

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
MEZŐGAZDASÁG- ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI KAR
ÁLLATTUDOMÁNYI INTÉZET
ÁLLATGENETIKA ÉS BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZETI TANSZÉK

**MELANOKORTIN RECEPTOR 4 POLIMORFIZMUS VIZSGÁLATA
MANGALICA ÉS MANGALICA × DUROC SERTÉSEKBEN**



Készítette:

SIMON ZSOLT

Élelmiszermérnök szak

Konzulensek:

PROF. DR. BALI PAPP ÁGNES

Egyetemi tanár

TEMPFLI KÁROLY

PhD hallgató

MOSONMAGYARÓVÁR
2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	4
2.1. A hazai sertésállomány alakulása	4
2.2. A téma aktualitása.....	6
3. A MC4R BEMUTATÁSA, ÉLETTANA	9
3.1. A MC4R a szervezetben.....	9
3.2. Szöveti eloszlása.....	11
3.3. Élettana	11
4. AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ÁLTALÁNOS LEÍRÁSA	14
4.1. PCR (polimeráz láncreakció)	14
4.2. RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)	19
4.3. Gélelektroforézis.....	20
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	22
6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	28
7. ÖSSZEFOGLALÁS	35
8. IRODALOMJEGYZÉK	36

1. BEVEZETÉS

Kutatásom során a melanokortin receptor 4 (MC4R) génben megfigyelt A1426G (Asp298Asn) polimorfizmus (DVOŘÁKOVÁ és mtsai, 2011) hatását vizsgáltam mangalica és mangalica×duroc keresztezett sertések különböző, hústermeléssel kapcsolatos eredményeire (MEIDTNER és mtsai, 2006). Sertésben a hústermelést befolyásoló polimorfizmusok (QI, L. 2008) nagyon fontosak lehetnek gazdaságilag és az élelmiszerellátás szempontjából is, hiszen a sertéshús és a belőle készült termékek hazánkban is nélkülözhetetlen fogyasztási cikkek. Jelentősége a társadalom, a gazdaság és a mezőgazdaság pénzügyi stabilitása szempontjából sem elhanyagolható. A sertésállomány mezőgazdasági, monetáris fenntartása és finanszírozása már évtizedek óta fontos követelmény és elvárás hazánk gazdasága szempontjából.

Dolgozatomban a MC4R gén A1426G polimorfizmusának hatását (KIM és mtsai, 2004) szándékoztam felmérni a napi súlygyarapodás, a szalonnavastagság (ÓVILO és mtsai, 2006), a vágás előtti testtömeg, a hús színének és egyes értékes húsrészek (sonka, lapocka) tömegének alakulására, amelyet más fajtákban már többen is vizsgáltak (BUTLER és mtsai, 2001; BARB és mtsai, 2004; KIM és mtsai, 2000b). A MC4R gén hatásának adott populációban való megismerésével és esetleges előnyeinek kihasználásával remélhetőleg gazdaságosabbá tehető a végtermék-előállítás, továbbá a molekuláris genetikai vizsgálat eredményei különböző szelekciós programokban is felhasználhatók. Az eredmények új információt nyújtanak továbbá a magyar mangalicában és duroc-kal keresztezett állományában megfigyelhető MC4R allél-és genotípus-összetételről.

Vizsgálataim során molekuláris genetikai eszközök segítségével olyan eredményeket kaptam, melyek kitűnően mutatják a vizsgált MC4R polimorfizmus hústermelésre gyakorolt hatását. Az adatok felhasználhatók a minőségi élelmiszer-előállításban, mert a fogyasztók ízlését is jelentősen befolyásoló effektusok (pl. hússzín) a polimorfizmus meghatározásával előre jelezhetőek.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A hazai sertésállomány alakulása

A mangalicatenyésztés története egészen a 19. századig nyúlik vissza, mivel a Magyarországon őshonos sertésfajták (nádi, bakonyi, szalontai sertés) és a szerb sumadia felhasználásával ekkor alakult ki a mangalica és ekkor kezdték nagyobb mennyiségekben tenyészteni (RADNÓCZI, 2006). A mangalica népszerűségét kiemelkedő zsírtermelése alapozta meg, hiszen a 19. században a zsiradék iránti növekvő igényt a lehető legrövidebb idő alatt olyan sertések tartásával és tenyésztésével lehetett biztosítani, amelyek intenzív zsírtermelésre képesek.

