRÁCE

V rámci této diplomové práce byly vyhodnoceny asociace genotypů genu *SCD1* se znaky kvality masa u skotu. Cílem této diplomové práce bylo zvládnutí základních metod molekulární genetiky: polymerázovou řetězovou reakci, štěpení restričními endonukleázami a gelovou agarózovou elektroforézou. Dále tyto metody aplikovat pro určení genotypů u genu *SCD1* a následně provést výpočet frekvence alel a genotypů u tohoto genu u plemene Český strakatý skot a vyhodnotit asociaci mezi zjištěným genotypem a vybranými znaky kvality masa.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou alifatické monokarboxylové kyseliny, kdy skoro všechny mají nerozvětvený řetězec se sudým počtem atomů uhlíku. Podle délky uhlíkatého řetězce se dělí na nižší, středně dlouhé a vyšší mastné kyseliny. Podle přítomnosti a počtu dvojných vazeb v řetězci se dělí na nasycené kyseliny (SFA), mononenasycené (MUFA) a polynenasycené (PUFA) mastné kyseliny (Mahan and Escott, 2008).

Nasycené mastné kyseliny neobsahují žádnou dvojnou vazbu v uhlíkatém řetězci. Nenasycené mastné kyseliny mají v uhlíkatém řetězci přítomnu jednu či více dvojných vazeb (Musil *et al.*, 1976). Dvojná vazba způsobuje ohnutí lipidové molekuly, tím nedovoluje těsné přilehnutí molekul na sebe jako je to možné u nasycených lipidů a vede k tekutosti lipidů. Nenasycené mastné kyseliny se mohou účastnit všech chemických reakcí charakteristických pro dvojnou vazbu mezi uhlíky. Nenasycené vyšší mastné kyseliny vznikají z nasycených mastných kyselin desaturací, kterou katalyzují oxygenázy. Nenasycené mastné kyseliny mají v organismu různý význam a mohou sloužit i jako zdroj energie. Jejich zvýšený obsah v krevní plazmě vede k zvýšení hladiny cholesterolu a může vést k obezitě (Dostál *et al.*, 2005).

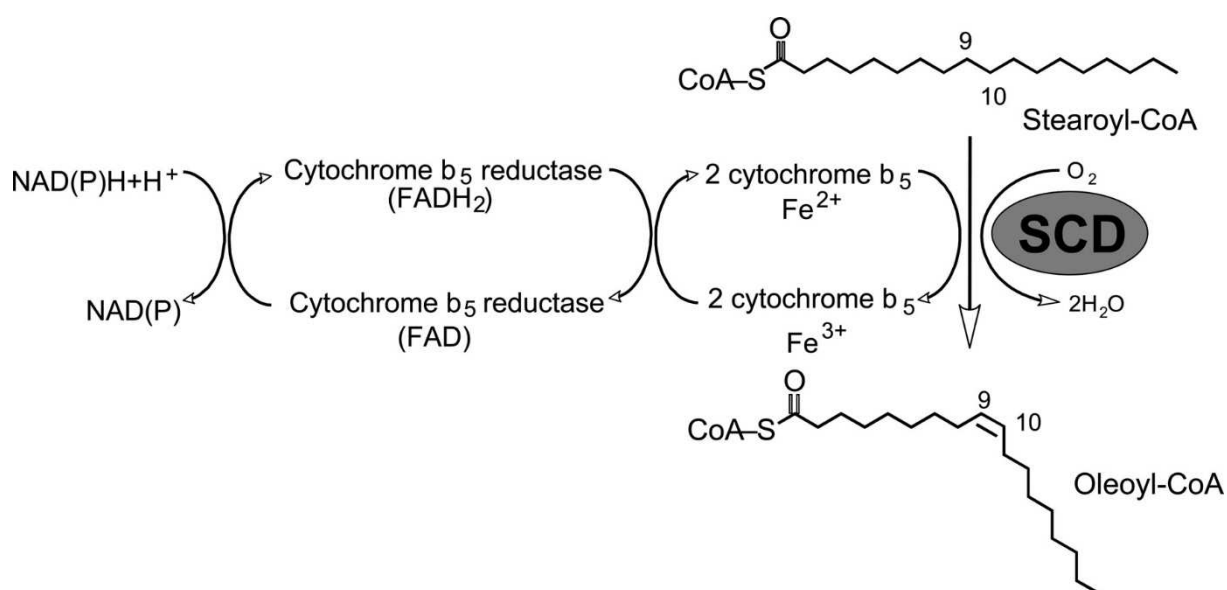
3.2 Funkce desaturázy

Desaturázy tvoří dvojnou vazbu mezi uhlíky. Z řetězců sousedních mastných kyselin se odštěpí dva vodíky, tím mezi uhlíky vznikne dvojná vazba, jejíž polohu určuje substrátová specifita enzymu. Desaturace volných mastných kyselin probíhá v játrech. Zde dochází k přeměně toxických nasycených mastných kyselin na neutrální nenasycené mastné kyseliny. (Ledvina *et al.*, 2003)

3.2.1 Stearoyl – CoA desaturáza

Stearoyl-CoA desaturáza (SCD) je enzym nacházející se v endoplazmatickém retikulu, který katalyzuje biosyntézu nenasycených mastných kyselin z nasycených mastných kyselin SCD reaguje společně s NAD(P) – cytochrom b5 reduktázou, elektronovým akceptorem

cytochromem b₅ a molekulárním kyslíkem, protože u savců je tento proces aerobní. Elektrony proudí z NAD(P)H přes cytochrom b₅ reduktázu do cytochromu b₅, dále do SCD a končí v O₂, které je redukováno na H₂O. Tento enzymový komplex indukuje jednu dvojnou vazbu na pozici 9, 10 dlouhého řetězce acyl-CoAs, viz obrázek 1. Acyl-CoAs je syntetizován de novo a nebo je vstřebán z potravy (Paton and Ntambi, 2008). Preferovanými substráty jsou palmitový a stearový – CoA, které jsou potom konvertovány do palmitolejové a olejové – CoA (Enoch *et al.*, 1976, Ntambi, 1999). Tyto produkty slouží jako substráty pro syntézu různých lipidů včetně fosfolipidů, triacylglyceridů, cholesterolových esterů a dalších (Paton and Ntambi, 2008).

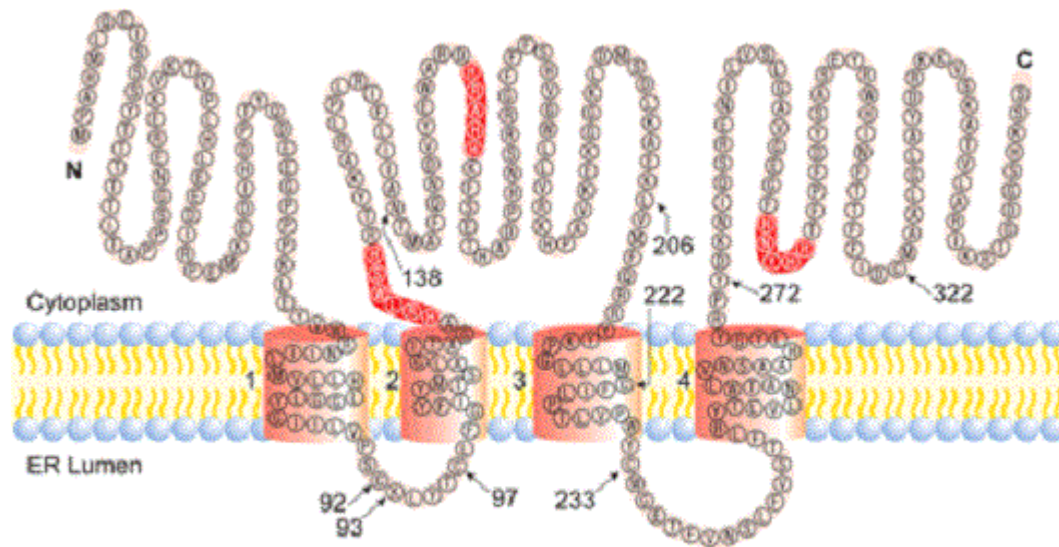


Obrázek 1: Cesta transferu elektronů při desaturaci nasycených mastných kyselin na nenasycené mastné kyseliny stearoyl - CoA desaturázou (SCD1) (Paton and Ntambi, 2008).

Aktivita enzymu SCD1 je stimulována příjmem potravy. Po příjmu potravy dochází k aktivaci jaderného receptoru PPAR- δ , který zvyšuje syntézu odpovídající mRNA. Naopak snížení aktivity je realizováno hydrolýzou části řetězce pomocí specifické proteázy (Rogorowski *et al.*, 2013). Činnost SCD1 je citlivá na změny stravovacích návyků a hormonální nerovnováhu (Ntambi, 1999).

SCD1 se skládá ze čtyř transmembránových domén s oběma NH₂ a COOH konci orientovanými k cytosolu. SCD1 obsahuje jednu cytoplasmatickou smyčku a COOH konec obsahují osm histidinových zbytků, které tvoří His box. Ten váže železo v katalytickém centru desaturázy. Dále dvě smyčky v lumenu endoplazmatického retikula, které jsou menší

v porovnání s cytoplazmatickou smyčkou, a které obsahují dva ze tří konzervovaných His motivů, viz obrázek 2 (Paton and Ntambi, 2008).



Obrázek 2: Model membránové topologie myšičího proteinu *SCD1*. Červeně zvýrazněná rezidua zobrazují konzervované histidinové regiony, která jsou esenciální pro katalýzu. N a C reprezentují NH₂ a COOH konce. Čísla 92, 97, 222, 233 a 322 jsou rezidua, ve kterých je lokalizováno 5 cysteinů. ER lumen znamená lumen endoplazmatického retikula (Paton and Ntambi, 2008).

3.3 Izoformy genu *SCD*

Existuje několik izoform genů *SCD*. U myši byly identifikovány čtyři izoformy (*SCD1*, *SCD2*, *SCD3*, *SCD4*), zatímco u krysu byly identifikovány pouze dvě izoformy (Ntambi, 1999). Geny *SCD* byly také naklonovány u dalších organismů jako je kvasinka, *Drosophilla*, *C. elegans*, ovce, křeček a také u člověka (Keaster *et al.*, 1989, Mihara *et al.*, 1990, Ntambi *et al.*, 1988, Stukey *et al.* 1990). U mnoha rozdílných kmenů myši se geny *SCD* nacházejí ve vzájemné blízkosti na chromozomu 19. Izoformy u myši mají z 85 – 88% identické sekvence aminokyselin, ale liší se v 5 – doprovodné oblasti, což vede k rozdílné tkáňově specifické expresi (Ntambi *et al.*, 1999). Za normálních dietologických podmínek je *SCD1* mRNA vysoce exprimována v bílé a hnědé tukové tkáni a některých žlázách (Miyazaki *et al.*, 2002, Miyazaki *et al.*, 2001, Miyazaki *et al.*, 2001). Při vysoce uhlohydrátové dietě se exprese *SCD 1* zvyšuje v jaterní a srdeční tkáni, a u *SCD2* izoformy se exprese při této dietě zvyšuje v játrech, slezině, srdci a plicích, kde jinak exprese probíhá v menší míře. *SCD2* je

převážně exprimován v mozku, kdy indukce exprese probíhá během neonatálního vývoje. *SCD3* izoforma je exprimována v některých žlázách a v kůži v sebocytech. *SCD4* izoforma je exprimována hlavně v srdeční tkáni, kde může být exprese zvýšena uhlohydrátovou dietou. V některých tkáních se vyskytuje exprese i více než jedné izoformy (Miyazaki *et al.*, 2003). Důvod pro expresi dvou či více izoform *SCD* v jedné tkáni není známý, ale pravděpodobně je to spojeno se substrátovou specifitou izomer a jejich hormonální a dietologickou regulací (Paton and Ntambi, 2008).

3.3.1 Exprese *SCD1* ve svalech

SCD1 izoforma je u myši také vysoce exprimována v kosterní svalovině, kde s nejvyšší pravděpodobností ovlivňuje složení mastných kyselin, lipidovou esterifikaci, lipogenezi a beta oxidaci, což má za následek vliv na vstřebávání glukózy a inzulinovou signalizaci (Stamatikos *et al.*, 2013). Ve studii, kdy myši samičky po dva týdny podstupovaly cvičení v plavání, vykazovaly ty ve skupině, která pravidelně plavala dramatický nárůst exprese *SCD1* v kvadricepsch a gastrocnemiu. Tento nárůst byl měřen 3 hodiny po cvičení a přetrvával po 22 hodin (Ikeda *et al.*, 2002).

Vysoká exprese *SCD1* byla pozorována u obézních hlodavců. Studie se Zuckerovými krysami, kde tyto krysy mají missense mutaci u leptinového receptoru, což způsobuje poškození leptinové signalizace a vede k hyperfágii a obezitě (Phillips *et al.*, 1996, Chua *et al.*, 1996). Navíc si tyto hlodavci vytvořili dysfunkci β buněk, která způsobuje redukcí hladiny inzulinu a tím i ovlivňuje míru exprese *SCD1* (Tokuyama *et al.*, 1995). Samci Zuckerových krys vykazují zvýšenou expresi *SCD1* ve svalech vedoucí k vyšší koncentraci palmitoolejové kyseliny v porovnání se štíhlými krysami (Voss *et al.*, 2005). Jiná studie zkoumala expresi *SCD1* u krysích samců, kteří podstupovali aerobní cvičení na běžícím pásu. Zjistili, že u cvičících krys byla vyšší koncentrace *SCD1* proteinu a mRNA v lýtkovém svalu než u necvičících krys. (Dobrzyn *et al.*, 2010).

U lidí byl zjištěn rozdíl v *SCD1* expresi ve svalech u skupiny obézních lidí a skupiny štíhlých lidí, kdy u obézních byla exprese *SCD1* vyšší. Zvýšená exprese *SCD1* korelovala se změnou složení mastných kyselin u glycerolipidů, kdy byl vyšší obsah kyseliny olejové a nižší obsah kyseliny palmitové (C16:0) a stearové (C18:0). Zvýšená exprese *SCD1* u obézních subjektů korelovala se sníženou β oxidací. Tento vztah byl zjištěn nadměrnou expresí *SCD1* v primárních myocytech, získaných od štíhlých subjektů, což vedlo ke zvýšené akumulaci

triacylglyceridů (Hulver *et al.*, 2005). Také bylo prokázáno, že jedna fáze aerobního cvičení zvýší koncentraci *SCD1* proteinu v kosterní svalovině u lidských subjektů (Schenk and Horowitz, 2007). Chronické aerobní cvičení také ovlivňuje hladinu *SCD1* proteinu u lidí. Studie zahrnující vytrvalostní atlety, štíhlé nebo obézní necvičící subjekty byla provedena pro determinaci rozdílů v obsahu *SCD1* proteinu. Expres *SCD1* proteinu byla zásadně vyšší u vytrvalostních atletů než u necvičících skupin (Amati *et al.*, 2011). Zároveň mají vytrvalostní atleti zvýšený obsah intramyocelulární triacylglyceridy a cvičení zvyšuje β oxidaci a lipogenezi ve svalech (Goodpaster *et al.*, 2001, Tunstall *et al.*, 2002, Ikeda *et al.*, 2002).

