

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2016

Bc. ANDREA MORAVANSKÁ



**Vztah polymorfismu UASMS1 v genu leptin s ukazateli
kvality masa**

Diplomová práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph. D.

Vypracovala:
Bc. Andrea Moravanská

ZADÁNÍ DP

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: *Vztah polymorfismu UASMS1 v genu leptin s ukazateli kvality masa* 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 *Směrnici 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

Tímto děkuji prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za pomoc při statistickém vyhodnocení získaných údajů a za rady při výpočtech. Hlavní poděkování pak patří manželům Horečtím, za jejich čas, cenné rady a pomoc v laboratoři.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo provedení asociační analýzy polymorfismu UASMS1 v genu leptin s parametry kvality hovězího masa u souboru býků plemene Český strakatý skot. Pomocí metody přímého sekvenování PCR produktu byly určeny genotypy 236 býků. Jednotlivé genotypy byly zpracovány do databáze a bylo provedeno statistické vyhodnocení asociace pomocí software SAS. Vysoce průkazná hodnota byla pozorována u kyseliny palmitoolejové ($p = 0,0006$) a kyseliny stearové ($p = 0,0005$) mezi genotypy *CT* a *TT*, průkazná hodnota pak u kyseliny myristoolejové ($p = 0,0117$) mezi genotypy *CT* a *TT* a u kyseliny linolelaidové mezi genotypy *CC* a *CT* ($p = 0,0340$) a i mezi genotypy *CC* a *TT* ($p = 0,0417$). Hodnoty vztahující se k vlivu na obsah sušiny ($p = 0,0746$) a barvu masa ($p = 0,0541$) se pouze blížily průkaznosti. Vliv genotypu na obsah intramuskulárního tuku nebo dalších parametrů kvality hovězího masa nebyl prokázán.

Klíčová slova: leptin, polymorfismus, UASMS1, kvalita masa

ABSTRACT

The aim of this thesis was to perform association analysis of UASMS1 polymorphism in leptin gene with parameters of beef quality, studied on a group of Czech Fleckvieh bulls. The group of 236 bulls was genotyped by direct sequencing of the PCR product. Individual genotypes were processed into a database and statistical evaluation of association was performed by using SAS software. The UASMS1 polymorphism had a highly significant effect on palmitoleic acid content ($p = 0.00006$) and stearic acid content ($p = 0.0005$) between *CT* and *TT* genotypes. There was a significant value in myristoleic acid content ($p = 0.0117$) between genotypes *CT* and *TT* and in linolelaidic acid content between both genotypes *CC* and *CT* ($p = 0.0340$) and *CC* and *TT* ($p = 0.0417$). Values relating to the effect on dry matter content ($p = 0.0746$) and colour of meat ($p = 0.0541$) had only approaching evidentiary values. The influence of genotype on intramuscular fat content or other parameters of beef quality has not been demonstrated in this study.

Key words: leptin, polymorphism, UASMS1, meat quality

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	CÍL.....	10
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1	Kvalita masa.....	11
3.1.1	Technologická kvalita.....	11
3.1.2	Senzorická kvalita.....	12
3.1.3	Nutriční kvalita	13
3.2	Genetické markery	14
3.3	Geny ovlivňující ukládání a metabolismus intramuskulárního tuku u skotu... 16	
3.3.1	Diacylglycerol O-acyltransferáza 1 (DGAT1)	16
3.3.2	Fatty acid binding protein 4 (FABP4)	17
3.3.3	Stearoyl – CoA desaturáza (SCD)	18
3.3.4	Thyroglobulin (TG)	19
3.4	Leptin (LEP).....	19
4	MATERIÁL A METODIKA	24
4.1	Materiál	24
4.1.1	Analyzované vzorky	24
4.1.2	Použité přístroje	24
4.2	Metodika	24
4.2.1	Návrhy primerů.....	24
4.2.2	PCR reakce	26
4.2.3	Agarózová gelová elektroforéza	28
4.2.4	Sekvenování.....	29
4.2.5	Chemická analýza	30
4.2.5.1	Stanovení obsahu sušiny v mase.....	30
4.2.5.2	Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase	30
4.2.5.3	Stanovení obsahu tuku v mase	31
4.2.5.4	Stanovení obsahu popelovin	31
4.2.5.5	Stanovení pH masa.....	31
4.2.5.6	Stanovení barvy masa	31
4.2.5.7	Stanovení obsahu mastných kyselin v mase	31
4.2.6	Matematicko – statistické zpracování dat.....	32
4.2.6.1	Výpočet frekvencí alel a genotypů.....	32
4.2.6.2	Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona.....	33
4.2.6.3	Asociační analýza.....	33
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	34

5.1	Návrh primerů	34
5.2	PCR	35
5.3	Sekvenování	35
5.4	Matematicko – statistické vyhodnocení	37
5.4.1	Výpočet frekvencí alel a genotypů	37
5.4.2	Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona	39
5.4.3	Asociační analýza	40
6	ZÁVĚR	46
7	LITERATURA.....	47
8	SEZNAM OBRÁZKŮ	53
9	SEZNAM TABULEK.....	54
10	SEZNAM ZKRATEK	55

1 ÚVOD

Jedním z hlavních odvětví živočišné výroby je chov skotu pro produkci masa a mléka. Na základě intenzivního šlechtění dochází k postupnému zvyšování užitkovosti jednotlivých plemen a v důsledku toho se snižuje počet chovaných jedinců. V současnosti existuje spousta druhů plemen skotu lišící se svým užitkovým zaměřením. V závislosti na specifické užitkovosti plemene se odvíjí i specifické vlastnosti masa (např. obsah intramuskulárního tuku) nebo mléka (např. obsah tuku, bílkovin). Český strakatý skot patří mezi plemena s kombinovanou užitkovostí, což znamená, že je chován pro produkci kvalitního mléka a chutného masa.

Spotřeba hovězího masa ve světě je poměrně odlišná, mezi největší producenty a konzumenty patří USA se spotřebou 42kg/obyvatel/rok, v České republice je to přibližně 10kg/obyvatel/rok. K nárůstu spotřeby červeného masa (vepřové a hovězí) nedochází, co se ale s postupem času zvyšuje, je zájem konzumenta o kvalitu kupovaného masa. Kvalitu masa lze posuzovat hygienicky (např. kontaminace mikrobiální a parazitární), sensoricky (např. vzhled a barva), technologicky (např. pH a vaznost masa) a z hlediska výživové (nutriční) hodnoty (např. obsah bílkovin a tuku).

Kandidátní gen je gen, se známým produktem, u kterého se předpokládá vliv na určitou užitkovou vlastnost. Mezi kandidátní geny, které mají vliv na příjem potravy, ukládání tuku v těle a další, patří gen leptin. V genu leptin bylo nalezeno několik jednonukleotidových polymorfismů, které jsou asociovány s kvalitou masa a vlivem na jatečně upravené tělo. Tato diplomová práce se zabývala vztahem polymorfismu UASMS1 v genu leptin s parametry kvality hovězího masa.

2 CÍL

Cílem diplomové práce je provedení asociační analýzy polymorfismu UASMS1 v genu leptin s parametry kvality hovězího masa u souboru býků studovaných na kvalitu masa. Součástí diplomové práce bylo osvojení si potřebných metod molekulární genetiky (polymerázová řetězová reakce, sekvenování DNA), stanovení genotypů, vypočítání frekvence alel a genotypů a následné statistické vyhodnocení asociace mezi zjištěnými genotypy a parametry kvality hovězího masa.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Kvalita masa

S postupem času sice dochází k čím dál většímu odstupu konzumenta od procesu vedoucího k zisku finálního produktu, ale na druhou stranu roste poptávka po kvalitě konečného výrobku. Kvalita masa je vnímána různě napříč konzumenty, výrobci i zeměmi. Na kvalitu masa má vliv plemeno (masná plemena vs. plemena dojená), věk zvířete, pohlaví, výživa, podmínky chovu (extenzivní chov vs. intenzivní chov), ale také způsob nakládání se zvířaty před porážkou a způsob zpracování masa po porážce. (Huidobro *et al.*, 2003). Níže jsou uvedeny vybrané ukazatele technologické, senzorické a nutriční kvality masa. Některé z ukazatelů mohou patřit i do více skupin současně, například barva masa patří do kategorie technologických i senzorických vlastností.

3.1.1 Technologická kvalita

Po porážce jsou mrtvá zvířata tzv. bourána a dochází ke vzniku jatečně upravených těl (JUT), která jsou uchovávána v chladicích boxech. Během skladování dochází ke změnám vnitřní struktury svalu. Svalová vlákna se smršťují laterálně (bočně), zatímco vypuzují intracelulární vodu do extracelulárních prostor, což vede ke ztrátě vody (Listrat *et al.*, 2016). Technologická kvalita souvisí s vazností masa, tzn. schopnost masa udržet si vnitřní vodu. Molekulární mechanismy způsobující ztrátu vody odkapem, jsou silně ovlivněny rychlostí a stupněm poklesu pH *post mortem* (po smrti). Měření pH masa se provádí vpichovou elektrodou 1h po porážce, případně 24 – 48 h po porážce. U hovězího masa patří mezi nejznámější vady spojené se změnou pH tzv. DFD (tmavé, tuché, suché, z anglického dark, firm, dry) maso, jehož hodnota pH se určuje 24h po porážce a je vyšší než 6,19. Takové maso velmi rychle podléhá působení mikroorganismů a dochází k jeho kažení, je proto nežádoucí a nevhodné pro prodej výsekového masa (Lebret *et al.*, 2015).

Pro spotřebitele hovězího masa je také velmi důležitá jeho křehkost. Proces křehčení masa začíná po porážce ze strany biochemických a fyzikálních změn (Lebret *et al.*, 2015). U skotu je vztah mezi svalovým vláknem a křehkostí masa komplexní a liší se podle druhu svalu, pohlaví a plemene (Ellies-Oury *et al.*, 2013). Použitím biomarkerů křehkosti hovězího masa bylo prokázáno, že u plemen s glykolytickým svalovým meta-

bolismem, jako jsou třeba francouzská masná plemena, jsou nejjemnější vlákna svalu *longissimus thoracis* nejvíce oxidační. Naopak plemena (například aberdeen angus), jejichž svalový metabolismus je oxidační, mají nejjemnější vlákna svalu *longissimus thoracis* nejvíce glykolytická. Tohle je v souladu s tím, že u plemen se svalovými vlákny typu I (pomalá, oxidační), jako jsou mléčná plemena nebo již výše zmiňovaný aberdeen angus, je maso roštěnce jemnější se snižující se intenzitou červené barvy. Naproti tomu u francouzských masných plemen, u kterých převažují svalová vlákna typu II (rychlá, glykolytická), je nejjemnější ten nejčervenější sval (Picard *et al.*, 2014).

3.1.2 Senzorická kvalita

Mezi hlavní ukazatele sensorické kvality, které vnímá spotřebitel jako první, je vzhled a barva masa. Barva masa je dána obsahem hemových pigmentů (myoglobin a oxymyoglobin) a oxidoredukčním stavem hemového železa, což je vysoce ovlivňováno také prostředím svalové buňky (Gobert *et al.*, 2014). Z tohoto důvodu je důležitá i stabilita masa v průběhu jeho skladování, protože vadná barva masa je často vnímána spotřebiteli jako známka zkaženého výrobku, který si samozřejmě nikdo nekoupí (Mancini a Hunt, 2005). Barva masa je obecně hodnocena vizuálními nebo instrumentálními metodami 24h po porážce, případně v určených dnech po porážce, a posuzuje se změna barvy v průběhu stárnutí, tj. oxidace povrchu myoglobinu (Listrat *et al.*, 2016).

Intramuskulární tuk (IMT) se skládá ze složených lipidů – hlavně z fosfolipidů a triacylglycerolů, které představují hlavní formu zásobní energie, ale také může být přítomno malé množství monoacylglycerolů, diacylglycerolů a mastných kyselin. Obsah IMT závisí na velikosti a množství intramuskulárních adipocytů a mění se v závislosti na plemenu, věku, genotypu jedince, výživě a podmínkách chovu zvířat (Bonnet *et al.*, 2007; Hocquette *et al.*, 2010). Když se počet a velikost těchto lipidových složek zvýší, na povrchu svalu jsou viditelné tukové kapénky v podobě bílých skvrn nebo bílých proužků, což známe jako mramorování (Yang *et al.*, 2006). Tato vlastnost je poslední dobou ve středu zájmu a je požadováno mramorování s rozumným množstvím intramuskulárního tuku, protože mramorování má vliv na chutnost, šťavnatost a křehkost masa (Clark *et al.*, 2011). Obsah intramuskulárního tuku ovlivňuje všechny 3 kategorie kvality a jedná se o kvantitativní vlastnost. Z důvodů předchozí intenzivní selekce na vyšší obsah libové svaloviny došlo ke snížení obsahu intramuskulárního tuku a tím i k viditelnému poklesu kvality masa, jelikož byly ovlivněny organoleptické vlastnosti, převážně pak chuť masa (Huidobro *et al.*, 2003; Scollan *et al.*, 2006). Intramuskulární

tuk u skotu obsahuje v průměru 45 – 48 % nasycených mastných kyselin (SFA), 35 – 45 % mononenasycených mastných kyselin (MUFA) a až 5 % nasycených mastných kyselin (Scollan *et al.*, 2006). Až 30 % obsahu SFA pak představuje kyselina myristová (C14:0), kyselina palmitová (C16:0) a kyselina stearová (C18:0). Nejvýznamnější z mononenasycených mastných kyselin je kyselina olejová (C18:1, n-9), přičemž ostatní MUFA jsou zastoupeny převážně cis- a trans-izomery této kyseliny. Hlavními zastupiteli PUFA jsou pak kyselina linoleová (C18:2) a kyselina α -linolenová (C18:3) (Mateescu, 2015).

3.1.3 Nutriční kvalita

Nutriční neboli výživová hodnota masa je dána jeho chemickým složením, kterou tvoří v průměru u libového masa přibližně 72 % vody, 21 % bílkovin, 5 % tuku a 1 % popela. Maso je důležitým zdrojem bílkovin, esenciálních aminokyselin, esenciálních mastných kyselin (polynenasycené mastné kyseliny, tzv. PUFA), minerálů a vitaminů (A, E a B) (Listrat *et al.*, 2016).