A 20. században a sertésenyésztés fokozatosan az állattenyésztés legfontosabb ágazatává vált, valamint a sertés az egyik legmeghatározóbb haszonállattá fejlődött a magyar mezőgazdaságban. Részesedése az állattenyésztés bruttó termeléséből az 1980-as években megközelítette a 40%-ot. A sertéshús a világ számos térségében a húsfogyasztásból mind nagyobb részarányt foglalt el. Az ország sertésállománya 1895-ben a mai ország területén 3,2 millió volt, majd 1935-re 4,7 millióra nőtt.

A sertésenyésztést a második világháború okozta anyagi és emberi veszteségek nagymértékben visszavetették, az ország sertésállománya 1945 végére körülbelül 1 millióra csökkent, azonban a sertések gyors reprodukciós képessége révén már 1949-re elérte a háború előtti számot. Az állomány növekedését az 1950-es évek politikai intézkedései nem vetették vissza, sőt az állomány nagysága folyamatosan növekvő tendenciát mutatott. A takarmánytermelés fejlődése, a szinte korlátlan felvevő képességű kelet-európai piacok, valamint az egyre nagyobb húsfogyasztás hatására az ország sertésállománya az 1980-as évek közepéig többször is meghaladta a 10 milliót. A bel- és külpiazi kereslet csökkenése miatt a sertésállomány 1985-1990 között 9-9,5 millió között volt. A sertések közel felét a mezőgazdaság nagyüzembe szervezése után is a magángazdaságok (háztáji, kisegítő és egyéni gazdaságok) tartották.

A rendszerváltást követően a sertésállomány nagymértékben csökkent, az 1995. év szeptemberi közel 5 milliós állomány jelentősen elmarad (40%) az 1990. évitől. A nagy felvevőképességű kelet-európai piac elvesztése és a piac beszűkülése hatására csökkentek az exportlehetőségek és

mind nagyobb és nagyobb importra szorult az ország, az áremelkedések miatt visszaesett a belső fogyasztás. Rontotta a sertésenyésztési kedvet, hogy az alacsony takarmánytermelés következtében jelentősen emelkedtek a takarmányárak. Az 1994. évi állomány azonban már olyan alacsony volt, hogy emiatt sertéshús-behozatalra szorultunk (<http://mek.oszk.hu/02100/02185/html/314.html#316>).

Napjainkban ez a tendencia továbbra is folytatódik, hazánk sertésállománya a KSH legfrissebb adatai szerint megközelíti a közel száz évvel korábbi adatokat és ma már nem éri el a 3,5 millió egyedet sem. Ez a csökkenő arány sajnos továbbra is fennáll és a mezőgazdaság sertésenyésztési- és tartási ágazata elveszítheti korábbi gazdasági erejét. A sertések száma az elmúlt tíz évben 3 és 5,3 millió között változott; 2008 decembere óta 3,5 millió alatti.

Év	Sertés			Ebből anyakoca		
	Összesen	Változás az előző évhez képest		Összesen	Változás az előző évhez képest	
	Ezer db	Ezer db	%	Ezer db	Ezer db	%
2009	3181	-502	-13,6	225	-25	-10
2010	3208	27	0,8	228	3	1,3
2011	3142	-66	-2,1	220	-8	-3,5
2012	2913	-229	-7,3	205	-15	-6,8

1. táblázat: a sertésállomány változása 2009-2012.

(<http://tudastar.elelmiszerklub.hu/2012/03/ksh-sertesallomany-2012-februar.html>)

A 19. századi állattenyésztésben a legnagyobb mennyiségben előállított sertésfajta volt a mangalica, számos kép ábrázolja jelenlétét a mindennapi életben is. Hazánkban a különböző mangalicafajták közül – szőke, fekete, fecskehasú, vadas, vörös mangalica – a szőke volt a legjelentősebb, amely az 1900-as évek közepén a mangalicaállomány zömét tette ki. A felsorolt fajták közül sajnos a fekete és a vadas mangalica már kihalt. A 20. század közepétől, az intenzív hússertés fajták tenyésztésével, a fajtaváltással, illetve a hús iránti kereslet növekedése hatására a mangalica kiszorult a piacról, a II. világháborút követően a fajta majdnem teljesen kipusztult. A mangalicalétszám folyamatosan csökkent, 1973-75-ben pedig az alig 50 nyilvántartott, fajtatiszta mangalica kocával mélypontra jutott. A magyar állam az 1970-es években felismerte a fajtacsoportot fenyegető veszélyt, és védelmébe vette a mangalicát, ami így állami

közbeavatkozásnak köszönheti jelenét. A magyar állam egy gazdasági állatfajta megmentését célzó támogatása egész Európát tekintve példa értékű volt, hiszen a háziállatokat a védendő biológiai értékek közé soroló ENSZ-határozat csak 1992-ben jelent meg (SZABÓ, 2006).

