

**Nyugat – magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar**

Állattudományi Intézet

Ujhelyi Imre Állattudományi Doktori Iskola

**Doktori iskola vezetője
Dr. Szabó Ferenc
egyetemi tanár, az MTA doktora**

**Az állati termék termelés nemesítési és
tartástechnológiai vonatkozásai program**

**Programvezető
Kovácsné Dr. Gaál Katalin
egyetemi tanár**

**Témavezető
Dr. Bali Papp Ágnes
egyetemi tanár**

**Dr. Macháty Zoltán
egyetemi tanár
Purdue University**

**SZAPORODÁSBIOLÓGIÁHOZ KÖTHETŐ
GÉNEK ELEMZÉSE KÜLÖNBÖZŐ SERTÉS
FAJTÁKBAN**

GAJDÓCSI ERZSÉBET EMÍLIA

**Mosonmagyaróvár
2014**

**SZAPORODÁSBIOLÓGIÁHOZ KÖTHETŐ GÉNEK ELEMZÉSE
KÜLÖNBÖZŐ SERTÉS FAJTÁKBAN**

című értekezést

a doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében írta

Gajdócsi Erzsébet Emília

Készült a Nyugat – magyarországi Egyetem
Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Karán,

Ujhelyi Imre Állattudományi Doktori Iskola,

Az állati termék termelés nemesítési és tartástechnológiai vonatkozásai
program keretében.

Témavezető: Dr. Bali Papp Ágnes
Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Témavezető

Témavezető: Dr. Macháty Zoltán
Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....
Témavezető

A jelölt a doktori szigorlaton..... % -ot ért el.

.....
Szigorlati Bizottság Elnöke

Mosonmagyaróvár, 2014.

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Első bíráló (Dr.....) igen /nem

.....
aláírás

Második bíráló (Dr.....) igen /nem

.....
aláírás

(Esetleg harmadik bíráló (Dr.....) igen /nem

.....
aláírás

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján.....% - ot ért el.

Mosonmagyaróvár, 2014.

.....
Bírálbizottság Elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDT Elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	7
RÖVIDÍTÉSEK	9
KIVONAT.....	11
ABSTRACT	13
1 BEVEZETÉS	15
1.1 Az értekezés célkitűzései.....	16
2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	17
2.1 A sertés géntérképezés fejlődése	17
2.2 A mangalica fajtacsoport bemutatása	25
2.2.1 <i>A szőke mangalica</i>	25
2.2.2 <i>A fekete mangalica:</i>	27
2.2.3 <i>A fecskehasú mangalica</i>	28
2.2.4 <i>A vörös mangalica</i>	29
2.3 A mangalica tenyésztés története	30
2.4 A mangalica fajtacsoport különálló fajtákból áll.....	35
2.5 Prolaktin.....	37
2.5.1 <i>A prolaktin gén és a prolaktin szerkezete</i>	38
2.5.2 <i>A prolaktin működése</i>	40
2.6 A prolaktin receptor.....	41
2.7 A sertés petesejt Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének	43
3 ANYAG ÉS MÓDSZER.....	50
3.1 Mangalicák prolaktin receptor génjének polimorfizmusa	50
3.1.1 <i>Anyagok</i>	50
3.1.2 <i>Kísérleti elrendezés</i>	50
3.1.3 <i>PCR program</i>	51
3.1.4 <i>Emésztés</i>	51
3.1.5 <i>Szeparálás</i>	51
3.1.6 <i>Statisztikai analízis</i>	52
3.2 A sertés petesejtek Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének expressziója	52
3.2.1 <i>Petesejtek kinyerése és in vitro maturációja</i>	52
3.2.2 <i>Kísérleti elrendezés</i>	53
3.2.3 <i>Primertervezés és qRT-PCR</i>	53
3.2.4 <i>Statisztikai analízis</i>	55
3.3 Különböző érési fázisú petesejtek Ca^{2+} szintjének mérése.....	55

Különböző sertésfajták genetikai analízise

3.3.2	<i>Kísérleti elrendezés</i>	55
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	57
4.1	Mangalicák prolaktin receptor génjének polimorfizmusa	57
4.1.1	<i>Géldokumentáció</i>	57
4.1.2	<i>Mangalicák adatai és a PRLR allélok összehasonlítása</i> 57	
4.2	A sertés petesejtek Ca^{2+} -oszcillációját befolyásoló gének expressziója	65
4.2.1	<i>Eredmények</i>	65
4.2.2	<i>Következtetések</i>	67
4.3	Különböző érési állapotú petesejtek Ca^{2+} beáramlásának mérése 71	
4.3.1	<i>Eredmények és értékelésük</i>	71
5	ÖSSZEFOGLALÁS	76
6	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	79
7	IRODALMI HIVATKOZÁSOK	81
8	MELLÉKLETEK	100
8.1	Melléklet 1: Sertések Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének expressziójának statisztikai analízise	100
8.2	Melléklet 2: A sertés IVM-hez, Ca^{2+} festéshez és E.coli tenyésztéshez használt tápközegek és oldatok összetétele	101
8.2.1	<i>Medium 199-en alapuló sertés IVM Medium (TCM)</i>	101
8.2.2	<i>FSH, LH és EGF oldatok</i>	101
8.2.3	<i>TL Hepes médium:</i>	102
8.2.4	<i>Ca^{2+}-mentes TL Hepes médium</i>	103
8.2.5	<i>Foszfát-pufferelt sóoldat (PBS)</i>	103
8.2.6	<i>Fura2-AM</i>	104
8.2.7	<i>Ampicillin</i>	104
8.2.8	<i>Penicillin/sztreptomycin</i>	104
8.2.9	<i>LB</i>	105
8.2.10	<i>LB agar</i>	105
8.2.11	<i>LB agar táptalaj</i>	106
8.3	Melléklet 3: Invitrogen Dynabeads mRNA Direct Micro Kit használati útmutató:.....	107
8.4	Melléklet 4: TOPO TA Cloning rendszer használati útmutató:	109
8.5	Melléklet 5: Qiaprep Spin Miniprep Kit használati útmutató mikrocentrifugához:	112
9	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	114

Különböző sertésfajták genetikai analízise

RÖVIDÍTÉSEK

ATP – adenzin trifoszfát

cDNS – komplementer DNS

CL - Corpus Luteum = sárgatest

cM – centi Morgan

CPA – cyclopiazonic acid = ciklopiazonsav

Ct érték – cycle threshold = ciklus küszöbérték

DNS - deoxiribonukleinsav

E. coli – *Escherichia coli*

EGF – Epidermal Growth Factor = Epidermális növekedési hormon

ER – endoplazmatikus retikulum

FSH – Follikulus stimuláló hormon

GV – Germinális vezikulum

GVBD - Germinal Vesicle Break Down = germinális vezikulum felbomlása

IVM – *In vitro* maturáció

LH – Luteinizáló hormon

MI – Meiózis 1. fázisa

MII – Meiózis 2. fázisa

mRNS – messenger RNS

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Orai – nem rövidítés, fantázianév, mely a görög mitológiában a Mennyország kapujának őrzőit jelenti

PCR – Polymerase chain reaction = polimeráz láncreakció

PRLR – prolaktin receptor

QTL – Quantitative Trait Loci = mennyiségi tulajdonságok helye

RFLP – Restriction fragments length polymorphism = restrikciós darabok hosszának polimorfizmusa

RNS – ribonukleinsav

qRT-PCR – Real Time PCR

Rt-PCR – Reverse Transcription PCR (Reverz transzkripció PCR)

SERCA - Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase = szarko/endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz

SNP – Single Nucleotide Polymorphism = egy nukleotidos polimorfizmus

SOCE – Store-Operated Calcium Entry = sejtraktárok által szabályozott kalcium beáramlás

STIM - Stromal Interaction Molecule= stromális (citoplazma) kölcsönhatás molekula

STX5, SYN5 – syntaxin 5

UTR - Untranslated Region = nem kódoló régió

Különböző sertésfajták genetikai analízise

KIVONAT

A mangalica megmentése fontos feladat és éppen ezért az alomméreték gyors növelése genetikai szelekció alapján érdeke a tenyésztőknek.

A termékenyülés jobb megismerése már a petesejtek szintjén is olyan tudás birtokába juttatná a szaporodásbiológiával foglalkozó kutatókat és általuk a tenyésztőket, mellyel hatékonyabbá válna a tenyésztői munka.

Az értekezés első részében a prolaktin receptor génjének polimorfizmusát vizsgáltam mangalicáknál, valamint az egyes allélok hatását az alomszám alakulására.

Kísérleteim során hasonló eredményre jutottam, mint a húshibridek vizsgálatát leíró számos kutatás, vagyis a mangalicában is jelen van a prolaktin receptor gén polimorfizmusa és az A allél van összefüggésben a magasabb alomszámmal.

A Ca^{2+} fontos szerepet játszik a sejt-kommunikációs folyamatokban, többek közt a spremium is egy Ca^{2+} - oszcillációt indít termékenyítéskor. Az értekezés második részében a sertés petesejtek Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének közül négy (SERCA2, STIM2, Orai2 és STX5) expresszióját vizsgáltam különböző fejlődési állapotú petesejtekben (GV, MI és MII). Arra kerestem a választ, hogy a petesejt érés során milyen mértékben változik ezeknek a géneknek az aktivitása.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Eredményeim alátámasztják az oszcillációban betöltött szerepük jelentőségét, két gén expressziójában találtam szignifikáns eltérést (Orai2 és STX5), kettőben pedig nem szignifikáns (SERCA2 és STIM2).

A harmadik részben a Ca^{2+} – beáramlást vizsgáltam sertés petesejtekben. A sejtekben a SERCA pumpát CPA-val (reverzibilisen kötődő inhibitor) Ca^{2+} - mentes közegben gátoltuk, majd mértük a Ca^{2+} beáramlást emelt Ca^{2+} -tartalmú oldat hozzáadását követően.

A mérések során az érett, MII állapotú petesejtekben lehetett kiváltani nagyfokú Ca^{2+} beáramlást - mely első lépése lehet egy kémiai aktiválásnak -, míg éretlen, GV és MI petesejtekben nem volt megfigyelhető egy ilyen mértékű Ca^{2+} beáramlás.

ABSTRACT

The rescue of the mangalica from extinction is an important task so that is why the fast increase of its litter size by genetical selection is essential for the breeders.

A better understanding of fertilization on the level of oocytes could provide a usefull knowledge for reproduction researchers and thus the breeders with which they could make fertilization and breeding more effective.

In the first part of my thesis the existence of polimorphism of prolactin receptor gene was investigated in mangalica and the effect of the differenet alleles on its litter size.

The result of my experiments was similar to those studies carried out in commercial meat type swine; the polimorphism of prolactin receptor gene exists in mangalica and the A allele is related to the bigger litter size.

The Ca^{2+} has really important role in cell communication and for example the sperm inducec a Ca^{2+} oscillation at fertilization. The second part of my thesis is about the investigation of the expression of four different genes (SERCA2, STIM2, Orai2 and STX5) which have influence on the Ca^{2+} -oscillation in pig oocytes of different developmental stages (GV, MI and MII). I was looking for an answer on how the activity of these genes changes with the maturation.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

The results confirm the importance of their role in oscillation; the expression of two genes (Orai2 and STX5) differed significantly while the two others (STIM2 and SERCA2) did not.

In the third part the ability of pig oocytes to generate a Ca^{2+} -influx was examined. The oocytes were treated with CPA (an inhibitor of SERCA pumps) in Ca^{2+} -free medium and the Ca^{2+} influx was measured after adding an elevated level of Ca^{2+} back to the medium.

During the measurements a large Ca^{2+} influx could be observed in completely mature (MII) oocytes – which could be the first step in an activation protocol – while immature (GV and MI) oocytes did not show this high level of influx.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

1 BEVEZETÉS

A DNS szerkezetének 1953-as feltárását követően (Watson – Crick, 1953) a molekuláris genetika rohamosan fejlődő tudományággá vált. Számos olyan módszer került kidolgozásra, mely megkönnyíti, lerövidíti a DNS sokszorozását, darabolását, beépítését, módosítását és egyéb vizsgálatát.

A sertés ágazat hazánkban hanyatlóban van, de a sertés értékes húsát és a belőle készült termékeket nem nélkülözheti a magyar konyha. A génmegőrzés igen divatos és aktuális témává vált, melynek keretei kiterjednek a mangalica fajtára is. E hazai sertésfajta tenyésztésének újjáéledését figyelhetjük meg napjainkban. Ahhoz, hogy egy fajtát megőrizhessünk genetikai szinten, több eszköz áll a rendelkezésünkre: génbankok, fajtafenntartó törzstenyészetek és persze a molekuláris genetika különböző vívmányainak alkalmazása is. A PCR-RFLP módszer egy olyan alapvető technika, mellyel az egyes egyedekről alkothatunk pontosabb képet. A Real-Time PCR segítségével feltárhatjuk az egyes szövetek, szervek, vagy akár sejtek génexpresszióját, mely tudás birtokában jobban megérthetjük a bennük lezajló folyamatokat és az öröklődést, valamint a környezeti hatásokat is.

A petesejtek parthenogenetikus aktiválása a transzgenikus állatok előállításának is fontos lépése. Segítségével pontosíthatjuk a termékenyítésről és embrionális fejlődésről szerzett tudásunkat.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A parthenogenetikusan aktivált emberi petesejtekből nyerhető donorjaik genetikai kódjával rendelkező őssejtek, melyek transzplantációs célra később felhasználhatók, bár a tudomány gyors fejlődése szerint már szinte bármilyen testi sejt „újraprogramozható”. Az emberhez felépítésében és genetikailag is közel álló sertés emberi betegségek modell állataként szolgálhat.

1.1 Az értekezés célkitűzései

Az értekezésben bemutatott kísérletekben a sertés szaporodásbiológia óriási területének két szegmensét vizsgáljuk, egyrészt a szaporasággal összefüggésben a prolaktin receptor polimorfizmust, másrészt azt a molekuláris mechanizmust, amely hozzájárul a petesejtek sikeres termékenyüléséhez. Ennek megfelelően a következő vizsgálatokat végeztük el:

- Mangalicák prolaktin receptor gén polimorfizmusának és a különböző allélok alomszámra gyakorolt hatásának vizsgálata.
- A sertés petesejtek Ca^{2+} -oszillációját befolyásoló gének expressziójának vizsgálata: SERCA2, STIM2, Orai2, STX5.
- A különböző fejlődésű állapotú sertés petesejtek Ca^{2+} visszaeresztő képességének analízise: Ca^{2+} -mentes közegben CPA-val történő blokkolást, majd emelt mennyiségű Ca^{2+} -ot tartalmazó oldat hozzáadását követően.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A sertés géntérképezés fejlődése

A géntérképezés már az 1970-es évek óta zajlik; különböző kísérleti állatok géntérképeit készítették el, többek között az ecetmuslicáét, egérét és az emberét is. Az emlősállatok géntérképezése fényt deríthet a genom evolúciós szerveződésére is, annak rekombinációs és variációs szempontjából is (ELLEGREN és mtsai, 1994). Kétféle genetikai térkép létezik, egy fizikai (cytogenetic) és egy kapcsoltsági (linkage). Az első típusú a gének kromoszómán való elhelyezkedését adja meg (akár láthatóvá is téve egy-egy régióban egy-egy gént), míg a második relatív helyeket ad meg, vagyis az adott gén más génektől való távolságát (<http://www.animalgenome.org/edu/.html>). A kapcsoltsági térképeket kizárólag, vagy többségében mikroszatellit markerek alkotják (ELLEGREN és mtsai, 1994). A sertés kromoszómaszáma minden sejtben 18 pár, valamint az ivari kromoszómák (X és Y) (www.animalgenome.org). A sertés genetikai térképének elkészítése komoly feladat és nem csak azért lényeges megvalósítani, mert a sertés az egyik legnagyobb hús- és fehérjeforrás az emberi táplálkozásban, hanem mert számos humán betegség fontos modell állata, valamint a xenotranszplantációs (idegen – pl. sertés – szervek beültetése emberbe) kísérletekben is kiemelt helye van (HUMPHRAY és mtsai, 2007, JIANG és mtsai, 2007, LUNNEY és mtsai, 2007). Olyan humán betegségek

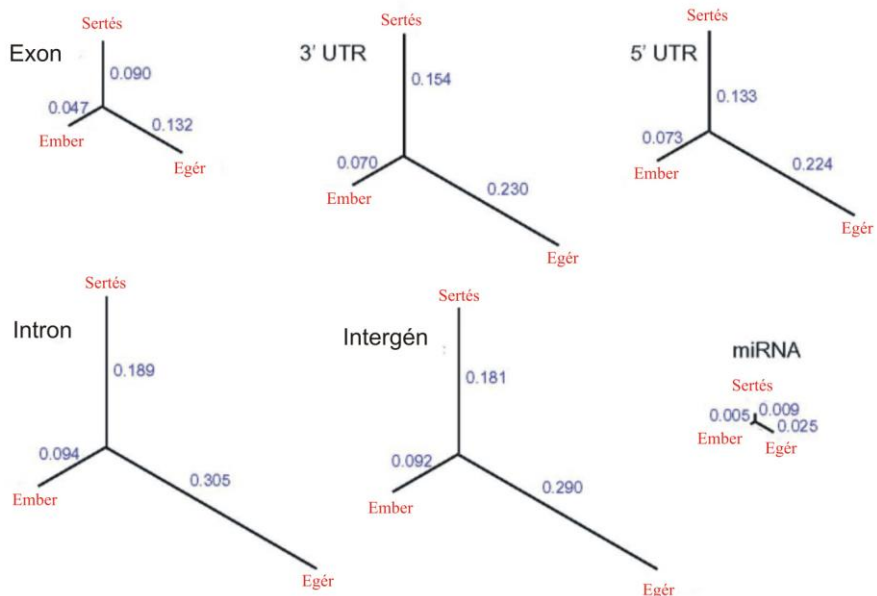
Különböző sertésfajták genetikai analízise

gyógyításában és modellezésében segíthetnek, mint például a cukorbetegség, elhízás, szív- és érrendszeri betegségek (mivel a szívük mérete és a vérnyomásuk is igen hasonló az emberéhez). Tanulmányozhatóak általuk az emberi szaporodásbiológiai és táplálkozásbiológiai (úgy mint a magas koleszterinszint) problémák is (ROHRER és mtsai, 2002). A malacok etológiai megfigyeléséből pedig a gyermekek viselkedésének bizonyos elemeire is következtethetünk (például a szülőtől való korai elválásztás agresszív viselkedést, immunrendszeri zavarokat és tanulási nehézségeket eredményez) (ORGEUR és mtsai, 2001, GARDNER és mtsai, 2003).

Az Emberi Genom Projekt (Human Genome Project) során feltérképezték az emberi örökítő anyagot. A rokon fajok géntérképeinek összehasonlítása segítséget nyújthat az eddig ismeretlen területek feltárásában. Mivel az ember és a sertés genetikailag közel áll egymáshoz, így ez az összehasonlítás közelebb viheti a tudósokat a sertések géntérképeinek befejezéséhez (HUMPHRAY és mtsai, 2007). WERNERSSON (és mtsai, 2005) öt sertésfajtából származó mintát hasonlított össze emberi és egér DNS mintákkal valamint evolúciós analízisnek vetette alá azokat véletlenszerű szekvenálással. Filogenetikus fát rajzolt eredményeik segítségével (**1. ábra**) és megállapította, hogy a sertés genom szekvenciája közelebb áll az emberéhez, mint az egéré. A vizsgált paraméterek közül a micro RNS-ek fejlődése volt a leggyorsabb, majd ezt követte az intergén és intron régiók szekvenciájának evolúciós fejlődése, valamint az 5' UTR (5'untranslated region = nem kódoló régió az mRNS-ben, más néven vezető szekvencia: ott kezdődik, ahol a transzkripció indul és a start kód

Különböző sertésfajták genetikai analízise

előtt fejeződik be), majd a 3' UTR (3' untranslated region = nem kódoló régió az mRNS-ben, a kódoló régiót követi). Végül az exonok evolúciója mutatta a leglassabb fejlődést, azaz a legkisebb eltérést a vizsgált fajok között.



1. ábra. Ember-egér-sertés filogenetikus fa: az egyes ágak hossza jelenti (vagyis a kiindulási ponttól való távolság) az evolúciós távolságot. Az egér fejlődése jóval előbb vált külön az emberétől, mint a sertésé. (forrás: TUGGLE és mtsai, 2001)

Az alábbiakban néhány lépcsőfokot említek a sertés géntérképezésének történetéből, a teljesség igénye nélkül.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Bár 1989-ben 50 gén és marker helyét már ismerték (ROTHSCHILD, 2000), a sertés géntérképezését az 1990-es évek elején kezdték el a PiGMap program keretein belül. Akkor 239 genetikai marker analízisével járultak hozzá a kapcsoltsági térkép megalkotásához, ezek közül 81 marker felelős az akkor már ismert gének kódolásáért; 69 markernek pedig már a kromoszómán elfoglalt helyét is megtalálták (ARCHIBALD és mtsai, 1995, ROTHSCHILD és mtsai, 2003).

1994-ben ROHRER és mtsai kapcsoltsági vizsgálatok során 23 autoszomális és egy X kromoszomális kapcsoltsági csoportot azonosított. Megmérték a szomszédos markerek átlagos távolságát, amit 5,5 cM-nek találtak. Az eddigre azonosított 383 kapcsolt marker összesen 1997 cM-t ölelt fel. Ez csaknem a teljes genom hossza, ám az 1994-es becsléseik szerint ez kb. 2300 cM (az emberé 3800-4000 cM, az egéré 1600 cM) (ELLEGREN és mtsai, 1994). 27 polimorf lókuszt rendeztek csoportokba 13 autoszomális kromoszómáról. 5 lókuszt a 7-es kromoszómán, 4-et a hatoson, a többi 11 kromoszómán pedig 1-3-t találtak meg. Kutatásuk eredményeként 4 ismert strukturális gén és 13 publikált MS (mikroszatellit) fizikai helyét azonosították.