Nejcennější složkou z hlediska nutričního a zpracovatelského jsou bílkoviny. Bílkoviny neboli proteiny jsou složeny z aminokyselin a představují základní stavební jednotku živých organismů. Maso je zdrojem tzv. plnohodnotných bílkovin, což znamená, že obsahuje všechny esenciální aminokyseliny, které si lidské tělo neumí samo vytvořit. Normální maso obsahuje 19 % bílkovin, z nichž 11,5 % tvoří strukturální proteiny – aktin a myosin, 5,5 % představují rozpustné sarkoplazmatické proteiny – myoglobin a hemoglobin, a 2 % tvoří pojivová tkáň – kolagen a elastin, zpevňující strukturální proteiny (Lebret *et al.*, 2015). Kolagen se od většiny proteinů liší obsahem aminokyselin a to vyšším obsahem hydroxylysinu a hydroxyprolinu a neobsahuje žádný cystein ani tryptofan. Elastin má méně hydroxylysinu a hydroxyprolinu. Proto je hodnota bílkovin v mase, které obsahuje více pojivové tkáně, nižší (Listrat *et al.*, 2016) .

Mastné kyseliny jako takové obvykle nejsou přítomny ve svalové ani tukové tkáni, ale jsou začleněny do triacylglycerolů a fosfolipidů. Tuková tkáň má mnohem vyšší obsah mastných kyselin než tkáň svalová, ale složení mastných kyselin v těchto tkáních je velmi podobné (Wood *et al.*, 2008). Jedním z kritérií, jak můžeme dělit mastné kyseliny, je jejich nasycenost. Dělíme je na nasycené mastné kyseliny (SFA), které ve svém řetězci neobsahují žádnou dvojnou vazbu a tvoří energetickou rezervu zejména v živočišných tucích, a nenasycené mastné kyseliny. Ty se dále dělí na mononenasycené mastné kyseliny (MUFA) s jednou dvojnou vazbou ve svém řetězci a polynenasycené

mastné kyseliny (PUFA), které zahrnují i esenciální mastné kyseliny, s jednou a více dvojnými vazbami ve svém řetězci. Fosfolipidy patří mezi polární lipidy a nachází se v buněčných membránách. Obsah fosfolipidů v mase je poměrně konstantní a nezávisí na celkovém množství tuku. Triacylglyceroly patří mezi neutrální lipidy a nachází se v adipocytech, jejich obsah je proto vysoce závislý na celkovém množství tuku. Triacylglyceroly jsou složeny především ze SFA a MUFA, zatímco PUFA jsou téměř výhradně uloženy ve fosfolipidových frakcích. Stanovení obsahu mastných kyselin je důležité s ohledem vlivu mastných kyselin na lidské zdraví, senzoryckou kvalitu masa a také na zpracování masných výrobků (Hocquette *et al.*, 2012; Wood *et al.*, 2008). Studie zaměřené na výživu se intenzivně snaží optimalizovat a snížit příjem nasycených mastných kyselin a naopak zvýšit příjem mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin ze zvířecích produktů pro lidskou spotřebu (Shingfield *et al.*, 2013). Kromě toho, že PUFA s více než 20 atomy uhlíku jsou primárně začleňovány do fosfolipidů, je možné zvýšit obsah těchto polynenasycených mastných kyselin v mase aniž by se zvýšil obsah intramuskulárního tuku (Listrat *et al.*, 2016). Zvláštností masa přežvýkavců je přítomnost konjugované kyseliny linolové (CLA), nazývaná též bachorová kyselina (rumenic acid), která se tvoří při bachorové biohydrogenaci, je přírodním izomerem kyseliny linolové a bylo u ní prokázáno antikarcinogenní působení u vybraných zvířecích modelů (Chin *et al.*, 1992; Shingfield *et al.*, 2013).

3.2 Genetické markery

Zlepšení vlastností hospodářských zvířat se zaměřilo na šlechtění jedinců s vynikajícími fenotypovými vlastnostmi. S rozvojem stále pokročilejších statistických metod, které umožňují výběr maximálního genetického zisku, byl tento jednoduchý přístup velmi úspěšný při zvyšování množství zemědělské produkce. Avšak informace, které jsou nyní dostupné ohledně organizace a funkce genomu, mohou být použity v chovných programech s cílem zlepšit řadu vlastností. Mnoho znaků je pod kontrolou několika genetických lokusů, z nichž každý přispívá k varianci znaku, proto se nazývají lokusy kvantitativních znaků (QTL – quantitative trait loci). Selektce pomocí markerů je kombinovaný produkt tradiční genetiky a molekulární biologie. MAS umožňuje výběr genů regulujících znaky našeho zájmu (Dekkers, 2004; Van Eenennaam *et al.*, 2007). Některé znaky jsou řízeny jednotlivými geny, ale většina hospodářsky významných vlastností jsou kvantitativní znaky, které jsou řízeny poměrně velkým počtem genů.

V kombinaci s tradičními technikami selekce se stala MAS cenným nástrojem při výběru zvířat do plemnitby pro jejich barvu, kvalitu masa, rezistenci vůči nemocem a jiné (Meuwissen a Goddard, 1996).

Genetický marker je sekvence DNA, kterou známe a lze ji snadno identifikovat. Jako DNA markery mohou být použity mutace nebo změny v kódující sekvenci genu. Tyto mutace mohou nebo nemusí způsobovat změny v proteinovém produktu. Změny v okolí genu mohou být také použity jako DNA markery (Collard *et al.*). Genetické markery mají široké spektrum využití, používají se například pro studium genetické variability v populacích a mezi populacemi, ověřování paternity, identifikaci jedince a ke studiu a hledání příčin dědičných genetických chorob. Mezi běžné a hojně používané typy genetických markerů patří RFLP, AFLP, RAPD, mikrosatelity (SSR, STR) a SNP markery (Liu a Cordes, 2004).

RFLP neboli polymorfismus délky restrikčních fragmentů detekuje rozdíl v homologní sekvenci DNA způsobený přítomností fragmentů různých délek po štěpení vzorku DNA specifickými restrikčními endonukleázami a slouží tedy k detekci bodových mutací. Restrikční fragmenty mohou být zobrazeny pomocí agarózové gelové elektroforézy, která separuje jednotlivé fragmenty v závislosti na velikosti jejich molekul, využívá se tak metody PCR-RFLP (Botstein *et al.*, 1980).

AFLP neboli polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů patří mezi hojně využívané genetické markery. Jeho hlavní výhodou je, že oproti použití mikrosatelitů lze při menším počtu primerů generovat více polymorfních markerů a to obzvláště u druhů, u nichž je známo pouze několik mikrosatelitních markerů (Huang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2014). AFLP slouží k posouzení genetické diverzity a k jednoduché identifikaci druhů (Liu *et al.*, 2014).

RAPD (náhodně amplifikovaná polymorfní DNA) je metoda založená na PCR reakci a byla značně využívána k odlišení kmenů různých bakteriálních druhů (Mbwana *et al.*, 2006). V této metodě se používá libovolná sekvence DNA jako primer, který má za cíl vytvořit genetický profil nespécifické genomové sekvence. Jestliže se mutace vyskytuje v templátové DNA na místě, které sloužilo k navázání primerů, pak nedochází ke vzniku PCR produktu (Liu a Cordes, 2004).

Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence DNA o délce do 10 párů bazí (bp), nejčastěji se však vyskytují mikrosatelity o velikosti 2-6 bp. Známé také pod názvy STR (Short Tandem Repeat) a SSR (Simple Sequence Repeat). Skládají se z mononukleotidových, dinukleotidových, trinukleotidových nebo tetranukleotidových

opakujících se motivů. Mikrosatelity se nacházejí v nekódujících sekvencích DNA a používají se k identifikaci lokusů kvantitativních znaků (QTL – quantitative trait loci) prostřednictvím asociace mezi markerem a fenotypem. Mají vysokou informační hodnotu a používají se jako genetické markery v analýzách populací, kde umožňují detekci vlivů působících na populaci (selektce, migrace a náhodný genetický drift), stejně tak i určení míry inbreedingu (Dovc *et al.*, 2006).

SNP (jednonukleotidový polymorfismus) vzniká bodovou mutací v jednom páru bází v kódující i nekódující sekvenci DNA. SNP použité jako DNA markery mohou být mutace vedoucí k produkci alternativní formy proteinu, mohou se vyskytovat v kódující sekvenci, ale nezpůsobovat změny v sekvenci aminokyselin nebo mohou být v blízkosti genu v nekódující sekvenci DNA. Vyskytují se hojně (přibližně každých 200 – 1000 bp) ve většině genomů. Byly popsány různé způsoby objevování SNP a některé z nich se v současné době používají pro stanovení genotypů, ale většina z nich je založena na srovnání lokusů specifických sekvencí vzniklých na různých chromozomech. Nejjednodušším způsobem je však provedení přímého sekvenování PCR produktu (Vignal *et al.*, 2002).

3.3 Geny ovlivňující ukládání a metabolismus intramuskulárního tuku u skotu

Jak již bylo zmíněno výše (kapitola), obsah intramuskulárního tuku lze zařadit mezi hlavní ukazatele kvality hovězího masa jak z hlediska technologického, tak i z hlediska senzorického a nutričního. Jedná se o kvantitativní vlastnost, na kterou mají vliv interakce QTL s prostředím. Níže jsou uvedeny vybrané kandidátní geny, které jsou spojovány s vlivem na ukládání a metabolismus intramuskulárního tuku u skotu.

3.3.1 Diacylglycerol O-acyltransferáza 1 (*DGATI*)

Triacylglyceroly jsou nejdůležitější zásobní formou energie pro eukaryotické buňky. V posledních letech došlo k výraznému pokroku objasnění funkce DGAT díky identifikaci mnoha genů kódující DGAT mezi druhy. S rozsáhlým pokrokem genomiky, bioinformatiky, transgenních organismů a také s pokrokem v purifikaci proteinů, byly u eukaryot určeny dva hlavní geny kódující DGAT a označeny jako *DGATI* a *DGAT2*. Tyto geny nemají sekvenční homologii (kódují polypeptidy s přibližně 35% rozdílem v délce) ačkoliv katalyzují stejnou biochemickou reakci (Liu *et al.*, 2012). Gen *DGATI*

o velikosti 8,6 kb je u skotu umístěn na 14. chromozomu a skládá se ze 17 exonů a 16 intronů.

Diacylglycerol transferáza 1 patří do velké rodiny proteinů nazývané MBOAT (membrane-bound O-acyltransferases), hraje klíčovou roli v distribuci uhlíku do triacylglycerolů a katalyzuje přenos mastných kyselin do hydroxy nebo thiolové skupiny lipidů nebo proteinů, čímž představuje poslední krok biosyntézy triacylglycerolů. U vyšších eukaryot je důležitá pro fyziologické procesy, jako je absorpce tuků ve střevech, tvorba tukové tkáně a laktace (Cases *et al.*, 1998). Studie uskutečněné pomocí genového knock-outu na modelech myši naznačily vztah DGAT s onemocněním spojených s metabolismem triacylglycerolů. Myši, u kterých byl knock-outován (vyřazen) gen *DGAT1*, měli ve tkáních sníženou hladinu triacylglycerolů a nebyly schopny laktace, ale plodnost u nich byla zachována stejně jako schopnost syntézy triacylglycerolů (Liu *et al.*, 2012).

Dinukleotidový polymorfismus, lokalizovaný v exonu 8 v genu *DGAT1*, má vliv na vlastnosti spojené s produkcí mléka. Dinukleotid AA je zaměněn za GC a vlivem této substituce dochází k náhradě aminokyseliny lyzin za aminokyselinu alanin. Grisart *et al.* (2002) uvádí, že dojnice, u kterých se vyskytuje daný polymorfismus, měly zvýšenou dojivost a vyšší obsah tuku v mléce. Významný vliv polymorfismu na obsah intramuskulárního tuku ve svalu *musculus semitendinosus* a *musculus longissimus dorsi* prokázali na populaci skotu holštýnského plemene a plemene charolais autoři Thaller *et al.* (2003). To potvrzují i výsledky autorů Anton *et al.* (2011), kteří také spojili tendence aminokyseliny lyzin (obzvláště pak homozygoty lyzin/lyzin) k vyššímu obsahu tuku.

3.3.2 Fatty acid binding protein 4 (FABP4)

Čtvrtý protein vázající mastné kyseliny (FABP4) má důležitou roli při transportu a oxidaci mastných kyselin. Patří do rodiny proteinů vázajících mastné kyseliny (FABP) a je to periferní membránový protein, který je spojován s vazbou rozmanitých hydrofóbních látek, jako jsou například mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a různé metabolity cyklooxygenáz a lipoxygenáz (Gargiulo *et al.*, 1999). Bylo prokázáno, že FABP4 souvisí s poruchami metabolismu lipidů, diabetem a obezitou (Schaffer a Lodish, 1994). Další studie ukazují, že exprese FABP4 se zvyšuje v průběhu diferenciaci adipocytů a jeho aktivita se může měnit v závislosti na mastných kyselinách, inzulínu, oxidovaném LDL a dalších (Lapsys *et al.*, 2000).

Michal *et al.* (2006) určili gen *FABP4*, nacházející se u skotu na 14. chromozomu, jako kandidátní gen pro obezitu. Ve své studii také uvádí 2 SNP (G7516C a G7713C), které mají prokazatelný vliv na stupeň mramorování a tloušťku podkožního tuku. Na rozdíl od zjištění těchto autorů, však výsledky studie autorů Curi *et al.* (2011) neprokázaly žádnou spojitost mezi těmito SNP a danými vlastnostmi. 4 SNP pak byly objeveny autory Hoashi *et al.* (2008), kteří stanovili genotypy u polymorfismů I74V (substituce aminokyseliny izoleucin za valin) a V110M (substituce valinu za methionin) a zjistili vysoce průkazné hodnoty u prvního polymorfismu v souvislosti s obsahem kyseliny palmitoolejové, kdy homozygoti izoleucin/izoleucin měly obsah této kyseliny o 0,5 % vyšší. Dle Barendse *et al.* (2009) mutace v genu *FABP4* u skotu nemusí vždy vykazovat asociace s intramuskulárním a podkožním tukem, což nasvědčuje faktu, že účinek tohoto genu je poměrně malý.

3.3.3 Stearoyl – CoA desaturáza (SCD)

Enzym stearoyl-CoA desaturáza katalyzuje přeměnu nasycených mastných kyselin na mononenasyčené mastné kyseliny v intramuskulárním tuku a v mléčném tuku a jeho činnost je velice citlivá na hormonální nerovnováhu a změny ve stravování (Kim a Ntambi, 1999). Aktivita enzymu je tedy regulována příjmem krmiva, kdy dochází k aktivaci gamma receptoru aktivujícího proliferaci peroxyzomu, zkráceně PPAR γ , který je odpovědný za zvýšení syntézy příslušné mRNA (Rogowski *et al.*, 2013). Stearoyl-CoA desaturáza je kódována genem *SCD* a nachází se v endoplazmatickém retikulu. Gen *SCD* o velikosti zhruba 17 000 páru bází s otevřeným čtecím rámcem (ORF) přes 1000 párů bází, byl u skotu lokalizován na 26. chromozomu a kóduje protein tvořený z 359 aminokyselin (Taniguchi *et al.*, 2004).