2.2. A téma aktualitása

A minőségi termelés felé forduló fogyasztói hozzáállás révén fokozódik a kiváló minőségű termékek, így a mangalicahús (főként sonka) iránti kereslet is, mely biztosíthatja a mangalicatenyésztés jövedelmezőségét. Az utóbbi évtizedben a fokozódó piaci igény miatt bekövetkezett létszámnövekedés a figyelmet a tenyésztési és gazdasági kérdésekre irányította (ZENGŐ, 2003). Ennek hatására a kocalétszám 2003-ban 2939-re emelkedett, 2008-ban pedig a nyilvántartott kocák száma megközelítette a 8000-et (TÓTH, 2009). A Mangalicatenyésztők Országos Egyesületének nyilvántartásában 2011-ben 6331 fajtatiszta mangalica koca és 268 kan szerepel. Legnagyobb mennyiségben szőke (61%), 23%-ban vörös és 16%-ban fecskehasú mangalica kocákat tenyésztettek, és hasonló eloszlás (53, 26 illetve 21%) figyelhető meg kanok esetében is. A mangalica védelme a biodiverzitás megőrzése szempontjából kiemelkedő fontosságú, a világ egyik legintenzívebb zsírsertéseként kiváló forrást szolgáltathat például a zsírsavcsere genetikai hátterét feltáró molekuláris biológiai kutatásokban (SZENTE és mtsai, 2011).

A mangalica tenyésztése és tartása ma is befolyásolhatja a magyar gazdaságot, állományának fenntartása azonban nem csak a gazdaság szempontjából fontos, mivel a fajta sokkal ellenállóbb a különböző stressz és környezeti hatásokra, nem jellemző rá az intramuszkuláris vízleadás, a mangalica húsa egyedi és egyedülálló, jól megkülönböztethető tulajdonságokkal és sajátos minőséggel rendelkezik. A minőséget befolyásoló tulajdonságoknak, illetve az egyediségnek köszönhetően a termék piaci lehetőségei jók, amelynek kihasználása a magyar élelmiszergazdaság szereplőinek a feladata. A marketing- és az értékesítési stratégia szempontjából igen fontos felismerés az, hogy a vizsgált fajta készítményei kiemelkedő táplálkozás-élettani előnyökkel rendelkeznek. LUGASI (2006) vizsgálatainak eredményei szerint a mangalica sonkában a vas, a mangán, a cink; a B-vitaminok közül a tiamin és a riboflavin koncentrációja nagyobb, mint a „modern” fajtákban. A zsírsavtartalom szempontjából előnyös, hogy a mangalica húsa az omega-3 zsírsavakat kedvezőbb mennyiségben tartalmazza, ezáltal

alkalmas lehet a magyar lakosság kedvezőtlen omega-6/omega-3 arányának egyensúlyozásához (HALMY, 2006; SZAKÁLY és mtsai, 2008). Az ismert kutatások alapján az omega-3 zsírsavak egyértelmű védőhatással rendelkeznek a szívinfarktus és az ischemiás szívbetegség, egyes daganatos betegségek, mozgásszervi betegségek, alvadási zavarok, illetve újszülött és csecsemőkori mentális zavarok kialakulása szempontjából (HALMY, 2006).

A hús nagy intramuszkuláris zsírtartalma és annak finom, egyenletes eloszlása kedvező hatású az ízletesség, a porhanyósság, az élvezeti érték szempontjából, és nem utolsósorban a „szték” jellegű húsok, valamint speciális termékek (sonka, karaj) előállításában is előnyt jelent. A mangalicasertés szalonnájának állaga, kedvező zsírsavösszetétele miatt kiválóan alkalmas minőségi és nagy értékű szalonna előállítására (HOLLÓ és mtsai, 2003). A zsiradékú zsírsavösszetétele pedig magas minőségű húspari termékek gyártását teszi lehetővé.

A változó fogyasztói hozzáállás miatt tehát a tenyésztők új kihívások elé kerülnek. Ahhoz, hogy ezeknek meg tudjanak felelni, a testtömeg-gyarapodás genetikai hátterének megismerése nyújthat segítséget.