ROHRER és mtsai (1996) 1042 kapcsoltsági lókuszt írt le, 19 csoportra osztva, ezek teljes hossza 2286,2 cM volt, átlagos távolságuk pedig 2,23 cM. Az egy kromoszómára eső lókusztok száma 11 és 90 közötti volt.

2000-ben két nagy sertés géntérképezési projekt volt, az egyik a PigMap, amit az EU finanszírozott, 15 európai (18 labor) és 7 más ország vett részt benne. A másik az Amerikai Egyesült Államok által támogatott USDA-ARS Pig Genome Coordination program (US Department of

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Agriculture – Agricultural Research Service). Egy minden háziállatfajt vizsgáló harmadik program - a NAGRP (National Animal Genome Research Program), mely szintén amerikai finanszírozású - keretei kiterjedtek a sertés géntérképezésre is. (Ezt a programot 1993-ban indították.) (FÉSÜS és mtsai, 2000, ROTHSCILD, 2003) 1996-ra több mint 1800 lókuszt – melyből 250 gént takart – térképeztek fel (ROHRER és mtsai, 1996).

2001-ben TUGGLE és mtsai arról számoltak be, hogy a Midwest EST (Expressed Sequence Tag) Consortium elkészítette a nőivarú sertések reproduktív szöveteiből nyert génexpressziós adatok alapján annak cDNS könyvtárát és közel 15000 génszekvenciával (ami 8900 gént jelent) járultak hozzá a nyilvános adatbázishoz. Közel 1500 sertés gén mutatott hasonlóságot az emberi génekkel. A 2000-es év végére 522 gén és 374 marker kromoszómán elfoglalt helyét is meghatározták a fizikai térképezés segítségével.
(<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/cyto/cyto.htm>)

2002-ben 2900 lókuszt, köztük kb. 1700 mikroszatellit markert és 1200 SNP/RFLP (Single Nucleotide Polymorphism/Restriction Fragment Length Polymorphism) markert tartalmazott a kapcsoltsági térkép (ROHRER és mtsai, 2002).

2003-ban megalakult az SGSC (Swine Genome Sequencing Consortium). A bakteriális mesterséges kromoszómák alkalmazásával (BAC- Bacterial Artificial Chromosome) a fizikai térképezést segítették elő. A sertés teljes genomjának 15%-át, vagyis 393756515 bázispárt határoztak meg (HUMPHRAY és mtsai, 2007).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

2005-re már több mint 3000 lókuszt katalogizáltak a sertés genomban (SCHOOK és mtsai, 2005), mely több száz gént is magában foglal (ROTHSCHILD, 2003). A szakirodalmi adatok azonban nem egységesek, HARBOE 2004-ben PhD értekezésében 5000 ismert lókuszt említ.

2007-ben CHEN (és mtsai, 2007) sertés géntérképezésről szóló cikkében már 4000 lókuszt ír le, mely 1588 gént foglal magában, valamint 2493 markert és ezek átlagos távolságát 2-3 cM-ben határozza meg. A fizikai térkép fejlődéséről is ír; a radiációs hibrid (Radiation Hybrid- RH) és a szomatikus sejt hibrid panelek segítségével eddig közel 10000 gén és marker kromoszómán elfoglalt helyét határozták meg. Cikkéből azt is megtudhatjuk, hogy jelenleg az USA-ban foglalkoznak a teljes genom szekvenálásával a CSREES-USDA (Cooperative State Research, Education and Extension Service at the United States Department of Agriculture) program keretében a The Wellcome Trust Sanger Institute laboratóriumában. ROTHSCHILD (és mtsai, 2007) cikkében a QTL (Quantitative Trait Loci, vagyis a mennyiségi tulajdonságok lókusztai) felfedezések gyors előrehaladásáról számol be. Hivatkozik a <http://www.animalgenome.org/QTLdb/> honlapra, melyen 2013. decemberi adatok szerint az eddigi 391 publikáció 9862 QTL-t írt le 653 különböző tulajdonságról sertésben. Itt részletező táblázatokat találhatunk az egyes tulajdonságok, tulajdonságcsoportok, megjelent újságok, folyóiratok, az adott évben felfedezett QTL-ek számáról (**1. táblázat, 2. ábra**) stb.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

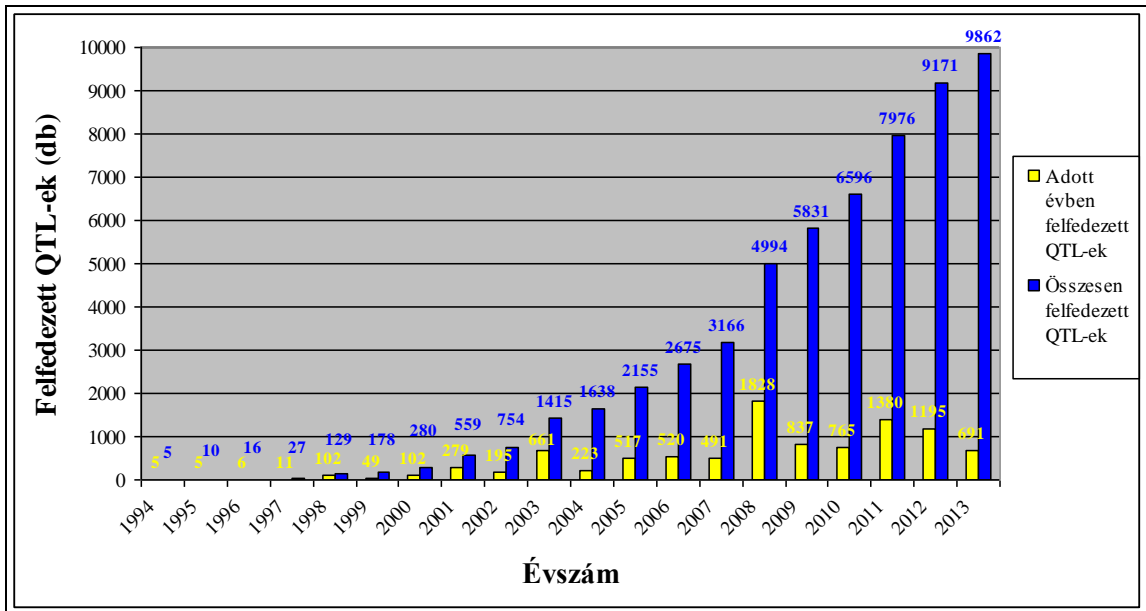
1. táblázat. A QTL felfedezések száma a különböző években (forrás: <http://www.animalgenome.org/QTLdb>)

Évszám	Felfedezett QTL-ek száma
1994	5
1995	5
1996	6
1997	11
1998	102
1999	49
2000	102
2001	279
2002	195
2003	661
2004	223
2005	517
2006	520
2007	491
2008	1828
2009	837
2010	765
2011	1,380
2012	1,195
2013	691

Egy másik honlapról, az SGSC hivatalos oldaláról megtudhatjuk, hogy a sertés-ember összehasonlító térkép elkészült (<http://www.piggenome.org/>).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A teljes sertés genom térképének megalkotása elkészült, ám az összes gén, marker, QTL feltárása jelenleg is folyamatban van. Az eddig felfedezett gének vizsgálatával és célirányos szelekcióval javíthatjuk a domesztikált sertés termelési mutatóit.



2. ábra. A felfedezett QTL-ek száma az egyes években és összesen (saját forrás: 1. táblázat adatai alapján)

A SNP (Single Nucleotid Polymorphism = egy nukleotidos polimorfizmus) hasznos eszköz lehet a sertés géntérképezésben illetve az egyes fajták analízisében, genetikai marker szerepüknek köszönhetően (KERSTEN és mtsai, 2009). Egy második generációs szekvenálási technológiával, a chippel egyszerre több SNP vizsgálatára nyílik lehetőség, így az egyedek és populációk vizsgálata gyorsabb és olcsóbb

Különböző sertésfajták genetikai analízise

lehet (RAMOS és mtsai, 2009). A kutatók megtervezhetik saját igényeik szerint, vagy a kereskedelemben használatos chipeket is megrendelhetik. Fókuszálhatnak egy tulajdonságcsoportra is, mint a szaporasággal összefüggő mutatók, vagy többre (UIMARI és mtsai, 2011).

2.2 A mangalica fajtacsoport bemutatása

A magyar mangalica fajta kialakítása 1833-ban kezdődött, amikor Szerbiából szumadia sertéseket hoztak be. A behozott sertések között különösen a kisjenői uradalom számára vásárolt 2 kanból és 9 kocából álló törzs volt értékes. A hazai parlagi sertésállomány (a bakonyinak és a szalontainak) a szumadia sertéssel való fajta-átalakító keresztezése, a megfelelő egyedek céltudatos kiválogatása és okszerű takarmányozása révén jött létre a magyar mangalica, amely mind küllemében, mind belső tulajdonságaiban lényegesen jobb a balkáni rokonainál.

2.2.1 *A szőke mangalica*



3. ábra. Szőke mangalicák

(<http://konyvtar.univet.hu/praxis/vetkonf6/mangalica.pps#23>)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A szőrzet finomszálú, télen gyaluforgácsszerűen göndör, nyáron ritkább, rövid és sima, színe a vidék talajának minőségétől függően a szürkétől a sárgás pirosig minden árnyalatban megtalálható. A pilla, a szemöldök és a tapintószőrök, valamint a farok bojt belseje fekete. A bőrt vékony, palaszürke színű réteg fedi, amely levágás után forrázással, pörzsöléssel teljesen eltávolítható. A túrókarima, szemhéjak, körmök, természetes testnyílások feketék, míg a péraajkak világosabb árnyalatúak is lehetnek. A bőr a hasaljon, a lágyéktájon, a haskorcon halvány palaszürke színű. A csecsbimbók feketék. A fültő belső és alsó szélén világosabb folt található, amely a környező testrészek palaszürke színébe fokozatosan megy át. A fej törzshöz viszonyítva középhosszú és oldalnézeten mérsékeltlen homorú. A középmagasan tűzött fülek az orrhát felé hajolnak, s így a látást nem zavarják. A fül hossza a fej hosszának kb. kétharmada. A hát középhosszú és enyhén ívelt. Az ágyék feszes, a far gyengén lejtős, a sonka közepesen izmolt, a farok középmagasan tűzött. A has feszes, 5-5 egyenletesen elosztott csecsbimbóval. A törzs közepesen hosszú, a csontozat szilárd. (<http://www.mangold.hu/hu/mangalica.php>, <http://mangalicatenyesztok.hu/fajtak.html>, HORN, 2000) Mozgása a legeléshez szokott sertésére jellemző; könnyed és rugalmas (**3 és 4. ábra**). Jó tulajdonságai közé tartozik az edzettség, az igénytelenség, a nagyfokú zsírtermelő-képesség. Emellett azonban olyan hibái is vannak, amelyeknek kiküszöbölése igen fontos a fajta fennmaradása érdekében. Így pl. nem elég szapora. Általában 5-8 malacot fial. Az egynapos mangalica malacok súlya 0,8-1 kg, az alom súlya pedig születésekor 6-10 kg. 30 napos korban megkívánjuk, hogy a malacsúly legalább 8-10 kg, az

Különböző sertésfajták genetikai analízise

alomsúly pedig legalább 60-70 kg legyen. A mangalica zsírtermelő-képessége minden fajtáét felülmúlja. Gyorshizlalással 10-12 hónapos korra 500-550 gramm átlagos napi súlygyarapodással a 130-150 kg vagy még ennél is nagyobb súlyra hizlalható. Ebben a súlyban levágva 55-60% fehérarut ad.



4. ábra. Szőke mangalica koca és kan (<http://www.zensor10-hc.eoldal.hu>, <http://allatvilagunk.hu/haziallatok/hazisertes.html>)

2.2.2 *A fekete mangalica:*

A dunántúli részeken a fekete színű mangalica terjedt el. Őse a horvát-szerémségi fekete - azaz a nápolyi - sertés, mely időnként keveredett a mangalicával, így nyerte el hasonló alakját, de megőrizte fekete színét. Az 1885-ben Kőbányán megtartott hizlalási próba szerint kissé lassabban, de nagyobbra nőtt, mint szőke rokona és a betegségekkel szemben sokkal ellenállóbb volt. Sajnos csak volt, ugyanis az addig nagy

Különböző sertésfajták genetikai analízise

létszámban tartott fekete mangalica az 1970-es években kihalt, utolsó példányait a Duna szerbiai szigetein látták azokban az években.

2.2.3 *A fecskehasú mangalica*

A szőke és fekete mangalica keveredéséből jött létre. A háta fekete, de a has és a combok belső oldala szőke színű. Egyéb tulajdonságaiban megegyezik a szőke mangalicával, egy kicsit kisebb rájájú és szaporább és talán kissé ellenállóbb annál. 1993-ra ez a szín is csaknem kihalt, mindössze 32 db koca volt belőle (**5. ábra**). Napjainkban néhány száz koca van, az elmúlt 2 évben szerencsére rohamosan bővülni kezdett a létszám.

(<http://konyvtar.univet.hu/praxis/vetkonf6/mangalica.pps#23>)

<http://www.mangalicatenyesztok.hu/fajtak.html>)



5. ábra. Fecskehasú mangalica koca és kan

(<http://allatvilagunk.hu/haziallatok/sertes/hazisertes.html>,

<http://www.mangalicatenyesztok.hu/fajtak.html>)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

2.2.4 A vörös mangalica

Új mangalicaszín (**6. ábra**), mely a szalontai sertés és a szőke mangalica keveredésével az 1910-es években jött létre. A régebbi szakirodalom inkább javított szalontainak nevezi, de az 1960-as évekre teljesen mangalicává alakult, csak a színe maradt vöröses rózsaszín. 1993-ra alig maradt belőle élő példány, 31 koca volt a teljes törzskönyvezett állomány. Ma pár száz koca van, lassan de biztosan gyarapszik a számuk.

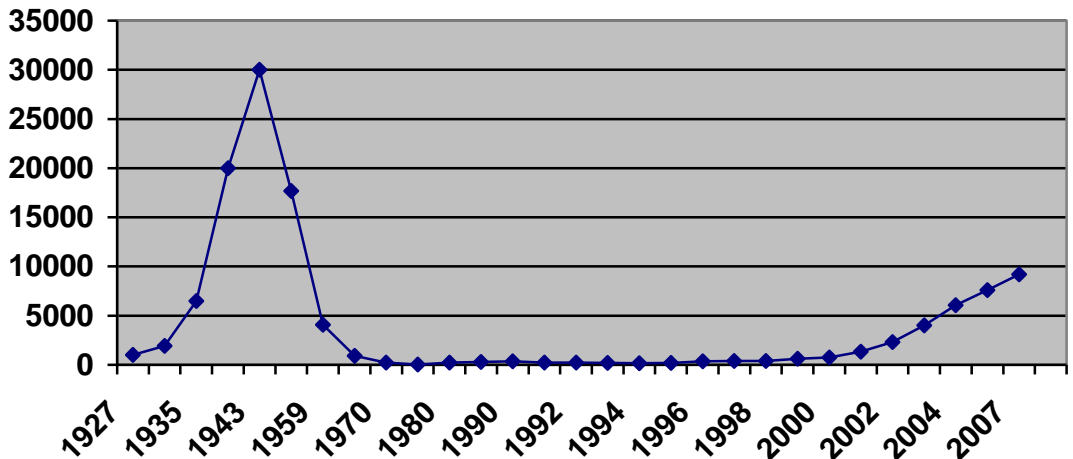


6. ábra. Vörös mangalica koca és kan

(<http://www.mangalicatenyestok.hu/fajtak.html>)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

2.3 A mangalica tenyésztés története



7. ábra. A mangalicák létszámának alakulása 1927-2007 között (<http://www.mangold.hu/egyesulet/dokumentumok/9.ppt#1>, <http://www.atk.hu/upload/dokumentumok/workshopok/Mangalica/Toth-Mangalica.pdf>)

A mangalicatenyésztés 1833-ban kezdődött, amikor József Nádor kisjenői uradalmára megérkezett az első 2 db kan és koca a híresen zsiros szerb szumadia sertésekből, melyeket a meglévő bakonyi és szalontai sertések keresztezésére használtak. Oly nagy sikerrel tették ezt, hogy az 1850-es évekre már minden nagy tenyészetben volt kisjenői vér és a 19. század végére a mangalica a magyar vidék szinte kizárólagos sertése lett. A mangalicatenyésztés hivatalos csúcsszerve a Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete 1927-ben alakult meg és ekkor kezdődött meg a tenyészetek, és tenyészállatok nyilvántartása is, korábbról csak elszórt adatokat lehet találni. A két háború közt megjelenő nyugat-európai

Különböző sertésfajták genetikai analízise

eredetű hússertések ekkor még nem veszélyeztették a fajta vezető szerepét. A II. Világháború pusztításait és a jóvátételi szállításokat már azonban nem tudta kiheverni. Az 1950-es évek iparosítása, a lakosság városiasodása egyre inkább a hús iránti keresletet erősítette, a végső csapást az import hússertések elszaporodása és a napraforgó étolaj fogyasztásának elterjedése mérte a fajtára. Az 1960-as években száma folyamatosan csökkent, mígnem a hetvenes évekre csaknem teljesen kihalt. A teljes kihalástól a magyar állam által 1974-ben létrehozott génbankok mentették meg. Akkorra a teljes kocalétszám kb. 200 db-ra esett. A területileg illetékes Állattenyésztő Vállalatok és a fajtát hivatalosan fenntartó Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet munkatársai egyre nehezebb anyagi körülmények közt dolgozva őrizték meg a fajtát a bizonytalan jövő számára. Azonban a rendszerváltás ezeket a kis tenyészeteket elsöpörte, sőt a tenyésztőszervezetei is megszűntek, vagy átalakultak. Tömegesen vágták le az utolsó megmaradt egyedeket, olyan nagy gyorsasággal, hogy 1991 nyarára már ismét alig 200 db alá esett a számuk, de ez a 200 db is vágásra volt ítélve, így 1992-1993-ra a fajta teljes eltűnése volt várható. A fecskehasú és vörös mangalica kocák száma 30 db-ra csökkent, így kihalásuk hónapok kérdése volt csupán. Mivel 1991-ben megjelent Spanyolország mangalica iránti piaci igénye, így egyre sürgetőbbé vált a fajta fenntartás és törzskönyvezés központi helyen történő végzése. 1994 tavaszán a Debreceni Agrártudományi Egyetemen megalakult a Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete. A MOE azóta a mangalicafajta államilag elismert hivatalos tenyésztő szervezete. Az elmúlt 10 évben a MOE újjászervezte a fajta tenyésztését. A MOE mára az ország legütőképesebb és legjobban szervezett tenyésztő

Különböző sertésfajták genetikai analízise

szervezetévé vált, országos hatáskörű területi képvisellel, csaknem 200 taggal és 5000 törzskönyvezett kocával. Az egyesület súlyát jelzi, hogy 2003 nyarától az FVM-től megkapta a fajtafenntartói jogkört is, sőt a három színváltozat önálló fajtvá nyilvánítása is megtörtént. Napjainkig és még most is egyre bővül a piac, nő a kereslet a mangalicatermékek iránt hazánkban is. 2012-ben a tenyészetek száma elérte a 170-et, a tenyészkokák száma összesen 7492, a tenyészkanoké pedig 251 volt. (http://www.mangalicatenyesztok.hu/downloads/tenyesztesi%20eredmenyek/pdf-hu/2012-Tenyesztesi_eredmenyek.pdf) **(7. és 8. ábra, 2. táblázat)**

Ezért az állomány is folyamatosan bővül. Az állomány fejlesztése folyamatos, 2006-ban meghaladta a 15 000 db-ot. A spanyol és magyar piac kész évente 50-60 ezer darab mangalica termék átvételére, így a fajta fejlődése és fennmaradása piaci oldalról biztosított. (<http://www.mangalica.com/index.php?menu=fajta&pg=tenyesztes>)

Nem csak Magyarországon foglalkoznak mangalicákkal. Svájcban is van a fajta tenyésztőinek külön szervezete, a Svájci Szövetség a Mangalicatenyésztésért. Az ország mangalicaállománya 105 koca és 40 kan. Ausztriában 120 fecskehasú koca és kb. 40-50 kan található. Németországban a tenyésztési állomány 160 állatból áll, melynek összetétele: 28 szőke koca és 16 kan, 45 fecskehasú koca és 17 kan, 38 vörös koca és 13 kan (<http://www.Ge-h.de/geh-sweine/19-woll.htm>). Húsa ízletessége miatt olyan népszerűsége tett szert a mangalica, hogy az Amerikai Egyesült Államokban is és Oroszországban is elkezdtek tenyészteni és a legelőkelőbb éttermek étlapján is szerepelnek mangalica ételek.

