

## IDENTIFICATION OF POLYMORPHISM IN THE CANDIDATE *MC5R* GENE IN PIGS BY PCR-RFLP

*Anton Kováčik, Jozef Bulla, Anna Trakovická, Zuzana Lieskovská, Nina Moravčíková, Alica Rafayová*

### ABSTRACT

The aim of this work was to identify the polymorphism of *MC5R*(*Bsa*HI) gene in pigs. For our experiment we used biological material from 28 pigs of hybrid combination Large White and Landrace. Genomic DNA was isolated from pig blood. The polymorphism of *MC5R* gene was analyzed by PCR and PCR - RFLP method with using *Bsa*HI restriction enzyme and we identified A303G mutation. Fragments were separated by electrophoresis on 2% agarose gel with reagent GelRed. We identified two genotypes AA(18), AG(10) in this pigs population. Genotype AA showed 238 bp fragment and genotype AG 238 bp and 179 bp fragments. The highest frequency of genotype was found in the genotype AA (0.643). We found a higher frequency of allele A (0.821) in comparison with allele G (0.179) in the set of pigs.

**Keywords:** pigs, *MC5R*, polymorphism, PCR-RFLP

### ÚVOD

Šľachtiteľské programy chovateľov ošípaných sa zameriavajú na zvýšenie ich produkčných a reprodukčných vlastností. S rozvojom metód molekulárnej diagnostiky a moderných biotechnológií vzrástol záujem o identifikáciu a použitie kandidátskych génov ošípaných. Melanokortínové receptory (*MCR*) patria medzi transmembránové G-protein coupled receptory, schopné viazať proteíny (napr. aguti a aguti-pribuzné proteíny). Väzba *MCR* s Gs proteínmi indukuje zvýšenie koncentrácie cAMP v intracelulárnom prostredí (*Nijunhuis et al., 2003*).

Doposiaľ bolo identifikovaných päť melanokortínových receptorov, receptor melanostimulačného hormónu (*MC1R*), receptor adrenokortikotropného hormónu (*MC2R*), dva neutrálne receptory (*MC3R*, *MC4R*) a *MC5R* (*Haegeman et al., 2000*).

Na základe uvedených fyziologických funkcií sa predpokladá vplyv melanokortínových receptorov na obezitu, preto sa gény *MCR* rodiny považujú za kandidátne gény pre mäsovú úžitkovosť (*Haegeman et al., 2000*).

Gén *MC5R*, patriaci do rodiny melanokortikotropných génov kóduje syntézu receptora pre adrenokortikotropný hormón (ACTH) a melanokortikotropný hormón (MSH). Proteín *MC5R* predstavujúci mediátor pre termoreguláciu, sekréciu žliaz a sexuálne správanie (*Kim et al., 2000*).

*Kim et al. (2000)* mapovaním lokalizovali *MC5R* gén na 6. chromozóme ošípanej.

Nukleotidová substitúcia A303G vedie k aminokyselinovej zámene Ala za Thr v 109. pozícii. Tento typ polymorfizmu pomocou reštrikčného enzýmu *Bsa*HI s naštiepenými polymorfnými fragmentmi A (238 bp) a G (179 bp a 59 bp) ako prvý detekovali *Kim et al. (2000)*.

Druhý typ polymorfizmu *MC5R* génu spôsobený substitúciou C841T bol zistený alelovo špecifickou PCR, ktorou sa detekujú dve alely C a T. Prítomnosť alely C charakterizuje fragment veľkosti 128 bp, alelu T 118 bp fragment (*Kim et al., 2000*).

Cieľom našej práce bolo identifikovať polymorfizmus génu *MC5R*(*Bsa*HI) na vybranej skupine ošípaných použitím molekulárno genetických metód PCR a PCR-RFLP.

### MATERIÁL A METODIKA

V našej práci sme analyzovali 28 vzoriek hybridných kombinácií Biela ušľachtilá a Landrass. Ako biologický materiál sme používali krv, z ktorej sme DNA izolovali klasickou vysol'ovacou metódou. Následná PCR reakcia prebiehala v termálnom cykleri C1000 (Bio-Rad).