3.3.2 Ovlivnění exprese *SCD1* proteinu dietou

Ntambi *et al.* (2002) ve své studii použil myši s cíleným narušením funkčnosti genu *SCD1* jako zvířecí model pro určení vlivu vysokotučné diety na fenotypový projev genotypu. Rozdělili myši do tří skupin podle genotypu: divoký typ homozygoti (+/+), *SCD1* heterozygoti (+/-) a *SCD1* homozygoti (-/-). *SCD1* (-/-) myši měli stejnou růstovou křivku jako jejich sourozenci s divokým genotypem. Rozdíl se začal projevovat až po zkrmování vysokotučné diety, kdy *SCD1* (-/-) myši zkonsumovali o 25% více potravy, ale byli štíhlejší a akumulovali méně tuku než divoký typ myši. Ze studie vyplývá, že myši s mutací v *SCD1* izoformě mají redukovanou tukovou tkáň, zvýšenou citlivost na inzulín a jsou odolné k tloustnutí, indukovaném dietou.

U prasat byl zkoumán efekt diety s redukovanými proteiny na aktivitu a expresi *SCD1*, na množství celkové tukové tkáně a na složení mastných kyselin ve svalech a v podkožní tukové tkáni. Značný vliv této diety na *SCD1* aktivitu a na *SCD1* expresi proteinu byl pozorován ve svalech, ale ne u podkožní tukové tkáně. Z toho vyplývá, že exprese *SCD1* může být tkáňově specifická za různých regulačních mechanismů mezi kosterní svalovinou a podkožní tukovou tkání (Doran *et al.*, 2006).

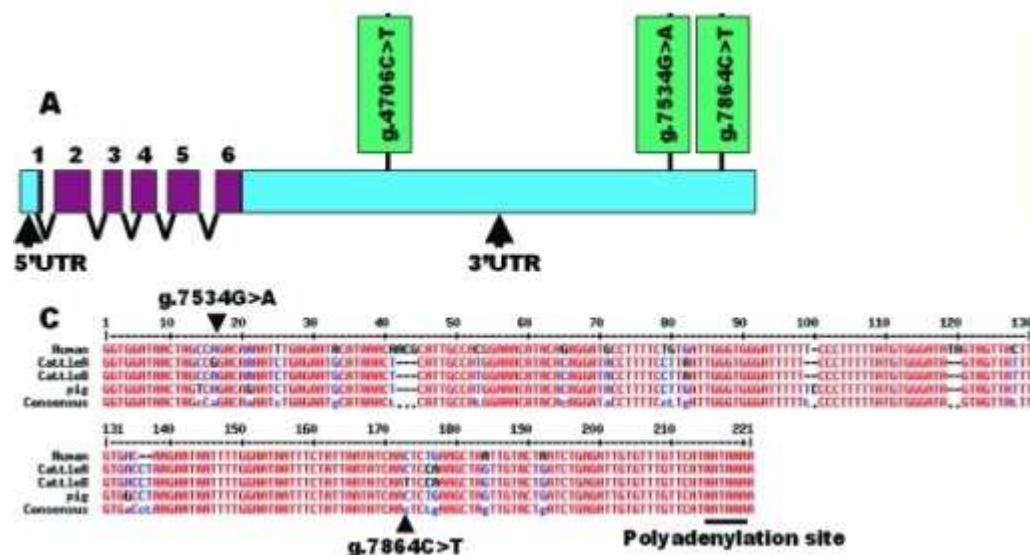
3.4 SCD u skotu

Stearoyl- CoA desaturáza je enzym s funkcí omezení rychlosti reakce, který katalyzuje syntézu mononenasyčených mastných kyselin z nasycených mastných kyselin (Ntambi and Miyazaki, 2004). Tento gen je za normálních dietologických podmínek vysoce exprimován v bílé tukové tkáni, hnědé tukové tkáni a u některých žláz (Dobrzyn *et al.*, 2006). Zároveň je *SCD1* vysoce exprimován u extrémně obézních lidí a u obézních na inzulín rezistentních

Zuckerových krys (Hulver *et al.*, 2005, Voss *et al.*, 2005). U přežvýkavců jsou mastné kyseliny přijaté potravou chemicky redukovány v batoru mikroorganismy a vstřebávány jako nasycené mastné kyseliny. Složení mastných kyselin v tukových zásobách odráží předchozí činnost SCD na substrátech jako je stearová kyselina a palmitová kyselina (Kim and Ntambi, 1999).

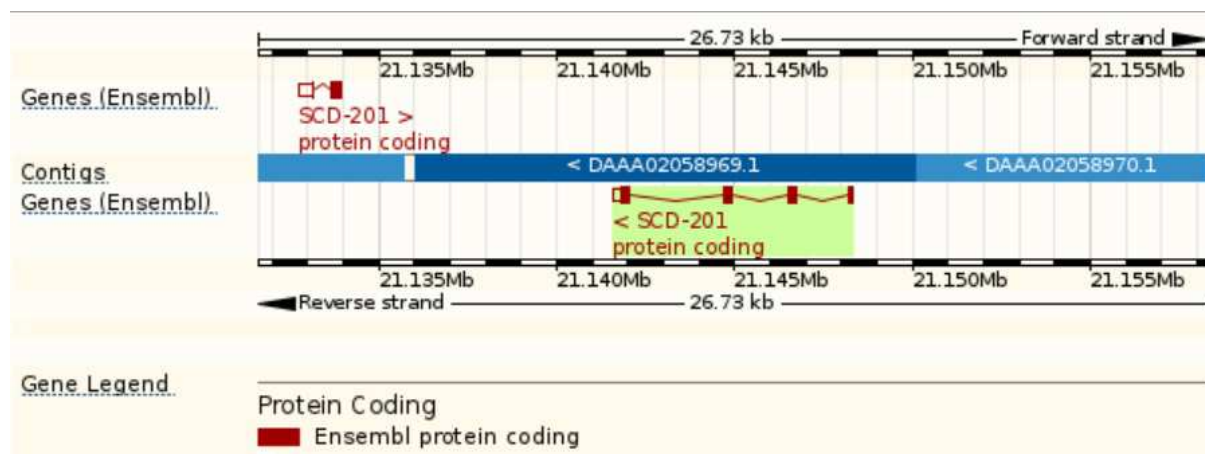
3.4.1 Výskyt SCD u skotu

U skotu byly charakterizovány dvě rozdílné izoformy genu *SCD*. *SCD1* izoforma, která se nachází na 26 chromozomu a *SCD5* izoforma, která se nachází na 6 chromozomu (Lengi and Corl, 2007). Bovinní gen *SCD1* je dlouhý zhruba 17 kb a dříve se myslelo, že se skládá se ze šesti exonů a pěti intronů, viz obrázek 3 (Taniguchi *et al.*, 2004). Bylo objeveno osm SNP v celé délce sekvence genu *SCD1* u Japonského černého plemene, z nichž tři se nacházejí v otevřeném čtecím rámci (ORF) u exonu 5 (Taniguchi *et al.*, 2004). Existence těchto tří SNP byla potvrzena i u Kanadského Holštýnského plemene a plemene Jersey, kdy u Holštýnského plemene bylo navíc jedno SNP v exonu 3 (Kgwatalala *et al.*, 2007). Dále tyto tři SNP v exonu 5 genu *SCD1* byly objeveny u jedenácti plemen skotu chovaných v Itálii (Milanesi *et al.*, 2008). Nicméně pouze SNP u nukleotidu 878 způsobuje substituci aminokyselin alaninu/valinu v SCD1 proteinu (Bartoň *et al.*, 2010).



Obrázek 3: A - Grafické znázornění původních 5 exonů genu *SCD1* a tří SNP (g.4706C>T, g.7534G>A a g.7864C>T). C - Sekvence genu *SCD1* a poloha tří SNP. (Jiang *et al.*, 2008)

Podle nejnovějších poznatků se ale gen *SCD1* skládá ze čtyř exonů (viz obr. 4) a polymorfismus *C878T* se nachází ve třetím exonu (NCBI, Gene ID: 280924, 2015).



Obrázek 4: Struktura bovinního genu *SCD1* (Ensembl, 2015)

Polymorfismus *C878T* v genu *SCD1* způsobuje substituci aminokyselin, kdy alela *C* kóduje v primární struktuře proteinu aminokyselinu alanin a alela *T* kóduje v primární struktuře proteinu aminokyselinu valin. Aminokyselina valin může způsobit inhibici enzymové katalytické aktivity oproti aminokyselině alaninu, kdy aminokyselina alanin je asociován s vyšším obsahem MUFA v mase (Taniguchi *et al.*, 2004).

3.4.2 Vliv *SCD* na kvalitu mléka

Složení mastných kyselin v mléce je důležitý parametr pro hodnocení nutriční kvality mléka, hlavně mono nenasycené mastné kyseliny (většinou kyselina olejová) a konjugovaná kyselina olejová (CLA) (Mele *et al.*, 2007). Složení mastných kyselin v kravském mléce je také z velké části determinováno geneticky, což pomocí šlechtění a selekce může vést ke zlepšení složení mléka a může mít pozitivní vliv na lidské zdraví (Schennink *et al.*, 2007, Soyeurt *et al.*, 2007). Tuk v mléce je z větší části složený z nasycených mastných kyselin, hlavně z kyseliny myristové (C14:0) a kyseliny palmitové (C16:0), a v menší míře z nenasycených mastných kyselin (Schennink *et al.*, 2008).

Na míru množství nenasycených mastných kyselin v mléce má vliv také krmná dávka (Baumgard *et al.*, 2000). Mastné kyseliny obsažené v krmné dávce jsou v batoru hydrogenizovány bakteriemi a dále transportovány pomocí krevního řečiště. V mléčné žláze potom mohou být mastné kyseliny, pocházející buď z krve, nebo syntetizovány de novo, desaturovány. Hodnotu nenasycenosti mléčných mastných kyselin tedy určuje množství

mastných kyselin uvolněných do mléka (Schennink *et al.*, 2008). Nicméně krávy krmeny stejnou dietou vykazují rozdíly ve složení mastných kyselin v mléce, což ukazuje na existenci rozdílných genetických variant (Karijord *et al.*, 1982, Bobe *et al.*, 1999, 2003).

Mezi několika enzymy, které ovlivňují metabolismus lipidů v mléčné žláze, je stearyl – CoA desaturáza nejvýznamnější, protože vnáší dvojnou vazbu mezi devátým a desátým uhlíkem v molekule u mnoha mastných kyselin (Ntambi, 1999). Nejvýznamnějšími substráty pro SCD jsou acyl – CoA z C14, C16, C18 a trans-11 C18:1 (kyselina vakcenová), které jsou konvertovány na C14:1 n-5, C16:1 n-7, cis-9 C18:1 a cis-9, trans-11 C18:2 (Corl *et al.*, 2001). Více než 70% cis-9, trans-11 CLA v kravském mléce je produkováno v mléčné žláze aktivitou SCD (Bauman *et al.*, 2006).

3.4.2.1 Italské Holštýnské plemeno

Mele *et al.* (2007) se věnovali asociaci mezi SCD polymorfismem a složením mastných kyselin v mléce u Italského Holštýnského plemene. K analýze použili vzorky od 297 krav, kdy frekvence alely A byla vyšší (0,57) než frekvence alely V (0,43). SCD genotyp výrazně ovlivňoval množství cis-9 C18:1, cis-9 C14:1 a celkový obsah MUFA, kdy genotyp AA vykazoval o 11,7% více MUFA, cis-9 C18:1 a cis-9 C14:1 než genotyp VV. Nicméně fáze laktace výrazně ovlivňovala množství MUFA. V prvních 100 dnech bylo v mléce více cis-9 C18:1 a méně C14:0 a cis-9 C14:1 než u pozdějších fází laktace.

Li *et al.* (2014) detekoval geny asociované se složením mléčného tuku. Pomocí čipů analyzoval 314 SNP (jednonukleotidové polymorfismy) spojených s 18 znaky mastných kyselin v mléce. SCD1 byl jedním z genů, který zkoumali a našli přítomnost několika SNP spojených s tímto kandidátním genem, které se mohou použít pro další analýzu.

3.4.2.2 Komerční kříženko

V jiné studii se Schennink *et al.* (2008) zabývali efektem polymorfismu A a V u SCD-1 na indexy nenasycenosti mléčných mastných kyselin. Index nenasycenosti představuje koncentraci nenasycených produktů v poměru k součtu nenasycených produktů a nasyceného substrátu. K výzkumu použili vzorky mléka a krve od 1933 krav na první laktaci, kdy tuk a proteiny byly měřeny spektroskopicky a genotypy ze vzorků DNA byly zjištěny pomocí SNaPshot metody. Alela V je asociována s nižším indexem u C10, C12 a C14 a s vyšším indexem u C16, C18 a CLA než u alely A.

3.4.3 Kvalita hovězího masa

Očekávání zákazníků ohledně kvality masa je důležitým faktorem ovlivňující rozhodnutí o nákupu (Grunert *et al.*, 2004). Tudíž by mělo být cílem producentů hovězího masa zlepšování jeho kvality. Typickými parametry hovězího masa jsou barva, obsah intramuskulárního tuku a vaznost vody. Maso s jasně červenou barvou může pozitivně ovlivnit výběr nakupujícího (Mancini and Hunt, 2005). Vyšší obsah intramuskulárního tuku zlepšuje kvalitu masa co do chuti, šťavnatosti a měkkosti (Crouse *et al.*, 1989).