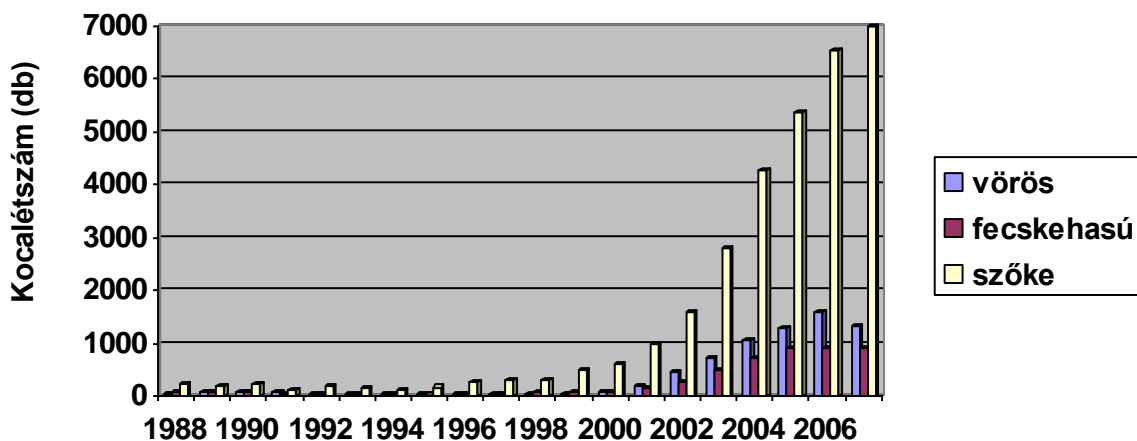
Különböző sertésfajták genetikai analízise

(<http://www.puremangalitsa.com/history.html>,

http://www.mlive.com/business/index.ssf/2013/08/mangalitsa_pig_michigan_gourme.html)

A mangalica vágósúlyának kétharmada fehér áru (zsír, hár, szalonna). Húsa jóval nagyobb zsírtartalmú, mint a hússertéseké. A mangalica hús- és zsír összetétele kedvezőbb, mint a többi sertésfajtáé. A mangalica zsírja több egyszeresen telítetlen és kevesebb többszörösen telítetlen zsírsavat tartalmaz (különösen akkor tartalmaz sok telítetlen zsírsavat, ha mangalica-takarmányon nevelték: búza, árpa, kukorica és ásványanyag kiegészítőkből és zöldtakarmányokból áll), ezért oxidatív stabilitásuk és élvezeti értékük jobb. Húsa több tiamint, riboflavint, vasat, cinket és rezet tartalmaz, mint a hússertéseké. Előnyösebb a nyersen, hosszú ideig érlelt termékek előállítása szempontjából. (Serrano sonka: több mint három éves érlelésnek vetik alá őket. A serrano típusú érleléssel előállított Monte-Nevado mangalica sonka kizárólag sózással és szárítással készül, nem pácolják és nem is füstölik). Magasabb mikroelem-tartalma is javítja a húsminőséget. (<http://konyvtar.univet.hu/praxis/vetkonf6/mangalica.pps#23>)

Különböző sertésfajták genetikai analízise



8. ábra. Az ellenőrzött mangalica kocalétszám színváltozatonként 1988-2007 között (<http://www.mangold.hu/egyesulet/dokumentumok/7.doc>, <http://www.atk.hu/upload/dokumentumok/wokrshopok/Mangalica/Toth-Mangalica.pdf>)

2. táblázat. A mangalicatenyészetek és tenyészállatok száma 2012-ben (forrás:http://www.mangalicatenyesztok.hu/downloads/tenyesztesi%20eredmenyek/pdf-hu/2012-Tenyesztesi_eredmenyek.pdf).

Fajta	Koca	Kan	Tenyészet
Szőke mangalica	4443	128	75
Fecskehasú mangalica	1171	55	37
Vörös mangalica	1877	68	58
Összesen	7492	251	170

Különböző sertésfajták genetikai analízise

2.4 A mangalica fajtacsoport különálló fajtákból áll

Egy kutatócsoport (ZSOLNAI és mtsai, 2006) vizsgálta a Mangalica fajtacsoport történetét és hány csoportba osztható, ha nem egységes fajta a mangalica a különböző színváltozatok alapján. A különböző földrajzi helyeken lévő farmokon tanulmányozták a genetikai rokonságot az őshonos magyar mangalica sertések között 10 mikroszatellit marker segítségével azért, hogy behatárolják a populációt és a tartásimódokat tudományosan megalapozottan tudják kiválasztani. A tanulmány feltevését – miszerint a mangalica egyedek egy egységes populációt alkotnak - cáfolták. Három csoportot különítettek el, mely a tenyésztésük történetével van összefüggésben. A megállapított legkisebb genetikai távolság a fecskehasú és a szőke mangalica között volt, míg a vörös mutatta a legnagyobb genetikai eltérést az előzőektől.

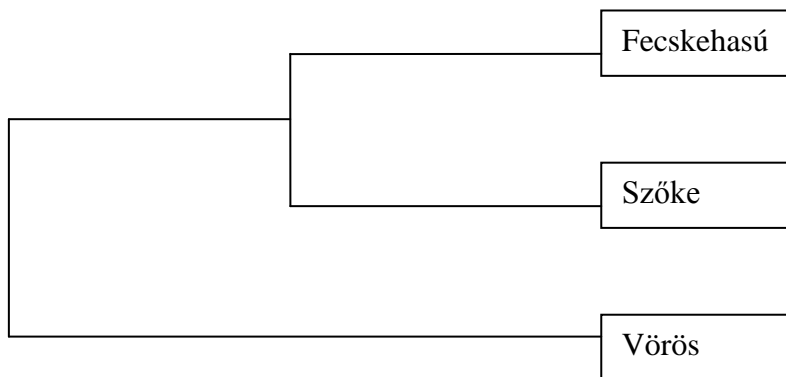
Széles körben elfogadott, hogy a lápi sertés ajta – melyet a Kárpát-medencéből származó avarok tartottak (isz. 800-900 körül) – lehet a mangalica fajtacsoport őse. Az írásos források szerint a XIX. században (1833) az alföldi, bakonyi, szalontai fajtákból származó egyedeket elkezdték keresztezni a szerbiai szumádia sertésekkel. Valószínűleg a szőkét alakították ki először és ezután kezdték keresztezni a horvát fekete szerémségi sertésekkel. A XIX. század végére a fekete eltűnt és kialakult a fecskehasú fekete szőrrel, de szőke torokkal és hasaljjal. A XIX. század második felében szőke kocákat párosítottak szalontai kanokkal, mely a vörös mangalicát eredményezte.

A II. világháború után a populáció drasztikus csökkenésen ment át. 1990-es években szerencsére újra felfedezték a mangalicát a

Különböző sertésfajták genetikai analízise

stresszhez való alkalmazkodóképességének és a betegségrezisztenciájának köszönhetően, valamint a kedvező anyai tulajdonságok és a húsának íze miatt. Magyarországi állományon kívül említést érdemlő mangalica populációk vannak még Svájcban, Németországban, Ausztriában és néhány tenyészállatot tartanak Romániában, továbbá az egykori Jugoszlávia területén.

123 mintát gyűjtöttek mindhárom színváltozat tenyészkocáiból és tenyészkanyjaiból. Kontrollként duroc sertésekből is gyűjtöttek mintákat. A vizsgálatok eredményeképpen megrajzoltak egy filogenetikai fát (lásd **9. ábra**). A kapott 3 csoport (3 különböző fajta) igazolja a történelmi dokumentumokat, miszerint a szőke mangalica és a fecskehasú közelebb áll egymáshoz, mint a vörös bármelyikükhöz. Ezek szerint a 3 mangalica populációt nem lehet csupán a mangalicák színváltozataként tekinteni, hanem ezek különböző fajták. (A különböző színváltozatok tenyészetenkénti megoszlását 2004-ben az **3. táblázat** mutatja).



9. ábra. Filogenetikus fa, a mangalica-fajták távolsága egymástól (ZSOLNAI és mtsai, 2006).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

3. táblázat. Különböző színek tenyészetenkénti megoszlása 2012-ben (http://www.mangalicatenyesztok.hu/downloads/tenyesztesi%20eredmenyek/pdf-hu/2012-Tenyesztesi_eredmenyek.pdf).

Színváltozat	Tenyészetek száma
Szőke mangalica	75
Vörös mangalica	34
Fecskehasú mangalica	22

2.5 Prolaktin

A prolaktin (prolactin, PRL; más néven laktogén hormon vagy luteotrop hormon) az agyalapi mirigy elülső lebenye által termelt egyik hormon. (HENNINGHAUSEN és mtsai, 1998). Fő feladata az, hogy biztosítsa a tejelválasztást a szoptatás alatt, azonban egyéb folyamatokban is szerepet játszik (pl. anyagcsere, növekedés, szaporodás), gyakran a nemi hormonokkal együtt. A szoptatás során serkenti a tejelválasztást (RIDDLE és mtsai, 1933) és segíti a tejmirigyek kialakulását (TOPPER és mtsai, 1980) Az anyatej termelődése 2 hormon hatására jön létre, ezek az prolaktin és az oxitocin. Hat a petefészkeken található sárgatestekre, így segít fenntartani a vemhességet és a progeszteron termelésének indításáért is felelős (KORWIN-KOSSASOWSKA és mtsai, 2006).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A XX. század elején terhes nők adenohipofízisének szövettani vizsgálata során változást észleltek (HALBAN és mtsai, 1900). Embereknél először FRIESEN (és mtsai, 1970) írta le a prolactin jelenlétét és szerepét. Francia kutatók azonosították először, hogy egy hipofízis hormon képes tejelválasztást indukálni a nyulaknál (STRICKER és mtsai, 1928). Később amerikai kutatók nevezték először ezt a faktort prolaktinnak (PRL) (RIDDLE és mtsai, 1933). Ma már tudjuk, hogy az összes gerincesben jelen van a prolaktin, ezért széles körben vizsgálják.

A prolaktinnak többféle hatása van, mint az összes többi agyalapi mirigy hormonnak együttvéve. Gerincesekben a prolaktin hatásait egy több, mint 300 különböző funkciót tartalmazó listában foglalták össze (BEN-JONATHAN és mtsai, 1996, BOLE-FEYSOT és mtsai, 1998). A prolaktin működése - akárcsak a többi hormoné - egy speciális membránreceptorhoz kötött.

Három évtizeddel a prolaktin felfedezése után a juh PRL aminosav szekvenciáját feltárták és egy 199 aminosavból álló fehérjeként határozták meg. Az 1970-es években a gyorsan fejlődő klóntechnológia lehetővé tette a PRL cDNS nukleotid szekvenciájának azonosítását számos fajban (BOLE-FEYSOT és mtsai, 1998).

2.5.1 A prolaktin gén és a prolaktin szerkezete

A PRL minden gerincesben jelen van. A hal kivételével (melynek PRL-je rövidebb és az elsődleges szerkezete is különbözik a többi

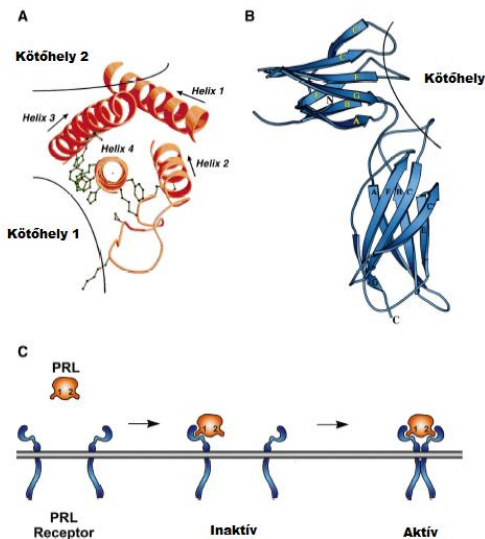
Különböző sertésfajták genetikai analízise

fajétól) minden feltárt PRL 197-199 aminosavból áll és 6 ciszteint tartalmaz, mely 3 diszulfid hidat hoz létre. Szekvencia összehasonlítás alapján kimutatták, hogy a PRL-t kódoló gén egy ősi génből fejlődött ki és mintegy 400 millió éve jelent meg először. A fehérje másodlagos szerkezetét kutató tanulmányok kimutatták, hogy a PRL α -hélixes szerkezetű fehérje, mely 50 %-ban tartalmaz hélixet, és a fennmaradó részben rendezetlen hurokszerkezetet mutat (BOLE-FEYSOT és mtsai, 1998) **(10. A, B ábra)**.

Sertésben a prolaktin gén 5 exonból és 4 intronból áll, mintegy 10 kb hosszúságú (KORWIN-KOSSASOWSKA és mtsai, 2006).

A prolaktint nem csak a hipofízis termeli, számos más sejt és szövet is előállítja. A PRL megtalálható számos testfolyadékban, mint például a vérérumban, cerebrospinális folyadékban, amniotikus folyadékban, könnyben, tejben, folliculáris folyadékban és izzadságban is (WALKER és mtsai, 1989, SABHARWAL és mtsai, 1992, OCHOA és mtsai, 2001).

Különböző sertésfajták genetikai analízise



10. ábra. A: Az emberi PRL 3 dimenziós szerkezete, 4 hélixes elrendeződés és a két kötőhely; B: Kötőhely; C: A PRLR aktiválása PRL-lel, két receptor molekula dimert képezve kötődik egy prolaktin molekulához (BOLE - FEYSOT, 1998).

2.5.2 A prolaktin működése

A hipofízis prolaktinja a klasszikus endokrin úton működik, az agyalapi mirigy választja ki, a vérkeringés szállítja, hatását a sejtekben fejt ki, a sejtmembrán periferiáján elhelyezkedő speciális receptorokon keresztül. A számos egyéb sejt által előállított PRL egyéb, más módon is kifejtheti hatását, így hat a szomszédos sejtekre vagy magára a kiválasztó sejtre is.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

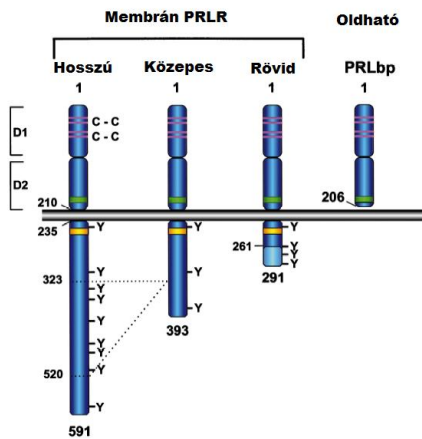
2.6 A prolaktin receptor

Két évtizeddel ezelőtt a prolaktin receptort nagy érzékenységgű, speciális, membránon átérő fehérjeként azonosították. Ez egy egyutas transzmembrán lánc.

A prolaktinnal ellentétben a prolaktin receptornak több módosulata létezik. Ezek a különböző formák eltérnek a hosszukban és a citoplazmatikus farok elrendeződésében (GOFFIN és mtsai, 1998). Létezik rövid, közepes és hosszú PRLR. A rövid prolaktin receptort először patkányok májában találták meg, a hosszú formát pedig az emlőmirigyében (**11. ábra**) Két prolaktin receptor molekula kapcsolódik egy-egy kötőhellyel egy prolaktin molekulához, így képeznek aktív komplexet (**10. C ábra**) (BOLE-FEYSOT és mtsai, 1998).

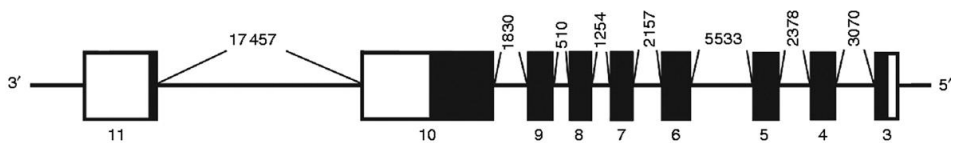
LE (és mtsai, 2012) kimutatta, hogy nem elég az egyik izoforma a normális petefészek működéshez, hanem a megfelelő CL (Corpus Luteum=sárgatest) képződéshez a hosszú és rövid formákra is szükség van.

Különböző sertésfajták genetikai analízise



11. ábra. A különböző méretű PRLR-ek a membránon, hosszú, közepes és rövid forma (BOLE-FEYSOT és mtsai, 1998).

A prolaktin receptor (PRLR) (**11. ábra**) génjét (NM_001001868) a 16. kromoszómán találták meg sertéseknél (VINCENT és mtsai, 1997). A gén a különböző sertésfajtákban polimorfizmust mutat, pontmutációja (G1789A) a 10. exonon (12.ábra) helyezkedik el, mely két különböző allélt eredményez, a B allél 2 kisebb (35bp, 92bp), az A allél 1 nagyobb (127 bp) fragmentet képez az Alu I enzimes emésztés során (LINVILLE, 2001).



12. ábra. A PRLR szerkezete, a pontmutáció a 10.exonon helyezkedik el (TROTT és mtsai, 2010).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A PRLR gén nullmutációja esetén egereknél romlottak a szaporodásbiológiai mutatók (implantáció hiánya, csökkent termékenyülési ráta, szabálytalan ciklusok stb.) A hímivarban csökkent fertilitás, vagy infertilitás figyelhető meg (ORMANDY és mtsai, 1997).

A prolaktin receptor génjét számos sertésfajtában vizsgálták már. DROGEMULLER (és mtsai, 2001) német sertésfajtákon (német landrace, duroc és hibrid: duroc × nagy fehér) végezte kísérleteit. Megállapította, hogy landrace fajtában az A allélnak volt kedvező hatása az alomméretre, míg a durocban a B allélnak volt hasonló hatása. VAN RENS és VAN DER LENDE (2002) nagy fehér × meishan keresztezett kocákat vizsgált és az A allél hatását találta kedvezőnek az alommérettel összefüggésben. Általában az AA genotípus magasabb malac számmal van összefüggésben. (ROTSCHILD és mtsai, 1998, VINCENT és mtsai, 1998, SOUTHWOOD és mtsai, 1999, KMIEC és mtsai, 2001, 2006,) Duroc esetében viszont a BB genotípus a kedvezőbb. (HAMANN és mtsai, 2000, ÁRNYASI és mtsai, 2001).

A vizsgált populációkban az A allél frekvenciája kisebb volt - ez alól a duroc állományok kivételt képeznek - és az AA genotípusú egyedek is kisebb hányadban voltak jelen (KMIEC és mtsai, 2001, LINVILLE és mtsai, 2001).

2.7 A sertés petesejt Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének

A sertés petesejtek parthenogenetikus aktiválása többek között a transzgénikus állatok előállítása során fontos. „A parthenogenezis egy

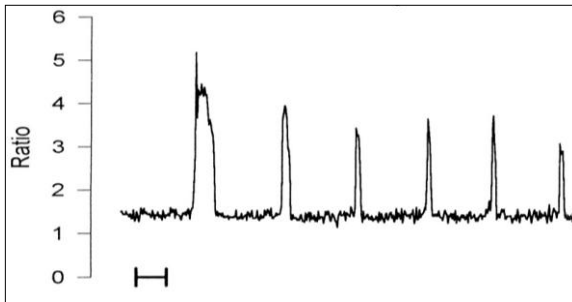
Különböző sertésfajták genetikai analízise

embrió létrehozása női ivarsejtből hímivarsejt közreműködése nélkül” (ROUGIER 2001). MCELROY és munkatársai 2010-ben még úgy gondolták, hogy humán célokra is felhasználhatók az állati modelleken kifejlesztett módszerek. Emberi, parthenogenetikusan aktivált petesejtekből nyerhetők összejek, melyek - ha szükséges, a donor számára bármely szervének későbbi transzplantációja - a szerv létrehozásának alapját képezhetik, így nincs kilökődés, hosszas várakozás az adott szervre. Mára már azonban a pluripotens összejeknek köszönhetően szinte bármilyen sejtet „újraprogramozhatunk” és a különböző betegséget a megfelelő sejtekkel küzdhetjük le. Például a szívinfarktust szívizomsejtek (YANG és mtsai, 2014) előállításával, az 1. típusú cukorbetegséget hasnyálmirigysejtek létrehozásával (LAHMY és mtsai, 2014), vagy az időskori makula degenerációt (KANEMURA és mtsai, 2014).

A termékenyítés nélküli embriófejlődést több módszerrel lehet elindítani, például vegyszerekkel: thimerosal (MACHÁTY és mtsai, 1997), ionomycin (SONG és mtsai, 2010, stroncium-klorid VARGA és mtsai, 2008), elektromos impulzussal (SUN és mtsai, 1992, IM és mtsai, 2006), vagy egyéb módszerekkel. Mindegyik módszer lényege a spermium által indukált Ca^{2+} -oszcilláció imitálása (ALBEIRO és mtsai, 2001, MIYAZAKI és mtsai, 2006) (**13. ábra**).

Ugyanakkor a Ca^{2+} jeleknek nem csak a termékenyüléskor van nagyon fontos szerepük, hanem az embrió további fejlődése során is, az osztódás során, a peri-implantációs folyamatoknál. A Ca^{2+} -függő fehérjék igen érzékenyek az oszcilláció hosszára, amplitudójára és frekvenciájára (JONES, 2005, DUCIBELLA és mtsai, 2006).

Különböző sertésfajták genetikai analízise



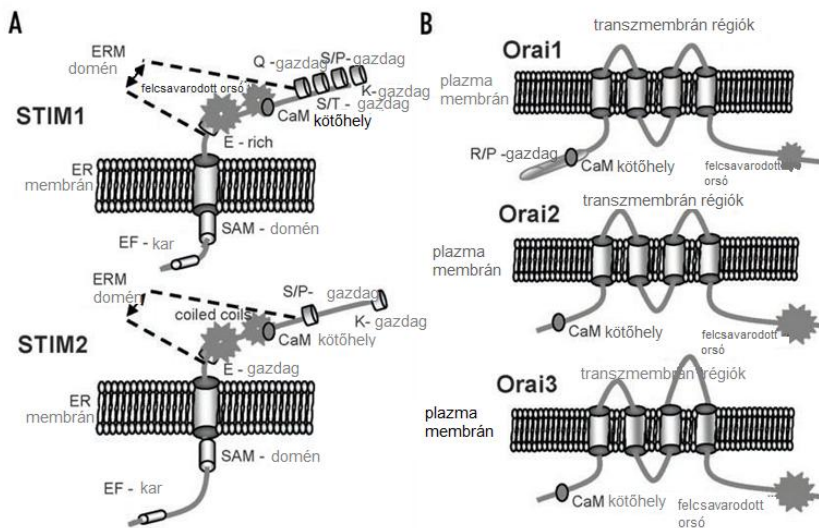
13. ábra. Érett petesejt Ca^{2+} -oszcillációja megtermékenyítést követően (Jones és mtsai, 1995).