Celkem bylo popsáno 8 jednonukleotidových substitucí v genu *SCD*, v 5. exonu pak byly detekovány 3 SNP nacházející se v ORF oblasti (substituce G702A, C762T a T878C) u japonského plemene wagy, které ve své studii popsali Taniguchi *et al.* (2004). Existenci těchto 3 polymorfismů potvrzuje i studie autorů Kgwatalala *et al.* (2007), zaměřená na plemeno holštýnského skotu a plemeno jersey, která objevila jeden SNP navíc v exonu 3 u holštýnského skotu. Substituce T878C způsobuje v proteinu záměnu aminokyseliny valin za alanin, což ovlivňuje složení mastných kyselin a teplotu tání u intramuskulárního tuku, kdy alanin zvyšuje obsah MUFA a je spojován s nižší teplotou tání IMT (Barton *et al.*, 2010; Taniguchi *et al.*, 2004). Ke stejným závěrům ve své studii dospěl i Mannen (2011). Bauman *et al.* (2006) považuje stearoyl-CoA desatu-

rázu za nejvýznamnější enzym působících na metabolismus lipidů v mléčné žláze a uvádí, že aktivitou SCD je produkováno přes 70 % kyseliny CLA.

3.3.4 Thyroglobulin (TG)

Gen *TG* kóduje hormon thyroglobulin - prekurzor trijodthyroninu (T3) a tetrajodthyroninu (T4), které slouží jako signály ovlivňující růst a diferenciaci tukových buněk (Ailhaud *et al.*, 1992; Darimont *et al.*, 1993). *TG* je považován za kandidátní gen, protože spolu s *DGATI* byl mapován v oblasti QTL, které mají vliv na obsah tuku (Casas *et al.*, 2005). Thaller *et al.* (2003) spojuje vliv TG hlavně na obsah tuku ve svalu *longissimus dorsi*.

Fortes *et al.* (2009) se zabývali studiem segregací alel *C* a *T* v genu *TG* a zjistili, že alela *C* byla fixována u jedinců plemene brahmánského skotu (původ z *Bos indicus*), což mělo za následek výskyt jedinců pouze s genotypem *CC*. Dospěli k závěru, že výskyt alely *T* se zvyšuje spolu s vyšším zastoupením plemen, která pocházejí původem z *Bos taurus*.

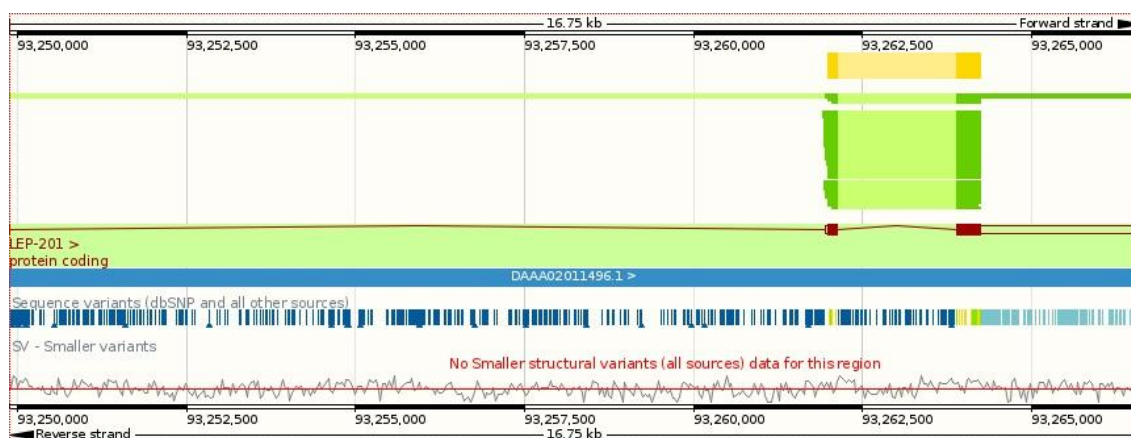
Polymorfismus genu *TG* leží v jeho 5' promotorové oblasti a je spojován s rozdíly ve stupni mramorování u hovězího masa (Barendse *et al.*, 1997). Dochází k substituci nukleotidu C za T v pozici 422. Po provedení asociační analýzy se ukázalo, že u jedinců nesoucích alespoň jednu alelu *T*, byl zjištěn vyšší stupeň mramorování (Thaller *et al.*, 2003). Toto tvrzení podpořily i studie Moore *et al.* (2003) na populaci holštýnského skotu, avšak uvádí, že stejné asociace nebyly nalezeny plemene charolais. Anton *et al.* (2008) ve své práci uvádí, že byl průkazný rozdíl u jedinců s genotypem *TT* a *CC*, kdy homozygoti *TT* měli vyšší % obsah tuku ve svalu *longissimus dorsi*. K opačným výsledkům však došli autoři Shin a Chung* (2007), kteří v 5' promotorové oblasti genu *TG* identifikovali 3 SNP a z toho 2 SNP byly nově popsány. V jejich studii, byla s pozitivním vlivem na stupeň mramorování, spojovaná alela *C*. K podobným výsledkům dospěli i autoři Casas *et al.* (2005), ale jejich hodnoty se pouze blížily průkaznosti, což mohlo být způsobeno příliš malým počtem jedinců zkoumané populace, kdy se genotyp *TT* vyskytoval pouze u 7 jedinců, z celkového počtu 467 jedinců.

3.4 Leptin (*LEP*)

Leptin (*LEP*) je často označován jako kandidátní gen, který má vliv na produkční znaky spojené s obsahem tuku a jelikož je tato práce zaměřena na polymorfismus v da-

ném genu, není zařazen ve stejné kapitole jako ostatní geny ovlivňující ukládání a metabolismus intramuskulárního tuku u skotu, ale tvoří samostatnou kapitolu.

Leptin, také známý jako gen obezity, je vysoce konzervován napříč všemi druhy, jelikož obsahuje homologní sekvence v kódující oblasti. Jeho sekvence má více než 16 000 párů bází, u skotu se nachází na 4. chromozomu (BTA4) a skládá se z 3 exonů, z nichž exony 2 a 3 obsahují oblasti kódující protein (viz obrázek 1) (Fu *et al.*, 2005; Green *et al.*, 1995; Lisa *et al.*, 2007).



Obrázek 1: Detail oblasti lokace leptinu na chromozomu 4 (ENSEMBL, 2016)

Exprese a sekrece leptinu je regulována v závislosti na množství tukové tkáně, výživě, ale také působením některých hormonů jako je například inzulin nebo růstový hormon. Endokrinní regulaci v expresi daného genu by mohli objasnit specifické transkripční faktory (Zieba *et al.*, 2005). V promotorové části genu bylo objeveno několik důležitých oblastí, které mají význam pro regulaci a vazbu domén, například CAAT-enhancer vázající protein (C/EBP), glukokortikoidy a gamma receptor aktivující proliferaci peroxizomu (PPARG). C/EBP se exprimuje v široké škále buněčných typů, hraje důležitou roli jako transkripční faktor a také má vysoký podíl na diferenciaci adipocytů (Houseknecht *et al.*, 1998).

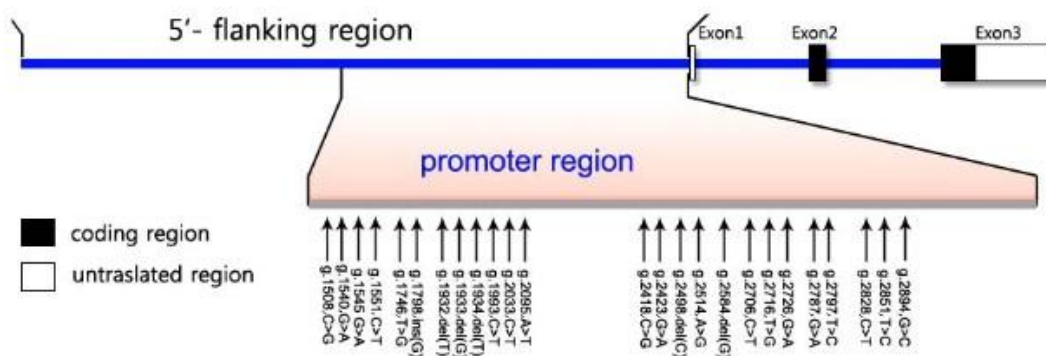
Gen kóduje proteinový hormon leptin o velikosti 167 aminokyselin a molekulové hmotnosti 16kDa, který je produkován a vylučován převážně bílými tukovými buňkami, tzv. adipocyty, do krevního oběhu (Houseknecht *et al.*, 1998). Ačkoliv jsou primárním zdrojem leptinu bílé tukové buňky, byla jeho produkce zaznamenána i v jiných tkáních, například v tkáni žaludku (Sobhani *et al.*, 2000), hypofýzy (Jin *et al.*, 1999), v prsní tkáni (Smith-Kirwin *et al.*, 1998) a dalších. Byl objeven v roce 1994 metodou pozičního klonování (Zhang *et al.*, 1994). Leptin působí centrálně i periferně a reguluje příjem

potravy, energetický výdej, tělesnou hmotnost a celkový metabolismus (Ducy *et al.*, 2000; Geary *et al.*, 2003; Giblin *et al.*, 2010). Předpokládá se, že jeho centrální působení je zprostředkováno neurotransmitéry, příkladem je pak neuropeptid Y. Leptin odráží do mozku stav energetických tělesných zásob a zde pak dochází k regulaci příjmu potravy a celkového energetického metabolismu v závislosti na přijatých signálech. V krevním oběhu se nachází buď ve volné formě nebo v komplexu s proteiny vázající leptin v závislosti na specifickém druhu zvířete a také jeho fyziologickém stavu (Garcia *et al.*, 2002; Houseknecht *et al.*, 1996).

Struktura leptinu je nejvíce podobná struktuře faktorů stimulujících kolonie granulocytů (G-CSF) a struktuře rodiny cytokinů, zahrnující například interleukin 6 (IL6), ciliární neurotrofický faktor (CNTF) a faktor inhibující leukemii (LIF) (Peelman *et al.*, 2014). Skládá se ze čtyř antiparalelních α -helixů, které jsou spojené dvěma vazbami a jednou smyčkou nacházející se v levotočivě zkrouceném helikálním svazku. V leptinu se nachází jedna disulfidová vazba, která má velký vliv na správnou funkci leptinu, jelikož při jejím poškození dochází ke ztrátě bioaktivity (Houseknecht *et al.*, 1998)

Již bylo zjištěno několik SNP v genu leptin u skotu (Buchanan *et al.*, 2002; Nkrumah *et al.*, 2005) a jsou, těmito i dalšími autory, spojovány s obsahem tuku (Fitzsimmons *et al.*, 1998), obsahem libového masa a stupněm křehkosti (Schenkel *et al.*, 2005), kvalitou masa a stupněm výnosu (Kononoff *et al.*, 2005), příjmem krmiva a průměrným denním přírůstkem (Nkrumah *et al.*, 2005) u masného skotu a také s plodností a produkcí mléka u mléčného skotu (Clempton *et al.*, 2011). Nejvíce zkoumaným SNP v genu *LEP* u skotu v souvislosti s vlivem na obsah tuku, je substituce C73T v exonu 2, kterou poprvé popsal Buchanan *et al.* (2002). V tomto polymorfismu je alela *T* spojována s vyšším obsahem tuku u jatečných těl. Choudhary *et al.* (2005) a Fortes *et al.* (2009) však ve svých studiích prokázali, že tento polymorfismus zcela chybí nebo je segregován pouze s velmi nízkou frekvencí alely u plemen pocházejících z *Bos indicus*.

Chung* *et al.* (2008) ve své studii zjistil 25 SNP v promotorové oblasti v genu leptin (viz obrázek 2) a 11 z nich nově popsal. Nkrumah *et al.* (2005) mimo jiné popisuje ve své studii polymorfismy, které se nachází v promotorové oblasti genu *LEP*, konkrétně pak UASMS1, UASMS2 a UASMS3.



Obrázek 2: Mapa zobrazující identifikované SNP v genu leptin na 4. chromozómu u skotu (Chung *et al.* 2008)

Polymorfismus UASMS1 se nachází v promotorové části genu *LEP* na pozici 207 a dochází v něm k jednonukleotidové substituci C za T (Nkrumah *et al.*, 2005). Daný polymorfismus uvedení autoři spojili s vlivem na tloušťku hřbetního tuku, spotřebu krmiva, hmotností a růstem. Schenkel *et al.* (2005) zkoumal možný vliv na obsah tuku a libové svaloviny, stupeň protučnění, jakostní třídu, obsah intramuskulárního tuku a křehkost. Uvádí, že alela C je spojena s nižším obsahem tuku a mohla by být spojena i s nižším stupněm protučnění a naopak vyšším obsahem libové svaloviny. Ke stejným závěrům došli i autoři Nkrumah *et al.* (2005), kteří u zvířat s genotypem CC zjistili nižší hodnoty pro tloušťku hřbetního tuku. Nejistil však žádnou spojitost s koncentrací leptinového séra, konverzí krmiva, stupněm mramorování a ani s obsahem libového masa. Studium polymorfismu UASMS1 a jeho vlivem na reprodukční vlastnosti a vlivem na produkci mléka se zabýval Clempson *et al.* (2011). Objevili však souvislost pouze s plodností krav, kdy alela T ovlivňuje délku mezidobí v pozitivním směru.