A sertéshús minőségi jellegzetességeit kialakító génekkel kapcsolatos ismereteink jelenleg még hiányosak, pedig a működésük megértése sok előnyt nyújtana. Ennek köszönhetően az elmúlt évtized alatt a sertéshús-előállítás genetikai hátterének megismerése a gyorsan fejlődő kutatások részévé vált. A hústermelőképesség javítása, alakítása napjainkban létfontosságú a fogyasztókért vívott harcban a fogyasztói igények (egészséges életmód és tápláló, ízletes hús) kielégítéséhez (RESURRECCION, 2004) szükséges megismernünk a végtermék minőségét kialakító genetikai tényezőket (FORTIN és mtsai, 2005; FERNANDEZ és mtsai, 1999). A minőség felé forduló tudatos fogyasztás megjelenésével és terjedésével a sertéstenyésztőknek fokozott figyelmet kell fordítaniuk a húsminőségre, ezt a szempontot hangsúlyozottan kell szelekciós programjaikba illeszteni. Ebben lehet segítségükre a genetikai markerekre alapozott szelekció (DAVOLI és BRAGLIA, 2008). A húsminőséget meghatározó legfőbb tulajdonságokat (pl. víztartó képesség, porhanyósság, márványozottság, pH) nehéz a hagyományos szelekcióval fejleszteni, mert azok örökölhetősége viszonylag alacsony, átlagosan 10 és 30 % (azaz h^2 értékei 0,1 és 0,3) közötti (SELLIER, 1998), mérésük nehézkes és főként csak vágás után kivitelezhető.

A piac fokozott igénye a minél vékonyabb hátszalonna iránt nagy befolyással volt a tenyésztői szelekció kialakítására (DE KONING és mtsai, 1999; DEVOL és mtsai, 1988). A modern, kevésbé zsíros fajták húsa azonban nem olyan ízletes. Ha az ízletesség és egyedülálló húsminőség szempontjából fontos intramuszkuláris zsírtartalom változtatása nélkül elérhetnénk őshonos mangalica fajtáink hátszalonna-vastagságának csökkentését, sokkal versenyképesebbé válhatna a tenyésztésük, akár extenzív tartástechnológia mellett és egyéb tulajdonságaik változtatása nélkül is. A hátszalonna vastagság és húsminőség javítása egyébként minden fajta esetében a legígéretebb vizsgált tulajdonságok közé tartozik (FERNANDEZ és mtsai, 1999; FORTIN és mtsai, 2005).

3. A MC4R BEMUTATÁSA, ÉLETTANA

3.1. A MC4R a szervezetben

A MC4R (melanokortin4-receptor) génje szerepet játszik a táplálkozási viselkedés kialakításában, szignifikáns hatása van a növekedési erélyre és a hátszalonna-vastagságra(YA-XIONG TAO, 2010). A leptin szint hat a MC4R szintre is, ezzel kapcsolatot tart fenn a takarmány-felvétel és a testtömeg között (PIÓRKOWSKA és mtsai 2010; KIM és mtsai, 2000a), szerepet játszva az egyensúly fenntartásában. A melanokortin-4 receptor gént 1993-ban fedezték fel és mutatták ki először PCR segítségével, funkciója azonban még ismeretlen volt. A későbbi vizsgálatok azonban mind arra mutattak rá, hogy a gén valószínűleg az energia-homeosztázis szabályozásában vesz részt (VAN DEN MAAGDENBERG és mtsai, 2007). Ezt a hipotézist 1997-ben bizonyították be először egereknél (YA-XIONG TAO 2010).

1998-ban igazolták, hogy az MC4R receptor gén mutációja az emberekben monogénes elhízást okozhat. Ma már több mint 150 féle mutációt ismerünk és a MC4R gén mutációk nagy része szerepet játszik a monogénes elhízás kialakulásában az emlősöknél. Az MC4R receptor génnek a tudomány mai állása szerint a szervezetben nagyon sokrétű funkciója ismert, hiszen befolyásolja az energiahomeosztázist (BUTLER és mtsai, 2001), a szív és érrendszeri funkciókat, a glükóz és lipid homeosztázist, a szaporodást és a szexuális funkciókat, illetve összefüggésbe hozható különböző agyi funkciókkal, így befolyásolja a szorongás érzését és a fájdalom érzékelését. A melanokortin 4 génnek tehát fiziológiai, patofiziológiai és farmakológiai funkciója is bizonyított napjainkban (SCHIÖTH, 2001).