A Ca^{2+} -oszcilláció létrehozásában fontos szerepet játszik a SOCE (Store-Operated Calcium Entry = sejtraktárok által szabályozott kalcium beáramlás) néven ismert mechanizmus, mely a raktárok lecsökkent Ca^{2+} szintjének visszapótlásában bír nagy jelentőséggel. Kutatások kimutatták, hogy testi sejtekben a raktárok által létrehozott Ca^{2+} beáramlás az Orai csatornán keresztül történik, (TAYLOR, 2006, CAHALAN és mtsai, 2007, GROSS és mtsai, 2007, HEWAVITHARANA és mtsai, 2007, PUTNEY, 2007, TOLHURST és mtsai, 2008) és e csatornák aktiválását STIM (Stromal Interaction Molecule= stromális kölcsönhatás molekula) fehérjék végzik. Ezek mellett a SERCA pumpa (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase =szarko/endoplazmatikus retikulum kalcium ATPáz), valamint a Syntaxin 5 is fontos szerepet játszanak a Ca^{2+} raktárból történő kiürítésében illetve visszapumpálásában (BENNETT és mtsai, 1993, COHEN és mtsai, 2004, ZHANG és mtsai, 2006, SUGA és mtsai, 2009).

A STIM fehérjék az ER Ca^{2+} -érzékelő transzmembrán fehérjéi, melyek az Orai fehérjékhez kapcsolódva indukálják a Ca^{2+} beáramlást a raktárok kiürülését követően. (**15. ábra**) Két módosulata létezik, STIM1 és STIM2 (ZHANG és mtsai, 2006, FRISCHAUF és mtsai, 2008). (**14. ábra**)

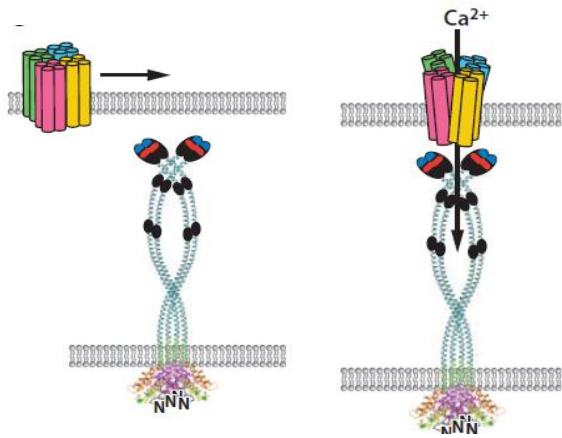
Különböző sertésfajták genetikai analízise

Az Orai fehérjék a plazmamembrán proteinjei, melyek aktiválódást követően oligomereket képeznek és ily módon hozzájárulnak az aktív Ca^{2+} csatornákhoz; segítségével a Ca^{2+} a sejtbe jut. Három módosulata ismert: Orai1, Orai2 és Orai3 (GWACK és mtsai, 2007, LIS és mtsai, 2007, FRISCHAUF és mtsai, 2008). A STIM2 génje sertésben a 8., az Orai2 génje pedig a 7. kromoszómán található.



14. ábra. A STIM és Orai fehérjék elhelyezkedése és szerkezete: A. A STIM fehérjék az ER membránon helyezkednek el. B. Három Orai módosulat a sejtmembránon, 4 alegysége van mindhárom módosulatnak (FRISCHAUF és mtsai, 2008).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

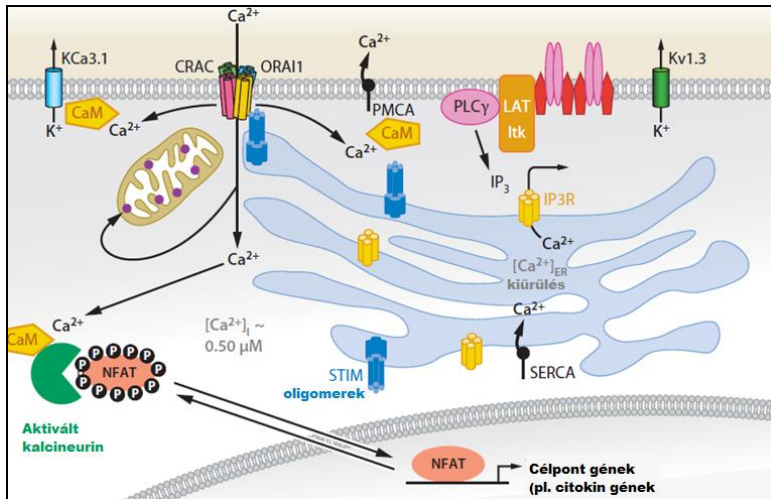


15. ábra. Az Orai és STIM fehérjék együttműködése és a Ca^{2+} beáramlása: A sejthártyán elhelyezkedő Orai fehérjéken keresztül áramlik a Ca^{2+} a sejtbe. Az Orai komplexeket az ER membránon lévő STIM fehérjék aktiválják oligomereket képezve (HOGAN és mtsai, 2010).

A SERCA pumpa az ER felszínén helyezkedik el és a spermium által okozott Ca^{2+} kiáramlást követően a Ca^{2+} raktárakba történő visszajuttatásáért felelős (HIGGINS és mtsai, 2006, ZHANG és mtsai, 2006, BRINI és mtsai, 2009) (**16. ábra**). A SERCA2 génjét sertésben a 14-es kromoszómán találták meg.

A ciklopiazonsav (CPA=cyclopiazonic acid) egy gombatoxin, mely a SERCA-pumpát gátolja, így ürítve ki a sejt Ca^{2+} raktárait (HOLZAPFEL, 1968, MIURA és mtsai, 1996). Számos tanulmányban írták már le ezt a funkciót, például simaziom összehúzóadás vizsgálatához, malária elleni gyógyszerként alkalmazva, stb. (YAO és mtsai, 2011, PANDE és mtsai, 2012).

Különböző sertésfajták genetikai analízise



16. ábra. SERCA pumpa és az Orai-STIM fehérjék együttműködése: A STIM fehérjék által kinyitott Orai csatornákon keresztül áramlik a Ca^{2+} a sejtbe, melyet a SERCA pumpa visszapótol az ER-be a raktárak kiürülését követően (HOGAN és mtsai, 2010).

A syntaxin 5 az ER membránon lévő policisztin-2 csatornát gátolja, mely az ER-ből történő Ca^{2+} kiáramlást szabályozza (TENG és mtsai, 2001, GENG és mtsai, 2008) (**17. ábra**). Génjét sertésben a 2. kromoszómán találták meg. MYAZAKI (és mtsai, 2012) vizsgálták a syntaxin 5 hosszú és rövid változatának szerepét és megállapították, hogy a hosszú változatnak van szerepe az ER formálásában, hiányában az ER teljesen a sejt szélére húzódik.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

3 ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Mangalicák prolaktin receptor génjének polimorfizmusa

3.1.1 *Anyagok*

A vizsgálatokat Promega termékekkel végeztük, a primerek az Integrated DNA Technologies Inc-től származnak. A DNS tisztítása Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) segítségével történt.

3.1.2 *Kísérleti elrendezés*

A kísérletben szőke és vörös mangalica egyedek (51 db) fagyaszott fül- illetve szőrtüszőmintáit használtuk. A DNS szakasz sokszorozásához polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk. A reakciót termocyclerben (thermoHybaid Px2, ThermoScientific, Foster City, CA, USA) futtattuk.

A reakció során használt oldat összeállítása a következő volt:

Gotaq polimeráz enzim	0.25 μ l (5u/ μ l)
5x puffer	10 μ l
dNTP	1 μ l (200 μ M végső koncentráció)
primer (XX IDT)	1 μ l (1 μ M végső koncentráció primerenként)
MgCl ₂	2 μ l (25mM)
víz	33.75 μ l
DNS	1 μ l (< 0.5 μ g/50 μ l)

Az oldat teljes mennyisége 50 μ l volt.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A PRLR primerek (LINVILLE RC, 2001):

PRLR4 5' CGG CCG CAG AAT CCT GCT GC 3'

PRLR5 5' ACC CCA CCT TGT AAC CCA TCA TCC 3'

3.1.3 PCR program

1 ciklus 95°C-on 2 percig

30 ciklus 95°C-on 1 percig

62°C-on 1 percig

72°C-on 1 percig

1 ciklus 72°C-on 10 percig

és 4°C tartása a gélen való ellenőrzésig.

A PCR terméket 2%-os agaróz gélen futtattuk. A várt fragmenthossz 170 bázispár.

3.1.4 Emésztés

A terméket restrikciós enzim segítségével emésztettük 37°C-on 4 órán át. A emésztéshez az Alu I enzimet használtuk. Az emésztési reakció elegy összetétele a következő volt:

0.5 µl Alu I restrikciós enzim 10u/µl

RE 10x puffer 2 µl

0.2 µl acetilált BSA 10µg/µl

10,3 µl steril, deionizált víz

7µl PCR termék.

3.1.5 Szeparálás

Az emésztés után a fragmentek szeparálása 3%-os agaróz gélen történt. Az agaróz gélhez fluoreszkáló festéket adtunk (etidium bromid).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Az UV fény segítségével a fragmentek láthatóvá váltak és ez lehetővé tette a géldokumentációt. Kodak DC290 Zoom digitális fényképezőgéppel és Alpha Innotech Corporation UV lámpával történt a gélekről a fénykép készítése. (**18. ábra**).

3.1.6 Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai elemzését IBM SPSS program 19-s verziójával végeztem Tukey féle post hoc analízis és egytényezős varianca analízis segítségével.

3.2 A sertés petesejtek Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének expressziója

Az összes vegyszer a SIGMA-ALDRICH Co.-tól (St.Louis, MO, USA) származik, ha ez nincs külön jelezve. Az alább ismertett kísérleteket a Purdue University - West Lafayette, Indiana, USA - Állattudományi Intézetében egy Fulbright ösztöndíj keretein belül végeztem.

3.2.1 Petesejtek kinyerése és *in vitro* maturációja

A sertés (nagy fehér \times duroc) petefészkeket az Indiana Packers Co., Delphi vágóhídról kaptuk. A 3-6 mm átmérőjű tüszőkből egy 10 ml-es fecskendőhöz csatlakoztatott steril, 20G méretű injekciós tűvel nyertük ki a petesejteket a follikuláris folyadékkal együtt.

Az *in vitro* maturáltatás 44 órán át LH és FSH hormonnal, valamint EGF-el (Epidermal Growth Factor = Epidermális Növekedési Faktor) kiegészített TCM (Medium 199-re alapozott sertés IVM oldat) oldatban történt (ABEYDEERA és mtsai, 2000). A GV állapotú

Különböző sertésfajták genetikai analízise

petesejteket a maturáltatás előtt, az MI fejlettségi állapotú petesejteket pedig 22 óra elteltével gyűjtöttük. (Melléklet 2)

3.2.2 Kísérleti elrendezés

A kísérletet háromszor hajtottuk végre, csoportonként és kísérletenként 2-2 qRT-PCR ismétlésben. Az első kísérletben a mintákat 93 GV, 92-92 MI és MII fázisú, a másodikban 70, a harmadikban 80 petesejt képezte és az ezekből nyert mRNS-ről írt cDNS-t használtuk a négy génből, egy kontroll génből és egy negatív kontrollból álló qRT-PCR-hoz.

3.2.3 Primertervezés és qRT-PCR

Az NCBI adatbázisát használtuk a génszekvenciák kereséséhez (Az alábbi géneket választottuk: STIM2: BP167477, Orai2 FD639141.1 (mivel ezek szerepe még kevésbé ismert és leírt, mint a STIM1 és Orai1 génké), SERCA2: NM_213865.1, STX5: BP159925), a primertervezéshez a Primer3 oldalt alkalmaztuk; a primereket az IDT Inc.-től rendeltük meg. (**4. táblázat**)

4. táblázat. A kezdeti primerek szekvenciája.

Primer	Szekvencia
SERCA2 F	5'-TCTGACTTTCGTTGGCTGTG-3'
SERCA2 R	5'-GTATATTGCCCGTCCCTCCT-3'
STIM2 F	5'-TGACCGGAGTCACAGACAGA-3'
STIM2 R	5'-GAAGTGCATCTGGAACAGACC-3'
Orai2 F	5'-CGGTCACCTACCCGGACT-3'
Orai2 R	5'-AGCAGAGCAGCACAACTCT-3'
STX5 F	5'-GCTGGAGAAGCTGACAATCC-3'
STX5 R	5'-CTCAATGTTCTGCATGGTGTCT-3'

Különböző sertésfajták genetikai analízise

A petesejtekből hírvivő RNS-t izoláltunk, melyet az Invitrogen Co. Dynabeads (mRNA DIRECT Micro Kit) (lifetechnology, Carlsbad, CA, USA) segítségével hajtottunk végre (Mellékelt 3). A Real-Time PCR reakciókat a cDNS-sel Bio-Rad készülékkel végeztük. A kétlépéses reverz transkripció PCR-hez a reagenseket a Bio-Rad Laboratories Inc.-től szereztük be, iScript cDNA Synthesis Kitet (BioRad, Hercules, CA), mely random primereket tartalmaz és iScript reverz transzkriptáz enzimet. A qRT-PCR reakciókhoz az iQ SYBR Green Supermixet (BioRad, Hercules, CA) használtuk.

5. táblázat. Az alkalmazott qRT-PCR primerek szekvenciája.

Primer	Szekvencia
ORAI2 F	5'-CACAACTCAACTCGGTCAA-3'
ORAI2 R	5'-CTGCCAGGAAGAGCAGTGT-3'
SERCA2 F	5'-TCTGACTTTCGTTGGCTGTG-3'
SERCA2 R	5'-GATCATAATGACCCGGATGC-3'
STIM2 F	5'-ACCGGAGTCACAGACAGAAA-3'
STIM2 R	5'-CAATTATGAGGAGGGCGTGT-3'
STX5 F	5'-AGGATTTTCGTGAGAGCCAAG-3'
STX5 R	5'-TTTGAAGTCATTGGACATGGAGG-3'

A petesejtekből nyert cDNS-t plazmid vektorral E.coli baktériumokba juttattuk Topo TA Cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével (leírást lásd a Melléklet 4). A baktériumokat 37°C-on ampicillines LB agaron tenyésztettük egy éjszakán át, majd inokuláltuk a

Különböző sertésfajták genetikai analízise

plazmidokat hordozó telepeket és folyékony LB tápoldatban 37°C-on rázóasztalos inkubátorban tenyésztettük egy éjszakán át (Melléklet 2). Az adott gént hordozó plazmidokat a Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) segítségével kinyertük (Melléklet 5) az *E. coli* baktériumokból. ECORI enzimes emésztés után agaróz gélen néztük meg, hogy beépült-e a kívánt gén és a génszekvenciát ellenőriztük (Purdue University). A génszakaszon belül rövidebb szakaszokra terveztünk primereket (**5. táblázat**). A plazmidokból kinyert DNS-ből standard sort csináltunk a qRT-PCR-hoz.

3.2.4 Statisztikai analízis

A Delta Delta Ct módszer alkalmazásával a vizsgált géneket a YWHAG génhez (GeneBank: C094522) viszonyítottuk. Ennek a háztartási génnek az expressziója állandó a korai sertés embriókban (WITHWORTH és mtsai, 2005). A statisztikai analízist a SAS programmal végeztük (Tukey féle post hoc analízis és egytényezős varianziaanalízis, Melléklet 1).

3.3 Különböző érési fázisú petesejtek Ca^{2+} szintjének mérése

3.3.1 Kísérleti elrendezés

A petesejteket Ca^{2+} -mentes tápközegben tartottuk, a mérés előtt 10 μM CPA-val inkubáltuk 2 órán át (a sejtek Ca^{2+} -raktárainak kiürítése céljából) és fél órán át Fura 2-AM Ca^{2+} -érzékelő festéket (lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) adtunk az oldathoz, hogy a petesejtekben jelen lévő Ca^{2+} -ot jelöljük (Melléklet 2). A mérést egy Nikon Eclipse TE-2000U invertmikroszkóp és egy hozzá kapcsolt InCyt

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Im2 fluoreszcencia-detektáló rendszer segítségével végeztük. A kezdeti, kb. 30 mp-es alap Ca^{2+} szint-mérés után a petesejthez emelt Ca^{2+} -koncentrációjú (10 mM) oldatot adtunk és tovább folytattuk a mérést (WANG és mtsai, 2013).

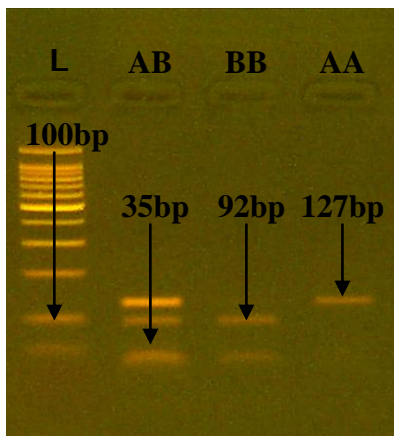
Különböző sertésfajták genetikai analízise

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Mangalicák prolaktin receptor génjének polimorfizmusa

4.1.1 Géldokumentáció

Az enzimes emésztést követően az agaróz gélen történt szeparálás után a következő fragmenteket kaptuk: A allél - 127 bp, B allél - 92, 35 bp.



18. ábra. A prolaktin receptor gén alléljainak fragmenthosszai (Az első zsebben a létra, a második zsebben a 38-as minta, a 3. zsebben 7. minta, a 4. zsebben pedig a 49. minta van).

4.1.2 Mangalicák alomadatai és a PRLR allélok összehasonlítása

A **6. táblázat** mutatja az egyedek alomadatait. A 48-as egyedről van a legtöbb fialási adatunk, hétszeri fialás. Az 1-22. állatok BB genotípusúak, a 23-47. kocák AB, a 48-51. egyedek pedig AA

Különböző sertésfajták genetikai analízise

genotípusúak. Látható a táblázatból, hogy a különböző genotípusok közt jelen van a mangalica fajtakör mindegyik képviselője, a vörös, szőke és fecskehasú is. A legtöbb az AB genotípusból fordult elő. A **7. táblázatban** foglaltuk össze a vizsgált populációk különböző genotípusainak átlagos alomadatait. A **9. táblázat** az allél- és genotípus gyakoriságokról ad információt, a **8. táblázatban** látható a Tukey féle post hoc analízis, a **10. táblázatban** pedig az egytényezős varianciaanalízis eredménye.

6. táblázat. A mangalica kocák alomadatai.

Sor-szám	Kocák típusa	Genotípus	Alom számok				
			1.	2.	3.	4.	5.
1.	vörös	BB	5				
2.	szőke	BB	7				
3.	fecskehasú	BB	5				
4.	szőke	BB	7	9			
5.	szőke	BB	8	8			
6.	szőke	BB	7	7	7		
7.	szőke	BB	8	7	8	6	7
8.	szőke	BB	7	8	7		
9.	vörös	BB	7				
10.	szőke	BB	6	7	6	8	8
11.	szőke	BB	4				
12.	szőke	BB	7				
13.	szőke	BB	4				
14.	vörös	BB	5	6	6		
15.	szőke	BB	5				
16.	szőke	BB	3				

Különböző sertésfajták genetikai analízise

17.	szőke	BB	5	8	4		
18.	szőke	BB	7	3			
19.	szőke	BB	7	3	6		
20.	szőke	BB	7	4	4		
21.	szőke	BB	4	4	6	7	3
22.	szőke	BB	3	5	5		
23.	szőke	AB	8				
24.	szőke	AB	6	7	10		
25.	szőke	AB	6	8	10		
26.	szőke	AB	6	5			
27.	szőke	AB	4	5			
28.	szőke	AB	4	7	6	6	
29.	szőke	AB	5	2			
30.	szőke	AB	4				
31.	szőke	AB	3				
32.	szőke	AB	3				
33.	szőke	AB	3				
34.	szőke	AB	7				
35.	szőke	AB	7				
36.	szőke	AB	9	10	8	9	9
37.	vörös	AB	7	7			
38.	fecskehasú	AB	10	6	8	4	6
39.	vörös	AB	6				
40.	fecskehasú	AB	4	8			
41.	szőke	AB	6				
42.	szőke	AB	6	8	8		
43.	szőke	AB	6	6	8		
44.	szőke	AB	7	6	7	8	
45.	szőke	AB	7				
46.	vörös	AB	9				

Különböző sertésfajták genetikai analízise

47.	fecskehasú	AB	8				
48.	szőke	AA	9	8	9	8	9
49.	szőke	AA	7	7	7	8	8
50.	szőke	AA	8	8	8	9	6
51.	szőke	AA	9	8			

(A 48-as egyed további kétszer fialt: 7, illetve 8 malacot)

Megállapíthattuk, hogy mangalicában az A allél van összefüggésben a nagyobb alomszámmal. Az AA genotípusú egyedek 2,21 malaccal többet fialtak a BB genotípusúaknál és a populáció átlagos alomméretét 1,33, az AB genotípusú egyedekét pedig 1,77 malaccal haladták meg.

7. táblázat. Átlagos alomméret adatok az egyes mangalica genotípusoknál.

AA átlagos alomszáma	8 ^a	AA nagyobb BB-nél	2,21
BB átlagos alomszáma	5,79 ^b	AA nagyobb populáció átlagnál	1,33
AB átlagos alomszáma	6,23 ^b	AA nagyobb AB-nél	1,77
Populáció átlagos alomszáma	6,67	AB nagyobb BB-nél	0,44

(^{a,b} az eltérő betűk az értékek közti szignifikáns különbséget jelölik; $p < 0,05$)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

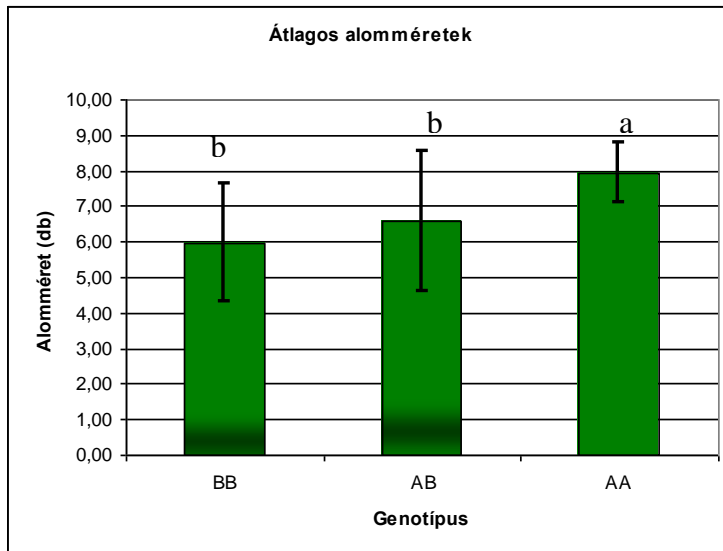
A három genotípus szignifikánsan ($p < 0,005$) eltér egymástól. Az AA magasabb alomszámmal van összefüggésben, mint az AB illetve BB, viszont az AB és a BB genotípusok közt nem mutatható ki szignifikáns különbség ($p > 0,005$) (**19. ábra**).