Dalším kandidátním genem užitkových vlastností hospodářských zvířat, který má souvislost s leptinem, je gen *LEPR* (Wylie, 2011). Leptinový receptor (LEPR) byl poprvé klonován z cDNA knihovny pro myši choroidní plexus s použitím expresní klonovací strategie (Tartaglia *et al.*, 1995). LEPR je glykoprotein s jednoduchou membránou překlenující doménu a nachází se v 6 různých izoformách (LEPR-a, LEPR-b, LEPR-c, LEPR-d, LEPR-e a LEPR-f), v důsledku alternativního sestřihu mRNA (Bjorbaek *et al.*, 1997; Trakovicka *et al.*, 2013). Tyto izoformy se pak dělí do 3 skupin: dlouhé, krátké a sekreční. Dlouhá, plně aktivní izoforma (LEPR-b) se exprimuje především v hypothalamu, kde se podílí na energetické homeostáze a regulaci aktivity sekrečních orgánů (Matteis *et al.*, 2012). Gen *LEPR* se skládá z 18 exonů a nachází se u skotu na

chromozomu 3q33 (Matteis *et al.*, 2012; Pfister-Genskow *et al.*, 1997). U vybraných čínských plemen skotu bylo lokalizováno pět jednonukleotidových polymorfismů (SNP), nacházejících se v leptinovém receptoru v intronu 3 a exonu 4 a po vyhodnocení jejich účinku na růstové vlastnosti byl *LEPR* označen jako potenciální kandidátní gen pro růst u zvířat (Guo *et al.*, 2008). Výsledky studie Matteis *et al.* (2012), hodnotící vliv SNP v genu *LEP* a *LEPR* na mléčnou užitkovost, dokazují, že oba geny mají vliv na tuto užitkovou vlastnost.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Materiál

4.1.1 Analyzované vzorky

Pro svou práci jsem využila vzorky DNA získané na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelovy univerzity v Brně. Analyzovala jsem celkem 236 vzorků DNA, která byla izolována z krve býků plemene Český strakatý skot.

4.1.2 Použité přístroje

Automatický sekvenátor 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

Automatický termální cykler GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

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

Centrifuga Mikro 120 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE)

Electronic UV Transilluminator (Ultra LŮM, Claremont, USA)

E-BOX VX5 (Schoeller Instruments s.r.o., Praha, Česká republika)

Fotoaparát Canon Powershot G6 (Canon, Tokyo, JPN)

UltraCam – Digital Imaging (Ultra LŮM, Claremont, USA)

Váha Scaltec SBA 41 (Sartorius, Göttingen, DE)

Vortex Bio Vortex V1 (Biosan, Riga, LT)

Vortex Genie 2 (Scientific Industries, New York, USA)

Zdroj elektrického napětí Power-Pac 300 (Bio-Rad, Hercules, USA)

4.2 Metodika

4.2.1 Návrhy primerů

Primery, které jsem použila v počátcích této práce, byly převzaty z práce Nkrumah *et al.*(2005). Po provedení přímé sekvenace PCR produktů se však při vyhodnocování

výsledků objevily potíže v podobě nekvalitních výstupů z genetického analyzátoru. Byly proto navrženy vlastní primery z volně dostupné sekvence pro gen leptinu u skotu (NC_007302.5) a za pomoci programu Oligo Primer Analysis Software v4.0 (Molecular Biology Insights Inc., Colorado Springs). Primery byly syntetizovány firmou IDT Inc. (Coralville, USA). Přehled všech primerů je uveden v tabulce 1, přičemž primer označený jako LEP_A a LEP_B je přímý a zpětný primer dle Nkrumah *et al.* (2005). Pod označením F1 a F2 jsou přímé primery a pod označením R1, R2 a R3 jsou zpětné primery.

Tabulka 1: Zkoušené primery

Primer	Sekvence 5' - 3'	Délka [bp]	G + C [%]	T _m [°C]
LEP_A	GGCACAATCCTGTGTATTGGTAAGA	25	44	70
LEP_B	GTCCATGTACCATTGCCCAATTTT	24	41,7	68
F1	GAGACAATGAAATGCCCTTAATG	24	37,5	66
F2	AGGAACGTAGCTTGCCAATG	21	47,6	62
R1	CCATTGCCCAATTTTAAACCA	20	40	56
R2	GCAATGAAGACCCAGCATAGA	22	45,5	64
R3	GGCCTTCCTTGGTGGTACA	19	57,9	60

Uvedené primery se poté testovaly na 4 různých vzorcích DNA v různých kombinacích (viz tabulka 2).

Tabulka 2: Kombinace primerů

Označení kombinace primeru	Použité primery	Velikost PCR produktu [bp]
1	LEP_A + R1	89
2	LEP_A + R2	276
3	LEP_A + R3	502
4	F1 + R1	381
5	F1 + R2	568
6	F1 + R3	794
7	F1 + LEP_B	390

8	F2 + R1	304
9	F2 + R2	491
10	F2 + R3	717
11	F2 + LEP_B	313

Po provedení PCR reakce se zdála být nejlepší kombinace primerů pod označením 4 a 8. Z PCR produktů obou kombinací se pak namíchala sekvenační reakční směs, která byla po provedení potřebných kroků (viz kapitola 4.2.4 Sekvenování) analyzována na automatickém genetickém analyzátoru 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Poté proběhlo vyhodnocení elektroforetogramů získaných z genetického analyzátoru a jako nejvhodnější kombinace pro analýzu genotypů daného polymorfismu byla vybrána kombinace 4, která obsahovala přímý primer F1 a zpětný primer R1.

4.2.2 PCR reakce

Metoda polymerázové řetězové reakce sloužila k amplifikaci vybraného úseku DNA. Pro přípravu reakční směsi u genu leptin bylo použito:

- PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR) - 150 mM Tris-HCl (pH 8,8), 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl_2 , 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 H_2O .

PCR reakční směs byla připravována na ledu na konečný objem 10 μl . Konečné koncentrace jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR

Složka	Množství	Konečná koncentrace
PPM Master Mix	5 μl	1 \times
Přímý primer	0,2 μl	0,2 μM
Zpětný primer	0,2 μl	0,2 μM
dH₂O	4,1 μl	Do 10 μl

DNA	0,5 μ l	50 ng
Celkové množství	10 μ l	-

Pro stanovení optimálních podmínek pro PCR reakci byl využit automatický termální cykler GeneAmp PCR System 9700 s nastavením profilu pro teplotní gradient. PCR reakce probíhala za reakčních podmínek uvedených v tabulce 4. Teplotní gradient byl nastavený na teploty 60 °C, 62 °C a 64 °C. Po skončení programu byly PCR produkty rozděleny pomocí elektroforézy na 3% agarózovém gelu. Pro vizualizaci vzorků a pořízení záznamu byl použit dokumentační systém E-BOX VX5. Na základě posouzení daných vzorků byl vybrán teplotní profil s optimální teplotou annealingu, což pro naše podmínky odpovídalo 62 °C.

Tabulka 4: Gradientová PCR

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	1×	95 °C	3 min
Denaturace	30×	95 °C	30 s
Teplotní gradient	30×	-	30 s
Elongace	30×	72 °C	30 s
Závěrečná elongace	1×	72 °C	7 min
Chlazení	-	7 °C	∞

Reakční podmínky PCR, které nakonec byly v této práci použity, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Reakční podmínky pro PCR

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	1×	95 °C	3 min
Denaturace	30×	95 °C	30 s
Annealing	30×	62 °C	30 s
Elongace	30×	72 °C	30 s
Závěrečná elongace	1×	72 °C	7 min
Chlazení	-	7 °C	∞

Amplifikace probíhala na automatickém termálním cykleru PTC-200 Peltier Thermal Cycler a po proběhnutí PCR reakce byl výsledek ověřován pomocí agarózové gelové elektroforézy na 3% agarózovém gelu. PCR produkt se uchovával při teplotě -20 °C, pokud ho nebylo ihned potřeba pro další reakce.

4.2.3 Agarózová gelová elektroforéza

Po amplifikaci byla použita horizontální agarózová gelová elektroforéza, která sloužila k ověření přítomnosti PCR produktů. Koncentrace používaného agarózového gelu byla 3 %. Na přípravu 3% gelu byla použita agaróza Agarose (SERVA, Heidelberg, DE) o hmotnosti 1,8 g a TBE pufr (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) o objemu 60 ml. Ethidium bromid (Top Bio s.r.o., Praha, ČR), o koncentraci zásobního roztoku 5 mg/ml a konečné koncentraci v gelu 0,5 µg/ml, byl použit jako vizualizační barvivo. Jelikož PPP Master Mix již obsahoval nanášecí aditiva pro přímou vizualizaci na gelu, nebylo nutné používat nanášecí pufr při pipetování PCR produktu na gel. Do první jamky na gelu byly nanášeny 4 µl DNA hmotnostního markeru (50 bp nebo 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a do dalších jamek 4 µl PCR produktu. V tabulce 6 je uveden rozsah a velikosti fragmentů u použitých markerů.

Tabulka 6: Charakteristika hmotnostních markerů

M50	M100
1000	1000
900	900
800	800
700	700
600	600
500	500
400	400
300	300
250	200
200	100
150	
100	
50	

Elektroforéza pak probíhala v TBE pufru při napětí 4 V/cm po dobu 20 minut. Po dokončení elektroforézy byly vzorky vizualizovány pomocí Electronic UV Transilluminatoru a k pořízení záznamu byl použit fotoaparát Canon Power Shot G6.

4.2.4 Sekvenování

Pro určení genotypu u testovaného souboru býků byla použita metoda přímého sekvenování PCR produktů. Množství PCR produktu potřebné do sekvenační reakce se určilo na základě koncentrace PCR produktu (viz tabulka 7). Reakční směs pro sekvenaci byla připravena dle manuálu výrobce pomocí BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) na konečný objem 10 μ l (viz tabulka 8).

Tabulka 7: Potřebné množství PCR produktu

Koncentrace PCR produktu	Potřebné množství
Optimální	0,2 μ l
Dostačující	0,5 μ l
Hraniční	1 μ l

Tabulka 8: Složení sekvenační reakční směsi

Složka	Množství
Reakční mix	0,5 μ l
Pufr	1,75 μ l
Přímý primer	0,16 μ l
dH ₂ O	Do 10 μ l
PCR produkt	Dle tabulky
Celkové množství	10 μ l

Amplifikace probíhala v automatickém termálním cykléru GeneAmp PCR System 9700 za podmínek uvedených v tabulce 9.

Tabulka 9: Amplifikace PCR produktu

Fáze	Počet opakování	Teplota	Čas
Úvodní denaturace	1×	96 °C	1 min
Denaturace	25×	96 °C	10 s
Annealing	25×	50 °C	5 s
Elongace	25×	60 °C	4 min
Chlazení	-	4 °C	∞

Po dokončení amplifikace se hotová sekvenační směs purifikovala za pomoci Big-Dye[®] XTerminator[™] Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) dle přiloženého manuálu od výrobce z důvodu odstranění neinkorporovaných dideoxynukleotidů. Nakonec byly vzorky analyzovány pomocí automatického genetického analyzátoru 3500 Genetic Analyzer, který využívá kapilární elektroforézy. K vyhodnocení získaných dat byl využit program Sequence Analysis Software v5.4. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a Sequence Scanner Software v1.0. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

4.2.5 Chemická analýza

Níže uvedené chemické analýzy provedla Ing. Eliška Dračková, Ph.D. v biotechnologické laboratoři na Ústavu chovu a šlechtění zvířat.

4.2.5.1 Stanovení obsahu sušiny v mase

Vysoušením vzorku masa (2-5 g) do konstantní hmotnosti byl stanovován obsah sušiny. Vzorek se smíchal s vysušeným mořským pískem a byl předběžně vysoušen při 60°C v sušárně, poté se dosoušel do konstantní hmotnosti při 105°C. Po vychladnutí došlo k opětovnému zvážení vzorku a z rozdílu hmotností před a po vysoušení se stanovil obsah sušiny.

4.2.5.2 Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase

Obsah dusíku se stanovuje Kjeldahlovou metodou. Metoda se skládá z mineralizace, kdy dochází k přeměně dusíku na síran amonný, destilace a následné

titrace, kdy se stanoví obsah amonného iontu. Přepočet stanoveného obsahu dusíku na obsah bílkovin se provádí dle vzorce $N \times 6,25$.

4.2.5.3 Stanovení obsahu tuku v mase

Ke stanovení obsahu tuku v mase byla provedena extrakce v Soxhletově extraktoru. Sušina získaná v předchozím kroku se po dobu 6 hodin extrahovala ethyletherem, po extrakci byl zbytek rozpouštědla odpařen a vzorek se 1 hodinu sušil při 105°C. Obsah tuku byl pak stanoven rozdílem hmotností vzorku před a po provedené extrakci.

4.2.5.4 Stanovení obsahu popelovin

Obsah popelovin byl stanoven spálením vzorku po dobu 8 hodin v muflové peci při teplotě 550 – 600 °C.

4.2.5.5 Stanovení pH masa

Hodnota pH se definuje jako záporně vzatý dekadický logaritmus vodíkových iontů. K měření hodnoty pH masa došlo po 7 dnech jeho zrání v chladicím boxu a měření bylo prováděno vpichovou kombinovanou pH elektrodou v nepomletém, pouze skalpelem naříznutém vzorku.

4.2.5.6 Stanovení barvy masa

Pro měření barvy masa byla zvolena metoda CIELab, která se všeobecně používá pro hodnocení rozdílu barev. Stanovení proběhlo na spektrofotometru Konica Minolta CM – 2600d, výsledné hodnoty jsou dány měrnou světlostí L^* a podílem červeného (a^*) a žlutého spektra (b^*).

4.2.5.7 Stanovení obsahu mastných kyselin v mase

Tuk, který jsme předtím vyextrahovali, byl rozpuštěn v isooktanu a zhomogenizován v ultrazvuku. Do směsi byl přidán methanolát sodný (CH_3ONa) roztok se zahříval pod zpětným chladičem. Došlo k reakci lipidů s methanolátem sodným, v zásaditém prostředí dochází k poměrně rychlému štěpení esterové vazby a mastné kyseliny se z lipidů uvolňují v podobě methylesterů. Po přidání fluoridu boritého (BF_3) byl zneutralizován methanolát sodný, který doposud nezreagoval, a v acidickém prostředí byly esterifikovány případné volné mastné kyseliny. Do reagenční směsi se přidal isooktan,

do kterého byl následně krátce a intenzivně vytřepán nasycený vodný roztok NaCl a FAME (Fatty Acid Methyl Esters). Tím došlo k rozdělení organické a vodné fáze a FAME se analyzovaly metodou kapilární plynové chromatografie na plynovém chromatografu HP4890 s kapilární kolonou DB-23 (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm). K následnému měření byl vybrán 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, nástřík 2 μl. Jako nosný plyn se uplatnil dusík. Výsledné chromatogramy byly zpracovány v programu CSW station (verze 1.7, DataApex) a byly stanoveny následné obsahy 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-9 (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. dokosaheptaenová, DHA).

4.2.6 Matematicko – statistické zpracování dat

4.2.6.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

Po určení genotypů u vzorků byly stanoveny frekvence alel a genotypů podle rovnic uvedených v tabulkách 10 a 11.