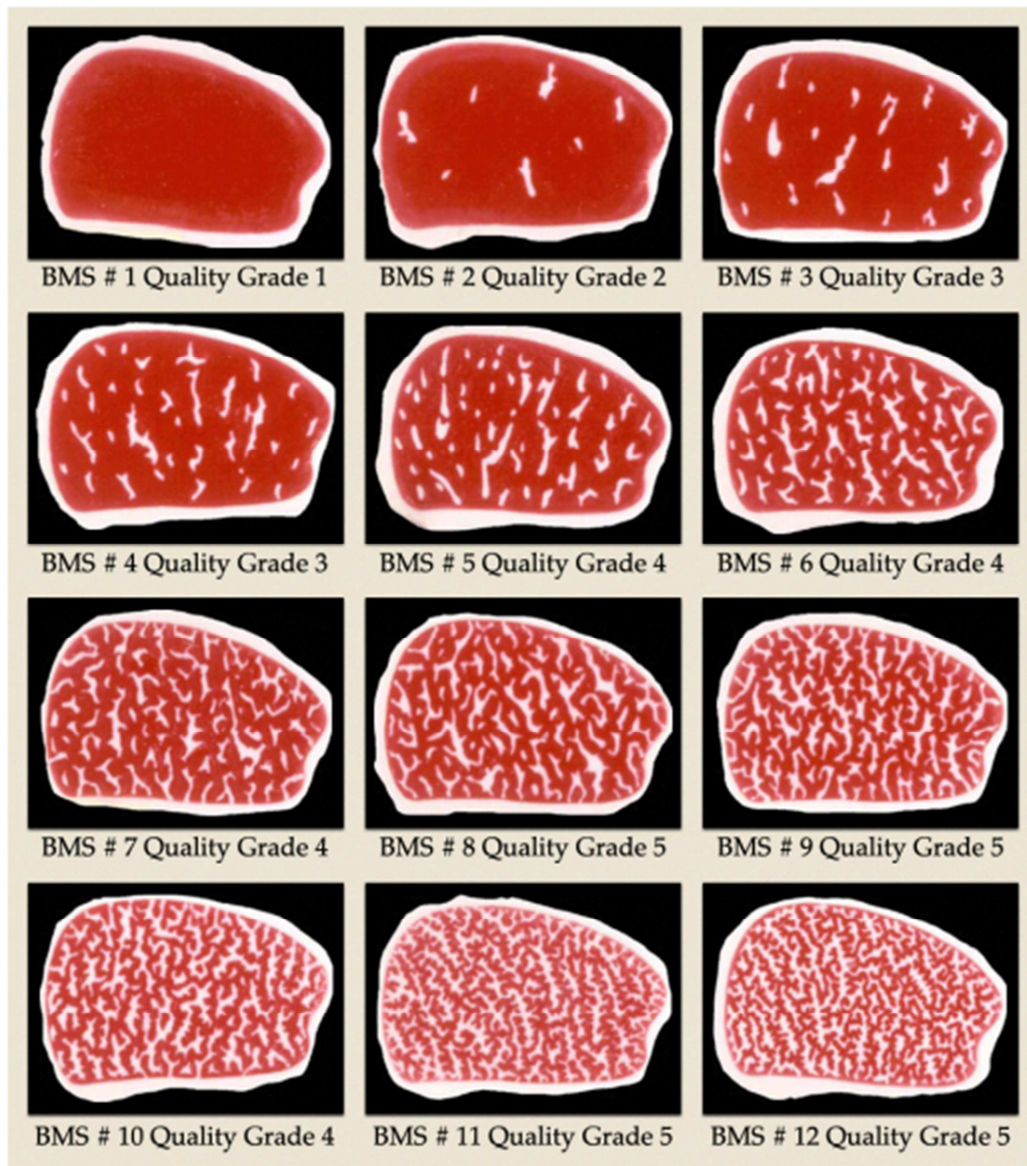
3.4.3.1 Marbling

Marblingem se nazývá výskyt bílých fleků nebo pruhů z tukové tkáně mezi svalovými vlákny, česky také mramorování masa. Marblingem jsou myšleny čistě tukové buňky v intramuskulárním prostoru a nezahrnuje intermuskulární nebo subkutánní tukové zásoby. Tato tuková ložiska mezi svalovými vlákny jsou složena z adipocytů nacházejících se ve spojovacím pojivu a shlukující se kolem kapilár v mase. Shluky adipocytů začínají být viditelné makroskopicky při počtu 10 – 15 buněk ve shluku, zároveň jsou však tyto adipocyty v marblovaném mase menší než adipocyty vyskytující se jinde v těle (Harper and Petick, 2001).

Adipocyty intramuskulárního tuku se vyvíjejí z pluripotentních buněk obsažených ve svalové tkáni, takzvaných preadipocytů. Tyto buňky se začínou diferenciovat až po indukci nějakým vnějším stimulem (Harper and Petick, 2004). Jedním z takových stimulů může být i stárnutí, kdy se tukové zásoby včetně intramuskulárního tuku rozšiřují s věkem na rozdíl od kostí a svalů, které dosáhnou svého maxima v dospělosti (Hood and Allen, 1973). Zároveň má na množství intramuskulárního tuku vliv pohlaví (Harper and Petick, 2001) a věk ve kterém byla provedena kastrace u samců, kdy jedinci kastrování hned po narození vykazovali vyšší množství intramuskulárního tuku než jedinci kastrování ve věku šesti měsíců (Worrel *et al.*, 1987). Z externích vlivů má na marbling významný dopad složení potravy, kdy vysokoenergetická strava po delší časový úsek zvyšovala množství marblingu v mase. Nicméně zvířata, která nemají genetické předpoklady pro vývoj intramuskulárního tuku při vysokoenergetické dietě, ukládají tuk spíše subkutánně (Harper and Petick, 2001).

Množství intramuskulárního tuku je determinované i geneticky, kdy se vyskytují rozdíly mezi plemeny. Například britská plemena jako Angus nebo Hereford mají vyšší marbling masa než plemena původem z Evropy jako je Limousine nebo Simentál. Ze všech

plemen vyčnívá plemeno Japonské černé, které vyniká vysokým marblingem (Harper and Petick, 2001). Míra marblingu je hodnocena podle BMS stupňů, viz obrázek 5.



Obrázek 5: Stupně pro hodnocení množství intramuskulárního tuku v hovězím maso (<httpwww.valio.dewagy-en.html>).

Preference marblovaneho masa se liší, někdo preferuje maso s co nejmenším množstvím tuku s cílem omezit příjem nasycených mastných kyselin ve stravě, naopak někdo preferuje marblovane maso pro jeho lepší chuť (Harper and Petick, 2001). Proto je důležitá funkce genu *SCD*, který je schopen „škodlivé“ nasycené mastné kyseliny přeměnit na

zdravější nenasycené mastné kyseliny a tím umožnit konzumentům lepší chuťový zážitek z masa beze strachu o zdraví.

3.4.3.2 Mastné kyseliny

Hodně pozornosti je v poslední době věnováno vlivu složení mastných kyselin v mase na lidské zdraví. Některé nasycené mastné kyseliny, které se běžně nachází v mase a mléčných výrobcích, hlavně myristová a palmitová kyselina, zvyšují hladinu celkového cholesterolu v těle konzumenta a jsou jedním z rizikových faktorů vzniku srdečních onemocnění (Erkkila *et al.*, 2008, Webb *et al.*, 2008). Dieta bohatá na nasycené mastné kyseliny má tendenci způsobit zvýšení hladiny cholesterolu v krvi, zatímco dieta bohatá na nenasycené mastné kyseliny má tendenci snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Cholesterol je v krvi v podobě lipoproteinu. Lipoprotein s nízkou hustotou (LDL) je „špatný“ cholesterol, protože zvýšená hladina LDL cholesterolu v krvi je spojována se zvýšeným rizikem onemocnění srdce. Naopak cholesterol s vysokou hustotou (HDL) je „dobrý“ cholesterol, protože vysoká hladina HDL je spojována se sníženým rizikem srdečních onemocnění. Z toho vyplývá, že vznik onemocnění srdce je ovlivněno konzumací určitých nenasycených mastných kyselin, protože snižují celkovou hladinu cholesterolu v plazmě a zároveň snižují hladinu „špatného“ cholesterolu (Jiang *et al.*, 2008). Již byl demonstrován vliv potravy na složení mastných kyselin v mase a mléčných výrobcích, ale molekulární mechanismus kontrolující složení mastných kyselin zatím nebyl plně objasněn.

3.4.4 Vliv SCD na kvalitu masa plemen skotu

3.4.4.1 Japonský černý skot

Maso Japonského černého skotu je ceněné pro jeho vysoké marbling skóre a nižší bod tání tuku než je u jiných plemen skotu. Nižší bod tání tuku je způsoben vyšším procentem nenasycených mastných kyselin v tuku (Yang *et al.*, 1999). Zároveň takové složení mastných kyselin může pozitivně přispívat k chuti hovězího (Meltonn *et al.*, 1982).

Taniguchi *et al.* (2004) ve své studii porovnávali sekvence celé délky bovinní SCD cDNA a 5'-upstream regionem a našli dva typy tohoto genu s jednoduchým nukleotidovým polymorfismem v ORF. Jedno z SNP nalezených v ORF způsobuje substituci aminokyselin a tím i možnost SCD genotypu ovlivnit složení mastných kyselin. Porovnáváním celé délky sekvence SCD cDNA 20 jedinců Japonského černého plemene identifikovali 8 SNP včetně

jednoho, který může způsobovat změnu katalytické aktivity enzymu. Záměna aminokyseliny substitucí alaninu za valin byla pozorována v třetím regionu bohatém na histidin (Taniguchi *et al.*, 2004). Valin na 293 pozici mezi aminokyselinami byl vysoce konzervován mezi savčími druhy, což znamená, že valin na této pozici je ancestrální aminokyselina (Strittmatter *et al.*, 1988, Shanklin *et al.*, 1994). Substitute těchto aminokyselin může mít klíčovou roli ve funkci SCD enzymu a tím způsobovat různé variace ve složení mastných kyselin mladých volů u rozdílných genetických variant SCD. Dále určovali jak moc je SCD genotyp asociován s procentem MUFA u intramuskulárního tuku v trapézovém svalu. Gen SCD typu A měl průměrný efekt genové substituce 0,805% na procento MUFA. Genotyp AA měl o 1,7% vyšší obsah MUFA než genotyp VV. Nicméně podle dalších výsledků SCD genotyp není jediný důvod genetické variability ve složení mastných kyselin u plemene Japonského černého skotu a další genetické faktory přispívají k rozdílné variabilitě procentuálního obsahu MUFA v tukové tkáni (Taniguchi *et al.*, 2004).

V další studii Taniguchi *et al.* (2004) zkoumali vliv plemene na genovou expresi stearyl – CoA desaturázy. Pro vyloučení vlivů ovlivňující genovou expresi, jako je věk a pohlaví, byl experiment proveden na třech desetiměsíčních volech jak Japonského černého plemene, tak Holštýnského plemene a jejich kříženců. Zvířata byla chována ve stejném prostředí a krmena stejnou potravou po dobu šestnácti měsíců. Ve věku dvaceti šesti měsíců byla u těchto zvířat provedena svalová biopsie u *musculus longissimus dorsi (m.l.d.)* a podkožního tuku. Tato studie demonstrovala genetickou varianci u hladiny mRNA u SCD což může asociovat s několika pozorovanými genetickými rozdíly ve složení mastných kyselin v podkožním tuku. Porovnáním míry exprese SCD v *m.l.d.* mezi plemeny Japonské černé, které je známo pro vysoký podíl marblingu v mase, vykazovalo vyšší hladinu SCD mRNA než Holštýnské plemeno. Zároveň hladina SCD mRNA v podkožním tuku byla vyšší u Japonského černého. Z toho vyplývá, že rozdíl ve složení tuku v *m.l.d.* neovlivňuje podstatně hladinu SCD mRNA v *m.l.d.*. Japonský černý skot tedy může mít více nenasycené tukové tkáně v intramuskulárním tuku v *m.l.d.* a v podkožní tukové tkáni než Holštýnské plemeno. Japonský černý skot tedy produkuje více chutné maso díky tukové tkáni s více nenasycenými mastnými kyselinami.

3.4.4.2 Plemena Wagyu a limousin

Studie genové exprese u lidí a zvířat ukázaly, že zvýšená aktivita stearyl – CoA desaturázy je asociována se sníženou akumulací tuku a s vyšším podílem mono nenasycených

mastných kyselin v kosterní svalovině. Nicméně výsledky dvou studií na lidech jsou rozporuplné. Proto Jiang *et al.* (2008) provedli pokus na křížencích dvou plemen skotu k objevení role genu *SCD1* v metabolismu svalů. K pokusu použili křížence plemen Wagyu a Limousin, kdy Wagyu (japonský skot) má větší úložiště tuku ve svalech a zároveň jemnější tuk než plemeno Limousin (Pitchford *et al.*, 2002). Tuk plemene Wagyu obsahuje znatelně méně nasycených mastných kyselin a více nenasycených mastných kyselin než u jiných plemen (Yang *et al.*, 1999). Pomocí zkušeného evaluátora bylo hodnoceno marbling skóre (BMS), výška podkožního tuku (SFD) a procento tuku u ledviny, pánve a srdce (KPH). Dále genotypovali tři SNP v 3'UTR (untranslated regions – nekódující oblasti genu) bovinního genu *SCD1* (g.4706C>T, g.7534G>A a g.7864C>T). Z výsledků vyplývá, že *SCD1* genotypy nemají žádný znatelný vliv na SFD a KPH, ale gen má velký vliv na tukové depozity v kosterní svalovině a na složení mastných kyselin. Zmiňované tři SNP se nacházejí v 3'UTR bovinního genu a dvě jsou v blízkosti polyadenylového signálního místa (AATAAA). U člověka, skotu, prasete, myši a krysy gen *SCD1* má dlouhý 3'UTR od 3350 až 3903 páru bází v porovnání s kódující sekvencí, která je dlouhá od 1068 až 1080 páru bází (Jiang *et al.*, 2008). Nekódující oblasti genů jsou většinou méně konzervované mezi druhy než kódující sekvence. Nicméně vysoce konzervované nekódující regiony mohou výrazně ovlivňovat funkci genu při postranskripčních úpravách (Shabalina *et al.*, 2004).

3.4.4.3 Plemeno Strakatého skotu

Další studie se zabývala určením existence polymorfismu u *SCD1* na 878 pozici u plemene Strakatého skotu, který se využívá jako kombinované plemeno (produkce masa x mléka). Vzorky od 370 býků (potomci celkem 66 plemenných býků) byly získány při porážkách v jedněch komerčních jatkách po dobu dvou let. Zvířata byla vykrmována v identických krmných a ustájovacích podmínkách. Vzorky svalu a tuku byly získány z pravé strany jatečného těla přibližně jednu hodinu po porážce. Vzorky svalů byly odebrány z *musculus longissimus thoracis* a vzorky tuku byly odebrány z bůčku (Bartoň *et al.*, 2010). Poté byla provedena chemická analýza pro určení složení mastných kyselin (Folch *et al.*, 1957), genotypizace na *SCD1* polymorfismus pomocí PCR – RFLP a statistická analýza. Analýza *SCD1* lokusu odhalila lehkou převahu alely A nad alelou V. U genotypů bylo nejvíce heterozygotů AV, potom homozygotů AA a nejméně homozygotů VV. I když zvířata byla chována ve stejných podmínkách a porážena ve stejném věku, objevovaly se u nich rozdíly v koeficientech u sledovaných znaků. To může být vysvětleno rozdílnými genetickými

faktory (jiný genotyp). Například genotypy AA a AV měli nižší hodnoty SFA, vyšší hodnoty MUFA a MUFA/SFA než zvířata s genotypem VV. Zároveň AA a AV projevovaly vyšší hodnoty u C14, C18 a indexu celkové desaturace. Tyto informace mohou posloužit ke šlechtění takových jedinců, kteří by měli lepší poměr mastných kyselin přispívající k dobrému zdraví lidí (Bartoň *et al.*, 2010).