8. táblázat. Mangalica alom adatok Tukey féle post hoc statisztikai analízise.

(I) VAR00002	(J) VAR00002	Átlagos különbség (I-J)	Std. hiba	Sznif. Sznif.	95% konfidencia Intervallum	
					Alsó határ	Felső határ
BB	AB	-0,61576	0,33626	0,164	-1,4138	0,1823
	AA	-1,96698*	0,4586	0	-3,0554	-0,8785
AB	BB	0,61576	0,33626	0,164	-0,1823	1,4138
	AA	-1,35121*	0,4574	0,01	-2,4368	-0,2656
AA	BB	1,96698*	0,4586	0	0,8785	3,0554
	AB	1,35121*	0,4574	0,01	0,2656	2,4368

*. Az átlagos különbség szignifikáns 0,05 szinten.

Különböző sertésfajták genetikai analízise



19. ábra. A különböző mangalica genotípusok átlagos alomméretei, az AA genotípusú egyedek szignifikánsan több malacot fialnak, mint az AB, vagy BB egyedek.

(^{a;b} az eltérő betűk az értékek közti szignifikáns különbséget jelölik; $p < 0,05$)

Az A allél gyakorisága (32%), valamint az AA genotípusú egyedek (8%) hányada a populációban kisebb és ez összhangban van más kutatók eredményeivel. Romániában 40 vörös mangalicában vizsgálták a PRLR A alléljának frekvenciáját, mely ott 11 % volt (CIOBANU és mtsai, 2001). Javasoljuk, hogy szelekcióval növeljék az A allél gyakoriságát, így várhatóan növekedni fog az alomszám is.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

9. táblázat. Allél- és genotípus gyakoriságok, az A allél, illetve az AA genotípusú egyedek kisebb arányban vannak jelen a populációban.

	Mangalica
Allél frekvencia	A=32%
	B = 68%
Genotípus gyakoriság	AA = 8%
	AB = 49%
	BB = 43%

10. táblázat. Mangalica alomméreték egytényezős varianciaanalízise.

EGYTÉNYEZŐS VARIANCIAANALÍZIS					
VAR00001					
	négyzetek összege	szabadsági fok (Df)	Átlagos négyzet	F	Szignif.
Csoportok közt	53,758	2	26,879	9,233	0,000
Csoportokon belül	346,447	119	2,911		
Összesen	400,205	121			

Az AA genotípus magasabb malac számmal van összefüggésben. (ROTSCHILD és mtsai, 1998, SOUTHWOOD és mtsai, 1999, VINCENT és mtsai, 1998, KMIÉC és mtsai, 2006). Az eredményeinkben az AA genotípust hordozó egyedek a mangalica állományban magasabb malacszámot produkáltak, mint a BB genotípusú egyedek. Kísérleteinkben az AB genotípusú egyedek is kisebb termelési eredményeket mutattak, mint az AA genotípusú egyedek. A duroc fajta a többtől eltérően pozitív kapcsolatot mutatott a BB genotípussal (HAMANN és mtsai, 2001). VAN RENS és VAN DER LENDE (2002)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

szerint az AA genotípusú kocák nagyobb számú malacnak adtak életet, mint a BB genotípusú társaik. A lengyel lapály esetében szignifikánsan nagyobb számú malacot produkáltak az AA genotípussal rendelkező egyedek (KMIEC és mtsai, 2001, 2006). VINCENT (és mtsai, 1998) 5 PIC vonalat teszteltek (2 nagy fehér, 1 lapály, 1 duroc × nagy fehér, 1 nagy fehér × meishan vonal). TOMÁS (és mtsai, 2006) a PRLR több polimorfizmusának vizsgálata, és feltárása során arra az eredményre jutott, hogy nem elég egy pontmutációt nézni e gén esetén, hanem a több pontmutáció együttesét kell megfigyelni az alommérettel összefüggésben. Kísérleteik során ugyanis nem tapasztaltak szorosabb összefüggést egy-egy mutáció és az alommérettel kapcsolatban ezért SNP alkalmazását javasolja. Mangalicánál is érdemes lenne megnézni az általa javasolt SNP-k együttes hatását az alomszámra, az ovulációs rátára, az élve született malacok számára stb.

Alacsonyabb A allél frekvenciát figyeltek meg lapály (DROGEMÜLLER és mtsai, 2000, KMIEC és mtsai, 2001, LINVILLE és mtsai, 2001), vörös mangalica (CIOBANU és mtsai, 2001) és nagy fehér kocáknál (PUTNOVA és mtsai, 2002). Duroc esetében az A allél magasabb frekvenciát mutatott (DROGEMÜLLER és mtsai, 2000). KMIEC (és mtsai, 2001) megállapította, hogy az AA genotípus esetében az első alomszám magasabb, mint az azt követőek. Vizsgálatainkban a mangalica egyedek esetében nem volt ilyen tendencia.

KMIEC (és mtsai, 2006) összefüggést talált az egyes allélok hatásban a kanok termékenységi mutatóira is (mint pl. az ejakulátum térfogata, spermium koncentráció és mozgékonyság). Kísérleteinket tovább lehetne folytatni vizsgálva az apai hatást, vagyis az egyes

Különböző sertésfajták genetikai analízise

genotípusú kanoktól született kocáknak mekkora volt az alomszáma, valamint közvetlenül a kanok termékenységi mutatóira milyen hatással van az A illetve B allél.

4.2 A sertés petesejtek Ca^{2+} -oszillációját befolyásoló gének expressziója

4.2.1 Eredmények

A kezdeti primerekkel létrehozott PCR termékek nagysága: SERCA2 493 bp, Orai2 441 bp, STIM2 497 bp, STX5 499 bp, melyeket sikeresen beépítettünk plazmid vektor segítségével *E.coli* baktériumokba és sikeresen standard sort csináltunk belőlük. A szekvenálási eredmények igazolták a megfelelő szekvenciát.

qRT-PCR Ct eredményeket és átlagokat a **11. táblázatban** foglaljuk össze.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

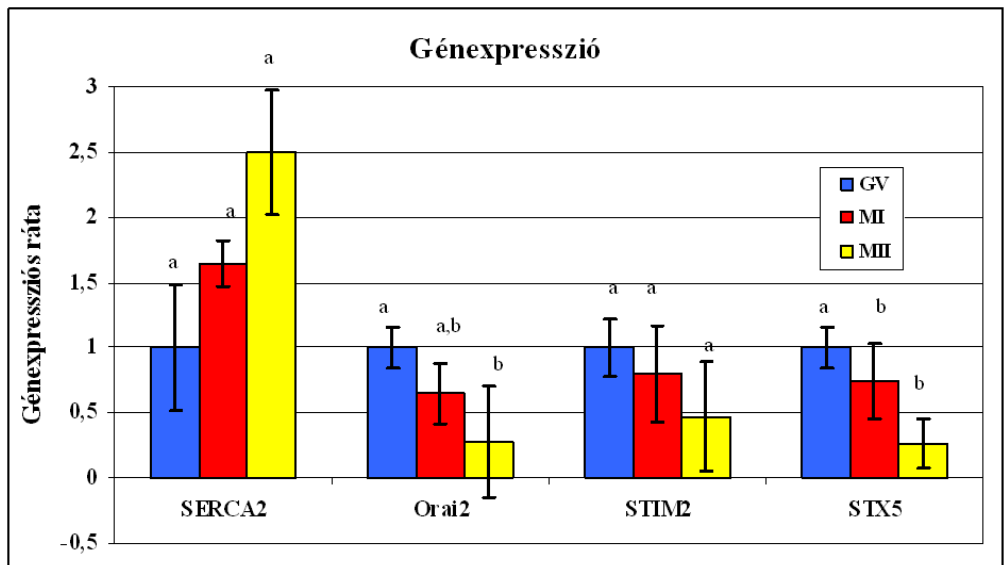
11. táblázat. A vizsgált gének Ct értékei a különböző fejlettségi állapotú petesejteknel.

gén	GV Ct 1	GV Ct2	Átlag	MI Ct 1	MI Ct2	átlag	MII Ct1	MII Ct2	átlag
Serca2	21,9	22,6	22,25	22,4	22	22,2	21,8	22,7	22,25
Orai2	23,5	23,5	23,5	24,2	25,1	24,65	25,9	26,7	26,3
Stim2	24,7	24,8	24,75	24,9	25,1	25	26,4	27	26,7
STX5	24,6	24,6	24,6	25,4	25,9	25,65	27,6	27,8	27,7
Yw	24		24	23,8	24,3	24,05	25	25,5	25,25
Serca2	24,4	24,1	24,25	22,6	22,6	22,6	23,7	23,9	23,8
Orai2	23,7	24	23,85	23,6	23,8	23,7	27,7	28,3	28
Stim2	25,8	25,7	25,75	24,9	25,6	25,25	28	28,6	28,3
STX5	25,4	25,7	25,55	24,4	24,9	24,65	28,2	28,7	28,45
Yw	24,3	24,6	24,45	23,7	24,1	23,9	25,3	26,1	25,7
Serca2	23,6	23,1	23,35	20,8	21,8	21,3	22	21,8	21,9
Orai2	23,3	24	23,65	22,9	22,9	22,9	24,1	24,5	24,3
Stim2	25,4	25,1	25,25	24,7	25	24,85	25,7	26,5	26,1
STX5	24,9	24,6	24,75	23,8	24,8	24,3	25,9	26,9	26,4
Yw	23,5	24	23,75	22,4	22,9	22,65	23	23,6	23,3

A tervezett qRT-PCR termékek hosszai a következők voltak: SERCA2 103 bp, STIM2 82 bp, Orai2 106 bp és STX5 114 bp.

A **20. ábrán** a gének expressziós értékeit ábrázoltuk génenként (SERCA2, Orai2, STIM2, STX5) és a petesejt-fejlődési csoportonként (GV, MI, MII). A szignifikáns különbségeket a különböző betűk jelentik (^{a, b}).

Különböző sertésfajták genetikai analízise



20. ábra. A vizsgált gének expressziós értékeinek különbségei GV, MI és MII állapotú petesejtnél.

(^{a,b} az eltérő betűk az értékek közti szignifikáns különbséget jelölik; $p < 0,05$)

A statisztikai analízis során két gén expressziójában tapasztaltunk szignifikáns eltérést a különböző fejlettségű petesejtek között ($p < 0,05$). A SERCA2 és STIM2 gének esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást, míg az Orai2 és STX5 gének kifejeződése csökkent a maturáltatás során.

4.2.2 Következtetések

A SERCA2 gén expressziójának változatlanságát az indokolhatja, hogy az ER raktár szerepe a petesejt érése során minden stádiumban egyaránt fontos, valamint ez a sejtszervecske egyéb sejt-kommunikációs folyamatokban is részt vesz (BRINI és mtsai, 2009). BRINI (és mtsai,

Különböző sertésfajták genetikai analízise

2009) szerint a két SERCA2 variáns, a és b közül az 'a' a vázizmokban expresszálódik, míg a 'b' mindenhol, azaz egyfajta alap életjelenséghez szükséges gén (háztartási gén). Bár eredményeinkben nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést az expressziójában, de egy növekvő trend figyelhető meg a petesejt érése során, így nem biztos, hogy alkalmazható lenne háztartási génként. További vizsgálatára szükség lenne. Dél-afrikai karmosbéka petékben kimutatták, hogy a SERCA2 a SERCA változatok közül a legérzékenyebb a Ca^{2+} -ra (JOHN és mtsai, 1998), de egyben a legkisebb is a Ca^{2+} -transzportáló képessége (LYTTON és mtsai, 1992), így valóban expressziójában a legkisebb változásra számíthatunk.

A STIM2 és Orai2 fehérjék szerepe még nem teljesen tisztázott, de a kísérletek alapján a STIM2-nek hasonló szerepe van, mint a STIM1-nek, bár főként a szabályozás (esetleg gátlás) a feladata (HEK293-ban vizsgált adatok szerint: HEWAVITHARANA és mtsai, 2007). Az Orai2 is hasonló - bár gyengébb - funkciót tölt be, mint az Orai1 (GWACK és mtsai, 2007), expresszióját már megfigyelték vese, tüdő és lépsejtekben is.

A STIM2 szerepében nem egységesek az irodalmi adatok, így csak bizonytalan következtetést tudunk levonni a saját kísérletekben tapasztalható expressziójának változatlanságában. Tüdőartéria simaizom sejtjeiben SONG (és mtsai, 2011) kimutatta, hogy a STIM2 magasabb expressziója növelte a SOCE-t és bár az siRNS injektálás csökkentette azt, a gén teljes kiütése után nem volt változás abban. Tehát a STIM2 szükséges a SOCE-hoz, de nem elegendő önmagában. Más kutatók eredményei szerint a STIM2 a STIM1-gyel kapcsolódva gátolja a SOCE-t HEK293, PC12, A7r5 és Jurakt T sejtekben (SOBOLOFF és mtsai, 2006).

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Tehát ha fontos szerepe van a SOCE-ban a STIM2 expressziójának növekednie kellene, míg ha gátló hatása van, akkor éppen ellenkezőleg, csökkenie kellene a petesejtek érése során. További vizsgálatok lennének szükségesek a kérdés eldöntésére.

Limfocita sejtekben írták le, hogy a STIM fehérjék dimereket illetve oligomereket képezve kapcsolódnak az Orai fehérjékhez, amint az ER raktár kiürül (HOGAN és mtsai, 2010) s csak így nyílnak meg a plazmamembrán Ca^{2+} csatornái. *Drosophila* sejtekben a STIM1 túlexpresszáltatása önmagában nem volt hatással a Ca^{2+} beáramlására, míg Orai1-gyel közösen túlexpresszáltatva jelentősen megnövelte azt (FESKE és mtsai, 2006, GWACK és mtsai, 2007). Ugyanezt az eredményt kapták Jurkat T sejtekben, RBL sejtekben és HEK293 sejtekben is (PEINELT és mtsai, 2006). Ezzel szemben a STIM2 az Orai1-gyel közösen túlexpresszáltatva gátolta a Ca^{2+} beáramlást a raktárak kiürülését követően, szintén HEK293 sejtekben (MERCER és mtsai, 2006), bár mások azt találták, hogy lényegesen nagyobb STIM2 szint közösen az Orai1-gyel képes volt megnövekedett Ca^{2+} áramot előidézni (HEWAVITHARANA és mtsai, 2007). Orai1 mutációt hordozó betegekből nyert fibroblaszt sejteken vizsgálták az Orai2 illetve Orai3 és STIM1 közös túlexpresszáltatását; azt tapasztalták a kísérletek során, hogy az Orai3-mal közösen a STIM1 megfelelő SOCE funkciót mutatott, míg Orai2-vel alacsony aktivitás volt megfigyelhető (GWACK és mtsai, 2007).

Úgy tűnik tehát, hogy az Orai és STIM fehérjék aránya meghatározó a Ca^{2+} -beáramlás szempontjából. A két fehérje együttes túlexpresszáltatása limfocita sejtekben és HEK293 sejtekben megnövekedett Ca^{2+} -áramlást eredményezett, míg az egyenkénti

Különböző sertésfajták genetikai analízise

túlexpresszáltatás gátolta a SOCE-t (MERCER és mtsai, 2006, HOGAN és mtsai, 2010). Saját eredményeink alátámasztják ezeket a megfigyeléseket. Éretlen petesejtek - melyekben magas az Orai2 szint a STIM1 szintjéhez képest- nem mutatnak hosszan tartó Ca^{2+} -oszcillációt spermiummal való fúziót követően. Az érés során csökken az Orai fehérjék STIM-hez viszonyított aránya a sejtekben és feltehetőleg ennek következtében ezen petesejtekben a termékenyítést végző spermium órákig tartó Ca^{2+} -oszcillációt képes előidézni.

A syntaxin 5 gén expressziójának csökkenésére az a magyarázat, hogy fehérjéje a policisztin-2 fehérjével kapcsolódva gátolja a Ca^{2+} -áramlást az ER membránon. Ezt a funkcióját GENG (és mtsai, 2008) írta le *in vitro* élesztőben, és *in vivo* coimmunoprecipitációs kísérletek igazolták veseszövetben és epitel sejtvonalakban. Így csökkenése indokolt, mivel az oszcilláció során a raktárakból kiáramló Ca^{2+} felelős elsődlegesen a Ca^{2+} szignál létrehozásában. A policisztin2 génjének expresszióját is érdemes lenne vizsgálni a különböző fázisú sertés petesejtekben. Kettős, illetve külön-külön történő túlexpresszáltatással, vagy géncsendesítéssel a STX5-tel.

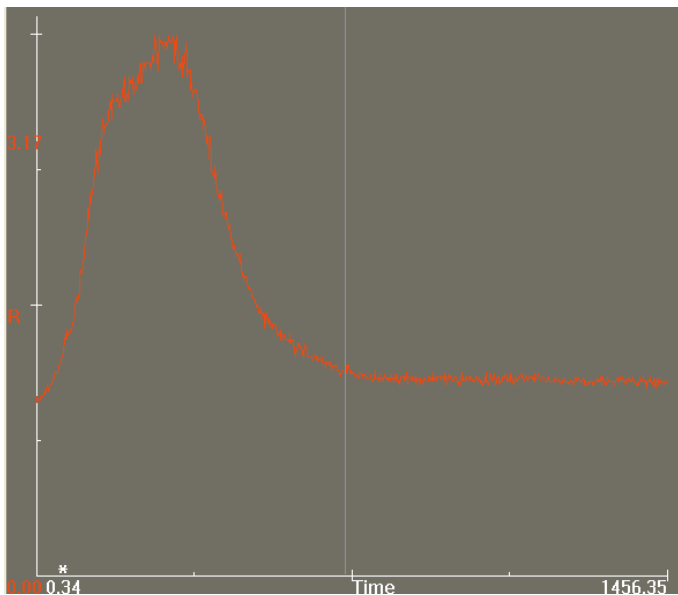
A vizsgált négy gén expressziós vizsgálatait tovább lehetne folytatni. Western-blottal megnézni fehérjéik jelenlétét, immunocitokémiai vizsgálattal a petesejteken belüli eloszlásukat. Túlexpresszáltatást illetve géncsendesítést követő megtermékenyítéssel vizsgálhatnánk az embriófejlődést, illetve rendellenességeket.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

4.3 Különböző érési állapotú petesejtek Ca^{2+} beáramlásának mérése

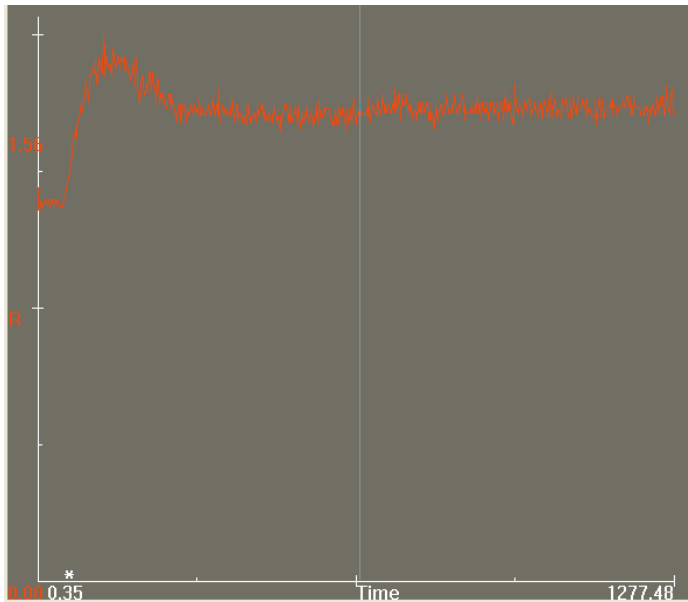
4.3.1 Eredmények és értékelésük

A három eltérő fejlettségű petesejtnél a következő eredményeket kaptuk: GV és MI állapotban kevésbé váltható ki a Ca^{2+} beáramlása, míg MII fázisban lényeges emelkedést mutatott a kezdeti „nyugalmi” Ca^{2+} szint (**21. 22. 23. ábra**). Ez a hirtelen Ca^{2+} szint-emelkedés alkalmas lehet egy későbbi kémiai aktiválás elindítására.



21. ábra. MII petesejtben 10 μM CPA és 10 mM Ca^{2+} által kiváltott Ca^{2+} csúcs.