Tabulka 10: Výpočet frekvencí genotypů (Urban, 2008)

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
CC	D	$d = \frac{D}{N}$
CT	H	$h = \frac{H}{N}$

TT	R	$r = \frac{R}{N}$
Σ	$D + H + R = N$	$d + h + r = 1$

Tabulka 11: Výpočet frekvencí alel (Urban, 2008)

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
C	$P = 2D + H$	$\frac{2D + H}{2N} = d + \frac{1}{2}h$
T	$Q = 2R + H$	$\frac{2R + H}{2N} = r + \frac{1}{2}h$
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

4.2.6.2 Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona

Po určení genotypů byl zjišťován rovnovážný stav populace podle Hardy-Weinbergova zákona, kde platí, že:

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

K vyhodnocení výsledků byl použit χ^2 (chí kvadrát) test neboli test dobré shody:

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

Kde platí, že:

P pozorovaná četnost genotypů

O očekávaná četnost genotypů

Σ suma

α hladina významnosti

$n - p - 1$ výpočet stupně volnosti

4.2.6.3 Asociační analýza

Asociační analýza pro vybrané hodnoty byla provedena v programu SAS v8.2 (SAS Institute Inc.) pomocí metody GLM (General Linear Model, zobecněný lineární model).

Pevným efektem byl zvolen efekt genotypu a efekt chovu a regrese na věk při porážce. K následnému výpočtu asociační analýzy byla navržena rovnice:

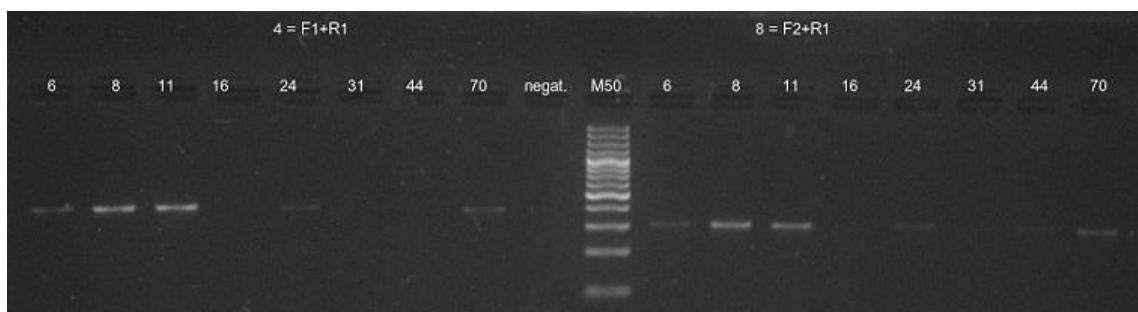
$$y_{ijk} = \mu + LEP_i + chov_j + b(věk_k) + e_{ijk}$$

Kde:	y_{ijk}	sledovaný znak
	μ	odhadovaný průměr sledovaného znaku
	LEP_i	pevný efekt i-tého genotypu genu
	$chov_j$	pevný efekt j-tého chovu
	$b(věk_k)$	regrese na věk při porážce
	e_{ijk}	náhodná chyba každého pozorování

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Návrh primerů

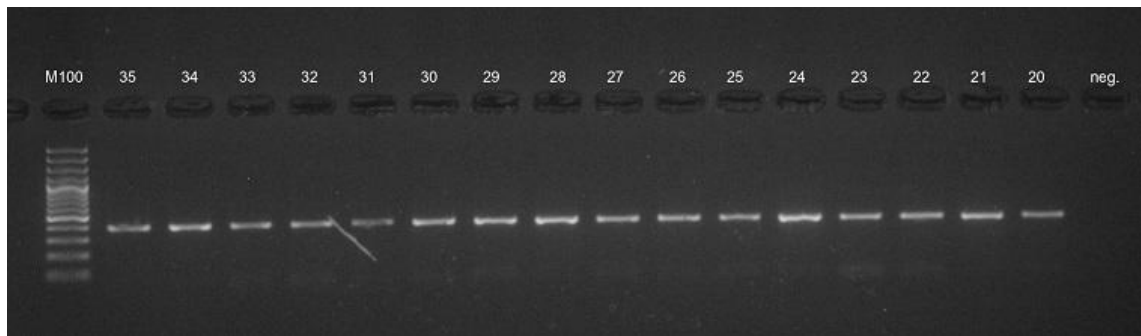
V počátcích práce bylo původním záměrem využít již navržených primerů pro polymorfismus UASMS1 od autorů Nkrumah *et al.* (2005). Výstupy z genetického analyzátoru však byly nečitelné a nepoužitelné pro další účely. Byly proto navrženy vlastní primery a zkoušely se jejich různé kombinace (i s původními převzatými). Po proběhnutí PCR reakce a ověření přítomnosti a kvality amplifikovaného produktu se některé kombinace ukázaly jako nevhodné, což mohlo být způsobeno nízkou specifitou primerů, kdy výsledkem PCR reakce byly nespecifické produkty, případně vyšší rozdíly teplot při nasedání primerů, kdy se jeden z nich naváže a u druhého k navázání na templát nedojde. V tomto případě při vizualizaci na gelu pak nevidíme žádný vzniklý PCR produkt. Po zhodnocení PCR reakce se ukázaly jako nejvhodnější kombinace 4 (F1 + R1) a 8 (F2 + R1), viz obrázek 3.



Obrázek 3: Výsledek PCR reakce kombinace primerů 4 a 8 na 3% agarózovém gelu

5.2 PCR

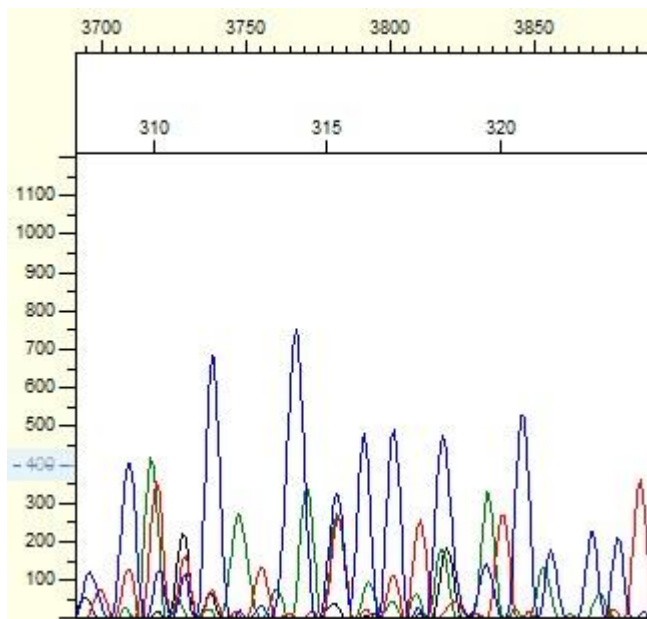
Polymorfismus UASMS1 v genu leptin byl amplifikován metodou PCR. Jedná se o jednonukleotidovou substituci C207T v 5' promotorové oblasti genu *LEP*, který se u skotu nachází na lokusu 4q32 na 4. chromozomu. K ověření přítomnosti a posouzení kvality amplifikovaného PCR produktu byla použita horizontální agarózová gelová elektroforéza, jako vizualizační barvivo vzorků sloužil ethidium bromid. Na obrázku je zobrazen záznam gelu po vizualizaci Electronic UV Transilluminátorem s jednotlivými amplifikovanými fragmenty.



Obrázek 4: 3% agarózový gel s amplifikovanými fragmenty genu *LEP*

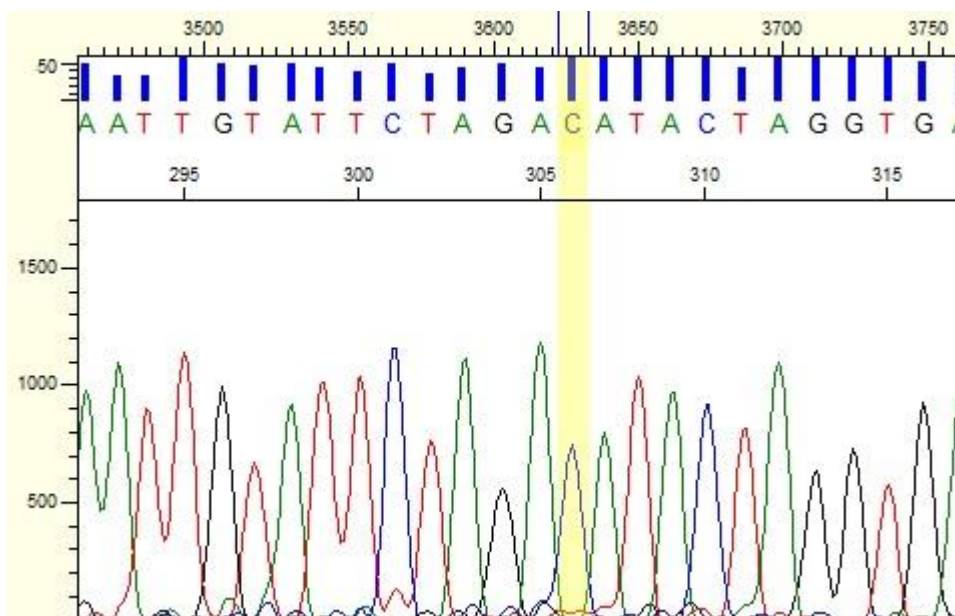
5.3 Sekvenování

K určení genotypů daného polymorfismu UASMS1 byla využita metoda přímého sekvenování PCR produktů. Pro zvolené kombinace primerů se namíchala sekvenační reakční směs s použitím přímých primerů a hodnotily se výsledné elektroforetogramy získané z automatického genetického analyzátoru. U kombinace 8 byla na výsledném elektroforetogramu zobrazena směsná sekvence (viz obrázek 5), což mohlo být zapříčiněno například přítomností pseudogenu.

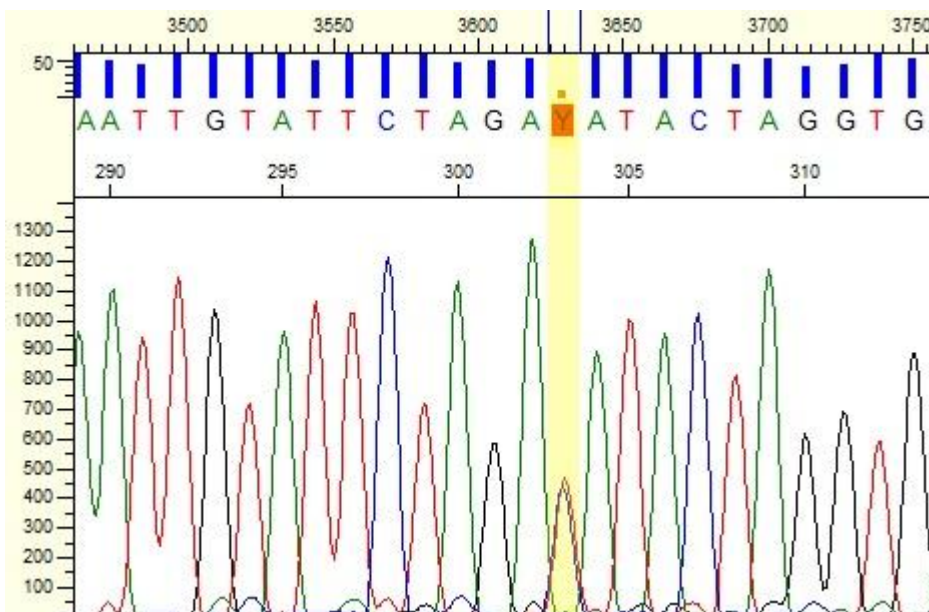


Obrázek 5: Výsledný elektroforetogram při kombinaci 8

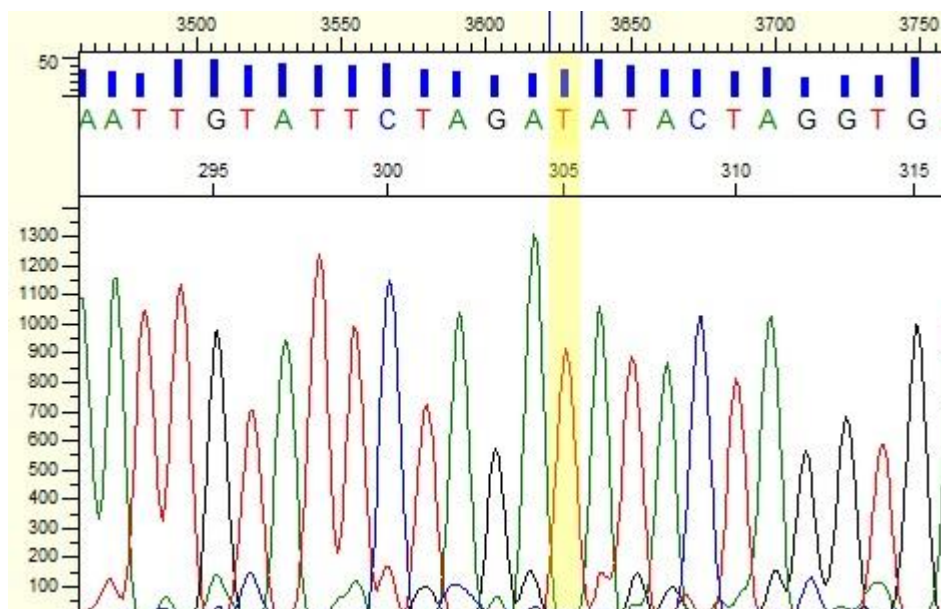
Po vyhodnocení elektroforetogramů byla pro další postup vybrána kombinace primerů 4, která obsahovala přímý primer F1 a zpětný primer R1. Na obrázcích 6, 7 a 8 níže jsou pak uvedeny ukázky elektroforetogramů, z kterých je jasně zřejmý i genotyp jedince.



Obrázek 6: Ukázka homozygota CC v polymorfismu UASMS1



Obrázek 7: Ukázka heterozygota *CT* v polymorfismu *UASMS1*



Obrázek 8: Ukázka homozygota *TT* v polymorfismu *UASMS1*

5.4 Matematicko – statistické vyhodnocení

5.4.1 Výpočet frekvencí alel a genotypů

Analyzovaná populace obsahovala celkem 236 jedinců a u všech jedinců byl určen jejich genotyp. K výpočtu absolutních a relativních frekvencí alel a genotypů byly využity vzorce z tabulek v kapitole Výpočet frekvencí alel a genotypů.