Zloženie PCR reakčnej zmesi:

MC5R FOR: 5' - TCA GCC TCT TGG AGA ACA TC - 3'

MC5R REV: 5' - GCC ACC AAG GAG ATG CAG - 3'

Reakčná zmes bola v objeme 25 µl a obsahovala 1 µl DNA, 5 U/µl Taq polymerázy (Fermentas), 10 mM dNTP, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Reaction buffer, 0.4 µl primeru MC5R FOR a 0.4 µl primeru MC5R REV.

Tabuľka 1 Teplotný a časový profil PCR reakcie

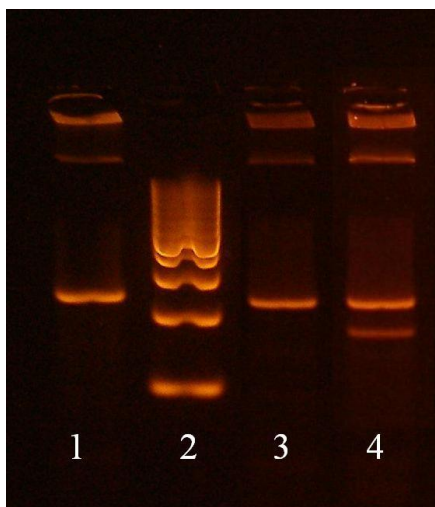
Kroky	MC5R	
	Teplota	čas
Štart	94 °C	3 min
Denaturácia	94 °C	10 s
Annealing	55 °C	20 s
Polymerizácia	72 °C	25 s
Elongácia	72 °C	10 min
Ochladenie	15 °C	forever
Počet cyklov	35	

PCR produkty boli vizualizované pod UV Transiluminátorom na 1% agarózovom géle s prídavkom GelRed (Biotium). Následne sme PCR produkty štiepili reštrikčným enzýmom Fast digest *Bsa*HI (Fermentas) pri teplote 37 °C po dobu 5 minút. Štiepne produkty sme vizualizovali pod UV Transiluminátorom na 2% agarózovom géle s prídavkom GelRed (Biotium). Pre

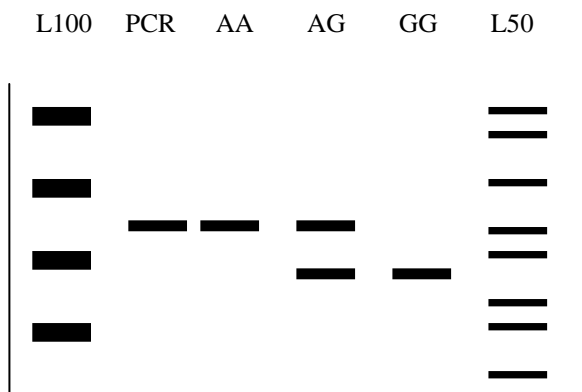
overenie veľkosti fragmentov sme použili marker Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

V sledovanej populácii 28 jedincov ošípaných sme PCR-RFLP metódou, použitím reštrikčnej endonukleázy *Bsa*HI, identifikovali dva genotypy. Genotyp AA s veľkosťou fragmentu 238 bp a genotyp AG s veľkosťou fragmentov 238 bp a 179 bp. Najväčšie zastúpenie mali jedince s genotypom AA (0.643). Jedince s genotypom GG sa v nami skúmanej skupine ošípaných nevyskytovali. V testovanej skupine sme zaznamenali jednoznačne vyššiu frekvenciu alely A (0.821) v porovnaní s alelou G (0.179).



**Obrázok 1** Štiepenie PCR produktu enzýmom *Bsa*HI 1 – PCR produkt (238bp), 2 - DNA ladder 100 bp, 3 – genotyp AA ( 238 bp), 4 – genotyp AG (238bp, 179bp)



**Obrázok 2** Zobrazenie štiepných fragmentov génu *MC5R* použitím reštrikčného enzýmu *Bsa*HI L100 – DNA ladder 100bp, PCR - PCR produkt (238bp), AA - (238bp), AG - (238bp, 179bp), GG - (179 bp), L50 – DNA ladder 50bp

Na základe zistených výsledkov PCR – RFLP analýzy sme vypočítali genetickú štruktúru a frekvenciu alel. Výsledky sú prezentované v tabuľke 2.