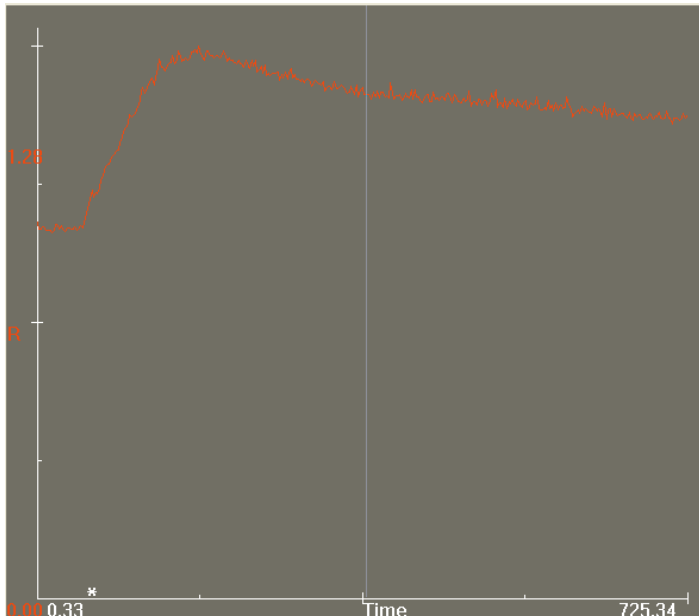
Különböző sertésfajták genetikai analízise



22. ábra. GV petesejtben 10 μM CPA és 10 mM Ca^{2+} által okozott Ca^{2+} csúcs.

Ez az emelkedés az extracelluláris Ca^{2+} sejtbe történő beáramlásának eredménye és a sejt Ca^{2+} raktárainak kiürülése váltotta ki (sejtraktárok által szabályozott Ca^{2+} beáramlás).

Különböző sertésfajták genetikai analízise



23. ábra. MI petesejtben 10 μM CPA és 10 mM Ca^{2+} által kiváltott Ca^{2+} beáramlás.

Az eredmény tehát azt bizonyítja, hogy érett petesejtekben jelentős Ca^{2+} beáramlás követi a raktárak kiürülését; ez lényeges a raktárak újratöltéséhez és a spermium által előidézett, hosszan tartó Ca^{2+} oszcilláció fenntartásához. GV és MI fázisban lévő petesejtek esetében nem következett be jelentős Ca^{2+} beáramlás a raktárak kiürítését követően; ez összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy éretlen petesejtekben a spermium csak rövid idejű Ca^{2+} jelet képes előidézni. Egér petesejtekben folytatott kutatás szerint a beáramlás GV állapotban volt megfigyelhető (ott tapszigarginnal történt a blokkolás), viszont MII-ben nem, ami meglepő eredmény (CHEON és mtsai, 2013, LEE és mtsai, 2013), bár a szerző az ER raktárak feltöltésének szerepét hangsúlyozza a

Különböző sertésfajták genetikai analízise

maturáció során. TOMBES (és mtsai, 1992) ugyanilyen eredményre jutottak hörcsög petesejtek vizsgálva. Az ER Ca^{2+} tartalma növekszik, míg a Ca^{2+} beáramlás csökken az érés során. Szintén egér petesejteken folytatott kutatások szerint az éretlen, GV petesejtekben a spontán Ca^{2+} oszcilláció a GVBD-ig (Germinal Vesicle Break Down = germinális vezikulum megszűnése) tart (CAROLL ÉS SWANN, 1992, FUJIWARA és mtsai, 1993) aztán egy blokkolást követően ez a folyamat megáll. Mint korábban említettük, a Ca^{2+} nagyon fontos a sejt-kommunikációban. Segít kilépni a petesejtnek a meiotikus stopból és tovább haladhat az érésben. Az extracelluláris Ca^{2+} jelenléte bizonyos fajokban szükséges, hogy vissztérhessen a sejt a normális sejt-ciklusba, míg más fajoknál nincs hatással az extracelluláris Ca^{2+} hiányának a meiosisba való visszatérésben, például sertésben (KAUFMAN és mtsai, 1993, WANG és mtsai, 2013), szarvasmarhában (HOMA, 1991) és emberben is (MARTÍN-ROMERO és mtsai, 2008). Fajbeli különbségek tehát léteznek, ezért kiemelkedően fontos, hogy további mérést folytathassunk.

A vizsgálatokat ki kellene bővíteni, hogy statisztikai elemzésnek vehessük alá. További méréseket kellene végezni, hogy aktiválható-e a petesejt CPA-val, vagy csak egyszeri Ca^{2+} beáramlást tudunk előidézni érett, MII petesejtekben. Valamint a 4.2 eredmények tükrében és az ott leírt javaslatok alapján nem csak spermiummal történt termékenyítést követően lehetne vizsgálni az ott javasolt túlexpresszáltatási-géncsendesítőes kísérleteket, de akár a CPA-val blokkolt, vagy aktivált petesejtekben is. A 4.2 fejezetben vizsgált gének további funkcióit tudnánk feltárni, illetve ismereteinket pontosítani, ha éretlen

Különböző sertésfajták genetikai analízise

petesejtekben is sikerülne nagy Ca^{2+} beáramlást előidézni microRNS illetve siRNS injektálással.

5 ÖSSZEFOGLALÁS

Hazánkban a sertés húsa és termékei nélkülözhetetlen részét képezik a gasztronómiának. A magyar mangalica fajta kifejezetten ízletes, ám mivel zsírsertés, népszerűsége és így tenyésztése is csökkent. Megőrzése mégis fontos a genetikai változatosság fenntartása érdekében is.

Disszertációm első részében a mangalica fajtakör prolaktin receptor génjének polimorfizmusát vizsgáltam és az egyes allélok hatását az alomméretre. A prolaktin fontos szerepet játszik többek közt a tejelválasztásban és a vemhesség fenntartásában is. A prolaktin a véráram segítségével az agyalapi mirigyből érkezik meg a receptorához, majd a két receptor alegység és a 4 hélixből álló prolaktin kapcsolódik. A prolaktin receptor génje a 16. kromoszómán van. Számos sertés fajtában kimutatták polimorfizmusát és alléljainak különböző hatását is leírták a különböző fajtákban. Ötvenegy mangalica fül- és szörtüsző mintáit használtam DNS forrásként.

Kísérleti eredményeink szerint a mangalicában is létezik e gén polimorfizmusa és az A allél kedvezőbben hat az alomméretre, ám az AA genotípusú egyedek kisebb hányadban vannak jelen a populációban. Az A allél gyakorisága 32%, az AA genotípusú egyedké pedig 8% volt. Az AA genotípusú egyedek 2,21 malaccal többet fialtak a BB genotípusúaknál és a populáció átlagos alomméretét 1,33, az AB genotípusú egyedekét pedig 1,77 malaccal haladták meg. A három genotípus szignifikánsan ($p < 0,005$) eltér egymástól. Az AA genotípusban figyelhetünk meg magasabb alomszámot, mint az AB illetve BB

Különböző sertésfajták genetikai analízise

egyedekben, viszont az AB és a BB genotípusok közt nem mutatható ki szignifikáns különbség ($p > 0,005$).

A petesejtekben is, úgy, mint a testi sejtekben a Ca^{2+} fontos szerepet tölt be a sejt-kommunikációs folyamatokban. A spermium egy Ca^{2+} -oszcillációt indít termékenyítéskor a petesejben, melyet a petesejt a raktáraiból történő kiürítést követően a környező közegből történő Ca^{2+} visszaszívással hoz létre. Ezt az oszcillációt csak érett petesejtekben lehet elindítani. Ebben a folyamatban számos gén vesz részt, ezek közül 4 expresszióját vizsgáltuk disszertációm második részében. Vizsgálataimat az USA-ban a Purdue Egyetemen folytattam 2009 és 2010-es tanévben, egy elnyert Fulbright ösztöndíj keretében.

SERCA pumpa az ER felszínén helyezkedik el és a spermium által okozott Ca^{2+} kiáramlást követően a Ca^{2+} raktárakba történő visszajuttatásáért felelős, génje a 14-es kromoszómán található. A syntaxin 5 az ER membránon lévő policisztin-2 csatornát gátolja, mely az ER-ből történő Ca^{2+} kiáramlást szabályozza, génje a 2. kromoszómán helyezkedik el. A STIM fehérjék az ER Ca^{2+} -érzékelő transzmembrán fehérjéi, melyek az Orai fehérjékhez kapcsolódva indukálják a Ca^{2+} beáramlást a raktárak kiürülését követően.

Eltérő érési fázisú sertés petesejtekből nyert mRNS-t írtunk át cDNS-re és a gének egyes szakaszaira tervezett primerekkel Real-Time PCR segítségével vizsgáltuk a génexpressziót. A SERCA2, STIM2, Orai2 és STX5 gének expressziójának statisztikai analízise során kettőben tapasztaltunk szignifikáns eltérést a különböző fejlettségű petesejtek között ($p < 0,05$). A SERCA2 és STIM2 gének esetében nem

Különböző sertésfajták genetikai analízise

tapasztaltunk szignifikáns változást, míg az *Orai2* és *STX5* gének kifejeződése csökkent a maturáltatás során.

Disszertációm harmadik részében a Ca^{2+} – beáramlást vizsgáltuk sertés petesejtekben. A ciklopiazonsav (CPA=cyclopiazonic acid) egy gombatoxin, mely a SERCA-pumpát gátolja, így ürítve ki a sejt Ca^{2+} raktárait. CPA-val gátoltuk a SERCA pumpát Ca^{2+} - mentes közegben, majd emelt Ca^{2+} -tartalmú oldat hozzáadását követően mértük a Ca^{2+} visszaáramlást három különböző érési fázisú petesejtekben.

GV és MI állapotban kevésbé váltható ki a Ca^{2+} beáramlása, míg MII fázisban lényeges emelkedést mutatott a kezdeti „nyugalmi” Ca^{2+} szint. Az eredmény tehát azt bizonyítja, hogy érett petesejtekben jelentős Ca^{2+} beáramlás követi a raktárak kiürülését; ez lényeges a raktárak újratöltéséhez és a spermium által előidézett, hosszan tartó Ca^{2+} oszcilláció fenntartásához. Ennek az oszcillációnak a kiváltása viszont nem lehetséges GV illetve MI petesejtekben.

Eredményeink alapján további vizsgálatokra lenne szükség, hogy a Ca^{2+} oszcillációt befolyásoló gének szerepét, valamint a CPA hatását, a petesejtben lezajló kommunikációt jobban megérthessük.

6 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- 1) A mangalica fajtában is jelen van a prolaktin receptor génjének polimorfizmusa és a különböző allélok eltérő hatással vannak az alomszám alakulására. Vizsgálataink alapján az A allélt hordozó, illetve az AA genotípusú kocák több malacot fialnak, ám kisebb arányban vannak jelen a populációban. Szelekcióval, a másik allél megtartásával érdemes lenne növelni ezt az arányt, hogy az alomszám növekedhessen.
- 2) A sertés petesejtekben a Ca^{2+} -oszcillációt befolyásoló gének közül a négy vizsgált gén különböző mértékben expresszálódik a különböző fejlődési stádiumokban. A syntaxin 5 és az Orai 2 expressziója csökken, míg a STIM 2 és a SERCA 2 nem változik szignifikánsan. Ezeket a géneket még nem vizsgálták sertés petesejtekben.
- 3) Érett sertés petesejtekben a Ca^{2+} -raktárak kiürítése Ca^{2+} beáramlást idéz elő a sejtmembránon keresztül CPA-val (ciklopiazonsav) történt blokkolást, majd emelt Ca^{2+} koncentrációjú oldat hozzáadását követően. A beáramlás mértéke növekszik a petesejtek érésével egyidőben és ez lényeges a megtermékenyítést követően, az embriófejlődést kiváltó Ca^{2+} -jelek előidézésének szempontjából. CPA-val történt blokkolást

Különböző sertésfajták genetikai analízise

követően először mi végeztük el a Ca^{2+} beáramlásának mérését sertés petesejtekben.

7 IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. ABEYDEERA, L.R. – WANG, W.H. – CANTLEY, T.C. – RIEKE, A. – MURPHY, C.N. – PRATHER, R.S. – DAY, B.N. (2000): Development and viability of pig oocytes matured in a protein-free medium containing epidermal growth factor. *Theriogenology*. 54(5), 787-797
2. ALBEIRO, R. - ZAKHARTCHENKO, V. - MOTLIK, J. –WOLF, E. (2001): Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *International Journal of Development Biology*. 45, 797-809
3. ARCHIBALD, A.L. – HALEY, C.S. – BROWN, J.F. – COUPERWHITE, S. – MCQUEEN, H.A. – NICHOLSON, D. – COPPIETERS, W. – VAN DE WEGHE, A. – STRATIL, A. - WINTERO, A.K. (1995): The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). *Mammalian Genome*. 6, 157-175
4. ÁRNYASI M. (2001): Molekuláris genetikai vizsgálatok a gazdasági állatfajok termelési eredményének javítása érdekében; *Debreceni Egyetem Agrártudományi Közlemények*. 1, 92-96
5. BEN-JONATHAN, N. – MERSHON, J.L. – ALLEN, D.L. – STEINMETZ, R.W. (1996): Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 17, 639–669
6. BENNETT, M. K. – GARCIA-ARRARAS, J. E. –ELFERINK, L. A. – PETERSON, K. –FLEMING, A. M. –HAZUKA, C. D. - SCHELLER, R.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- H.(1993): The Syntaxin Family of Vesicular Transport Receptors. *74*, 663-673
7. BRINI, M. –CARAFOLI, E. (2009): Calcium pumps in health and disease. *Physiological Reviews* *89*, 1341–1378
 8. BOLE-FEYSOT, C. – VINCENT, G. – EDERY, M. – BINART, M. – KELLY, P. A. (1998): Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*. *19*(3), 225-268
 9. CAHALAN, M. D. –ZHANG, S. L. –YEROMIN, A. V. –OHLSEN, K. – ROOSB, J. –STAUDERMAN, K. A. (2007): Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium*. *42*, 133–144
 10. CAROLL, J. – SWANN, K. (1992): Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol triphosphate occur during *in vitro* maturation of mouse oocytes. *Journal of Biological chemistry*. *267*, 11196-11201
 11. CHEN, K. - BAXTER, T. - MUIR, W. M. - GROENEN, M.A. - SCHOOK, L. B. (2007): Genetic resources, genome mapping and evolutionary genomics of the pig (*Sus scrofa*). *International Journal of Biological Sciences*. *3*, 153–165
 12. CHEON, B. – LEE, H.-C. – WAKAI, T. – FISSORE, R.A. (2013): Ca²⁺ influx and store-operated Ca²⁺ entry pathway undergo regulation during mouse oocyte maturation. *Molecular Biology of the Cell*. *24*(9), 1396-1410
 13. CIOBANU, D.C. – DAY, A.E. – NAGY, A. – WALES, R. – ROTSCCHILD, M.F. – PLASTOW, G.S. (2001): Genetic variation in

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. *Genetics Selection Evolution*. 33, 417-432
14. COHEN, R. – ATLAS, D. (2004): R-type voltage-gated Ca^{2+} channel interacts with synaptic proteins and recruits synaptotagmin to the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. *Neuroscience*. 128, 831-841
15. DROGEMÜLLER, C. – HAMANN, H. – DISTL, O. (2001): Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *Journal of Animal Sciences*. 79, 2565-2570
16. DUCIBELLA, T. – SCHULTZ, R.M. – OZIL, J.P. (2006): Role of calcium signals in early development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 17, 324–332
17. ELLEGREN, H. – CHOWDHARY, B. P. – JOHANSSON, M. – Marklund, L. – FREDHOLM, M. - GUSTAWON, I. – ANDEMSON, L. (1994): A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. *Genetics*. 137, 1089-1100
18. FESKE, S. – GWACK, Y. – PRAKRIYA, M. – SRIKANTH, S. – PUPPEL, S.H. – TANASA, B. – HOGAN, P.G. – LEWIS, R.S. – DALY, M. – RAO, A. (2006): A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*. 441(7090), 179-85.
19. FÉSÜS L. – KOMLÓSI I. – VARGA L.– ZSOLNAI A. (2000): Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroiinform Kiadó, Budapest

Különböző sertésfajták genetikai analízise

20. FRISCHAUF, I. – SCHINDL, R. - DERLER, I. - BERGSMANN, J. – FAHRNER, M. – ROMANIN, C. (2008): The STIM/Orai coupling machinery. *Channels*. 2, 4
21. FRIESEN, H. – GUYDA, H. - HARDY, J. (1970): Biosynthesis of Human Growth Hormone and Prolactin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 31 (6), 611–624.
22. FUJIWARA, T. – NAKADA, K. – SHIRAKAWA, H. – MIYAZAKI, S. (1993): Development of inositol triphosphate-induced calcium release mechanism during maturation of hamster oocytes. *Developmental Biology*. 156, 69-79
23. GARDNER, J. M. - DE LANGE, C. F. M. – WIDOWSKI, T. M. (2003): Belly-nosing in early-weaned piglets is not influenced by diet quality or the presence of milk in the diet. *Journal of Animal Sciences*. 79, 73-80
24. GENG, L. – BOEHMERLE, W. – MAEDA, Y. – OKUHARA, D. Y.-TIAN, X. – YU, Z. – CHOE, C. – ANYATONWU, G. I. – EHRLICH, B. E. – SOMLO, S. (2008): Syntaxin 5 regulates the endoplasmic reticulum channel-release properties of polycystin-2. *PNAS* 105(41), 15920-15925
25. GOFFIN, V. - FERRAG, F. – KELLY, P.A. (1998): Molecular aspects of prolactin and growth hormone receptors. *Advances in Molecular Cell Endocrinology*. 2, 1–33
26. GROSS, S. A. – WISSENBACH, U. – PHILIPP, S. E. – FREICHEL, M. – CAVALIE, A. – FLOCKERZI, V. (2007): Murine ORAI2 splice variants form functional Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- channels. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(27), 19375–19384
27. GWACK, Y. – SRIKANTH, S. – FESKE, S. – CRUZ-GUILLOTY, F. – OH-HORA, M. – NEEMS, D. S. – HOGAN, P. G. – RAO, A. (2007): Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(22), 16232–16243
28. HALBAN J.(1900): Die innere Sekretion von Ovarium und Placenta und ihre Bedeutung für die Function der Milchdrüse. *Monatsschrift für Geburtshilfe und Gynäkologie*. 12, 496–503
29. HAMANN, H. - DROGEMÜLLER, C. - KRIETER, J. - PRESUHN, U. - WALLENBURG, J. - DISTL, O. (2000): Genetic markers for litter size in German pig breeds; 51th Annual meeting of EAAP, Haga, Netherlands
30. HARBOE, T. L. (2004): Gene mapping (Ph.D. Thesis) The Wilhelm Johannsen Centre of Functional Genomics, Department of Medical Genetics, Institute of Medical Biochemistry and Genetics, The Panum Institute, University of Copenhagen
31. HENNIGHAUSEN, L. – ROBINSON, G.W. (1998): Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. *Genes and Development*. 12, 449-455
32. HEWAVITHARANA, T. – DENG, X. – SOBOLOFF, J. – GILL D. L. (2007): Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium*. 42, 173–182

Különböző sertésfajták genetikai analízise

33. HIGGINS, E. R. – CANNELL, M. B. – SNEYD J. (2006): A buffering SERCA pump in models of calcium dynamics. *Biophysical Journal*. 91, 151–163
34. HOGAN, P. G. – LEWIS, R. S. - RAO, A. (2010): Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual Review of Immunology*. 28, 491–533
35. HOLZAPFEL, C.W. (1968): The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Wetling. *Tetrahedron*. 24(5), 2101-2119
36. HOMA S.T. (1991): Neomycin, an inhibitor of phosphoinositide hydrolysis, inhibits the resumption of bovine oocyte spontaneous meiotic maturation. *The Journal of Experimental Zoology*. 258(1), 95-103
37. HORN P. (2000): Állattenyésztés 3. Sertés, nyúl, prémes állatok, hal. *Mezőgazda Kiadó, Budapest* 141-143.
38. HUMPHRAY, S. J. –SCOTT, C. E. –CLARK, R. – MARRON, B. - BENDER, C. –CAMM, N. –DAVIS, J. –JENKS, A. – NOON, A. - PATEL, M. –SEHRA, H. –YANG, F.- ROGATCHEVA, M. B. –MILAN, D. - CHARDON, P. –ROHRER, G. –NONNEMAN, D. –DE JONG, P. – MEYERS, S. N. - ARCHIBALD, A. –BEEVER, J. E. –SHOOK, L. B. – ROGERS, J. (2007): A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biology*. 8, 139
39. IM, G. –SEO, J. – HWANG, I. – KIM, D. – KIM, S. – YANG, B. – YANG, B. – LAI L. – PRATHER, R. S. (2006): Development and apoptosis of pre-implantation porcine nuclear transfer embryos

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- activated with different combination of chemicals. *Molecular Reproduction and Development*. 73(9),1094-101
40. JIANG, Z.H. – ROTHSCHILD, M.F. (2007): Swine genome science comes of age. *International Journal of Biological Sciences*. 3, 129-131
41. JOHN, L. M. – LECHLEITER, J. D. – CAMACHO, P. (1998): Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *Journal of Cell Biology*. 142, 963–973
42. JONES, K.T. – CARROLL, J. – WHITTINGHAM, D.G. (1995): Ionomycin, thapsigargin, ryanodine and sperm induced Ca^{2+} release increase during meiotic maturation of mouse oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 6671-6677
43. JONES K.T.(2005): Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130, 813-823
44. KANEMURA, H. – GO, M.J. – SHIKAMURA, M. – NISHISHITA N. – SAKAI, N. – KAMAO, H. – MANDAI, M. – MORINAGA, C. – TAKAHASHI, M. – KAWAMATA, S. (2014): Tumorigenicity studies of induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) – derived Retina Pigment Epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration. *PLoS One*. 9(1), e85336
45. KAUFMAN, M.L. – HOMA, S.T. (1993): Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *The Journal of Experimental Zoology*. 265(1), 69-76
46. KERSTEN, H.H.D.- KOLLERS, S. – KOMMADATH, A. – DEL ROSARIO, M. – DIBBITS, B. – KINDERS, S.M. – CROOIJMANS, R.P. – GOENEN, M. (2009): Mining for single nucleotide