Tabulka 12: Absolutní a relativní frekvence genotypů

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>CC</i>	6	0,03
<i>CT</i>	100	0,42
<i>TT</i>	130	0,55
Σ	236	1

Tabulka 13: Absolutní a relativní frekvence alel

Alela	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
<i>C</i>	112	0,24
<i>T</i>	360	0,76
Σ	472	1

Ze zjištěných genotypů polymorfismu UASMS1 se stanovila frekvence alel a genotypů (viz tabulka 12 a 13). Ve zkoumané populaci 236 býků tvořil nejpočetnější skupinu genotyp *TT*, který čítal 130 jedinců. Druhým nejvíce zastoupeným genotypem byl genotyp *CT*, který byl stanoven u 100 jedinců a nejméně zastoupen byl genotyp *CC*, který byl detekován pouze u 6 kusů. Relativní frekvence genotypů jsou pak pro genotyp *CC* 3 %, pro genotyp *CT* 42 % a pro genotyp *TT* 55 %. Nejvíce byla v populaci zastoupena alela *T*, jejíž relativní frekvence činila 76 %, u alely *C* pak tato frekvence byla 24 %.

Nkrumah *et al.* (2005) ve své práci uvádí frekvenci alely *T* 59 % a alely *C* 41 % zjištěné u experimentální skupiny hybridního skotu. Převahu frekvence alely *T* nad alelou *C* potvrzuje i Schenkel *et al.* (2005) na hybridní populaci skotu s hodnotami 61,1 % pro alelu *T* a 38,9 % pro alelu *C*, Gill *et al.* (2009) také na hybridní populaci skotu s hodnotami 58 % u alely *T* a 48 % u alely *C*, Clempson *et al.* (2011) u populace holštýnského skotu publikuje hodnotu 59,5 % pro alelu *T* a 40,5 % pro alelu *C* a v populaci brahmanského skotu s 98,8% převahou alely *T* a pouze 2,2% obsahem alely *C* (da Silva *et al.*, 2012). I když doposud zjištěné hodnoty frekvencí alel mají poměrně široký rozptyl, lze říct, že ze studií vyplývá, že v populaci skotu se vyskytuje predominance alely *T*, což se ukázalo i v mé zkoumané populaci býků.

5.4.2 Hodnocení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona

Stanovení genetické rovnováhy bylo provedeno dle Hardy-Weinbergova zákona a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 14: Výpočet genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona

	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	Σ
P_A	6	100	130	236
O_R	0,0562	0,3617	0,5821	1
O_A	13,2632	85,3612	137,3756	100
$d = (P - O_A)$	-7,2632	14,6388	-7,3756	
$\chi^2 = \frac{(P-O_A)^2}{O_A}$	3,9775	2,5104	0,3960	6,8839

Kde platí, že:

P_A pozorované absolutní frekvence genotypů

O_R očekávané relativní frekvence genotypů

O_A očekávané absolutní frekvence genotypů

d rozdíl mezi pozorovanou a očekávanou absolutní frekvencí genotypů

χ^2 chí kvadrát

Stupeň volnosti (df) pro gen, který má tři genotypy a dvě alely, se vypočítá podle vzorce $df = \text{počet znaků} - \text{počet kategorií} - 1$, což v mém případě bylo $df = 3 - 1 - 1 = 1$, tudíž stupeň volnosti je roven 1.

Tabulka 15: Srovnání vypočítaných a tabulkových hodnot χ^2

Hladina významnosti	Tabulková hodnota χ^2 – stupeň volnosti 1	Vypočítaná hodnota χ^2
0,01	6,35	6,8839
0,05	3,84	6,8839

Podle Hardy-Weinbergova zákona platí, že pokud je tabulková hodnota χ^2 nižší než vypočítaná hodnota, pak je průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými frekvencemi genotypů a populace není v genetické rovnováze. Po srovnání mnou vypočítá-

ných hodnot s tabulkovými hodnotami vyplynulo, že analyzovaná populace býků není v genetické rovnováze (viz tabulka 15).

5.4.3 Asociační analýza

Pro následnou asociační analýzu bylo vyřazeno pět jedinců kvůli jejich vysokému věku při porážce, což ovlivňuje množství a obsah ukládaného tuku. Údaje o obsahu mastných kyselin byly dostupné pouze u 155 kusů býků. V tabulce 16 jsou uvedeny počty kusů, průměrné hodnoty, rozptyl, směrodatná odchylka a minimální a maximální hodnota pro vybrané ukazatele. V tabulce 17 je pak uveden vliv polymorfismu na jednotlivé ukazatele kvality masa a obsah mastných kyselin u analyzované populace skotu.

Tabulka 16: Popisná analýza vybraných ukazatelů

Ukazatel	Počet kusů	Průměr	Rozptyl	Směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Sušina	231	25,2300	1,2950	1,1380	21,8400	29,9300
Tuk	231	1,9942	1,1844	1,0883	0,2600	7,8600
Bílkoviny	231	21,2105	0,4756	0,6897	19,0200	22,7200
N-látky	231	3,3919	0,0122	0,1106	3,0400	3,6400
Popel	231	1,0800	0,0023	0,0486	0,8300	1,2400
Vaznost	231	80,9782	15,2595	3,9064	73,1100	95,7000
Barva	231	3,8668	0,5991	0,7741	2,0330	6,3950
pH	231	5,6489	0,0729	0,2701	5,4100	6,8400
C12:0	155	0,0707	0,0005	0,0223	0,0340	0,2060
C14:0	155	2,6652	0,2138	0,4624	1,4110	4,0350
C14:1	155	0,4215	0,0340	0,1845	0,0850	1,1270
C16:0	155	27,9318	3,6814	1,9187	21,0880	32,0300
C16:1	155	2,9351	0,5267	0,7257	1,1340	5,0130
C18:0	155	19,4707	9,2445	3,0405	12,9410	27,9040
C18:1	155	40,7186	10,5815	3,2530	26,9080	48,2770
C18:2, n-6	155	3,7295	2,9898	1,7291	1,8070	16,3740
C18:3, n-6	155	0,1276	0,0014	0,0374	0,0460	0,2980
C18:3, n-3	155	0,4322	0,0146	0,1208	0,2670	1,3500
C18:2, n-9	155	0,2048	0,0043	0,0657	0,0390	0,3460

C20:0	155	0,1472	0,0031	0,0558	0,0830	0,4960
C20:1	155	0,1804	0,0017	0,0421	0,0970	0,3220
C20:4, n-6	155	0,5299	0,3814	0,6176	0,0490	5,3760
C20:5, n-3	155	0,0560	0,0088	0,0938	0,0040	0,6300
C22:4, n-6	155	0,1037	0,0139	0,1183	0,0100	0,9540
C22:5, n-6	155	0,0642	0,0111	0,1055	0,0040	0,7360
C22:5, n-3	155	0,1597	0,0308	0,1756	0,0130	1,2750
C22:6, n-3	155	0,0514	0,0063	0,07989	0,0040	0,5840

Tabulka 17: Vliv genotypu polymorfismu UASMS1 na vybrané ukazatele

Ukazatel	Genotyp polymorfismu			Průkaznost (p) u jednotlivých genotypů		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC-CT</i>	<i>CC-TT</i>	<i>CT-TT</i>
	LSM±SE	LSM±SE	LSM±SE			
Sušina	24,7655± 0,4839	25,5985± 0,2487	25,4633± 0,2384	0,0746	0,1321	0,3705
Tuk	1,6733± 0,4766	2,3888± 0,2449	2,1857± 0,2348	0,1196	0,2610	0,1725
Bílkoviny	21,0293± 0,3068	21,2719± 0,1577	21,2733± 0,1512	0,4115	0,4056	0,9887
N-látky	3,3650± 0,0491	3,3987± 0,0252	3,4024± 0,0242	0,4764	0,4252	0,8051
Popel	1,1234± 0,0212	1,0915± 0,0109	1,0962± 0,0104	0,1192	0,1815	0,4726
Vaznost	79,1751± 1,7063	80,4170± 0,8769	81,2818± 0,8406	0,4496	0,1970	0,1049
Barva	3,9574± 0,2912	3,7252± 0,1496	3,9008± 0,1434	0,4076	0,8387	0,0541
pH	5,5138± 0,1181	5,5514± 0,0607	5,5856± 0,0582	0,7411	0,5252	0,3535
C12:0	0,0678± 0,0176	0,0697± 0,0082	0,0651± 0,0078	0,9072	0,8664	0,2119
C14:0	2,3411±	2,7910±	2,6905±	0,1746	0,2898	0,1821

	0,3625	0,1691	0,1607			
C14:1	0,4279±	0,6121±	0,5379±	0,1521	0,3900	0,0117
	0,1406	0,0656	0,0623			
C16:0	27,6043±	29,3109±	28,9598±	0,2159	0,3238	0,2624
	1,5091	0,7040	0,6690			
C16:1	2,4776±	3,2715±	2,8691±	0,1174	0,4373	0,0006
	0,5540	0,2584	0,2456			
C18:0	19,7420±	16,6017±	18,2287±	0,1215	0,4529	0,0005
	2,2163	1,0339	0,9825			
C18:1	39,3516±	42,6596±	41,9003±	0,1514	0,2670	0,1474
	2,5213	1,1762	1,1178			
C18:2, n-6	5,4968±	2,8769±	2,9882±	0,0340	0,0417	0,6899
	1,3460	0,6279	0,5967			
C18:3, n-6	0,0803±	0,1308±	0,1262±	0,0622	0,0889	0,4502
	0,0295	0,0138	0,0131			
C18:3, n-3	0,5516±	0,3927±	0,4007±	0,0688	0,0829	0,6861
	0,0952	0,0444	0,0422			
C18:2, n-9	0,1534±	0,2413±	0,2317±	0,0613	0,0939	0,3699
	0,0512	0,0239	0,0227			
C20:0	0,1537±	0,1355±	0,1423±	0,6522	0,7764	0,4612
	0,0444	0,0207	0,0196			
C20:1	0,1811±	0,1933±	0,1817±	0,6846	0,9829	0,0918
	0,0329	0,0153	0,0146			
C20:4, n-6	0,9747±	0,4020±	0,3832±	0,2017	0,1861	0,8532
	0,4908	0,2289	0,2175			
C20:5, n-3	0,0257±	0,0332±	0,0323±	0,9121	0,9219	0,9558
	0,0749	0,0349	0,0332			
C22:4, n-6	0,1281±	0,0732±	0,0772±	0,5226	0,5521	0,8380
	0,0941	0,0439	0,0417			
C22:5, n-6	0,0379±	0,0498±	0,0372±	0,8775	0,9925	0,4723
	0,0842	0,0393	0,0373			
C22:5, n-3	0,1541±	0,1238±	0,1237±	0,8130	0,8121	0,9980
	0,1403	0,0654	0,0622			

C22:6, n-3	0,0500±	0,0308±	0,0237±	0,7406	0,6497	0,5919
	0,0636	0,0296	0,0282			

Pozn.: LSM±SE = Least Squares Mean ± Standart Error

Cílem této práce bylo dokázat vliv genotypu v polymorfismu UASMS1 v genu leptin na jednotlivé ukazatele kvality masa. Statisticky průkazná hodnota je ověřena, pokud je hodnota $p < 0,05$. Pokud je hodnota $p < 0,01$, pak se jedná o hodnotu s vysokou průkazností. Z výsledků uvedených v tabulce vyplývá, že pro polymorfismus UASMS1 a jeho vliv na obsah sušiny se hodnoty pouze blíží průkaznosti u genotypu *CC* a *CT* ($p = 0,0746$). Pokud jde o vliv polymorfismu na barvu masa, pak byl pozorován téměř průkazný rozdíl mezi genotypy *CT* a *TT* ($p = 0,0541$). Průkaznost byla zjištěna u obsahu kyseliny myristolejové (C14:1) mezi genotypy *CC* a *TT* ($p = 0,0117$) a dále u kyseliny linolelaidové (C18:2, n-6) u genotypů *CC* a *CT* ($p = 0,0340$) a i u genotypů *CC* a *TT* ($p = 0,0417$). Vysoce průkazné rozdíly hodnot byly pozorovány u kyseliny palmitolejové (C16:1) mezi genotypy *CC* a *TT* ($p = 0,0006$) a kyseliny stearové (C18:0) u těchto genotypů ($p = 0,0005$). Za pomoci metody nejmenších čtverců (LSM) a její standardní chyby (\pm SE) byly vypočteny hodnoty pro kyselinu linolelaidovou $5,4968 \pm 1,3460$ u genotypu *CC*, $2,8769 \pm 0,6279$ u genotypu *CT* a $2,9882 \pm 0,5967$ u genotypu *TT*. Jelikož nejvyšší hodnota byla u genotypu *CC*, dá se říct, že alela *C* pozitivně ovlivňuje obsah kyseliny linolelaidové.

Z výsledků zjištěných v této studii vyplývá, že daný polymorfismus UASMS1 nemá vysoce průkazný ani průkazný vliv na obsah sušiny, tuku, bílkovin, dusíkatých látek, popela ani na vaznost, barvu a hodnotu pH. Vliv na obsah mastných kyselin byl pozorován pouze u kyselin zmiňovaných výše.

V publikacích je uvedeno, že polymorfismy UASMS1 a UASMS3 jsou kompletně propojeny, vykazují stejnou Mendelistickou dědičnost a i stejné asociace s ukazateli kvality masa (Nkrumah *et al.*, 2005; Schenkel *et al.*, 2005). Proto pokud byl zkoumán polymorfismus UASMS 1 a UASMS3, byl pak pro další analýzy a studie vybrán pouze jeden z nich, s nímž se následně pracovalo. Zde uvedené studie se doposud zabývaly asociací polymorfismu UASMS1 s níže uvedenými vlastnostmi, ale žádná z nich se nezabývala vlivem na obsah jednotlivých mastných kyselin.