3.4.4.4 Plemeno Český strakatý skot

Český strakatý skot je původním plemenem skotu v České republice. Je součástí celosvětově rozšířené populace fylogeneticky podobných strakatých plemen, které vynikají svými vlastnostmi a všestranným využitím. České strakaté plemeno se na celkových stavech skotu v České republice podílí zhruba jednou polovinou (Čestr, 2015). Chovný cíl plemene je zaměřen na hospodárnou a vysokou produkci kvalitního mléka a masa. Požadován je skot kombinovaného produkčního zaměření se zvýrazněnými znaky mléčnosti, středního až většího tělesného rámce, dobrého osvalení a harmonického zevnějšku. Hospodárnost chovu tohoto plemene je určena ukazateli chovné užitkovosti, hlavně dobrým zdravotním stavem mléčné žlázy, celkovým zdravím, pravidelnou plodností, snadnými porody, vitalitou telat, snadným odchovem, vysokému příjmu a využití objemných krmiv i schopností k pastvě. Mléčná užitkovost je charakterizována cílem 6000 až 7500 kg mléka s obsahem bílkovin 3,5% a masnou užitkovost charakterizuje denní přírůstek nad 1300 g v intenzivním výkrmu býků (Genetické zdroje, 2015).

Ve zpracovatelském průmyslu jsou oceňovány kvalitní suroviny tohoto plemene: mléko v nejvyšší třídě jakosti a chuťově výrazné maso vhodné ke všem technologickým úpravám. Díky širší typové variabilitě v rámci populace, jeho adaptabilitě na různé chovatelské podmínky a jeho kombinovaném zaměření Český strakatý skot umožňuje chovatelům reagovat pružně na měnící se požadavky trhu (Čestr, 2015).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Analyzované vzorky

Ve své práci jsem analyzovala vzorky DNA, které byly získány na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat Agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Soubor se skládal z 260 vzorků DNA izolovaných z krve býků plemene Českého strakatého skotu.

4.1.2 Použité přístroje

Automatický termální cykler PTC-200 Peltier Thermal Cycler (Bio - Rad, Hercules, USA)

Automatický centrální cykler GeneAmp®PCR System 9700 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA)

Centrifuga Mikro 20 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE)

E-BOX VX5 (Schoeller, Praha, ČR)

Elektronic UV Transilluminator (Ultra LUM, Claremont, USA)

Elektrický zdroj Power Pac 300 (Bio - Rad, Hercules, USA)

Fotoaparát Powershot G6 (Canon, Tokyo, JPN)

Genetický analyzátor ABI PRISM® 3500 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA)

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

Váha Scaltec SBA 41 (Sartorius, Bohemia, USA)

Vortex Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, LT)

Termostat BE 200 (Mettler GmbH, Schwabach, DE)

4.2 Metodika

4.2.1 PCR – RFLP

Metoda PCR – RFLP byla použita pro určení genotypů polymorfismů u genu *SCD1*.

Pro přípravu reakční směsi u genu *SCD1* bylo použito:

- PPP Master Mix (Top – Bio s.r.o., Praha, ČR) - 150 mM Tris–HCl (pH 8,8), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂, 400 μM každý dNTP, 100 U/ml Taq DNA polymerázy, barvivo, stabilizátory a aditiva;
- primery (IDT Inc., Coralville, USA) – zásobní roztok 100 pmol/μl, pracovní roztok 10 pmol/μl;
- ultračistá H₂O (Top – Bio s.r.o., Praha, ČR)

PCR reakční směs byla připravována na ledu na konečný objem 15 μl. Konečné koncentrace jednotlivých komponent jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Množství
PPP Master Mix	1x
Přímý primer	0,2 μM
Zpětný primer	0,2 μM
dH ₂ O	Do 15 μl
DNA	20 ng
Celkové množství	15 μl

Primery pro amplifikaci fragmentu *SCD1* byly převzaty z práce Bartoň *et al.* (2010), v tabulce 2 je uvedena jejich sekvence, délka, obsah G + C a T_m. Délka amplifikovaného fragmentu je 144 bp.

Tabulka 2: Primery pro amplifikaci genu *SCD1*

Označení primeru	Sekvence 5' - 3'	Délka [bp]	G + C [%]	T _m [°C]
SCD1-1A	ATG TAT GGA TAC CGC CCT TAT GAC	24	46	60,92
SCD1-2B	TTC TGG CAC GTA ACC TAA TAC CCT	24	46	60,86

PCR probíhala za reakčních podmínek uvedených v tabulce 3. Fáze denaturace, annealingu a elongace byly opakovány po sobě v 35 cyklech.

Tabulka 3: Reakční podmínky PCR

Fáze	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	95°C	5 min
Denaturace	95°C	30 s
Annealing	60°C	30 s
Elongace	72°C	45 s
Závěrečná elongace	72°C	7 min
Chlazení	4°C	∞

Specifické úseky DNA byly amplifikovány na automatickém cykleru PTC-200. Po proběhnutí reakce se produkt, pokud nebyl hned použit pro další reakce, uchovával při teplotě -20°C. Výsledek PCR reakce byl ověřován elektroforeticky na 3% agarózovém gelu.

Reakční směs pro RFLP analýzu genotypů polymorfismu *SCDI* byla připravována na konečný objem 15 µl, složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 4. Inkubace reakční směsi probíhala v inkubátoru BE 200, při teplotě 37°C. Inkubace při této teplotě probíhala přes noc, a po uplynutí inkubační doby byly vzorky pro určení genotypu hned nanášeny na 3% agarózový gel.

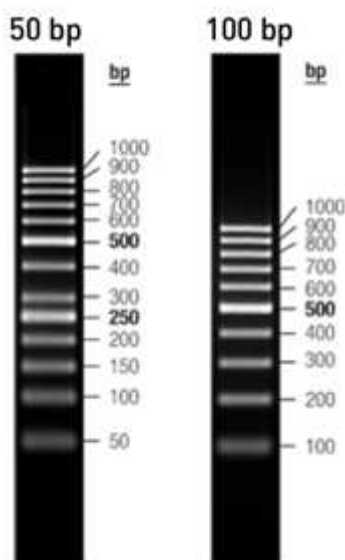
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro štěpení PCR produktu

Složka	Množství
Pufř G	1x
<i>SatI</i>	1 U
dH ₂ O	do 15 µl
PCR produkt	5 µl
celkem	15 µl

Restrikce PCR produktů byla prováděna restrikčním enzymem *SatI* (*Fnu4HI*) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Inkubace probíhala přes noc při teplotě 37°C. Restrikční místo enzymu je 5'.....TG↓YGG.....3', kde Y= C, T. Po štěpení má alela C velikost fragmentů 39, 47 a 68, a alela T velikost fragmentů 39 a 115.

4.2.2 Agarózová gelová elektroforéza

Pro ověření přítomnosti amplifikovaného segmentu po PCR a pro identifikaci délky fragmentů po štěpení restriktázou byla použita horizontální agarózová gelová elektroforéza. Používána koncentrace gelu byla 3%. Pro přípravu gelu byla použita agaróza Agarose (SERVA, DE) a TBE pufr (Sigma Aldrich, USA). Jako vizualizační barvivo byl používán ethidium bromid (Top Bio) (zásobní roztok 5 mg/ml, konečná koncentrace v gelu 0,5 µg/ml). Pro nanášení vzorků byla jako nanášecí pufr používána sacharóza. Při nanášení PCR produktu na gel se nanášecí pufr nepoužíval, protože PPP Master Mix už obsahoval nanášecí aditiva pro přímou vizualizaci na gelu. K porovnání a ověření velikosti fragmentů PCR produktů a fragmentů po štěpení byly použity hmotnostní standarty 50 bp DNA Ladder a 100 bp DNA Ladder (viz obr.6) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).



Obrázek 6: Rozložení hmotnostních standartů o velikosti 50 bp a 100 bp na gelu (<https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific/generuler-dna-ladders.html>).

Samotná elektroforéza probíhala v TBE pufru při napětí 4V/cm po dobu 20 – 40 minut. Vzorky byly po separaci vizualizovány pomocí Electronic UV Transilluminator, kdy jako záznamové zařízení byl použit fotoaparát Canon Power Shot G6.

4.2.3 Sekvenování

Pro ověření správnosti určení genotypů jedinců bylo provedeno přímé sekvenování PCR produktů. PCR produkty byly před vlastní přípravou sekvenační reakční směsi purifikovány pomocí MinElute PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) podle protokolu výrobce. Jejich koncentrace byla poté zjištěna pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000. Sekvenační reakční směs byla připravována pomocí BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) podle protokolu výrobce na konečný objem 10 μ l. Koncentrace jsou uvedeny v tabulce 5. Množství DNA potřebné do sekvenační reakce bylo určováno na základě koncentrace PCR produktu a jeho velikosti uvedené v tabulce 6.

Tabulka 5: Složení sekvenační reakční směsi

Složka	Množství [μl]
Reakční směs	2
Pufr	1
Přímý primer	0,16
dH₂O	do 10
DNA	dle tabulky ...
Celkové množství	10 μ l

Tabulka 6: Potřebné množství PCR produktu pro 10 μ l sekvenační reakční směsi

Velikost produktu PCR [bp]	Množství potřebné pro sekvenační reakci [ng]
100 – 200	1 – 3
200 – 500	3 – 10
500 – 1000	5 – 20
1000 – 2000	10 – 40
> 2000	40 - 100

Amplifikace templátu probíhala v termálním cykleru GeneAmp®PCR System 9700 zobrazených v tabulce 7, kdy fáze denaturace, annealingu a elongace byly opakovány v 25 cyklech.

Tabulka 7: Fáze amplifikace templátu

Fáze	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	96°C	1 min
Denaturace	96°C	10 s
Annealing	50°C	5 s
Elongace	60°C	4 min
Chlazení	4°C	∞

Hotová reakční směs byla po proběhnutí amplifikace purifikována pomocí BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) podle přiloženého protokolu od výrobce. Purifikace byla provedena pro odstranění neinkorporovaných terminátorů. Vzorky byly posléze analyzovány kapilární elektroforézou, které využívá genetický analyzátor ABI PRISM® 3500. Data byla vyhodnocena pomocí programů Sequence Analysis Software v5.4. a Sequence Scanner v1.0.

4.2.4 Stručný popis chemických analýz

Níže popsané chemické analýzy byly provedeny na Ústavu chovu a šlechtění zvířat Ing. Eliškou Dračkovou, Ph.D.

4.2.4.1 Stanovení obsahu sušiny v mase

Sušina byla stanovovaná vysoušením vzorku masa (2 – 5 g) do konstantní hmotnosti. Vzorek byl po smíchání s vysušeným mořským pískem předběžně vysoušen v sušárně při 60 °C, poté byl dosušen při 105 °C do konstantní hmotnosti. Vzorek byl znovu zvážen po vychladnutí a stanovila se sušina.

4.2.4.2 Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase

Obsah dusíku byl stanovovaný metodou dle Kjeldahla. Stanovený obsah dusíku se přepočítal na obsah bílkovin dle vzorce $N \times 6,25$. Dusík bílkovin se převedl mineralizací na amoniak, který se stanovil po destilaci titračně.

4.2.4.3 Stanovení obsahu tuku v mase

Za tuk se považují látky rozpustné v éteru, xyleny a tetrachlórmetanu. Získaná sušina z předchozího kroku byla extrahována etyléterem v extrakčním nástavci Soxhletova přístroje po dobu 6 hodin. Po extrakci byl zbytek rozpouštědla odpařen, baňka s tukem se v sušárně vysušila a zvažila.

4.2.4.4 Stanovení obsahu popelovin

Popeloviny byly stanoveny spálením vzorku v Muflově peci při teplotě 550 – 600 °C po dobu přibližně 8 hodin.

4.2.4.5 Stanovení pH masa

Záporný logaritmus vodíkových iontů představuje hodnotu pH. Stanovení se provádělo vpichovou kombinovanou pH elektrodou v nepomletém, skalpelem naříznutém vzorku. Hodnota pH se měřila po 7 dnech zrání v chladicím boxu.

4.2.4.6 Stanovení barvy masa

Pro měření barvy masa vzorků byl použit spektrofotometr Konica Minolta – 2600d a výsledné hodnoty jsou udávány v jednotkách (L^*), kde sledujeme světlost, podíl červeného (a^*) a žlutého spektra (b^*) – metoda CIELab.

4.2.4.7 Stanovení obsahu mastných kyselin v mase

Vyextrahovaný tuk se rozpustil v isooktanu a zhomogenizoval v ultrazvuku. Po přidání methanolátu sodného se směs zahřívala pod zpětným chladičem. V první fázi lipidy reagovaly s methanolátem sodným. V alkalickém prostředí se dobře a rychle štěpí esterové vazby lipidických sloučenin a MK se z nich uvolňují ve formě methylesterů. Po přidání BF₃ se zneutralizoval nezreagovaný CH₃ONa a v kyselém prostředí se esterifikovaly případné volné MK. K ještě horké reagenční směsi byl přidán isooktan, následně nasycený vodný roztok NaCl a FAMES (Fatty acid methyl ester) se krátce a intenzivně vytřepal do isooktanu. Po rozdělení organické a vodné fáze se FAMES analyzovaly metodou kapilární plynové chromatografie. Analýza MK byla provedena na plynovém chromatografu HP4890 s kapilární kolonou DB-23 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Pro měření byl zvolen teplotní program od 100 °C * 3 min * 10 °C/min * 170 °C * 0 min * 4 °C/min * 230 °C * 8 min * 5 °C/min * 250 °C *

15 min, teplota injektoru 270 °C, teplota detektoru 280 °C. Nástřik 2 μ l. Nosným plynem byl dusík. K výstupu z kolony byl připojen plameno-ionizační detektor (FID). Finální chromatogramy byly zpracovány programem CSW station (verze 1.7, Data Apex).

Ve vyextrahovaném tuku byly stanoveny obsahy následujících mastných kyselin:

- nasycené mastné kyseliny: C12:0 (kys. laurová), C14:0 (kys. myristová), C16:0 (kys. palmitová), C18:0 (kys. stearová), C20:0 (kys. arachová);
- nenasyčené mastné kyseliny monoénové: C14:1 (kys. myristolejová), C16:1 (kys. palmitolejová), C18:1, n-7 (kys. olejová), C20:1 (kys. gadolejová);
- nenasyčené mastné kyseliny dienové: C18:2, n-6t (kys. linolelaidová); C18:2, n-6c (kys. linolová), C18:2, n-9 (konjugovaná kys. linolová, CLA)
- nenasyčené mastné kyseliny polyenové: C18:3, n-6 (kys. γ -linolenová), C18:3, n-3 (kys. α -linolenová), C20:4, n-6 (kys. arachidonová), C20:5, n-3 (kys. timnodová, EPA), C22:4, n-6 (kys. adrenová), C22:5, n-6 (kys. klupanodonová), C22:5, n-3 (kys. dokosapentaenová), C22:6, n-3 (kys. dokosahexaenová, DHA).

4.2.5 Matematicko – statistické zpracování

4.2.5.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

U výsledného polymorfismu byly určeny frekvence alel a genotypů uvedených v tabulkách 8 a 9.