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- polymorphisms in pig genome sequence data. *BMC Genomics*. *10*, 4
47. KMIEC, M. - DYBUS, A. - TERMAN, A. (2001): Prolactin receptor gene polymorphism and its association with litter size in Polish Landrace. *Archiv Tierzucht Dummerstorf*. *44*, 547–551
48. KMIEC, M. - TERMAN, A. (2006): Associations between the prolactin receptor gene polymorphism and reproductive traits of boars. *Journal of Applied Genetics*. *47*, 139-141
49. KORWIN-KOSSAKOWSKA, A. - WYSZYŃSKA-KOKO, J. - SENDER, G. (2006): A novel polymorphism of the porcine prolactin gene (PRL). *Neuro Endocrinology Letters*. *27(1-2)*, 241-6
50. LAHMY, R. – SOLEIMANI, M. – SANATI, M.H. – BEHMANESH, M. – KOUKHAN, F. – MOBARRA, N. (2014): miRNA-375 promotes beta pancreatic differentiation in human induced pluripotent stem (hiPS) cells. *Molecular biology reports*. 2014-jan-29 [Epub ahead of print]
51. LE, J.A. – WILSON H.M. – SHEHU, A. – MAO, J. – DEVI, Y.S. – HALPERIN, J. – AGUILAR, T. – SEIBOLD, A. – MAIZELS, E. – GIBORI, G. (2012): Generation of mice expressing only the long form of the prolactin receptor reveals that both isoforms of the receptor are required for normal ovarian function. *Biology of Reproduction*. *86(3)*, 86
52. LEE, B. – PALERMO, G. – MACHACA, K. (2013): Downregulation of store-operated Ca^{2+} entry during mammalian meiosis is required for the egg-to-embryo transition. *Journal of Cell Science*. *126*, 1672-1681

Különböző sertésfajták genetikai analízise

53. LINVILLE, R.C. - POMP, D. - JOHNSON, R.K. - ROTSCCHILD, M. F. (2001): Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *Journal of Animal Sciences*. 79, 60-67
54. LIS, A. – PEINELT, C. – BECK, A. – PARVEZ, S. – MONTEILH-ZOLLER, M. – FLEIG, A. – PENNER, R. (2007): CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Current Biology*. 17, 794–800
55. LUNNEY, J. K. (2007): Advances in swine biomedical model genomics. *International Journal of Biological Sciences*. 3, 179-184
56. LYTTON, J. – WESTLIN, M. – BURK, S.E. – SHULL, G.E. – MACLENNAN, D.H. (1992): Funczional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *The Journal of Biological Chemistry*. 267(20), 14483-9
57. MACHÁTY Z. – WANG, W. - DAY, B. N. – PRATHER, R. S. (1997): Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biology of Reproduction*. 57, 1123-1127
58. MARTÍN-ROMERO, F.J. – ORTÍZ-DE-GALISTEO, J.R. – LARA-LARANJEIRA, J. – DOMINÍQUEZ-ARROYO, J.A. – GONZÁLEZ-CARRERA, E. – ALVAREZ, I.S. (2008): Store-operated calcium entry in human oocytes and sensitivity to oxidative stress. *Biology of Reproduction*. 78(2), 307-15
59. McElroy, S.L. – BYRNE, J.A. – CHAVEZ, S.L.- BEHR, B. – HSUEH, A.J. – WESTPHAL, L.M.- PERA, R.A.(2010): Parthenogenic

Különböző sertésfajták genetikai analízise

blastocysts derived from cumulus-free in vitro matured human oocytes. *PLoS One*. 7;5(6), e10979

60. MERCER, J. C. – DEHAVEN, W. I. – SMYTH, J. T. – WEDEL, B. – BOYLES, R. R.- BIRD, G. S. – PUTNEY JR, J. W. (2006): Large Store-operated Calcium-selective Currents due to Co-expression of Orai1 or Orai2 with the Intracellular Calcium Sensor, STIM1. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(34), 24979–24990
61. MIURA, Y. – GILON, P. – HENQUIN, J.C. (1996): Muscarinic stimulation increases Na^+ entry in pancreatic B-cells by a mechanism other than the emptying of intracellular Ca^{2+} pools. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 224(1), 67-73
62. MIYAZAKI, S. – ITO, M. (2006): Calcium signals for egg activation in mammals. *Journal of Pharmacol Sciences*. 100, 545 – 552
63. MIYAZAKI, K. – WAKANA, Y. - NODA, C. – ARASAKI, K. – FURUNO, A. – TAGAYA, M.(2012): Contribution of the long form of syntaxin 5 to the organization of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*. 125, 5658-66
64. OCHOA, A, - MONTES DE OCA, P. – RIVERA, J. C. – DUEÑAS, Z. - NAVA , G. - DE LA ESCALERA, G. M. – CLAPP, C.(2001): Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 42(7), 1639-45
65. ORGEUR, P. – HAY, M. – MORMÈDE, P. – SALMON, H. - LE DIVIDICH, J. – NOWAK, R. – SCHAAL, B. – LÉVY, F. (2001): Behavioural, growth and immune consequences of early weaning

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- in one-week-old large-white piglets. *Reproduction, Nutrition, Development*. *41*, 321-332
66. ORMANDY, C. J. - CAMUS, A. - BARRA, J. - DAMOTTE, D. - LUCAS, B. - BUTEAU, H. - EDERY, M. - BROUSSE, N. - BABINET, C. - BINART, N. - KELLY P. A. (1997): Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes and Development*. *11*, 167-178
67. PANDE, J. - DIMMERS, G. - AKOLKAR, G. - SKELLEY, L. - SAMSON, S.E. - GROVER, A.K. (2012): Store operated Ca²⁺ entry dependent contraction of coronary artery smooth muscle: inhibition by peroxide pretreatment. *Cell Calcium*. *51*(2), 149-54
68. PEINELT, C. - VIG, M. - KOOMOA, D.L. - BECK, A. - NADLER, M.J. - KOBLAN-HUBERSON, M. - LIS, A. - FLEIG, A. - PENNER, R. - KINET, J.P. (2006): Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nature Cell Biology*. *8*(7), 771-3
69. PUTNEY J.W. (2007): Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell Calcium*. *42*, 103-110
70. PUTNOVA, L. - KNOLL, A. - DVORAK, J. - CEPICA, S. (2002): A new Hpa II PCR-RFLP within the porcine prolactin receptor (PRLR) gene and study of its effect on litter size and number of teats. *Journal of Animal Breeding Genetics*. *119*, 57-63
71. RAMOS, A. M. - CROOIJMANS, R.P.M.A. - AFFARA, N.A. - AMARAL, A.J. - ARCHIBLAD, A. - BEEVER, J.E. - BENDIXEN, C. - CHURCHER, C. - CLARK, R. - DEHAIS, P. - HANSEN, M.S. - HEDEGAARD, J. - ZHI-LIANG HU - KERSTEN, H.H. - LAW, A.S. -

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- MEGENS, H.J. – MILAN, D. – NINNEMAN, D.J. – ROHRER, G.A. – ROTHSCHILD, M.F. – SMITH, T.P.L. – SCNABEL, R.D. – VAN TASSEL, C.P. – TAYLOR, J.F. – WIEDMANN, R.T. – SCHOOK, L.B. – GROENEN, M.A.M (2009): Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. *PLoS One*. 4(8), e6524
72. RIDDLE, O. – BATES, R.W. – DYKSHORN, S.W.(1933): The preparation, identification and assay of prolactin- a hormone of the anterior pituitary. *American Journal of Physiology*. 105(1), 191-216
73. ROHRER, G. A. –ALEXANDER, L. J. –KEELE, J. W. – Smith T. P. – Beattie, C.W. (1994): A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*. 136, 231-245
74. ROHRER, G. A. –ALEXANDER, L. J. –HU, Z. –SMITH, T. P.L. – KEELE, J.W. – BEATTIE, C. W. (1996): A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Research*. 6, 371-391
75. ROHRER, G. A. –BEEVER, J. E. – ROTHSCHILD, M. F. – Schook, L. B. (2002): Porcine genomic sequencing initiative. *Porcine Sequencing White Paper*.
<http://www.animalgenome.org/pigs/community/PigWhitePaper/PigWhitePaper.html>
76. ROTHSCHILD, M. F. - VINCENT, A. L. - TUGGLE, C. K. - EVANS, G. - SHORT, T.H. - SOUTHWOOD, O.I. et al. (1998): A mutation in the prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. *Animal Genetics*. 29, 60–74

Különböző sertésfajták genetikai analízise

77. ROTHSCHILD, M. F. (2000): Advances in pig molecular genetics, gene mapping and genomics. NC-210 Pig Genome Annual Meeting Report (Positional and functional identification of economically important genes in the pig) X. Reunion Nacional de Mejora Genetica Animal, Cadles de Montbui.
78. ROTHSCHILD, M. F. (2003): Advances in pig genomics and functional gene discovery. *Comparative and Functional Genomics*. 4, 266–270
79. ROTHSCHILD, M.F. –HU, Z. –JIANG, Z. (2007): Advances in QTL mapping in pigs. *International Journal of Biological Sciences*. 3, 192-197
80. ROUGIER, N. – WERB, Z. (2001): Minireview: Parthenogenesis in mammals. *Molecular Reproduction and Development*. 59, 468-474
81. SABHARWAL, P. – GLASER, R. – LAFUSE, W. – VARMA, S. – LIU, Q. – ARKINS, S. - KOOIJMAN, R.- KUTZ, L. – KELLEY, K. W. – MALARKEY, W.B. (1992): Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 15;89(16),7713-6
82. SCHOOK, L. B. –BEEVER, J. E. –ROGERS, J. – HUMPHRAY, S. – ARCHIBALD, A. - CHARDON, P. –MILAN, D. –ROHRER, G. – EVERSOLE, K. (2005): Swine genome sequencing consortium (SGSC): A strategic roadmap for sequencing the pig genome. *Comparative and Functional Genomics*. 6, 251–255

Különböző sertésfajták genetikai analízise

83. SOBOLOFF, J. - SPASSOVA, M.A. –HEWAVITHARANA, T. - HE, L.P. - XU, W. - JOHNSTONE, L.S. - DZIADEK, M.A. - GILL, D.L. (2006):STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} entry. *Current Biology*. *16*, 1465–1470
84. SONG, H. – KANG, E. – KIM, M. – OCK, S. – JEON, B. – LEE, S. – RHO, G. (2010): Influence of parthenogenetic activation on nuclear maturation of canine oocytes. *The Journal of Veterinary Medical Science*. *72(7)*, 887-92
85. SONG, M.Y. – MAKINO, A. – YUAN, J.X.-J. (2011): STIM2 contributes to enhanced store-operated Ca^{2+} entry in pulmonary artery smooth muscle cells from patient with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation*. *1(1)*, 84-94
86. SOUTHWOOD, O.I. - SHORT, T. H. - PLASTOW, G. S. - ROTHSCHILD, M. F. (1999): A genetic marker for litter size in Landracebased pig lines. EAAP (European Federation for Animal Sciences) Zurich 22–26 August 5, 1
87. STRICKER, P. – GRUETER, R. (1928): Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*. *99*, 1978–1980
88. SUGA, K. –SAITO, A. –TOMIYAMA, T. –MORI, H. –AKAGAWA, K.(2009): The Syntaxin 5 isoforms Syx5 and Syx5L have distinct effects on the processing of β -amyloid precursor protein. *Journal of Biochemistry*. *146(6)*, 905-15
89. SUN, F.Z. - HOYLAND, J. - HUANG, X. – MASON, W. - MOOR R.M. (1992): A comparison of intracellular changes in porcine eggs

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- after fertilization and electroactivation. *Development*. *115*, 947-956
90. TAYLOR, C.W. (2006): Store-operated Ca^{2+} entry: a STIMulation stOrai. *TRENDS in Biochemical Sciences*. *31*, 11
91. TENG, F. Y. H. – WANG, Y. –TANG, B. L. (2001): The syntaxins. *Genome Biology*. *2(11)*, 3012.1–3012.7
92. TOLHURST, G. –CARTER, R.N. –AMISTEN, S. –HOLDICH, J.P. – ERLINGE, D. –MAHAUT-SMITH, M.P. (2008):Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for Orai1 in the store-operated Ca^{2+} influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets*. *19(4)*, 308-313
93. TOMÁS, A. – CASELLAS, J. – RAMÍREZ, O. – MUNOZ, G. – NOGUERA, J. L. – SÁNCHEZ, A. (2006): High amino acid variaton in the intracellular domain of the pig prolaction receptor (PRLR)and its relation to ovulation rate and piglet survival traits. *Journal of Animal Science*. *84(8)*, 1991-1998
94. TOMBES, R.M. – SIMERLY, C. – BORISY, G.G. – SCHATTEN, G. (1992): Meiosis, egg activation and nuclear envelope breakdown are differentially reliant on Ca^{2+} , whereas germinal vesicle breakdown is Ca^{2+} independent in the mouse oocyte. *The Journal of Cell Biology*. *117*, 799-811
95. TOPPER, Y.J. – FREEMAN, C.S. (1980): Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Reviews*. *60*,1049–1056

Különböző sertésfajták genetikai analízise

96. TROTT, J. F. – SCHENNINK, A. – HOVEY, R.C. (2010): Cloning and expression of a unique short form of the porcine prolactin receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*. *46*, 51-62
97. TUGGLE, C. K. - PRATHER, R. S. - SOARES, M. B. - CASAVANT, T. - POMP, D. - ROTHSCHILD, M. F. – BEAVIS, W. (2001): Gene discovery and functional genomics in the pig. National Swine Improvement Federation Conference and Annual Meeting. St. Louis, Missouri. *26*.
98. UIMARI, P. – SIRONEN, A. – SEVÓN-AIMONEN, M.L (2011): Whole-genome SNP association analysis of reproduction traits in the Finnish Landrace pig breed. *Genetics Selection Evolution*. *43*, 42
99. VAN RENS, B.T.T.M. – VAN DER LENDE, T. (2002): Litter size and piglet traits of gilts with different prolactin receptor genotypes. *Theriogenology*. *57*, 883-893
100. VARGA E. – PATAKI R. – LÓRINCZ ZS. – KOLTAI J. – BALI PAPP Á. (2008): Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. *Animal Reproduction Science*. *105*, 226-233
101. VINCENT, A.L. – WANG, L. – TUGGLE, C. K. – ROBIC, A. – ROTHSCHILD, M.F.(1997): Prolactin receptor maps to pig Chromosome 16. *Mammalian Genome*. *8*, 793-794
102. VINCENT, A.L – EVANS, G. – SHORT, T. H. – SOUTHWOOD, O. I. – PLASTOW, G. S. – TUGGLE, C. K. – ROTHSCHILD, M. F. (1998.): The prolactin receptor gene is associated with increased

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- litter size in pigs. Proceedings 6th World Cong Genet App Livest Prod 27, 15–18
103. WALKER, A.M.- ROBERTSON, M. T. – JONES, C.J.(1989)
Distribution of a prolactinlike material in human eccrine sweat glands. *Journal of Investigative Dermatology*. 93(1), 50-3
104. WANG, C. – LEE, K. – GAJDÓCSI, E. – BALI PAPP, Á – MACHÁTY, Z. (2012): Orail mediates store-operated Ca^{2+} entry during fertilization in mammalian oocytes. *Developmental Biology*. 365, 414-423
105. WANG, C. – MACHATY, Z. (2013): Calcium influx in mammalian eggs. *Reproduction*. 145, R97-R105
106. WATSON, J.D. – CRICK, F.H. (1953): The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 18, 123-31
107. WERNERSSON, R. –SCHIERUP, M. H. –JÖRGENSEN, F. G. - GORODKIN, J. –PANITZ, F. –STÆRFELDT, H.-H. –CHRISTENSEN, O. F. - MAILUND, T. –HORNSHØJ, H. –KLEIN, A. –WANG, J. –LIU, B. - HU, S. –DONG, W. –LI, W. –WONG, G. K. S. –YU, J. –WANG, J. - BENDIXEN, C. –FREDHOLM, M. –BRUNAK, S. –YANG, H. - BOLUND, L. (2005): Pigs in sequence space: A 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 6, 70
108. WITHWORTH, K.M. – AGCA, C. – KIM, J.G. – PATEL, R.V. – SPRINGER, G.K. – BIVENS, N.J. – FORRESTER, L.J. – MATHIALAGAN, N. – GREEN, J.A. – PRATHER, R.S. (2005): Transcriptional profiling of pig embryogenesis by using a 15-K

Különböző sertésfajták genetikai analízise

- member unigene set specific for pig reproductive tissues and embryos. *Biology of Reproduction*. 72, 1437-1451
109. YANG, Y. – PABOU, L. – MURRY, C.E. (2014): Engineering adolescent: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation Research*. 114(3), 511-23
110. YAO, S. – GALLENKAMP, D. – WÖLFEL, K. – LÜKE, B. – SCHINDLER, M. – SCHERENBECK, J. (2011): Synthesis and SERCA activities of structurally simplified cyclopiazonic acid analogues. *Bioorganic and Medical Chemistry*. 19(15), 4669-78
111. ZHANG, S. L. – YEROMIN, A. V. - ZHANG X. H.-F. – YU, Y. - SAFRINA, O. - PENNA, A. - ROOS, J. – STAUDERMAN, K. A. – CAHALAN, M. D. (2006): Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *PNAS*. 103(24), 9357-62
112. ZSOLNAI A.– RADNÓCZY L. – FÉSÜS L. - ANTON I.(2006): Do Mangalica Pigs of Different Colours Really Belong to Different Breeds? *Archiv Tierzucht Dummerstorf*. 49 (5), 477-483
113. <http://allatvilagunk.hu/haziallatok/sertes/hazisertés.html> (2014)
114. <http://www.animalgenome.org/edu/.html> (2014)
115. <http://www.animalgenome.org/QTLdb> (2014)
116. <http://www.atk.hu/upload/dokumentumok/wokrshopok/Mangalica/Toth-Mangalica.pdf> (2014)
117. <http://www.Ge-h.de/geh-sweine/19-woll.htm> (2010)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

118. <http://konyvtar.univet.hu/praxis/vetkonf6/mangalica.pps#2>
3 (2010)
119. <http://www.mangalica.com/index.php?menu=fajta> (2010)
120. <http://www.mangalica.com/index.php?menu=fajta&pg=tenyesztes> (2014)
121. <http://www.mangalicatezenyeszto.hu/fajtak.html> (2014)
122. http://www.mangalicatezenyeszto.hu/downloads/tenyesztes_i%20eredmenyek/pdf-hu/2012-Tenyesztesi_eredmenyek.pdf
(2014)
123. <http://www.mangold.hu/egyesulet/dokumentumok/7.doc>
(2013)
124. <http://www.mangold.hu/egyesulet/dokumentumok/9.ppt#1>
(2013)
125. <http://www.mangold.hu/egyesulet/dokumentumok/9.ppt#2>
(2013)
126. <http://www.mangold.hu/hu/mangalica.php> (2011)
127. http://www.mlive.com/business/index.ssf/2013/08/mangalitsa_pig_michigan_gourme.html (2013)
128. <http://www.piggenome.org/> (2013)
129. <http://www.puremangalitsa.com/history.html> (2013)
130. <http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/cyto/cyto.htm> (2010)
131. <http://www.zensor10-hc.eoldal.hu/fenykepek/sertes/mangalica--szoke.-.html> (2013)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

8 MELLÉKLETEK**8.1 Melléklet 1: Sertések Ca^{2+} – oszcillációját befolyásoló gének expressziójának statisztikai analízise**

Tukey féle post hoc statisztikai analízise a sertés petesejtek kalciumion oszcillációját befolyásoló gének expressziójának

STIM2		Tukey csoportosítás	Átlag	N	trt
Alpha	0.05				
Hiba szabadsági foka	6	A	2.2833	3	MII
Hiba átlagok négyzete	0.363056	A			
Student tartomány kritikus értéke	4.33920	A	1.5000	3	MI
Minimum szignifikáns különbség	1.5095	A			
		A	1.1833	3	GV
Orai2		Tukey csoportosítás	Átlag	N	trt
Alpha	0.05				
Hiba szabadsági foka	6	A	1.4500	3	MII
Hiba átlagok négyzete	0.257778	A			
Student tartomány kritikus értéke	4.33920	B A	0.2167	3	MI
Minimum szignifikáns különbség	1.272	B			
		B	-0.4000	3	GV
SERCA2		Tukey csoportosítás	Átlag	N	trt
Alpha	0.05				
Hiba szabadsági foka	6	A	-0.7833	3	GV
Hiba átlagok négyzete	0.491111	A			
Student tartomány kritikus értéke	4.33920	A	-1.5000	3	MI
Minimum szignifikáns különbség	1.7557	A			
		A	-2.1000	3	MII
STX5		Tukey csoportosítás	Átlag	N	trt
Alpha	0.05				
Hiba szabadsági foka	6	A	2.7667	3	MII
Hiba átlagok négyzete	0.143889				
Student tartomány kritikus értéke	4.33920	B	1.3333	3	MI
Minimum szignifikáns különbség	0.9503	B			
		B	0.9000	3	GV

Különböző sertésfajták genetikai analízise

8.2 Melléklet 2: A sertés IVM-hez, Ca^{2+} festéshez és E.coli tenyésztéshez használt tápközegek és oldatok összetétele

8.2.1 *Medium 199-en alapuló sertés IVM Medium (TCM)*

törzsoldat (1 adag M199 1 literhez)

2,2g Na-bikarbonát
 0,55g glükóz
 0,1g nátrium pyruvát
 1g polyvinylalkohol (PVA)
 0,05g streptomycin
 0,075g penicillin G

A pH-t 7,3-ra kell beállítani és steril szűrővel átszűrni, majd 4°C-on tárolni.

Kiegészítő IVM oldathoz

0,069 mg/ml cisztein
 10ng/ml EGF
 0,5 IU/ml LH (5 μ l LH 100IU/ml LH-t tartalmaz)
 0,5 IU/ml FSH (5 μ l FSH törzsoldat, mely 100IU/ml FSH-t tartalmaz)

Steril filterrel kell átszűrni. Az oldatból 500 μ l-t kell tenni a 4 lyukú tenyésztőedény minden lyukába és lefedni olajjal. A tenyésztőoldatban 44 órán át tartani. NEM KELL LECSERÉLNI az oldatot.