Schenkel *et al.* (2005) se ve své studii zabýval studiem pěti SNP v genu leptin u skotu a jejich možným vlivem na obsah tuku a libové svaloviny, stupeň protučnění, jakostní třídu, obsah intramuskulárního tuku a křehkost. Zjistil, že pro polymorfismus

UASMS1 je alela *C* spojena s nižším obsahem tuku, odhadovaný rozdíl mezi homozygotními genotypy *CC* a *TT* byl roven $-1,5\%$ s průkazností $p < 0,05$. Dále uvádí, že alela *C* by mohla být spojována ($p < 0,15$) s nižším stupněm protučnění a naopak s vyšším obsahem libového masa, odhadované rozdíly mezi genotypy *CC* a *TT* byly $-0,6$ mm pro tuk a o $1,4\%$ vyšší obsah libové svaloviny. Zjištění, že alela *C* má vliv na nižší obsah tuku, odpovídá i studii autorů Nkrumah *et al.* (2005), kteří pozorovali asociace polymorfismu s tloušťkou hřbetního tuku. Nkrumah *et al.* (2005) dále uvádí, že zvířata s genotypem *TT* v testu spotřebovala více krmiva, ($p < 0,001$), měla tendenci k vyššímu příjmu zbytkového krmiva ($p = 0,09$), v průběhu testu měla vyšší hmotnost ($p = 0,02$) a sklony k rychlejšímu růstu ($p = 0,08$) než zvířata s genotypem *CT* nebo *CC*. Výška hřbetního tuku byla u zvířat s genotypem *TT* také vyšší. Nicméně však dospěl k závěru, že zvířata s různými genotypy se nelišila v koncentraci leptinového séra, konverzi krmiv, stupni mramorování a ani v obsahu libového masa (Nkrumah *et al.*, 2005). I když předchozí práce dokládají vliv polymorfismu UASMS1 na obsah tuku, Gill *et al.* (2009) nezjistili žádný vztah genotypu v daném polymorfismu na tuto vlastnost.

Clempson *et al.* (2011) se ve své práci zabýval vztahem polymorfismu UASMS1 s reprodukčními vlastnostmi a vlivem na produkci mléka u populace krav holštýnského plemene. Nezjistili však žádné průkazné asociace polymorfismu UASMS1 s produkcí mléka v dané populaci krav, ale průkazné hodnoty objevili v souvislosti s plodností. Uvádí, že daný polymorfismus má vliv na délku mezidobí, přičemž genotyp *TT* snižuje délku mezidobí o více než 20 dní. Giblin *et al.* (2010) prováděli studii také na populaci plemene holštýnského skotu, avšak ve své publikaci spojují alelu *T* ($p < 0,05$) se sníženou koncentrací mléčného tuku, sníženou koncentrací bílkovin a delší délkou březosti. Dále také uvádějí, že by mohla mít vliv ($p < 0,1$) na zvýšené obtíže při otelení, perinatální úmrtnost telat a na počet somatických buněk v mléce.

V porovnání s předchozími studiemi se v mé práci nepodařilo prokázat vliv polymorfismu UASMS1 na obsah tuku ani na další parametry ukazatele kvality masa (s výjimkou obsahu některých mastných kyselin). To mohlo být způsobeno zkoumáním odlišné populace zvířat, kdy se v mém případě jednalo o zvířata plemene český strakatý skot, který se chová jako plemeno s kombinovanou užitkovostí. Naproti tomu uvedení autoři, s výjimkou Clempson *et al.* (2011) a Giblin *et al.* (2010), použili pro své studie křížence typicky masných plemen skotu, jako jsou například aberdeen angus, blonde d'aquitaine, hereford, charolais, simmental a další. Jelikož jsou zkoumané vlastnosti polygenní, projevuje se určitou mírou i vliv vnějšího prostředí, proto výsledky této práce mohlo ovliv-

nit i prostředí, ve kterém byla zvířata chována, typ chovu, ale také obsah a složení krmných dávek. Další možností, proč se dané asociace nepotvrdily, může být to, že zkoumaný polymorfismus má samostatně pouze malý vliv a ukazatele kvality masa jsou řízeny tzv. minogeny. Interakce mezi těmito geny jsou velmi složité a komplexní. Hodnoty, které se pouze blížily průkaznosti, pro obsah sušiny ($p = 0,0746$) u genotypu *CC* a *TT* a barvu masa ($p = 0,0541$) u genotypu *CT* a *TT*, by se pravděpodobně potvrdily, pokud by počet jedinců ve zkoumané populaci byl vyšší.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provedení asociační analýzy jednonukleotidového polymorfismu UASMS1 v genu leptin s parametry kvality hovězího masa u vybraného souboru 236 býků plemene český strakatý skot.

Po optimalizaci podmínek metody PCR a provedení PCR reakce byly jednotlivé genotypy stanoveny přímým sekvenováním PCR produktů. Zjištěné genotypy pak byly zpracovány do databáze spolu s hodnotami pro jednotlivé ukazatele kvality masa a následovalo jejich statistické vyhodnocení. Ve zkoumané populaci býků převažovala alela *T* s frekvencí 76 %, alela *C* pak měla frekvenci 24 %. V porovnání s ostatními studii se i zde potvrdila predominance alely *T*. Průkaznost byla zjištěna v obsahu kyseliny myristoolejové v genotypu *CT* a *TT* ($p = 0,0117$), u kyseliny linolelaidové v genotypu *CC* a *CT* ($p = 0,0340$) i *CC* a *TT* ($0,0417$), kdy nejvyšší odhadnutá střední hodnota pro obsah kyseliny linolelaidové v mase byla v genotypu *CC*. Vysoce průkazné hodnoty pak byly zjištěny pro kyselinu palmitoolejovou v genotypu *CT* a *TT* ($p = 0,0006$) a pro kyselinu stearovou taktéž v genotypu *CT* a *TT* ($p = 0,0005$). Pro sušinu v genotypu *CC* a *CT* ($p = 0,0746$) a barvu masa v genotypu *CT* a *TT* ($p = 0,0541$) se hodnoty pouze blížily průkaznosti. Asociace polymorfismu UASMS1 s dalšími vybranými parametry kvality hovězího masa nebyla prokázána.

Na základě předložené práce nelze jednoznačně vyloučit vliv polymorfismu UASMS1 na jednotlivé ukazatele kvality hovězího masa. Nicméně jelikož se jedná o polygenní vlastnosti, doporučuji rozsáhlejší studii zaměřenou na více polymorfismů a jejich vzájemné interakce.

7 LITERATURA

- Ailhaud, G., P. Grimaldi and R. Negrel** (1992). "Cellular and molecular aspects of adipose tissue development." *Annu Rev Nutr* 12: 207-233.
- Anton, I., K. Kovacs, L. Fesus, J. Varhegyi, L. Lehel, Z. Hajda, J. P. Polgar, F. Szabo and A. Zsolnai** (2008). "Effect of DGAT1 and TG gene polymorphisms on intramuscular fat and on milk production traits in different cattle breeds in Hungary." *Acta Vet Hung* 56(2): 181-186.
- Anton, I., K. Kovács, G. Holló, V. Farkas, L. Lehel, Z. Hajda and A. Zsolnai** (2011). "Effect of leptin, DGAT1 and TG gene polymorphisms on the intramuscular fat of Angus cattle in Hungary." *Livestock Science* 135(2-3): 300-303.
- Barendse, W., R. J. Bunch, M. B. Thomas and B. E. Harrison** (2009). "A splice site single nucleotide polymorphism of the fatty acid binding protein 4 gene appears to be associated with intramuscular fat deposition in longissimus muscle in Australian cattle." *Anim Genet* 40(5): 770-773.
- Barendse, W., D. Vaiman, S. J. Kemp, Y. Sugimoto, S. M. Armitage, J. L. Williams, H. S. Sun, A. Eggen, M. Agaba, S. A. Aleyasin, M. Band, M. D. Bishop, J. Buitkamp, K. Byrne, F. Collins, L. Cooper, W. Coppettiers, B. Denys, R. D. Drinkwater, K. Easterday, C. Elduque, S. Ennis, G. Erhardt, L. Li and et al.** (1997). "A medium-density genetic linkage map of the bovine genome." *Mamm Genome* 8(1): 21-28.
- Barton, L., T. Kott, D. Bures, D. Rehak, R. Zahradkova and B. Kottova** (2010). "The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls." *Meat Sci* 85(1): 15-20.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall and A. L. Lock** (2006). "Major advances associated with the biosynthesis of milk." *J Dairy Sci* 89(4): 1235-1243.
- Bjorbaek, C., S. Uotani, B. da Silva and J. S. Flier** (1997). "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor." *J Biol Chem* 272(51): 32686-32695.
- Bonnet, M., Y. Faulconnier, C. Leroux, C. Jurie, I. Cassar-Malek, D. Bauchart, P. Boulesteix, D. Pethick, J. F. Hocquette and Y. Chilliard** (2007). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and leptin are related to marbling differences among Limousin and Angus or Japanese Black x Angus steers." *J Anim Sci* 85(11): 2882-2894.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis** (1980). "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms." *Am J Hum Genet* 32(3): 314-331.
- Buchanan, F. C., C. J. Fitzsimmons, A. G. Van Kessel, T. D. Thue, D. C. Winkelman-Sim and S. M. Schmutz** (2002). "Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels." *Genet Sel Evol* 34(1): 105-116.
- Casas, E., S. N. White, D. G. Riley, T. P. Smith, R. A. Brenneman, T. A. Olson, D. D. Johnson, S. W. Coleman, G. L. Bennett and C. C. Chase, Jr.** (2005). "Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle." *J Anim Sci* 83(1): 13-19.
- Cases, S., S. J. Smith, Y. W. Zheng, H. M. Myers, S. R. Lear, E. Sande, S. Novak, C. Collins, C. B. Welch, A. J. Lusk, S. K. Erickson and R. V. Farese, Jr.** (1998). "Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13018-13023.

- Clark, D. L., D. D. Boler, L. W. Kutzler, K. A. Jones, F. K. McKeith, J. Killefer, T. R. Carr and A. C. Dilger** (2011). "Muscle gene expression associated with increased marbling in beef cattle." *Anim Biotechnol* 22(2): 51-63.
- Clempson, A. M., G. E. Pollott, J. S. Brickell, N. E. Bourne, N. Munce and D. C. Wathes** (2011). "Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows." *J Dairy Sci* 94(7): 3618-3628.
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer and E. C. K. Pang** "An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts." *Euphytica* 142(1): 169-196.
- Curi, R. A., L. A. L. Chardulo, M. D. B. Arrigoni, A. C. Silveira and H. N. de Oliveira** (2011). "Associations between LEP, DGAT1 and FABP4 gene polymorphisms and carcass and meat traits in Nelore and crossbred beef cattle." *Livestock Science* 135(2-3): 244-250.
- da Silva, R. C., J. B. Ferraz, F. V. Meirelles, J. P. Eler, J. C. Balieiro, D. C. Cucco, E. C. Mattos, F. M. Rezende and S. L. Silva** (2012). "Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin and leptin receptor genes with growth and ultrasound carcass traits in Nelore cattle." *Genet Mol Res* 11(4): 3721-3728.
- Darimont, C., D. Gaillard, G. Ailhaud and R. Negrel** (1993). "Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine." *Mol Cell Endocrinol* 98(1): 67-73.
- Dekkers, J. C.** (2004). "Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons." *J Anim Sci* 82 E-Suppl: E313-328.
- Dovc, P., T. Kavav, H. Solkner and R. Achmann** (2006). "Development of the Lipizzan horse breed." *Reprod Domest Anim* 41(4): 280-285.
- Ducy, P., M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, A. F. Schilling, F. T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J. M. Rueger and G. Karsenty** (2000). "Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay: A Central Control of Bone Mass." *Cell* 100(2): 197-207.
- Ellies-Oury, M. P., Y. Durand, F. Delamarche, M. Jouanno, J. Lambert, D. Micol and R. Dumont** (2013). "Relationships between the assessment of "grain of meat" and meat tenderness of Charolais cattle." *Meat Sci* 93(3): 397-404.
- ENSEMBL.** (2016, March 2016). "Gene LEP." Retrieved 28.4.2016, from http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Location/View?db=core;g=ENSBTAG00000014911;r=4:93249874-93266624;t=ENSBTAT00000019853.
- Fitzsimmons, C. J., S. M. Schmutz, R. D. Bergen and J. J. McKinnon** (1998). "A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle." *Mamm Genome* 9(6): 432-434.
- Fortes, M. R., R. A. Curi, L. A. Chardulo, A. C. Silveira, M. E. Assumpcao, J. A. Visintin and H. N. de Oliveira** (2009). "Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness." *Genet Mol Biol* 32(1): 75-82.
- Fu, L., M. S. Patel, A. Bradley, E. F. Wagner and G. Karsenty** (2005). "The Molecular Clock Mediates Leptin-Regulated Bone Formation." *Cell* 122(5): 803-815.
- Garcia, M. R., M. Amstalden, S. W. Williams, R. L. Stanko, C. D. Morrison, D. H. Keisler, S. E. Nizielski and G. L. Williams** (2002). "Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle." *J Anim Sci* 80(8): 2158-2167.
- Gargiulo, C. E., S. M. Stuhlsatz-Krouper and J. E. Schaffer** (1999). "Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane." *J Lipid Res* 40(5): 881-892.

- Geary, T. W., E. L. McFadin, M. D. MacNeil, E. E. Grings, R. E. Short, R. N. Funston and D. H. Keisler** (2003). "Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle1." *Journal of Animal Science* 81(1).
- Giblin, L., S. T. Butler, B. M. Kearney, S. M. Waters, M. J. Callanan and D. P. Berry** (2010). "Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires." *BMC Genetics* 11(1): 1-10.
- Gobert, M., T. Sayd, P. Gatellier and V. Sante-Lhoutellier** (2014). "Application to proteomics to understand and modify meat quality." *Meat Sci* 98(3): 539-543.
- Green, E. D., M. Maffei, V. V. Braden, R. Proenca, U. DeSilva, Y. Zhang, S. C. Chua, Jr., R. L. Leibel, J. Weissenbach and J. M. Friedman** (1995). "The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7." *Genome Res* 5(1): 5-12.
- Grisart, B., W. Coppieters, F. Farnir, L. Karim, C. Ford, P. Berzi, N. Cambisano, M. Mni, S. Reid, P. Simon, R. Spelman, M. Georges and R. Snell** (2002). "Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition." *Genome Res* 12(2): 222-231.
- Guo, Y., H. Chen, X. Lan, B. Zhang, C. Pan, L. Zhang, C. Zhang and M. Zhao** (2008). "Novel SNPs of the bovine LEPR gene and their association with growth traits." *Biochem Genet* 46(11-12): 828-834.
- Hoashi, S., T. Hinenoya, A. Tanaka, H. Ohsaki, S. Sasazaki, M. Taniguchi, K. Oyama, F. Mukai and H. Mannen** (2008). "Association between fatty acid compositions and genotypes of FABP4 and LXR-alpha in Japanese black cattle." *BMC Genet* 9: 84.
- Hocquette, J.-F., R. Botreau, B. Picard, A. Jacquet, D. W. Pethick and N. D. Scollan** (2012). "Opportunities for predicting and manipulating beef quality." *Meat Science* 92(3): 197-209.
- Hocquette, J. F., F. Gondret, E. Baeza, F. Medale, C. Jurie and D. W. Pethick** (2010). "Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers." *Animal* 4(2): 303-319.
- Houseknecht, K. L., C. A. Baile, R. L. Matteri and M. E. Spurlock** (1998). "The biology of leptin: a review." *J Anim Sci* 76(5): 1405-1420.
- Houseknecht, K. L., C. S. Mantzoros, R. Kuliawat, E. Hadro, J. S. Flier and B. B. Kahn** (1996). "Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity." *Diabetes* 45(11): 1638-1643.
- Huang, C.-W., Y.-S. Cheng, R. Rouvier, K.-T. Yang, C.-P. Wu, H.-L. Huang and M.-C. Huang** (2009). "Duck (*Anas platyrhynchos*) linkage mapping by AFLP fingerprinting." *Genetics Selection Evolution* 41(1): 1-8.
- Huidobro, d. R. F., E. Miguel, E. Onega and B. Blazquez** (2003). "Changes in meat quality characteristics of bovine meat during the first 6 days post mortem." *Meat Sci* 65(4): 1439-1446.
- Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha and M. W. Pariza** (1992). "Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens." *Journal of Food Composition and Analysis* 5(3): 185-197.
- Choudhary, V., P. Kumar, T. K. Bhattacharya, B. Bhushan and A. Sharma** (2005). "DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle." *Genetics and Molecular Biology* 28: 740-742.