Tabulka 8: Výpočet frekvence genotypů (Hartl and Clark, 2006)

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>CC</i>	D	$d = D/N$
<i>CT</i>	H	$h = H/N$
<i>TT</i>	R	$r = R/N$
Σ	$D + H + R = N$	$d + h + r = 1$

Tabulka 9: Výpočet frekvence alel (Hartl and Clark, 2006)

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>C</i>	P	$p = (2D + H)/2N = d + 1/2$
<i>T</i>	Q	$q = (2R + H)/2N = r + 1/2$
Σ	$P + Q = 2N$	$p + q = 1$

Kde platí, že:

D, H, R = absolutní frekvence genotypů

d, h, r = relativní frekvence genotypů

P, Q = absolutní frekvence alel

p, q = relativní frekvence alel

N = absolutní frekvence všech jedinců

4.2.5.2 Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy – Weinbergova zákona

U zjištěných genotypů byl zjišťován rovnovážný stav podle Hardy – Weinbergova zákona kdy platí, že:

$$1 = p^2 + 2pq + q^2$$

Pro vyhodnocení byl použit test dobré shody χ^2 (tzv. chí kvadrát):

$$\chi^2_{(h-p-1;\alpha)} = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

Kde platí, že:

P pozorovaná četnost genotypů

O očekávaná četnost genotypů

Σ suma

α hladina významnosti

$n - p - 1$ výpočet stupně volnosti

4.2.5.3 Asociační analýza

Asociační analýza byla vypočítána pomocí smíšeného lineárního modelu REML v programu SAS v8.2 (SAS Institute Inc.). Jako pevné efekty byly navrženy: efekt genotypu, efekt chovu a regrese na věk porážky. Jako náhodný efekt byl navržen efekt otce.

K vypočítání asociační analýzy byla navržena tato rovnice:

$$f_{ijkl} = \mu + SCD1_i + chov_j + věk_k + otec_k + e_{ijkl}$$

Kde platí, že:

f_{ijkl} sledovaný znak

μ odhadovaný průměr sledovaného znaku

$SCD1_i$ pevný efekt i -tého genotypu genu

$chov_j$ pevný efekt chovu

$věk_k$ regrese na věk porážky

$otec_k$ náhodný efekt otce

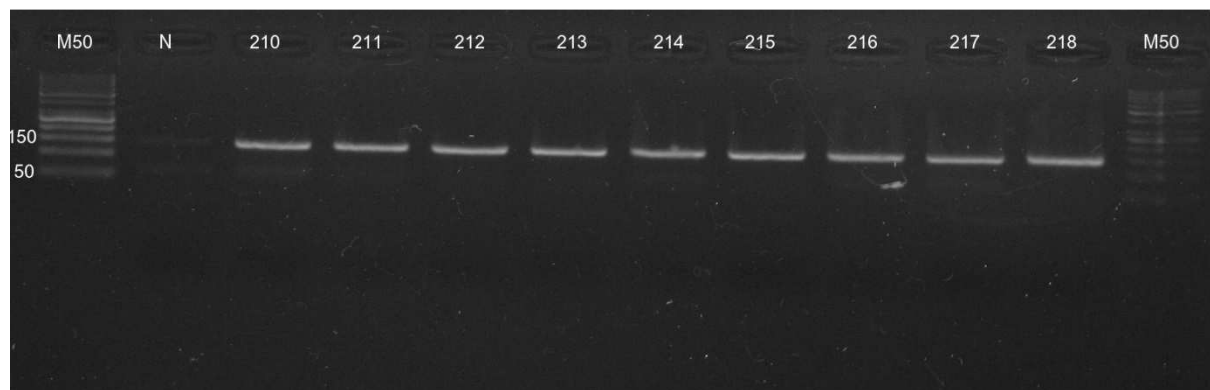
e_{ijkl} náhodná chyba každého pozorování

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 PCR

Polymorfismus *C878T* genu *SCD1* byl amplifikován pomocí metody PCR. Gen *SCD1* se nachází na 26 chromozomu a skládá se ze čtyř exonů. Substituce *C* za *T* v polymorfismu způsobuje záměnu aminokyseliny alaninu za valin a podle dřívějších poznatků se nachází v exonu 5 (Taniguchi *et al.*, 2004), ale podle nejnovějších informací má gen *SCD1* pouze 4 exony a polymorfismus se nachází v exonu 3 (NCBI, Gene ID: 280924, 2015).

Amplifikovaný fragment měl délku 144 bp. Pro ověření amplifikace PCR produktu jsem použila horizontální agarózovou elektroforézu a jako vizualizační barvivo jsem použila ethidium bromid. Obrázek 7 zobrazuje prosvícený gel s amplifikovanými fragmenty.



Obrázek 7: Agarózový gel s amplifikovanými fragmenty genu SCD1.

5.2 RFLP

Amplifikovaný produkt PCR reakce byl štěpen restriční endonukleázou *SatI*. Po štěpení touto endonukleázou vznikly naštěpené fragmenty o délce 29 bp, 47 bp a 68 bp u genotypu *CC*, fragmenty o délce 29 bp, 47 bp, 68 bp a 115 bp u genotypu *CT* a fragmenty o délce 29 bp a 115 bp u genotypu *TT*. Teoretickou vizualizaci štěpení zobrazuje obrázek 8.

Velikost fragmentu	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>
29	████████	████████	████████
47		████████	████████
68		████████	████████
115	████████		████████

Obrázek 8: Teoretická vizualizace štěpení genu *SCD1* restriční endonukleázou *SatI*.

Fragment o délce 29 bp se nacházel u všech genotypů, protože v mnou zkoumané sekvenci se nacházela dvě štěpná místa restriční endonukleázy *SatI*. Tyto dvě štěpná místa jsou vyznačena na obrázku 9. Mnou zkoumaný polymorfismus se nacházel na 71 pozici, kdy 5'.....TG↓YGG.....3', kde *Y*= *C*, *T*.

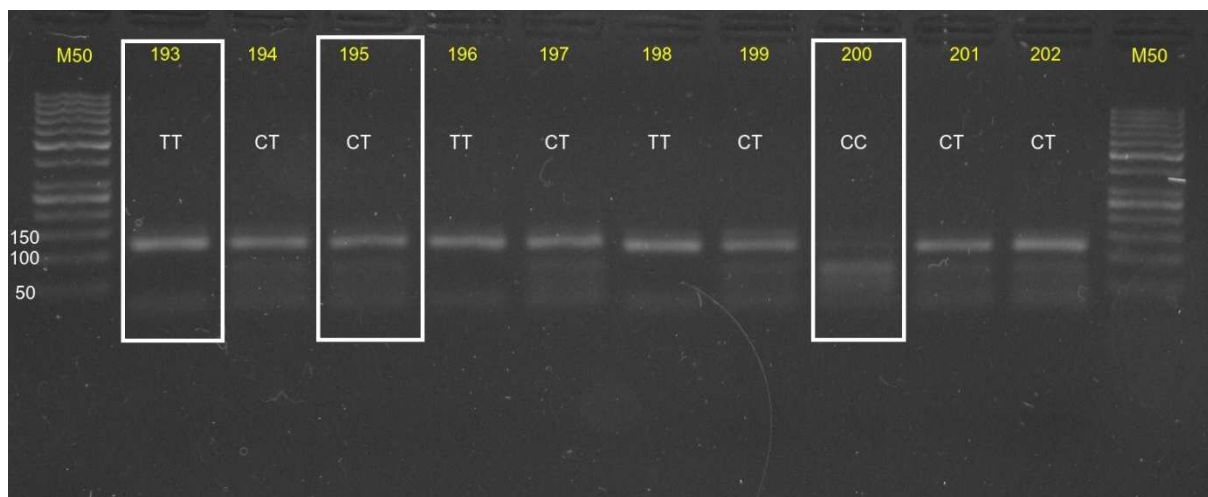
```

ATGTATGCATACCGCCCTTATGACAAGACCATCAACCCCGAGAGAATATTCTGGTTTCCCTGGGAGCTGYGGGTA
AGTCAGCAGTCCACAGCAAGACCACGTCTAGTGGTCTGCTGCTTAGGGTATTAGGTTACGTGCCAGAA

```

Obrázek 9: Sekvence genu *SCD1* s vyznačenými štěpnými místy.

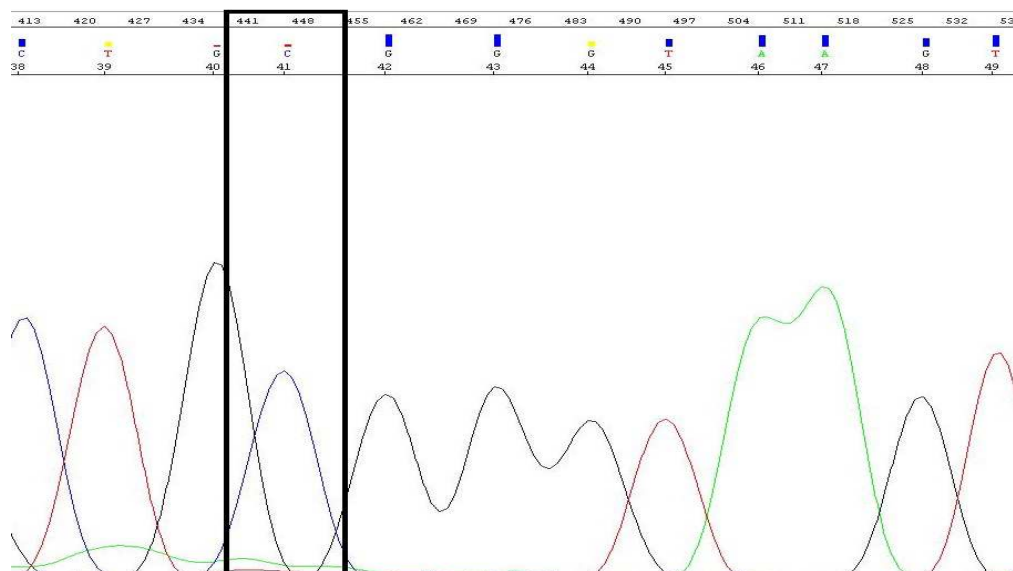
K vyhodnocení výsledků byla použita horizontální gelová elektroforéza. Výsledky štěpení jsou zobrazeny na obrázku 10.



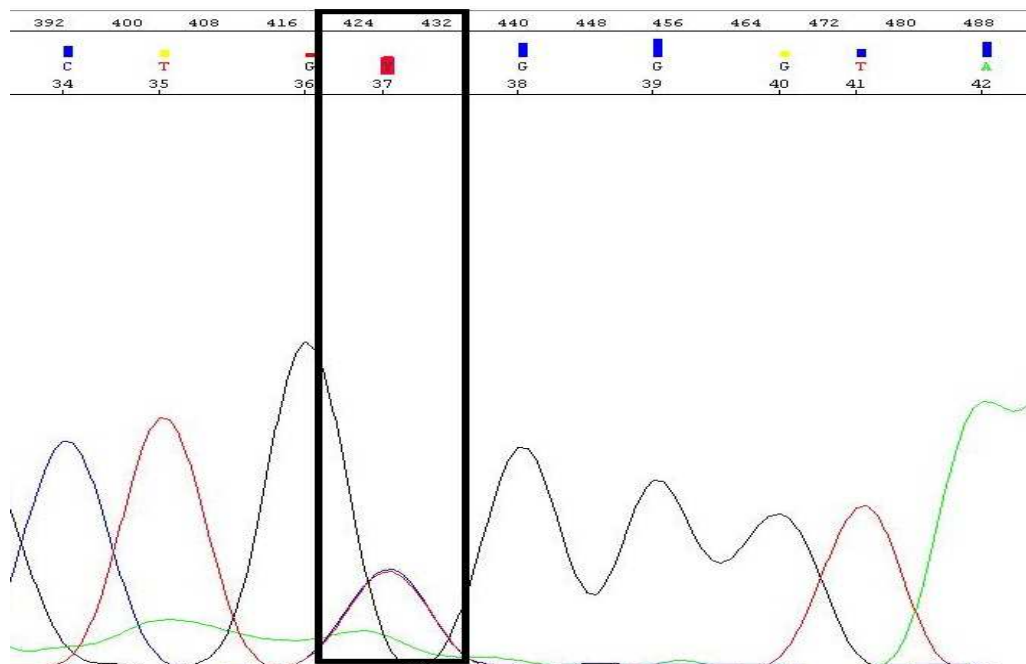
Obrázek 10: Štěpený PCR produkt genu *SCD1* restriční endonukleázou *SatI*. Všechny tři genotypy jsou vyznačeny.

5.3 Sekvenování

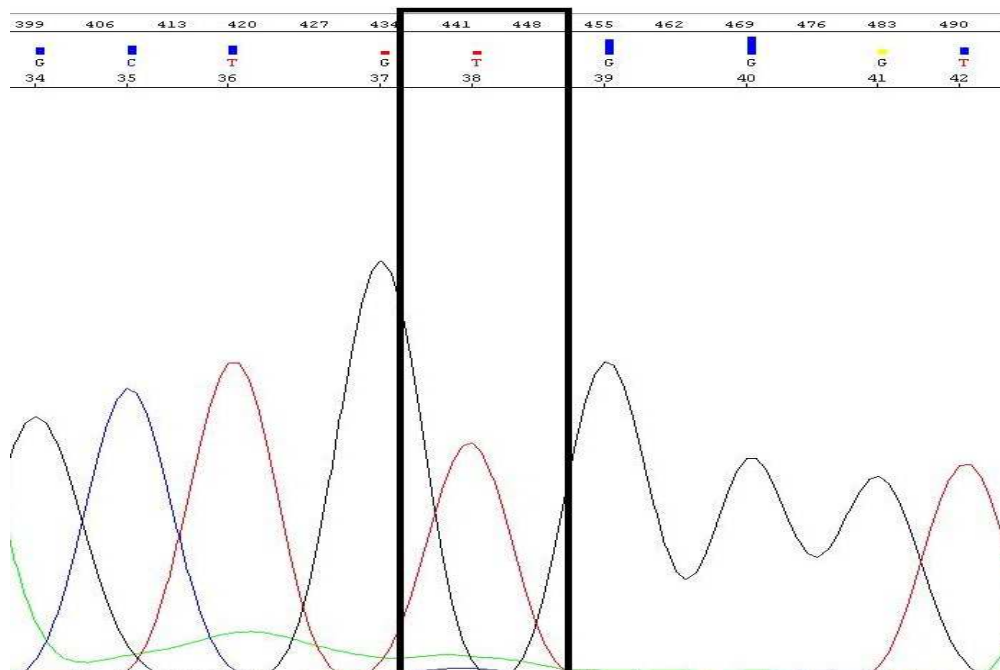
Pro ověření správnosti štěpení pomocí RFLP bylo využito metody sekvenování. Polymorfní alela je na obrázcích 11, 12 a 13 zvýrazněna.



Obrázek 11: Ukázka genotypu *CC* genu *SCD1*.



Obrázek 12: Ukázka genotypu CT genu SCD1.



Obrázek 13: Ukázka genotypu TT genu SCD1.

5.4 Matematicko – statistické vyhodnocení

5.4.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

Celková populace zahrnovala 260 zkoumaných jedinců. Z tohoto souboru bylo genotypováno 248 jedinců, kdy u devíti jedinců se nepodařil určit genotyp z důvodu špatné nenaamplifikování PCR produktu. Tři jedinci byli vyřazeni z matematicko – statistických výpočtů pro jejich vysoký věk, který koreluje s množstvím ukládání tuku. Výpočet absolutních a relativních frekvencí alel a genotypů byl proveden podle tabulek v kapitole 4.2.5.