8.2.2 *FSH, LH és EGF oldatok*

FSH:

50 egység van egy üvegben

Ez egyenlő 50X9,8=490 IU

A végső koncentrációnak 0,5 IU/ml-nek kell lennie a maturációs oldatban.

A 9,8 ml TCM médiumot egy üvegbe kell önteni ahhoz, hogy 490 IU/9,8 ml oldatot kapjunk. 20 μ l-es adagokra kell osztani (1 IU/20 μ l, 490 cső), majd lefagyasztani. A használata: 5 μ l-t kell tenni 495 μ l TCM-be, a végső koncentráció így 0,25 IU/0,5 ml=0,5 IU/ml lesz.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

LH:

15 NIH egység van egy üvegben

Ez megegyezik $2000 \times 15 = 30000$ IU-gel

A végső koncentrációnak $0,5$ IU/ml-nek kell lennie a maturációs oldatban. 10 ml TCM médiumot kell adni a 30000 IU/ 10 ml-es törzsoldat elkészítéséhez. 100 μ l-es adagokat kell készíteni (300 IU/ 100 μ l), majd fagyasztani. 6 ml TCM médiumot kell adni egy törzsoldathoz, hogy 300 IU/ 6 ml-t kapjunk. Ezt 20 μ l-es adagokra kell osztani és (1 IU/ 20 μ l, 300 cső) fagyasztani. A használata: 5 μ l-t kell adni 495 μ l maturációs oldathoz, a végső koncentráció így $0,25$ IU/ $0,5$ ml lesz.

EGF:

100 μ g/ml törzsoldat

Végső koncentráció 20 ng/ml lesz

2 μ l törzsoldatot kell adni 10 ml médiumba

8.2.3 TL Hepes médium:

(Bavister és mtsai, BOR 28:235-247, 1983)

Összetevők	mM	g/1000ml	g/2000ml
CaCl ₂ X2H ₂ O	2	0,294	0,588
NaCl	114	6,662	13,324
KCl	3,2	0,239	0,478
NaHCO ₃	2	0,168	0,336
NaH ₂ PO ₄	0,4	0,048	0,096
Na-laktát 60% szirup	10	1,86ml	3,72ml
MgCl ₂ X6H ₂ O	0,5	0,102	0,204
Hepes	10	2,4	4,8
Szorbitol		2,186	4,372
Penicillin		0,075	0,15
Sztreptomycin		0,05	0,1
fenol piros 0,5%		1ml	2ml
Na piruvát	0,2	0,022	0,044
PVA		0,1	0,2

A szükséges kétszer deszt. víznek kb. a 80%-át egy keverőbe kell önteni. Folyamatos keverés közben hozzá kell adni az összetevőket sorban. A

Különböző sertésfajták genetikai analízise

pH-t 7,4-re kell állítani 1 vagy 2 NaOH pasztillát használva. Vízzel kell kiegészíteni a végső koncentrációra, majd szűrni.

8.2.4 Ca^{2+} -mentes TL Hepes médium

Összetevők	mM	g/1000ml	g/2000ml
NaCl	115	6,72	13,44
KCl	3,2	0,239	0,478
NaHCO ₃	2	0,168	0,336
NaH ₂ PO ₄	0,4	0,048	0,096
Na-laktát 60% szirup	10	1,4ml	2,8ml
MgCl ₂ X6H ₂ O	0,5	0,102	0,204
Hepes	10	2,4	4,8
Glükóz	5	0,901	1,802
Na-piruvát	0,2	0,022	0,044
EGTA(or EDTA)	1	0,2922	0,5844
PVA		1	2

Csak műanyagot lehet használni! A szükséges 2-szer desztvíz kb.80%-át egy műanyag palackba kell tölteni. Folyamatos keverés közben hozzá kell adni az összetevőket sorban, a pH-t 7,4-re állítani 1 vagy 2 NaOH pasztillával. Majd kiegészíteni a végső térfogatra deszt. vízzel és leszűrni (0,2 µm szűrővel)

8.2.5 Foszfát-pufferelt sóoldat (PBS)

8g (137mM) NaCl
 0,2 g (2,7 mM) KCl
 1,44 g (10mM) NaHPO₄
 0,24 g (2mM) KH₂PO₄

800ml kétszer deszt.vízben kell oldani és a pH-t 7,4-re állítani HCl-dal, majd kiegészíteni vízzel 1 literre. Kisebb adagokra kell osztani és sterilizálni autoklávozással 20 percig 15psi (1,05kg/cm²) nyomáson folyadék ciklusban, vagy leszűrni. Szobahőn tárolható.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Ha szükséges, kiegészíthető a PBS-t:

1mM (111 mg/l) CaCl_2 és

0,5 mM (95,21 mg/l) MgCl_2

8.2.6 *Fura2-AM*

1. 2mM Fura2-AM törzsoldat készítése:

100 μg Fura2-AM-t kell oldani 50 μl DMSO-ban. (1mg-ot 500 μl -ben)

10 percet kell várni, majd szét kell osztani 3 μl -es adagokra és fagyasztani, deszikkálni.

2. 20% (w/v) pluronic F-127 oldatban:

0,2 g pluronic-ot kell oldani 1 ml DMSO-ban

Majd fel kell melegíteni 40°C-ra 20 percre, ha szükséges, szobahőn tárolható.

3. Munkahígítás készítése. Közvetlenül felhasználás előtt:

3 μl festéket kell adni 2992 μl TL-be, majd

3 μl pluronic oldatot a Fura 2-AM oldatba

(Fura2-AM koncentrációja 2 μM =500X hígítás lesz, pluronic koncentrációja 0,02%=1000Xhígítás lesz, DMSO konc. 6 μl /3000 μl =0,2% lesz)

8.2.7 *Ampicillin*

50mg/ml törzsoldat:

El kell keverni 2,5 g ampicillint 50 ml 18 M Ω dH₂O-val

Majd 4°C-on tartani alumínium fóliával körütekerve 50ml-es tölcséres aljú csőben.

8.2.8 *Penicillin/sztreptomycin*

Kiad 156 ml 500X törzsoldatot

1g penicillin G szobahőn tárolva

1,56 g sztreptomycin szulfát (4°C-on tárolva)

Különböző sertésfajták genetikai analízise

156 ml 18 MΩ dH₂O-ban kell oldani átszűrni és kisebb adagokra osztani: Egy 60 cc fecskendővel, melyhez egy szűrőt csatlakoztattunk át kell szűrni és 15 ml-es csövekbe tenni
-30°C-on fagyasztva tárolandó.

8.2.9 LB

1 liter LB-hez össze kell keverni az alábbi hozzávalókat egy 2 literes lombikban, bele kell tenni egy keverőbotot és addig keverni, amíg nem tisztul le:

10 g Bacto-tripton
5g Bacto-élesztő kivonat
5g NaCl
1 l 18 MΩ dH₂O

Hozzá kell adni 200 µl 5N NaOH-t (vagy 400 µl 2,5 N NaOH)
Igény szerint szét kell osztani kisebb adagokba csavaros üvegekbe, vagy alumínium fóliával letakarva és autoklávozni.

8.2.10 LB agar

1 liter LB agarhoz:
10 g Bacto-tripton
5g Bacto-élesztő kivonat
5g NaCl
1 liter 18 MΩ dH₂O

200 µl 5N NaOH-t (vagy 400 µl 2,5 N NaOH-t) kell hozzáadni, majd szétosztani 500 ml-ként 1 literes palackokba.

15g Bacto-agart kell adni minden adaghoz, majd összerázni olyan óvatosan, amennyira csak lehet. A kupakját rá kell csavarozni, vagy letakarni alumínium fóliával és autoklávozni.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

8.2.11 *LB agar táptalaj*

Hagyni kell, hogy az agar szobahőmérsékletűre hűljön. Majd hozzá kell adni 2 µl/ml specifikus gyógyszert (ampicillin).

A Petri-csészéket kb. feléig tölteni, majd hagyni megszilárdulni.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

8.3 Melléklet 3: Invitrogen Dynabeads mRNA Direct Micro Kit használati útmutató:

mRNS izolálása sejtekből PCR reakcióhoz:

Megjegyzés: Használat előtt minden puffert hagyni kell felmelegedni szobahőre, kivéve a 10 mM Tris-HCl-t.

A. Dynabeads Oligo (dT)₂₅ előkészítése:

1. Szuszpendálni kell a Dynabeads-t alaposan használat előtt.
 2. A Dynabeads törzsoldatból minden mintához megfelelő mennyiségűt kell tenni steril RNáz-mentes csövekbe (20 µl Dynabeads mRNS izolálásónként).
 3. A csöveket Dynal mágnesre kell helyezni.
 4. 30 másodperc elteltével (vagy amikor már az oldat feltisztult), el kell távolítani a felülúszót.
 5. Ki kell venni a csöveket a mágnesből és átmosni a Dynabeads-t a kiindulási mennyiséggel azonos Lysis/Binding Pufferben fel-le pipetázva.
 6. A csöveket a mágnesre helyezve el kell távolítani a felülúszót.
- Megjegyzés: Nem szabad hagyni, hogy a Dynabeads kiszáradjon mivel ez csökkentheti a hatékonyságot.
7. A csöveket a mágnesből ki kell venni és újraszuszpendálni a kiindulási térfogattal megegyező Lysis/binding pufferben. Majd szét kell osztani 20 µl-re a szuszpenziót minden mintacsőbe

C. Protokoll mRNS izolációhoz PCR-es sokszorozáshoz

1. A Dynabeads-et és a lizátumot elő kell készíteni az A pontban leírtak szerint
2. A tiszta lizátumot a 20 µl előmosott Dynabeads-et tartalmazó csövekbe kell tenni.
3. Össze kell keverni fel-le pipetázással.
4. A csövet a mintakeverőre kell helyezni, vagy kerékre 5 percre szobahőmérsékleten, hogy az mRNS hozzákapszolódhasson a Dynabeads-hez a folyamatos keverés során.
5. A csövet vissza kell helyezni a mágnesre és eltávolítani a felülúszót.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

6. A csövet ki kell venni a mágnesből és szuszpendálni újra a Dynabeads-mRNS komplexet 100 µl Washing puffer A-ban óvatos pipettázással.
7. A mintát ismét a mágnesre kell helyezni és eltávolítani a felülúszót.
8. A 6 – 7. lépést még egyszer megismételni.
9. Újra kell szuszpendálni a Dynabeads-mRNS komplexet 100 µl Washing puffer B-ben.
10. A szuszpenziót egy tiszta csőbe kell tenni.
11. Az új csövet a mágnesre kell helyezni és eltávolítani a felülúszót.
12. Újra kell szuszpendálni a Dynabeads-mRNS komplexet 100 µl Washing puffer B-ben.
13. Majd a csövet a mágnesre kell rakni és eltávolítani a felülúszót.
14. A csövet a mágnesből ki kell venni és szuszpendálni 100 µl jéghideg 10mM Tris-HCl-ben.
15. A mintákat jégen kell tartani a PCR amplifikáció előtt.
(Javaslat: a reverz transzkripció reakciót össze kell állítani az mRNS izoláció előtt.)
16. Közvetlenül az előtt, a reverz transzkripció PCR keverék hozzáadása előtt, a csövet a mágnesre kell rakni és eltávolítani a felülúszót.
17. Egy-lépéses PCR-hez, a Dynabeads-mRNS komplexet 50 µl reverz transzkripció PCR mix-ben kell szuszpendálni és áttenni egy PCR-csőbe. Két-lépéses PCR-hez, a Dynabeads-mRNS komplexet reverz transzkripció PCR mixben kell szuszpendálni a gyártó javaslata szerint.
18. A cDNS szintézist a gyártó javaslata szerint kell elvégezni. Hőstabil reverz transzkriptáz és a „gyöngykötött” oligo- (dT), mint primer használata esetén az első cDNS szintézishez, akkor szükséges lehet egy kezdeti 50°C inkubáció 5 percig, mielőtt a javasolt hőmérsékleten elkezdődik a folyamat.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

8.4 Melléklet 4: TOPO TA Cloning rendszer használati útmutató:

A következő PCR összeállítása javasolt a TOPO TA Cloning használata előtt:

A következő ciklusparaméterekkel és olyanokkal, amelyek a legjobban megfelelnek a terméknek: foglaljon magába egy 7-30 perces extenziót 72°C-on a legutolsó ciklust követően, hogy bizonyos legyen, hogy az összes PCR termék teljes hosszában jelen van és a 3' vég adenilált.

DNS	10-100 ng
10X PCR puffer	5 µl
50 mM dNTP	0.5 µl
Primerek (100-200 ng)	1 µM each
Steril víz a 49 µl-es térfogatig	
<i>Taq</i> Polymerase (1 unit/µl)	1 µl
Teljes végső térfogat	50 µl

A PCR terméket agaróz gélelectroforézissel kell ellenőrizni. Egyetlen, jól elkülönülő sávot kell látni.

Minden tranformációhoz szükség van egy adag kompetens sejtre és két szelektív táptalajra.

- A vízfürdő hőmérsékletét 42°C-ra kell beállítani
- Fel kell melegíteni egy adag SOC médiumot szobahőmérsékletre.
- A táptalajokat 37°C-ra kell melegíteni 30 percig.
- Szét kell oszlatni 40 µl 40 mg/ml X-gal-t mindegyik táptalajon és inkubálni 37°C-on, míg kész nem lesz a használatra.
- Jégen 1 egység One Shot® sejtet kell felengedni minden transzformációhoz.

Az alábbi táblázat mutatja, hogy hogy kell elkészíteni a TOPO® Cloning reakciót (6 µl):

Reagens*	Kémiaailag kompetens <i>E. coli</i>
Friss PCR termék	0.5 - 4 µl
Sóoldat	1 µl
Steril Víz	a teljes mennyiségre 5 µl
TOPO® vektor	1 µl
Végső térfogat	6 µl

Különböző sertésfajták genetikai analízise

*Minden reagenst -20°C -on kell tárolni, amikor kész a reakció összeállítása. A sóoldat és a víz szobahőn, vagy $+4^{\circ}\text{C}$ -on tárolható.

1. Össze kell keverni a reagenseket óvatosan és inkubálni 5 percig szobahőn ($22-23^{\circ}\text{C}$).

Megjegyzés: A legtöbb alkalmazásra, 5 perc rengeteg elemezhető kolóniát ad.

Az igényeknek megfelelően a TOPO® Cloning reakció ideje változhat 30 másodperctől 30 percig. Rutin PCR termékek felszopításához, 30 másodperc elég lehet. Nagy PCR termékekhez ($> 1 \text{ kb}$), vagy ha TOPO® Cloning több PCR termék kerül klónozásra, akkor az idő emelése növeli a kolóniák számát.

2. A reakciót jégre kell helyezni és a One Shot® Kémiai vagy a One Shot® Elektroporációs Transzformációnak megfelelően folytatni

Kémiai transzformáció:

1. $2 \mu\text{l}$ TOPO® Cloning reakcióból kell adni egy egység One Shot® Kémiailag Kompetens *E. coli*-hoz és összekeverni óvatosan. Nem szabad fel-le pipettázni!

2. Jégen kell inkubálni 5-30 percig.

Megjegyzés: Hosszab inkubációs időnek a jégen, úgy tűnik, nincs hatása a transzformáció hatékonyságára. Az inkubációs idő hossza a felhasználó igényei szerint változhat.

3. A sejteket hősokknak kell kitenni 30 másodpercig 42°C -on összerázás nélkül.

4. Azonnal vissza kell tenni a csövet jégre.

5. Hozzá kell adni $250 \mu\text{l}$ szobahőmérsékletű SOC médiumot.

6. Szorosan kell lezárni a csövek kupakját és vízszintesen rázni (200 rpm) 37°C -on 1 órán át.

7. Minden transzformátumból szét kell osztani $10-50 \mu\text{l}$ -t az előmelegített szelektív táptalajokon és inkubálni egy éjszakán át 37°C -on. Ahhoz hogy egyenletesen lehessen elosztani a kis mennyiségeket, hozzá lehet adni $20 \mu\text{l}$ SOC-t. Azt javasoljuk, hogy két különböző mennyiség legyen szétosztva a táptalajokon, hogy bizonyosan legyenek legalább az egyik táptalajon jól elkülönülő kolóniák.

8. Egy hatékony TOPO® Cloning reakció több száz telepet eredményez. Kb.10 fehér, vagy világoskék telepet kell kiválasztani az analízishez.

Nem szabad sötétkék kolóniákat választani.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

Analízis:

1. 10 fehér vagy világoskék telepet kell inokulálni és tenyészteni egy éjszakán át 50 µg/ml ampicillint tartalmazó LB médiumban.
2. A plazmid DNS-t egy a felhasználó által választott módszerrel kell izolálni.
3. Majd a plazmidokat emésztési reakcióval ellenőrizni (*EcoR* I vagy a térképen megtalálható egyéb helynek megfelelő enzimmel), vagy szekvenálással. M13 Forward (-20) és M13 Reverz primerekkel.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

8.5 Melléklet 5: Qiaprep Spin Miniprep Kit használati útmutató mikrocentrifugához:

Ezt a protokolt 20 µg magas kópiaszámú plazmid DNS-re tervezték, melyet 1-5 ml LB tápoldatban, egy éjszakán át tenyésztett *E.coli*ből nyertek. (A Minipreppel való munka megkezdése előtt a megfelelő mennyiségű 1-5ml baktérium levest le kell centrifugálni és a felülúszót eltávolítani)

Megjegyzés: Minden lépést szobahőmérsékleten kell végrehajtani.

1. A pelletet 250 µl Puffer P1-ben kell szuszpendálni, majd áttenni mikrocentrifuga csőbe.

Meg kell győződni arról, hogy az RNáz A hozzá lett-e adva a Puffer P1-hez! A szuszpendálás után nem szabad sejttöszetapadásoknak maradnia az oldatban.

2. 250 µl Puffer P2-t kell hozzáadni és óvatosan, a cső 4–6-szori átforgatásával összekeverni.

Óvatosan, a cső átforgatásával kell keverni! Ne szabad Vortexet használni, mivel az a genomiális DNS töredezéséhez vezethet. Ha szükséges, addig kell folytatni az átforgatást, amíg az oldat nem kezd el viszkózussá és kissé tisztává válni. Nem szabad, hogy a lízis reakció tovább folytatódjon, mint 5 perc.

3. Hozzá kell adni 350 µl Puffer N3-t és rögtön, de óvatosan átforgatni a csövet 4-6-szor.

Ahhoz, hogy a helyi precipitáció elkerülhető legyen, azonnal össze kell keverni, de óvatosan az oldatot a Puffer N3 hozzáadása után. Az oldatnak zavarosnak kell lennie.

4. Centrifugálni kell 10 percig 13,000 rpm-en (~17,900 x g) mikrocentrifugában. Összeállt, fehér pellet fog képződni.

5. A 4-es lépésből származó felülúszót át kell rakni QIAprep Spin Oszlopra átöntéssel, vagy pipettázással.

6. 30–60 másodpercig kell centrifugálni. Ki kell önteni az átfolyó folyadékot.

7. (Választható): A QIAprep Spin Oszlopot 0.5 ml Puffer PB-vel át kell mosni és centrifugálni 30–60 másodpercig. Ki kell önteni az átfolyót. Ez a lépés azért szükséges, hogy minden maradék nukleáz aktivitást megszüntessünk, amikor *endA*+ vonalat használunk, mint pl. JM széria, HB101 és azok leszármazottjai, vagy vad típusú vonalat, melynek magas

Különböző sertésfajták genetikai analízise

a nukleáz aktivitási szintje vagy a szénhidrát tartalma. A befogadó vonal, mint pl a XL-1 Kék és a DH5 α TM nem igényli ezt a plusz mosási lépést.

8. A QIAprep Spin Oszlopot 0.75 ml Puffer PE-vel át kell mosni és centrifugálni 30–60 másodpercig.

9. Az átfolyó folyadékot ki kell önteni és még egy percig centrifugálni kell a maradék mosópuffer eltávolítása érdekében.

Fontos: a maradék mosópuffert nem lehet maradéktalanul eltávolítani, ha nincs kiöntve az átfolyó az újabb centrifugálás előtt. A Puffer PE-ből visszamaradt etanol gátolhatja a megfelelő enzimreakciókat.

10. A QIAprep oszlopot egy tiszta 1.5 ml mikrocentrifuga csőbe kell rakni. Hogy megfelelően oldódjon a DNS, hozzá kell adni 50 μ l Puffer EB-t (10 mM Tris·Cl, pH 8.5), vagy vizet az oszlop membránjának közepére, állni kell hagyni egy percet, majd centrifugálni egy percig.

Különböző sertésfajták genetikai analízise

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni két konzulensemnek, Dr. Bali Papp Ágnesnek és Dr. Macháty Zoltánnak a rengeteg tudást, támogatást, segítséget és barátságot PhD hallgatói éveim alatt, valamint a disszertáció megírása alatt.

Köszönöm diplomamunka-társ konzulensemnek, Pataki Renátának a gyakorlati tudást és segítséget.

Köszönöm a Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar Állattudományi Intézetének minden dolgozójának és PhD hallgatóinak a segítséget.

Köszönöm a Purdue University Department of Animal Sciences laboratórium PhD hallgatóinak, Kiho Leenek, Chunmin Wangnak és Jack Chaillenek.

Köszönöm a mintákat biztosító telepeknek, személyeknek és vágóhidaknak: Neckár Mónikának és Arany Lászlónak a Móri Cívis KHT munkatársainak, Zsoldos Lászlónak a pécs-hirdi mintákat, Hollósi Balázsnak és feleségének a csertői mintákat, Molnár Ferencnek és családjának a hosszúhetényi mintákat. Az Olmos és Tóth Kft-nek emődi és nyírtassi mintákat valamint az Indiana Packers Co., Delphi vágóhid munkatársainak.

Páromnak, szüleimnek és barátaimnak is köszönöm minden támogatásukat, szeretetüket és türelmüket.