- Chung*, E. R., S. C. Shin, K. H. Shin and K. Y. Chung** (2008). "SNP Discovery in the Leptin Promoter Gene and Association with Meat Quality and Carcass Traits in Korean Cattle." *Asian Australas. J. Anim. Sci* 21(12): 1689-1695.
- Jin, L., B. G. Burguera, M. E. Couce, B. W. Scheithauer, J. Lamsan, N. L. Eberhardt, E. Kulig and R. V. Lloyd** (1999). "Leptin and Leptin Receptor Expression in Normal and Neoplastic Human Pituitary: Evidence of a Regulatory Role for Leptin on Pituitary Cell Proliferation." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84(8): 2903-2911.
- Kgwatalala, P. M., E. M. Ibeagha-Awemu, J. F. Hayes and X. Zhao** (2007). "Single nucleotide polymorphisms in the open reading frame of the stearoyl-CoA desaturase gene and resulting genetic variants in Canadian Holstein and Jersey cows." *DNA Seq* 18(5): 357-362.
- Kim, Y. C. and J. M. Ntambi** (1999). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* 266(1): 1-4.
- Kononoff, P. J., H. M. Deobald, E. L. Stewart, A. D. Laycock and F. L. Marquess** (2005). "The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle." *J Anim Sci* 83(4): 927-932.
- Lapsys, N. M., A. D. Kriketos, M. Lim-Fraser, A. M. Poynten, A. Lowy, S. M. Furler, D. J. Chisholm and G. J. Cooney** (2000). "Expression of genes involved in lipid metabolism correlate with peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human skeletal muscle." *J Clin Endocrinol Metab* 85(11): 4293-4297.
- Lebret, B., M. Povse Prevolnik and M. Candek-Potokar** (2015). Muscle and fat colour. *Handbook of Reference Methods for the Assessment of Meat Quality Assessment Parameters*. F. A. I. COST: 33-44.
- Lisa, C., S. Sartore and L. Di Stasio** (2007). "Variability of Leptin gene promoter in cattle." *Italian Journal of Animal Science* 6(sup1): 150-152.
- Listrat, A., B. Lebret, I. Louveau, T. Astruc, M. Bonnet, L. Lefaucheur, B. Picard and J. Bugeon** (2016). "How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality." *ScientificWorldJournal* 2016: 3182746.
- Liu, Q., R. M. Siloto, R. Lehner, S. J. Stone and R. J. Weselake** (2012). "Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology." *Prog Lipid Res* 51(4): 350-377.
- Liu, Y. L., M. Cheng, M. F. Jiang, Y. Wang, J. Wang and X. H. Fu** (2014). "Genetic diversity analysis of eight indigenous goat breeds (groups) in China using AFLP markers." *Russian Journal of Genetics* 50(12): 1294-1301.
- Liu, Z. J. and J. F. Cordes** (2004). "DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics." *Aquaculture* 238(1-4): 1-37.
- Mancini, R. A. and M. C. Hunt** (2005). "Current research in meat color." *Meat Sci* 71(1): 100-121.
- Mannen, H.** (2011). "Identification and utilization of genes associated with beef qualities." *Anim Sci J* 82(1): 1-7.
- Mateescu, R. G.** (2015). Genetics of Meat Quality. *The Genetics of Cattle*. C. I. 2015: 545-552.
- Matteis, G. D., M. C. Scatena, F. Grandoni, F. Petrera, F. Abeni, G. Catillo, F. Napolitano and B. Moiola** (2012). "Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows." *Open Journal of Animal Sciences* Vol.02No.03: 9.

Mbwana, J., I. Bölin, E. Lyamuya, F. Mhalu and T. Lagergård (2006). "Molecular Characterization of *Haemophilus ducreyi* Isolates from Different Geographical Locations." *J Clin Microbiol* 44(1): 132-137.

Meuwissen, T. H. E. and M. E. Goddard (1996). "The use of marker haplotypes in animal breeding schemes." *Genetics, Selection, Evolution : GSE* 28(2): 161-176.

Michal, J. J., Z. W. Zhang, C. T. Gaskins and Z. Jiang (2006). "The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses." *Anim Genet* 37(4): 400-402.

Moore, S. S., C. Li, J. Basarab, W. M. Snelling, J. Kneeland, B. Murdoch, C. Hansen and B. Benkel (2003). "Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate genes for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*." *J Anim Sci* 81(8): 1919-1925.

Nkrumah, J. D., C. Li, J. Yu, C. Hansen, D. H. Keisler and S. S. Moore (2005). "Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit." *J Anim Sci* 83(1): 20-28.

Peelman, F., L. Zabeau, K. Moharana, S. N. Savvides and J. Tavernier (2014). "20 years of leptin: insights into signaling assemblies of the leptin receptor." *J Endocrinol* 223(1): T9-23.

Pfister-Genskow, M., H. Hayes, A. Eggen and M. D. Bishop (1997). "The leptin receptor (LEPR) gene maps to bovine chromosome 3q33." *Mamm Genome* 8(3): 227.

Picard, B., M. Gagaoua, D. Micol, I. Cassar-Malek, J. F. Hocquette and C. E. Terlouw (2014). "Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle." *J Agric Food Chem* 62(40): 9808-9818.

Rogowski, M. P., M. T. Flowers, A. D. Stamatikos, J. M. Ntambi and C. M. Paton (2013). "SCD1 activity in muscle increases triglyceride PUFA content, exercise capacity, and PPARdelta expression in mice." *J Lipid Res* 54(10): 2636-2646.

Scollan, N., J. F. Hocquette, K. Nuernberg, D. Dannenberger, I. Richardson and A. Moloney (2006). "Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality." *Meat Sci* 74(1): 17-33.

Shin, S. C. and E. R. Chung* (2007). "Association of SNP Marker in the Thyroglobulin Gene with Carcass and Meat Quality Traits in Korean Cattle." *Asian Australas. J. Anim. Sci* 20(2): 172-177.

Shingfield, K. J., M. Bonnet and N. D. Scollan (2013). "Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods." *Animal* 7 Suppl 1: 132-162.

Schaffer, J. E. and H. F. Lodish (1994). "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein." *Cell* 79(3): 427-436.

Schenkel, F. S., S. P. Miller, X. Ye, S. S. Moore, J. D. Nkrumah, C. Li, J. Yu, I. B. Mandell, J. W. Wilton and J. L. Williams (2005). "Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle." *J Anim Sci* 83(9): 2009-2020.

Smith-Kirwin, S. M., D. M. O'Connor, J. Johnston, E. d. Lancy, S. G. Hassink and V. L. Funanage (1998). "Leptin Expression in Human Mammary Epithelial Cells and Breast Milk." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83(5): 1810-1810.

Sobhani, I., A. Bado, C. Vissuzaine, M. Buyse, S. Kermorgant, J. Laigneau, S. Attoub, T. Lehy, D. Henin, M. Mignon and M. Lewin (2000). "Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach." *Gut* 47(2): 178-183.

- Taniguchi, M., T. Utsugi, K. Oyama, H. Mannen, M. Kobayashi, Y. Tanabe, A. Ogino and S. Tsuji** (2004). "Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle." *Mamm Genome* 15(2): 142-148.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark, J. Deeds, C. Muir, S. Sanker, A. Moriarty, K. J. Moore, J. S. Smutko, G. G. Mays, E. A. Wool, C. A. Monroe and R. I. Tepper** (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* 83(7): 1263-1271.
- Thaller, G., C. Kuhn, A. Winter, G. Ewald, O. Bellmann, J. Wegner, H. Zuhlke and R. Fries** (2003). "DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle." *Anim Genet* 34(5): 354-357.
- Trakovicka, A., N. Moravcikova and R. Kasarda** (2013). "Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle." *Acta Biochim Pol* 60(4): 783-787.
- Urban, T.** (2008, 3.2.2015). "Genetika populací: organizace genetické variability - Hardy - Weinbergův princip." *Virtuální svět genetiky 3: Genetika populací a kvantitativních znaků* Retrieved 28.4.2016, from <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul4b.html>
- Van Eenennaam, A. L., J. Li, R. M. Thallman, R. L. Quaas, M. E. Dikeman, C. A. Gill, D. E. Franke and M. G. Thomas** (2007). "Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits." *J Anim Sci* 85(4): 891-900.
- Vignal, A., D. Milan, M. SanCristobal and A. Eggen** (2002). "A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics." *Genetics Selection Evolution* 34(3): 1-31.
- Wood, J. D., M. Enser, A. V. Fisher, G. R. Nute, P. R. Sheard, R. I. Richardson, S. I. Hughes and F. M. Whittington** (2008). "Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review." *Meat Science* 78(4): 343-358.
- Wylie, A. R.** (2011). "Leptin in farm animals: where are we and where can we go?" *Animal* 5(2): 246-267.
- Yang, X. J., E. Albrecht, K. Ender, R. Q. Zhao and J. Wegner** (2006). "Computer image analysis of intramuscular adipocytes and marbling in the longissimus muscle of cattle." *J Anim Sci* 84(12): 3251-3258.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman** (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-432.
- Zieba, D. A., M. Amstalden and G. L. Williams** (2005). "Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review." *Domest Anim Endocrinol* 29(1): 166-185.

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Detail oblasti lokace leptinu na chromozomu 4 (ENSEMBL, 2016)</i>	20
<i>Obrázek 2: Mapa zobrazující identifikované SNP v genu leptin na 4. chromozómu u skotu (Chung et al. 2008).....</i>	22
<i>Obrázek 3: Výsledek PCR reakce kombinace primerů 4 a 8 na 3% agarózovém gelu ..</i>	34
<i>Obrázek 4: 3% agarózový gel s amplifikovanými fragmenty genu LEP</i>	35
<i>Obrázek 5: Výsledný elektroforetogram při kombinaci 8.....</i>	36
<i>Obrázek 6: Ukázka homozygota CC v polymorfismu UASMS1</i>	36
<i>Obrázek 7: Ukázka heterozygota CT v polymorfismu UASMS1.....</i>	37
<i>Obrázek 8: Ukázka homozygota TT v polymorfismu UASMS1</i>	37

9 SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1: Zkoušené primery</i>	25
<i>Tabulka 2: Kombinace primerů</i>	25
<i>Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR</i>	26
<i>Tabulka 4: Gradientová PCR</i>	27
<i>Tabulka 5: Reakční podmínky pro PCR</i>	27
<i>Tabulka 6: Charakteristika hmotnostních markerů</i>	28
<i>Tabulka 7: Potřebné množství PCR produktu</i>	29
<i>Tabulka 8: Složení sekvenační reakční směsi</i>	29
<i>Tabulka 9: Amplifikace PCR produktu</i>	30
<i>Tabulka 10: Výpočet frekvencí genotypů (Urban, 2008)</i>	32
<i>Tabulka 11: Výpočet frekvencí alel (Urban, 2008)</i>	33
<i>Tabulka 12: Absolutní a relativní frekvence genotypů</i>	38
<i>Tabulka 13: Absolutní a relativní frekvence alel</i>	38
<i>Tabulka 14: Výpočet genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona</i>	39
<i>Tabulka 15: Srovnání vypočítaných a tabulkových hodnot χ^2</i>	39
<i>Tabulka 16: Popisná analýza vybraných ukazatelů</i>	40
<i>Tabulka 17: Vliv genotypu polymorfismu UASMS1 na vybrané ukazatele</i>	41

10 SEZNAM ZKRATEK

AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (amplification fragment length polymorphism)
bp	pár bází (base pair)
BTA4	označení 4. chromozomu u skotu (<i>Bos taurus</i> , 4. chromozom)
C/EBP	protein vázající zesilovač CCAAT
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CLA	konjugovaná kyselina linolová (conjugated linoleic acid)
CNTF	ciliární neurotrofický faktor (ciliary neurotrophic factor)
CoA	koenzym A (coenzyme A)
DFD	tmavé, tuhé, suché (dark, firm, dry)
DGAT	diacylglycerol O-transferáza
dH ₂ O	destilovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FABP	protein vázající mastné kyseliny (fatty acid binding protein)
FABP4	4. protein vázající mastné kyseliny (fatty acid binding protein 4)
FAME	methylestery mastných kyselin (fatty acid methyl ester)
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte-colony stimulating factor)
GLM	zobecněný lineární model (general linear model)
IL6	interleukin 6
IMT	intramuskulární tuk
JUT	jatečně upravené tělo
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (low density lipoprotein)
LEP	leptin
LEPR	receptor leptinu (leptin receptor)
LIF	faktor inhibující leukemii (leukemia inhibitory factor)
MAS	selekce pomocí markerů (marker assisted selection)
MBOAT	
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MUFA	mononenasyčené mastné kyseliny (monounsaturated fatty acid)
ORF	otevřený čtecí rámeček (open reading frame)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PPARG	gamma receptor aktivující proliferaci peroxizomu (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acid)
q	označení krátkého raménka chromozómu
QTL	lokusy kvantitativních znaků (quantitative trait loci)
RAPD	polymorfismus náhodně amplifikované DNA (randomly amplified polymorphic DNA)
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
SCD	stearoyl-CoA desaturáza
SFA	nasyčené mastné kyseliny (saturated fatty acid)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SSR	repetice jednoduchých sekvencí (simple sequence repeat)
STR	krátké tandemové repetice (short tandem repeat)
T3	trijódthyronin
T4	tetrajódthyronin
TBE	tris/borate/EDTA
TG	thyroglobulin
T _m	teplota tání (melting temperature)