Tabulka 10: Výpočet absolutní a relativní frekvence alel genu *SCD1*

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence $\pm s_x$
<i>C</i>	247	0,4980 \pm 0,02
<i>T</i>	249	0,5020 \pm 0,02
Σ	496	1

Tabulka 11: Výpočet absolutní a relativní frekvence genotypů genu *SCD1*

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>CC</i>	49	0,19
<i>CT</i>	149	0,60
<i>TT</i>	50	0,20
Σ	248	1

Ve mnou zkoumané populaci 248 jedinců byl nejvíce zastoupen genotyp *CT* u 149 jedinců. Druhým nejpočetnějším genotypem byl genotyp *TT* u 50 jedinců a nejméně početným byl genotyp *CC* s 49 jedinci. Frekvence genotypů v populaci je u *CC* 19%, u *CT* 60% a u *TT* 20%. V populaci byla nejvíce zastoupena alela *T* s frekvencí 50,2%. Alela *C* měla v populaci frekvenci 49,8%.

Pokud je v sekvenci polymorfismu alela *C*, v primární struktuře bílkoviny se tvoří aminokyselina alanin, $C=A$. A pokud alela *T* tak se tvoří valin, $T=V$. Bartoň *et al.* (2010) zkoumali populaci plemene simentálského typu a u polymorfismu *C878T* zjistili frekvenci

alely A 55,54% a alely V 44,46%. Dále zjistili frekvenci genotypů, kdy nejvíce byl zastoupen genotyp AV s 46,76%, poté genotyp AA s 32,16% a nejmíň zastoupen byl genotyp VV s 21,08%. Mele *et al.* (2007) u populace Italského Holštýnského skotu zjistili frekvence alel, kdy nejvíce byla zastoupena alela A s 57% a alel V měla frekvenci 43%. Frekvenci genotypů u tohoto plemene vypočítali s nejhojněji zastoupeným genotypem AV s 60%, dále genotypem AA s 27% a nejméně zastoupeným genotypem VV s 13%. Taniguchi *et al.* (2004) zkoumali populaci plemene Japonského černého skotu, kdy frekvence alel u této populace byla u nejvíce se vyskytující alely A 59% a u alely V 41%. Wu *et al.* (2012) zkoumali asociaci *SCD1* s intramuskulárním tukem u Čínského Simentálského skotu a distribuci polymorfismu u 8 čínských plemen, kdy zjistili, že alela C vykazuje nižší frekvenci u Čínského Simentálského skotu než u dalších osmi plemen, kde má spíše střední hodnotu. Dále zjistili, že alela T snižuje množství intramuskulárního tuku u Čínského Simentálského plemene. Schennink *et al.* (2008) také uvádí, že u dánského Holštýnského plemene je u genu *SCD1* nejvíce zastoupena alela A s frekvencí 73%. Moioli *et al.* (2007) zkoumali dvě plemena šlechtěná na mléčnou produkci – Jersey a Valdostana a jedno plemeno s využitím jak na mléčnou produkci tak na masnou Piedmontese. U plemen Jersey a Valdostana byla převaha alely A s frekvencemi 94% a 65% oproti alele V s frekvencemi 6% a 35%. U plemene Piedmontese byla naopak převaha alely V s frekvencí 58% oproti alele A s frekvencí 42%. Převahu alely V u býků z šlechtitelského programu v Iově zjistil i Zhang (2005), kdy frekvence alely V byla 83% a frekvence alely A byla 17%.

S poznatky o frekvenci alel u mnou zkoumané populace se shodují zjištěné frekvence alel od Zhanga (2005) a Moioliho *et al.* (2007). Tak malá shoda se zjištěnými poznatky je zřejmě dána tím, že alela T způsobující tvorbu valinu v primární struktuře enzymu steroyl – CoA desaturázy způsobuje inhibici její aktivity u některých mastných kyselin a není tedy výhodná pro šlechtění. Nicméně frekvence alely T byla vyšší pouze o jedno procento.

5.4.2 Stanovení genetické rovnováhy podle Hardy – Weinbergova zákona

Výpočty stanovení genetické rovnováhy dle Hardy – Weinbergova zákona je uvedeno v tabulce 12. V tabulce 13 je uvedeno porovnání vypočítaných hodnot s tabulkovými hodnotami.

Tabulka 12: Stanovení genetické rovnováhy podle Hardy - Weinbergova zákona

	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	Σ
P_A	49	149	50	248
O_R	0,25	0,50	0,25	1
O_A	61,50	123,99	62,50	249
χ^2	2,54	5,04	2,50	10,08

Kde platí, že:

P_A Pozorované absolutní frekvence genotypů

O_R Očekávané relativní frekvence genotypů

O_A Očekávané absolutní frekvence genotypů

χ^2 chí kvadrát

Tabulka 13: Porovnání vypočítaných hodnot s hodnotami tabulkovými.

Hladina významnosti	Tabulková hodnota pro stupeň volnosti 1	Vypočítaná hodnota χ^2
0,05	3,841	10,08
0,01	6,635	10,08

Vzorec pro výpočet stupně volnosti (df) genu se třemi genotypy a dvěma alelami je:

$$df = \text{počet znaků} - \text{počet kategorií} - 1$$

$$df = n - p - 1$$

$$df = 3 - 1 - 1 = 1$$

Stupeň volnosti vypočítaný pro gen *SCDI* byl 1. Vypočítaná hodnota χ^2 byla 10,08. Tato hodnota převyšuje hodnotu tabulkovou v obou případech a podle Hardy – Weinbergova zákona pokud je vypočítaná hodnota vyšší než tabulková, H_0 se zamítá a je průkazný rozdíl mezi očekávanými a pozorovanými počty genotypů. Z toho vyplývá, že mnou analyzovaná

populace není v rovnováze a to se může odrážet v selekčním tlaku na jiné znaky kvality masa jako je mramorování masa.

5.4.3 Asociační analýza

Tabulka 14: Popisná analýza vybraných hodnocených znaků

Znak	počet kusů	průměr	rozptyl	střední odchylka	MIN	MAX
Sušina	255	25,23	1,31	1,15	21,84	29,93
Tuk	255	1,99	1,16	1,08	0,26	7,86
Bílkoviny	255	21,21	0,48	0,70	19,02	22,72
N	255	3,39	0,01	0,11	3,04	3,64
Popel	255	1,08	0,002	0,05	0,83	1,24
Vaznost	255	80,93	15,24	3,90	73,11	95,70
Barva	255	3,85	0,58	0,76	2,03	6,40
pH	255	5,65	0,07	0,27	5,41	6,84
C12:0	175	0,07	0,0005	0,02	0,03	0,20
C14:0	175	2,68	0,21	0,46	1,41	4,04
C14:1	175	0,42	0,03	0,18	0,09	1,13
C16:0	175	28,00	3,63	1,91	21,09	32,03
C16:1	175	2,96	0,51	0,71	1,13	5,01
C18:0	175	19,47	9,09	3,02	12,94	27,90
C18:1	175	40,68	10,39	3,22	26,91	48,28
C18:2, n-6	175	3,68	2,74	1,66	1,81	16,37
C18:3, n-6	175	0,13	0,001	0,04	0,01	0,30
C18:3, n-3	175	0,43	0,01	0,12	0,19	1,35
C18:2, n-9	175	0,20	0,004	0,07	0,04	0,35
C20:0	175	0,15	0,002	0,05	0,08	0,50
C20:1	175	0,18	0,001	0,04	0,08	0,32
C20:4, n-6	175	0,52	0,35	0,59	0,05	5,38
C20:5, n-3	175	0,06	0,007	0,09	0,004	0,63
C22:4, n-6	175	0,10	0,01	0,11	0,01	0,95
C22:5, n-6	175	0,06	0,009	0,10	0,004	0,74
C22:5, n-3	175	0,16	0,03	0,17	0,01	1,28
C22:6, n-3	175	0,05	0,005	0,08	0,004	0,58

Tabulka 15: Vliv genotypu genu *SCD1* na sledované znaky

Znak	Genotyp polymorfismu <i>SCD1</i>			Průkaznost		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC - CT</i>	<i>CC - TT</i>	<i>CT - TT</i>
	n = 43 LSM±SE	n = 151 LSM±SE	n = 54 LSM±SE			
Sušina	25,57±0,30	25,43±0,26	25,42±0,31	0,46	0,53	0,96
Tuk	2,29±0,28	2,25±0,25	2,23±0,29	0,83	0,79	0,90
Bílkoviny	21,19±0,29	21,22±0,26	21,08±0,29	0,84	0,47	0,24
N	3,39±0,03	3,39±0,03	3,38±0,03	0,94	0,56	0,51
Popel	1,08±0,01	1,08±0,01	1,07±0,01	0,89	0,59	0,59
Vaznost	81,18±0,98	80,30±0,88	79,99±1,02	0,14	0,11	0,60
Barva	4,03±0,17	3,83±0,15	3,82±0,18	<u>0,07</u>	0,12	0,92
pH	5,59±0,07	5,57±0,06	5,55±0,07	0,62	0,40	0,58
C12:0	0,07±0,01	0,07±0,01	0,08±0,01	0,91	0,51	0,48
C14:0	2,78±0,18	2,75±0,17	2,74±0,19	0,73	0,68	0,87
C14:1	0,66±0,07	0,53±0,06	0,43±0,07	<u>0,0002</u>	<u><0,0001</u>	<u>0,003</u>
C16:0	29,67±0,75	29,17±0,71	29,24±0,78	0,18	0,34	0,86
C16:1	3,03±0,28	3,01±0,26	3,07±0,29	0,86	0,85	0,68
C18:0	17,14±1,13	17,96±1,06	18,24±1,17	0,15	0,11	0,62
C18:1	42,15±1,28	41,91±1,20	41,74±1,33	0,71	0,61	0,79
C18:2, n-6	2,88±0,67	2,94±0,62	2,90±0,70	0,85	0,97	0,88
C18:3, n-6	0,12±0,01	0,13±0,01	0,14±0,02	0,34	0,13	0,35
C18:3, n-3	0,39±0,05	0,40±0,04	0,39±0,05	0,83	0,93	0,91
C18:2, n-9	0,24±0,03	0,22±0,02	0,22±0,03	0,10	0,18	0,98
C20:0	0,13±0,02	0,14±0,02	0,15±0,02	0,48	0,31	0,59
C20:1	0,18±0,02	0,18±0,02	0,18±0,02	0,55	0,98	0,57
C20:4, n-6	0,35±0,24	0,39±0,22	0,37±0,25	0,74	0,89	0,87
C20:5, n-3	0,03±0,04	0,03±0,03	0,04±0,04	0,77	0,49	0,57
C22:4, n-6	0,06±0,05	0,08±0,04	0,08±0,05	0,37	0,65	0,73
C22:5, n-6	0,04±0,04	0,05±0,04	0,06±0,04	0,59	0,35	0,53
C22:5, n-3	0,12±0,07	0,13±0,06	0,13±0,07	0,70	0,75	0,99
C22:6, n-3	0,02±0,03	0,03±0,03	0,04±0,03	0,47	0,27	0,53

V tabulce 14 jsou uvedeny hodnoty popisné analýzy hodnocených znaků, kdy uvádím počet kusů, průměr, rozptyl, střední odchylku a minimální a maximální hodnoty pozorovaných znaků. V tabulce 15 jsou uvedeny účinky polymorfismu *C878T* genu *SCD1* na znaky kvality masa a složení mastných kyselin u skotu.

Steroyl – CoA desaturáza katalyzuje vznik mononenasycených mastných kyselin z nasycených mastných kyselin vnesením dvojně vazby do molekuly a tím zvyšuje obsah MUFA ve tkáni (Ntambi and Miyazaki, 2004). Obsah mastných kyselin má vliv na vzhled mramorovaného masa (Smith *et al.*, 1998), jeho měkkost a chuť (Melton *et al.*, 1982). Zároveň je *SCD* klíčovým enzymem v endogenní produkci *cis* – 9, *trans* – 11 isomerů konjugované kyseliny linoleové (CLA) (Bauman *et al.*, 2006). CLA se běžně nachází v mléku a tukové tkáni přežvýkavců a považuje se za prospěšné pro lidské zdraví v několika ohledech (Bhattacharya *et al.*, 2006). Bylo popsáno 8 SNP genu *SCD1*, jedním z nich je i polymorfismus substituce *C878T*, kdy tato substituce způsobuje záměnu aminokyseliny valinu za alanin na 293 pozici v bílkovině steroyl – CoA desaturázy (Taniguchi *et al.*, 2004). Tento polymorfismus byl zkoumán u mnoha populací skotu.

Taniguchi *et al.* (2004) zkoumal vliv *SCD1* na obsah mastných kyselin v mase plemene Japonského černého skotu, kdy zjistil o 1,7% vyšší obsah MUFA u genotypu AA než u genotypu VV. Nicméně přínos *SCD* genotypu do variace obsahu MUFA nebyl tak vysoký a že *SCD* genotyp není jediná příčina genetické variability na obsah mastných kyselin u tohoto plemene. Zároveň Taniguchi *et al.* (2004) porovnával množství MUFA v tukové tkáni svalu *longissimus dorsi* mezi Japonským černým plemenem a Holštýnským skotem. Zjistili, že u Japonského černého plemene bylo výrazně vyšší procento MUFA než u Holštýnského plemene a zároveň hladina *SCD* mRNA byla vyšší u Japonského černého než u Holštýnského skotu. Toto může být dáno faktem, že Holštýnský skot je šlechtěný především na mléčnou produkci, zatímco Japonské černé plemeno je známo pro vysoký obsah intramuskulárního tuku. Bartoň *et al.* (2010) zjistili asociaci polymorfismu *C878T* s obsahem kyseliny myristolejové (C14:1, *cis* – 9), olejové (C14) a stearové (C18:0) a AA genotypu u plemene Strakatého skotu, který se využívá jak pro mléčnou tak masnou produkci. Jejich výsledky naznačují, že *SCD1* polymorfismus má významný vliv na kompozici mastných kyselin u svalového a subkutánního tuku. Horecký (2013) ve své diplomové práci zkoumal vliv *SCD1* na kvalitu masa u plemen Galloway a Highland, kdy vyloučil asociaci zkoumaného polymorfismu s obsahem intramuskulárního tuku, ale pozoroval průkaznou asociaci u obsahu

kyseliny myristové (C14:0), linolové (C18:2, $n - 6$), γ -linolenové (C18:3, $n - 6$), α -linolenové (C18:3, $n - 3$), CLA a celkového obsahu omega-6 mastných kyselin mezi genotypy *CT-TT*. Moiola *et al.* (2007) prokázali pozitivní vliv alely *C* na obsah kyseliny myristolejové (C14:1) a kaproolejové (C10:1) v mléce u tradičních italských plemen Jersey, Piedmontese a Valdostana, ale neprokázali vliv na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, pravděpodobně kvůli rozdílnému vzniku. Mele *et al.* (2007) zkoumali vliv daného polymorfismu na obsah mastných kyselin v mléce u plemene Italský Holštýn. Prokázali vliv genotypu *AA* na vyšší obsah kyseliny elaidové (18:1, $n - 9$), myristolejové (C14:1) a celkovému množství MUFA. Schennink *et al.* (2008) zkoumali obsah mastných kyselin v mléce krav z komerčních chovů v asociaci se zkoumaným polymorfismem. Zjistil, že alela *V* má pozitivní vliv na obsah kyselin kaprinovou (C10:0), laurovou (C12:0), myristovou (C14:0), palmitolejovou (C16:1) a CLA a negativní vliv na kyseliny kaproolejovou (C10:1), myristolejovou (C14:1), stearovou (C18:0), lauroolejovou (12:1) a askleповou (C18:1, $n - 11$). Xin *et al.* (2013) zkoumali vliv polymorfismu C878T na barvu, marbling a vaznost vody u populace skotu ze Švédska. Zjistili, že přítomnost alely *A* způsobovala menší intenzitu červené barvy masa. Baeza *et al.* (2012) zkoumal vliv genu *SCD1* na složení mastných kyselin u Branguských býků na pastvě. Zjistili, že markery asociované s *SCD1* ovlivňovali pozitivně množství C14:1 a C18:1, kdy nejvyšší hodnoty vykazovala alela *A*.