**Tabuľka 2** Genetická štruktúra - genotypy a frekvencia alel

	n	Frekvencia genotypov			Frekvencia alel	
		AA	AG	GG	A	G
ošípané	28	0.643	0.357	0	0.821	0.179

Nami zistené frekvencie genotypov korešpondujú so zisteniami autorov *Kim et al. (2000)* a *Emnett et al. (2001)*, ktorí potvrdili prevahu genotypu AA, ale nekorešpondujú so zisteniami *Mindekovej et al. 2006*, kde bol potvrdený vyšší výskyt genotypu AG. Vyššia frekvencia alely A, ktorú sme zaznamenali korešponduje so zisteniami autorov *Kim et al. (2000)*, *Emnett et al. (2001)* a *Mindeková et al. (2006)*.

### ZÁVER

Metódou PCR a PCR-RFLP pri použití reštrikčnej endonukleázy *Bsa*HI sme identifikovali mutáciu A303G v géne *MC5R* ošípaných. V analyzovanej skupine prevažovali genotypy AA. Alela G sa vyskytovala v heterozygotnej kombinácii AG, pričom jej frekvencia bola 0.179. Na základe distribúcie alel je možné analyzovať gén *MC5R*, ako marker pre zisťovanie vplyvu melanokortínových receptorov na produkčné vlastnosti ošípaných.

### LITERATÚRA

EMNETT, R., MOELLER, S., IRWIN, K., ROTHSCILD, M. F., PLASTOW, G., GOODWIN, R. 2001. *Association Studies With Leptin Receptor, Melanocortin-4 Receptor, Melanocortin-5 Receptor, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ*. In Eastridge, M. L., Bacon, W. L., Knipe, C. L., Meeker, D. L., Turner, T. B., and Zartman, D. L. *Research and Reviews: Swine 2001*. (OARD Special Circular; 185), 57-63

HAEGEMAN, A., JACOBS, K., Van ZEVEEREN, A., PEELMAN, L. J. C. 2000. Characterization of the porcine and bovine melanocortin receptor gene family. In *Plant and Animal Genome VIII conference*, San Diego, January 9-12, 2000

KIM, K. S., MARKLUND, S., ROTHSCILD, M. F. 2000. The porcine melanocortin 5-receptor (*MC5R*) gene: polymorphisms, linkage, and physical mapping. In *Animal Genetics*, 31, 2000c, p. 230-231

MINDEKOVÁ, S., TRAKOVICKÁ, A. 2006. Polymorphism of pigs *MC5R* (*Hsp92I*) gene, In *Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo*, 2006, p. 202-203.

NIJENHUIS, W. A. J., WANDERS, N., KRUIJTZER, J. A. W., LISKAMP, R. M., GISPEN, W. H., ADAN, R. A. H. 2003. Evidence that the enhancing effects of melanocortin ligands on sensory recovery after sciatic nerve crush are not mediated by melanocortin 4 receptor. <http://www.library.uu.nl/digiarchief/dip/diss/2003-0414-153325/c3.pdf>, 2003

### Acknowledgments:

This work was supported by VEGA No. 1/0790/11 and VEGA No. 1/0061/10.

**Contact address:**

Ing. Anton Kováčik, Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: anton.kovacik@yahoo.com

prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc., Department of Animal Physiology, Faculty of Biotechnology and Food Science, Slovak University of Agriculture, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra Slovakia, Email: jozef.bulla@uniag.sk

doc. Ing. Anna Trakovická CSc., Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: anna.trakovicka@uniag.sk

Ing. Zuzana Lieskovská, Department of Genetics and Breeding Biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: z.lieskovska@gmail.com

Ing. Nina Moravčíková, Department of genetics and breeding biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: nina.moravcikova1@gmail.com

Ing. Alica Rafayová PhD., Department of genetics and breeding biology, Faculty of Agrobiolgy and Food Resources, Slovak University of Agriculture in Nitra, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, Email: alica.rafayova@gmail.com