V mé studii zkoumající vliv polymorfismu C878T u genu *SCD1* na kvalitu masa u skotu byla pozorována průkazná asociace mezi genotypy *CC - CT* a *CC - TT* a obsahem kyseliny myristolejové (C14:1). Pokud je hodnota průkaznosti menší než 0,05 tak rozdíl mezi sledovanými genotypy je průkazný. U kyseliny myristolejové je rozdíl mezi genotypy *CC* a *CT* vysoce statisticky průkazný, protože hodnota průkaznosti je 0,0002, Zároveň je vysoce statisticky průkazný i rozdíl mezi genotypem *CC* a genotypem *TT*, kdy hodnota průkaznosti je <0,0001. Rozdíl mezi genotypem *CT* a genotypem *TT* je také vysoce statisticky průkazný s hodnotou 0,003. Metodou nejmenších čtverců byly vypočítány hodnoty pro kyselinu myristolejovou $LSM \pm SE$ 0,66 \pm 0,07 u *CC*, 0,53 \pm 0,06 u *CT* a 0,43 \pm 0,07 u *TT*, kdy nejvyšší hodnota byla u genotypu *CC*. U dalšího hodnoceného znaku barvy byla hodnota rozdílu mezi genotypy *CC* a *CT* 0,07 a pouze se blížila statistické průkaznosti. Vliv na množství intramuskulárního tuku nebyl pozorován.

U mnou zkoumané populace plemene s kombinovanou užitkovostí vyšla vysoce průkazná asociace s variabilitou polymorfismu u všech uvedených genotypů, ale nejvyšší

odhadnutá střední hodnota byla u genotypu *CC*. To naznačuje vliv alely *C* na vyšší obsah kyseliny myristolejové u zkoumané populace. Vliv alely *C* na vyšší obsah kyseliny myristolejové potvrzuje i výzkum Moiola *et al.* (2007), který také pozoroval vyšší obsah této kyseliny u alely *C* u mléčných plemen. Dále Mele *et al.* (2007) a Bartoň *et al.* (2010) pozorovali vliv genotypu *AA* na vyšší obsah kyseliny myristolejové u plemen s mléčnou nebo kombinovanou produkcí. Baeza *et al.* (2012) také potvrdili vliv alely *A* na vyšší obsah kyseliny myristolejové u plemene s masnou užitkovostí. Výše uvedené poznatky se tedy shodují s mým pozorováním. Nicméně se neprokázal vliv polymorfismu genu *SCD1* na jiné mastné kyseliny jako to bylo u jiných autorů. To může být důsledkem různé výživy, kdy vznik mastných kyselin a jejich desaturace je velice komplexní proces, který je kromě mnoha genů ovlivňován především výživou a je citlivý na změny ve výživě a na hormonální nerovnováhu. Xin *et al.* (2013) pozorovali menší intenzitu červené barvy u alely *A*. U dalšího sledovaného znaku kvality masa barvy se variabilita mezi genotypy *CC* a *CT* blížila statistické průkaznosti, což je nejspíš způsobeno velikostí zkoumané populace a kdyby byl vyšší počet zkoumaných jedinců tak by se asociace s variabilitou polymorfismu genu *SCD1* potvrdila. Vliv zkoumaného polymorfismu genu *SCD1* na jiné znaky kvality masa jako je množství intramuskulárního tuku, pH, vaznost a obsah bílkovin nebyl v této studii pozorován, pravděpodobně proto, že gen *SCD1* má vliv pouze na množství nenasycených mastných kyselin.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zvládnutí základních molekulárně genetických metod, jejich optimalizace k danému polymorfismu a ověřit asociaci polymorfismu C878T genu *SCD1* s vyšším obsahem mastných kyselin v mase a dalších znaků kvality masa u vybrané skupiny býků plemene Českého strakatého skotu, kdy zjištěné poznatky mohou sloužit jako doporučení pro chovatele pro účinnější selekci.

Polymorfismus byl určen u 248 jedinců z 260 z důvodu nezdařené amplifikace PCR produktu u některých vzorků. Frekvence obou alel byla poměrně vyrovnaná, alela T i A měla cca 50%. Byla zjištěna vysoká průkaznost mezi všemi genotypy pro kyselinou myristoolejovou. Nejvyšší odhadnutá střední hodnota pro obsah kyseliny v mase byla u genotypu CC. Vliv genotypů na ostatní mastné kyseliny nebyl prokázán. Asociace polymorfismu s množstvím intramuskulárního tuku ani s dalšími vybranými znaky kvality masa nebyla v této práci prokázána.

Tato diplomová práce prokázala vliv alely C pouze na vyšší obsah kyseliny myristoolejové. Na základě těchto výsledků i vzhledem ke komplexnosti sledovaných znaků nelze vyvodit obecný závěr ohledně vlivu alely C na vyšší obsah nenasycených mastných kyselin u mnou zkoumané populace a tedy ani vyvodit jednoznačné doporučení šlechtění pro chovatele.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Amati F., Dube J.J., Alvarez – Carnero E., Endreira M.M., Chomentowski P., Coen P.M., Switzer G.E., Bickel P.E., Stefanovic – Racic M., Toledo F.G., Goodpaster B.H., 2004:** *Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance – trained athletes?* Diabetes, 60: 2588 – 2597, ISSN: 1939 – 327X
- Baeza M.C., Corva P.M., Soria L.A., Pován E., Rincon G., Medrano J.F., 2012:** *Genetic variants in lipid regulatory pathway as potential tools for improving the nutritional quality of grass – fed beef.* Animal Genetics, 44:121 – 129, ISSN: 1365 - 2052
- Bauman D.E., Mather I.H., Wall R.J., Lock A.L., 2006:** *Major advances associated with the biosynthesis of milk.* Journal of Dairy Science, 89: 1235 – 1243, ISSN: 0022-0302
- Baumgard L.H., Corl B.A., Dwyer D.A., Saebo A., Bauman D.E., 2000:** *Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis.* American Journal of Physiology – regulatory, integrative and comparative physiology, 278: R179 – R184, ISSN: 1522 - 1490
- Bartoň L., Kott T., Bureš D., Řehák D., Zahrádková R., Kottová B., 2010:** *The polymorphisms of stearoyl – CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein – 1 (SREB – 1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls.* Meat Science, 85: 15 – 20, ISSN: 1873-4138
- Bhattacharya A., Banu J., Rahman M., Causey J., Fernandes G., 2006:** *Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease.* Journal of Nutritional Biochemistry, 17(12): 789 – 810, ISSN: 1873 - 4847
- Bobé G. Beitz D.C., Freeman A.E., Lindberg G., 1999:** *Association among individual proteins and fatty acid in bovine milk as determined by correlation and factor analyses.* Journal of Dairy Research, 66: 523 – 536, ISSN: 0022 - 0299

- Bobe G., Hammond E.G., Freeman A.E., Lindberg G.L. Beitz D.C.,** 2003: *Texture of butter from cows with different milk fatty acid compositions.* Journal of Dairy Science, 86: 3122 – 3127, ISSN: 0022-0302
- Corl B.A., Baumgard L.H., Dwyer D.A., Griinari J.M., Phillips B.S., Bauman D.E.,** 2001: *The role of Δ^9 - desaturase in the production of cis – 9, trans – 11 CLA.* Journal of Nutritional Biochemistry, 12: 622 – 630, ISSN: 1873 - 4847
- Crouse J.D., Cundiff L.V., Kach R.M., Koochmaraie M., Seideman S.C.,** 1989: *Comparisons of Bos Indicus and Bos Taurus inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability.* Journal of Animal Science, 67: 2661 – 2668, ISSN: 1525 - 3163
- Čestr,** 2015: *Plemeno.* <http://www.cestr.cz/plemeno.html>
- Dobrzyn P., Pyrkowska A., Jazurek M., Szymanski K., Langfort J., Dobrzyn A.,** 2010: *Endurance training – induced accumulation of muscle triglyceride is coupled to upregulation of stearoyl – CoA desaturase.* Journal of Applied Physiology, 109: 1653 - 1661, ISSN: 0021 - 8987
- Dobrzyn A., Dobrzyn P.,** 2006: *Stearoyl – CoA desaturase – a new player in skeletal muscle metabolism regulation.* Journal of Physiology and Pharmacology, 57, 10: 31 – 42, ISSN: 1899 - 1505
- Doran O., Moule S.K., Teye G.A, et al., Whittington F.M., Hallett K.G., Wood J.D.,** 2006: *A reduced protein diet induces stearoyl – CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation.* British Journal of Nutrition., 95 (3): 609 – 617, ISSN: 1475 - 2662
- Dostál J., Bochořádková H., Paulová H., Sláma J., Slanina J., Tallová J., Tomandl J., Tomandlová M.,** 2005: *Lékařská Chemie II, Bioorganická chemie.* Masarykova Univerzita v Brně, Lékařská Fakulta, ISBN 80 – 210 – 3789
- Enoch H.G., Catala A., Strittmatter P.,** 1976: *Mechanism of rat liver microsomal stearoyl – CoA desaturase.* Journal of Biological Chemistry, 251: 5095 – 5103, ISSN: 1083 - 351X, ISSN: 1083 - 351X

- Ensembl**, 2015: ENSBTAG00000045728.1,
http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000045728;r=26:21141592-21148318;t=ENSBTAT00000063883
- Erkkila A, de Mello V.D.F., Riserius U, Laaksonen D.E.**, 2008: *Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach*. Progress in Lipid Research, 47: 172 – 187, ISSN: 1873 - 2194
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S.**, 1957: *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. Journal of Biological Chemistry, 226: 497 – 509, ISSN: 1083 - 351X
- Genetické zdroje**, 2015: *Český Strakatý skot*.
http://www.genetickezdroje.cz/index.php?p=skot_02
- Goodpaster B.H., He J., Watkins S., Kelley D.E.**, 2001: *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance – trained athletes*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86: 5755 – 5761, ISSN: 1945 - 7197
- Grunert K.G., Bredahl L., Brunso K.**, 2004: *Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector*, Meat Science, 66: 259 – 272, ISSN: 1873-4138
- Hartl D.L., Clark A.G.**, 2006: *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc, ISBN-13: 978-0878933082 ISBN-10: 0878933085
- Harper G. S. and Pethick D. W.**, (2001), *The physiology of marbling: what is it, and why does it develop*, Australian Journal of Experimental Agriculture, 73: 457-461, ISSN: 0816 - 1089
- Harper G.S., Pethick W.B.**, 2004: *How might marbling begin?* Australian Journal of Experimental Agriculture, 44: 653 – 662, ISSN: 0816 - 1089
- Hood R.L., Allen C.E.**, 1973: *Cellularity of bovine adipose tissue*. Journal of Lipid Research, 14: 605 – 610, ISSN: 0022-2275
- Horecký Č.**, 2013: *Analýza genetických markerů ovlivňujících jakost a kvalitu masa pro zpřesnění selekce ve stádě masného skotu*, (nepubl., dep. knihovna Mendelovy univerzity v Brně), Diplomová práce, Mendelu Brno

- Hulver M.W., Berrgren J.R., Carper M.J., Miyazaki M., Ntambi J.M., Hoffman E.P., Thyfault J.P., Stevens R., Dohm G.L., Houmard J.A., Muoio D.M., 2005: *Elevated stearoyl – CoA desaturase – 1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans.* Cell Metabolism, 2: 251 – 261, ISSN: 1932 - 7420**
- Ikeda S., Miyazaki H., Nakatani T., Kamei Y., Miura S., Tsuboyama – Kasaoka N., Ezaki O., 2002: *Up – regulation of SREBP – 1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training.* Biochemical and Biophysical Research Communication, 296: 395 – 400, ISSN: 1090-2104, ISSN: 1095 - 9203**
- Chua S.C. Jr, Chung W.K., Wu – Peng X.S., Zhang Y., Liu S.M., Tartaglia L., Leibel R.L., 1996: *Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor.* Science, 271: 994 – 996, ISSN: 1095 - 9203**
- Jiang Z., Michal J.J., Tobey D.J., Daniels T.F., Rule D.C., McNeil M.D., 2008: *Significant associations of stearoyl – CoA desaturase (SCD1) gene with fat deposition and composition in skeletal muscle.* International Journal of Biological Sciences, 4(6): 345 – 351, ISSN: 1449 - 2288**
- Kaestner K.H., Ntambi J.M., Kelly T.J., Lane M.D., 1989: *Differentiation – induced gene expression in 3T3 – L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl – CoA desaturase.* Journal of Biological Chemistry, 264: 14755 – 14761, ISSN: 1083 - 351X**
- Karijord O., Standal N., Syrstad O., 1982: *Sources of variation in composition of milk fat.* Z. Tierzucht, Zuchtungsbiol, 99: 81 - 93**
- Kgwatalala P.M., Ibeagha – Awemu E.M., Hayes J.F., Zhao X., 2007: *Single nucleotide polymorphism in the open reading frame of the stearoyl – CoA desaturase gene and resulting genetics variants in Canadian Holstein and Jersey cows.* DNA Sequence, 18: 357 – 362, ISSN: 1029 - 2365**
- Kim Y.C., Ntambi J.M., 1999: *Regulation of stearoyl – CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation.* Biochemistry and Biophysics Research Community, 266: 1 – 4, ISSN: 0006 - 291X**

- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J., 2003:** *Biochemie pro studující medicíny.*
Karolinum, ISBN 8024614162, 9788024614168
- Lengi A.J., Corl B.A., 2007:** *Identification and characterization of novel bovine stearoyl – CoA desaturase isoform with homology to human SCD5.* *Lipids*, 42: 499 – 508, ISSN: 1558 - 9307
- Li C., Sun D., Zhang S., Wang S., Wu X., Zhang Q., Liu L., Li Y., Qiao L., 2014:** *Genome wide association study identifies 20 novel promising genes associated with milk fatty acid traits in Chinese Holstein.* *Plos One*, Vol 9, Issue 5, e96186, ISSN: 1932 - 6203
- Li X., Eherljung M., Lundstrom K., Lunden A., 2013:** *Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and ČAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden.* *Meat Science*, 94: 153 – 158, ISSN: 1873 - 4138
- Mahan L.K., Escott – Stump S., 2008:** *Krause´s food and nutritions therapy.*
Saunders/Elsevier, ISBN 1416034013, 9781416034018
- Mancini R.A., Hunt M.C., 2005:** *Current research in meat color.* *Meat Science*, 71: 100 - 121, ISSN: 1873 - 4138
- Mele M., Conte G., Castiglioni B., Chessa S., Macciotta N.P.P., Serra A., Buccioni A., Pagnacco G., Secchiari P., 2007:** *Stearoyl – CoA desaturase gene polymorphism and milk fatty acid composition in Italian Holsteins.* *Journal of Dairy Science*, 90: 4458 – 4465, ISSN: 0022 - 0302
- Melton S.L., Amiri M., Davis G.W., Backus W.R., 1982:** *Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass -, forage -, grain – and grain – finished steers.* *Journal of Animal Science*, 55: 77 – 87, ISSN: 1525 - 3163
- Mihara K., 1990:** *Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl – CoA desaturase gene.* *Journal of Biochemistry*, 108: 1022 – 1029, ISSN: 1756 - 2651
- Milanesi E., Nicoloso L., Crepaldi P., 2008:** *Stearoyl – CoA desaturase (SCD) gene polymorphism in Italian cattle breeds.* *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125: 63 – 67, ISSN: 1439 - 0388

- Miyazaki M., Gomez F.E., Ntambi J.M.,** 2002: *Lack of stearoyl – CoA desaturase – 1 function induces a palmitoyl – CoA delta6 desaturase and represses the stearoyl – CoA desaturase – 3 gene in the preputial glands of the mouse.* Journal of Lipid Research, 43: 2146 – 2154, ISSN: 0022-2275
- Miyazaki M., Jacobson M.J., Man W.C., Cohen P., Asilmaz E., Friedman J.M. Ntambi J.M.,** 2003: *Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart – specific stearoyl – CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors.* Journal of Biological Chemistry, 278: 33904 – 33904, ISSN: 1083 - 351X
- Miyazaki M., Kim H.J., Man W.C., Cohen P., Ntambi J.M.,** 2001: *Oleoyl – CoA is the major de novo product of stearoyl – CoA desaturase 1 gene isoform and substrate for the biosynthesis of the Harderian gland 1-alkyl-2,3-diacylglycerol.* Journal of Biological Chemistry, 276: 39455 – 39461, ISSN: 1083 - 351X
- Miyazaki M., Man W.C., Ntambi J.M.,** 2001: *Targeted disruption of stearoyl – CoA desaturase 1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid.* Journal of Nutrition, 131: 2260 – 2268, ISSN: 1541 - 6100
- Moioli B., Contarini G., Avalli A., Catillo G., Orru L., DeMatteis G., Masoero G., Napolitano F.,** 2007: Short communication: *Effect of stearoyl – Coenzyme A desaturase polymorphism on fatty acid composition of milk.* Journal of Dairy Science, 90: 3553 – 3558, ISSN: 0022-0302
- Musil, J, Nováková, O., Kunz, K.,** 1976: *Biochemie v obrazech a schématech,* Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha, ISBN 08 – 070 – 75
- NCBI, 2015, Gene ID: 280924, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280924>
- Ntambi J.M., Buhrow S.A., Kaestner K.H., Christy R.J., Sibley E., Kelly T.J., Lane M.D.,** 1988: *Differentiation – induced gene expression in the 3T3 – L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl – CoA desaturase.* Journal of Biological Chemistry, 263: 17291 – 17300, ISSN: 1083 - 351X
- Ntambi J.M.,** 1999: *Regulation of stearoyl – CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol.* Journal of Lipid Research, 40: 1549 – 1558, ISSN: 0022-2275

- Ntambi J.M., Miyazaki M.,** 2004: *Regulation of stearoyl – CoA desaturases and role in metabolism.* Progress in Lipid Research, 43(2): 91 – 104, ISSN: 1873 - 2194
- Ntambi J.M., Miyazaki M., Stoehr J.P.,** 2002: *Loss of stearoyl – CoA desaturase – 1 function protects mice against adiposity.* Proceeding of the National Academy of Science of the USA, 99: 11482 – 11486, ISSN: 1091 - 6490
- Paton C.M., Ntambi J.M.,** 2008: *Biochemical and physiological function of stearoyl – CoA desaturase.* American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 297: E28 – E37, ISSN: 1522 - 1555
- Phillips M.S., Liu Q., Hammond H.A., Dugan V., Hey P.J., Caskey C.J., Hess J.F.,** 1996: *Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rats.* Nature Genetisc, 13: 18 - 19, ISSN: 1061 - 4036
- Pitchford W.S., Deland M.P., Siebert B.D., Malau – Aduli A.E., Bottema C.D.,** 2002: *Genetic variation in fatness and fatty acid composition of crossbred cattle.* Journal of Animal Science, 80: 2825 – 2832, ISSN: 1525 - 3163
- Rogorowski M.P., Flowers M.T., Stamatikos A.D., Ntambi J.M., Paton C.M.,** 2013: *SCD1 activity in muscle increases triglyceride PUFA content, exercise capacity and PPAR α expression in mice.* The Journal of Lipid Research, 54(10): 2636 – 2646, ISSN: 0022-2275
- Shabalina S.A., Spiridonov N.A.,** 2004: *The mammalian transcriptome and the function of non – coding DNA sequences.* Genome Biology, 5: 105, ISSN: 1465 - 6914
- Shanklin J., Whittle E., Fox B.G.,** 1994: *Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane – associated iron enzyme, stearoyl – CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxyrase and xylene monooxygenase.* Biochemistry, 33: 12787 - 12794, ISSN: 1520 - 4995
- Smith S.B., Yang A., Larsen T.W., Tume R.K.,** 1998: *Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation.* Lipids, 33: 197 – 207, ISSN: 1558 - 9307

- Schenk S., Horowitz J.F., 2007:** *Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid – induced insulin resistance.* Journal of Clinical Investigation, 117: 1690 – 1698, ISSN: 1558 - 8238
- Schennink A., Stoop W.M., Visker M.H.P.W., Heck J.M.L., Bovenhuis H., van der Poel J.J., van Valenberg H.J.F., van Arendonk J.A.M., 2007:** *DGAT1 underlines large genetic variation in milk – fat composition of dairy cows.* Animal Genetics, 38: 467 – 473, ISSN: 1365 - 2052
- Soyeurt H., Gillon A., Vanderick S., Mayers P., Bertozzi C., Gengler N., 2007:** *Estimation of heritability and genetic correlations for the major fatty acids in bovine milk.* Journal of Dairy Science, 90:4435 – 4442, ISSN: 0022-0302
- Schennink A., Heck J.M.L., Bovenhuis H., Visker M.H.P.W., van Valenberg H.J.F., van Arendonk J.A.M., 2008:** *Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl – CoA desaturase (SCD1) and acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1).* Journal of Dairy Science, 91: 2135 – 2143, ISSN: 0022-0302
- Stamatikos A.D., Paton C.M., 2013:** *Role of stearoyl – CoA desaturase – 1 in skeletal muscle function and metabolism.* American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 305: E767 – E775, ISSN: 1522 - 1555
- Strittmatter P., Thiede M., Hackett C.S., Ozols J., 1988:** *Bacterial synthesis of active rat stearoyl – CoA desaturase lacking the 26 – residue amino . terminal amino acid sequence.* Journal of Biological Chemistry, 263: 2532 – 2535, ISSN: 1083 - 351X
- Stukey J.E., McDonough V.M., Martin C.E., 1990:** *The OLE1 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl – CoA desaturase gene.* Journal of Biological Chemistry, 265: 20144 – 20149, ISSN: 1083 - 351X
- Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Mannen H., Kobayashi M., Tanabe Y., Ogino A., Tsuji S., 2004:** *Genotype of stearoyl – CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle.* Mammalian Genome, 14: 142 – 148, ISSN: 1432 - 1777

- Taniguchi M., Mannen H., Oyama K., Shimakura Y., Oka A., Watanabe H., Kojima T., Komatsu M., Harper G.S., Tsuji S., 2004:** *Differences in stearyl – CoA desaturase mRNA levels between Japanese Black and Holstein cattle.* Livestock Production Science, 87: 215 – 220, ISSN: 0301 - 6226
- Tokuyama Y., Sturis J., DePaoli A.M., Takeda J., Stoffel M., Tang J., Sun X., Polonsky k.S., Bell G.I., 1995:** *Evolution of beta – cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat.* Diabetes, 44: 1447 – 1457, ISSN: 1939 – 327X
- Tunstall R.J., Mehan K.A., Wadley G.D., Collier G.R., Bonen A., Hargreaves M., Cameron – Smith D., 2002:** *Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle.* American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 283: E66 – E72, ISSN: 1522 - 1555
- Voss M.D., Beha A., Tennagels N., Tschank G., Herling A.W., Quint M., Gerl M., Metz – Weidmann C., Haun G., Korn M, 2005:** *Gene expression profiling in skeletal muscle of Zucker diabetic Fatty Rats: implicatoin for a role of stearyl – CoA desaturase 1 in insulin resistence.* Diabetologia, 48: 2622 – 2630, ISSN: 1432 - 0428
- Webb E.C., O’Neill H.A., 2008:** *The animal fat paradox and meat quality.* Meat Science, 80: 28 – 36, ISSN: 1873-4138
- Worrel M.A., Clanton D.C., Calkins C.R., 1987:** *Effect of weight of castration on steer performance in the feedlot.* Journal of Animal Science, 64: 343 – 347, ISSN: 1525 - 3163
- Wu X.X., Yang Z.P., Shi X.K., Li J.Y., Ji D.J., Mao Y,J, Chang L.L., Gao H.J., 2012:** *Association of SCD1 and DGAT1 SNPs with the intramuscular fat traits in Chinese Simmentale cattle breeds.* Molecular Biology Reports, 39: 1065 – 1071, ISSN: 1573 - 4978
- Yang A., Larsen T.W., Powell V.H., Tume R.K., 1999:** *A comparsion of fat composition of Japanese and long – term grain – fed Australian steers.* Meat Science, 51: 1 – 9, ISSN: 1873-4138
- Zhang S., 2005:** *Association of genetic variation to healthfulness of beef.* Iowa State University Animal Industry Report, <www.ans.iastate.edu/report/air/2005.pdf>

7 SEZNAM ZKRATEK

BMS	Standart hovězího marblování (Beef marbling standarts)
CoA	Koenzym A
CLA	Konjugovaná kyselina olejová
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
HDL	Lipoprotein s vysokou hustotou (High – density lipoprotein)
KPH	Procento tuku v oblasti ledvin, pánve a srdce (Percent kidney, pelvic and heart fat)
LDH	Lipoprotein s nízkou hustotou (Low – density lipoprotein)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MUFA	Mononenasyčené mastné kyseliny (Monounsaturated fatty acids)
ORF	Otevřený čtecí rámeček (Open reading frame)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PPAR	Receptory aktivované proliferátory peroxizomů (Peroxisome proliferator – activated receptors)
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated fatty acids)
RFLP	Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism)
SCD	Stearoyl – CoA desaturáza
SFA	Nasyčené mastné kyseliny (Saturated fatty acids)
SFD	Výška podkožního tuku (Subcutaneous fat depth)
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism)
TBE	Tris-Borate-EDTA
UTR	Nepřekládaná oblast mRNA (untranslated region)

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Cesta transferu elektronů při desaturaci nasycených mastných kyselin na nenasycené mastné kyseliny stearoyl - CoA desaturázou (SCD1) (Paton and Ntambi, 2008).</i>	12
<i>Obrázek 2: Model membránové topologie myšského proteinu SCD1. Červeně zvýrazněná rezidua zobrazují konzervované histidinové regiony, která jsou esenciální pro katalýzu. N a C reprezentují NH₂ a COOH konce. Čísla 92, 97, 222, 233 a 322 jsou rezidua, ve kterých je lokalizováno 5 cysteinů. ER lumen znamená lumen endoplazmatického retikula (Paton and Ntambi, 2008).</i>	13
<i>Obrázek 3: A - Grafické znázornění původních 5 exonů genu SCD1 a tří SNP (g.4706C>T, g.7534G>A a g.7864C>T). C – Sekvence genu SCD1 a poloha tří SNP.(Jiang et al., 2008).</i>	16
<i>Obrázek 4: Struktura bovinního genu SCD1 (Ensembl, 2015)</i>	17
<i>Obrázek 5: Stupně pro hodnocení množství intramuskulárního tuku v hovězím mase (httpwww.valio.dewagyu-en.html).</i>	Chyba! Záložka není definována.
<i>Obrázek 6: Rozložení hmotnostních standartů o velikosti 50 bp a 100 bp na gelu (https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific/generuler-dna-ladders.html).</i>	28
<i>Obrázek 7: Agarózový gel s amplifikovanými fragmenty genu SCD1.</i>	35
<i>Obrázek 8: Teoretická vizualizace štěpení genu SCD1 restriční endonukleázou SatI.</i>	36
<i>Obrázek 9: Sekvence genu SCD1 s vyznačenými štěpnými místy.</i>	36
<i>Obrázek 10: Štěpený PCR produkt genu SCD1 restriční endonukleázou SatI. Všechny tři genotypy jsou vyznačeny.</i>	37
<i>Obrázek 11: Ukázka genotypu CC genu SCD1.</i>	37
<i>Obrázek 12: Ukázka genotypu CT genu SCD1.</i>	38
<i>Obrázek 13: Ukázka genotypu TT genu SCD1.</i>	38

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení reakční směsi pro PCR.....	26
Tabulka 2: Primery pro amplifikaci genu <i>SCD1</i>	26
Tabulka 3: Reakční podmínky PCR.....	27
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro štěpení PCR produktu	27
Tabulka 5: Složení sekvenační reakční směsi	29
Tabulka 6: Potřebné množství PCR produktu pro 10 μ l sekvenační reakční směsi	29
Tabulka 7: Fáze amplifikace templátu	30
Tabulka 8: Výpočet frekvence genotypů (Hartl and Clark, 2006).....	32
Tabulka 9: Výpočet frekvence alel (Hartl and Clark, 2006).....	33
Tabulka 10: Výpočet absolutní a relativní frekvence alel genu <i>SCD1</i>	39
Tabulka 11: Výpočet absolutní a relativní frekvence genotypů genu <i>SCD1</i>	39
Tabulka 12: Stanovení genetické rovnováhy podle Hardy - Weinbergova zákona	41
Tabulka 13: Porovnání vypočítaných hodnot s hodnotami tabulkovými.....	41
Tabulka 14: Popisná analýza vybraných hodnocených znaků	43
Tabulka 15: Vliv genotypu genu <i>SCD1</i> na sledované znaky	44