A melanokortin rendszer számos agonistát tartalmaz (CONE és mtsai, 1996; CONE, 2006), mely mellett jelen van két antagonistá és az öt melanokortin receptor gén is (OOSTEROM és mtsai, 2001). Az agonisták, az α -MSH (melanocita stimuláló hormon), a β -MSH, a γ -MSH, és az ACTH (adenokortikotróp hormon), valamint néhány kevésbé ismert peptid típusú prehormon és a POMC hormonok (pro-opiomelanocortin hormonok) (A POMC egy ősi gén mely már 700 millió éve is jelen volt az ősi gerincesekben) szövet-specifikus termelődéséből származnak. Az agyalapi mirigyben a POMC hatására termelődik az ACTH (SMITH és FUNDER, 1988). Napjainkban már bizonyított, hogy az MSH már a magzati időszak alatt is termelődik, később pedig a bőr, a haj, az agy is szerepet játszik az elválasztásában (SCHIÖTH, 2001).

A melanokortin rendszer egyedülálló, hiszen két endogén antagonistája is ismert az agouti és agouti-rokon peptid (AgRP). A rendszerben számos segédfehérje (pl.: szindekán-3) is jelen van, melyek modulálják a receptorok működését kölcsönhatásban Agouti és AgRP-vel (GANTZ és mtsai, 1993).

Öt melanokortin receptor (MCRs) közvetíti a melanokortinok tevékenységét. Ezeket a szekvenálási sorrendjük alapján számozták MC1R-től egészen MC5R-ig. Az MC1R a klasszikus MSH receptor, mely a bőrben és a hajhagymákban expresszálódik, és szabályozza a pigmentációt. A MC2R a klasszikus ACTH receptor, amely a mellékvesekéregben fejeződik ki és szabályozza mellékvese szteroidogenezisét. A MC3R és a MC4R pedig a központi idegrendszerben fejt ki hatását, ezért ezek az idegi melanokortinok. Mind a MC3R és a MC4R az energia homeosztázis szabályozásában vesz részt. A MC5R nagyon széles körben jelen van a szervezetben, elsősorban az exokrin mirigyek választják ki és termelik (GANTZ és mtsai, 1993).

A GANTZ és mtsai. (1993), valamint CONE és mtsai. (1996) szekvenálták először az emberi MC4R gént. Az emberi MC4R gén 999 bázispár (bp) méretű és egy olyan fehérjét kódol, amely 332 aminosavból áll (CHHAJLANI és WIKBERG, 1992). Fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) segítségével a MC4R-t a kromoszómálisan is lokalizálták a 18q21.3 helyen. A MC4R-t mára számos állatból klónozták beleértve az orángután, a selyemmajmot és más főemlősöket is, de klónozták már egérből, tehénből, kutyából, macskából, juhból és sertésből is. Szekvenálták nem emlős állatokban, így madarakban és halakban is. Az aminosav szekvenciák a különböző fajok között erősen konzerváltak. Ezt bizonyítja, hogy 93%-ban azonos a MC4R a patkány és az ember között, 87%-ban a baromfi és az ember között, sőt még a tuskécáppával is 71%-os az azonosság (MAGENIS és mtsai, 1994).

3.2. Szöveti eloszlása

GANTZ és mtsai (1993) bizonyították, hogy a MC4R elsősorban az agyban van jelen és ott választódik ki. Patkányokon végzett széles körű kísérletek alapján ki lehet jelenteni, hogy a MC4R az agy számos területén megtalálható, beleértve a kéregállományt, a talamuszt, hipotalamuszt, agytörzset és a gerincvelőt. A hipotalamuszban és a paraventriculáris magban választódik ki elsősorban. A neuronok mellett ráadásul asztrociták is hozzájárulnak a MC4R kiválasztódásához.

Patkányokon végzett kísérletek alapján kimutatták, hogy a MC4R már az embrionális időszak 14. napján is termelődik a köztiagyban (hipotalamusz és talamusz), a nagyagyban, és a gerincvelőben is. Az embrionális időszak 19. napja után a MC4R az agy számos más területén termelődik. A legmagasabb expressziós szintet a vegetatív idegrendszer mutatja. Ezenkívül, a MC4R számos perifériás szövetben is expresszálódik a magzati időszak alatt, beleértve a fejlődő szívet, tüdőt, légzésben érintett izmokat, mint a membrán és a bordaközi izmokat (SELKIRK és mtsai, 2007).

3.3. Élettana

A táplálékfelvételt a hipotalamusz orexigén (éhség) és anorexigén (jóllakottság) neuronokat tartalmazó magcsoportjai szabályozzák. Az elsődleges központ a nucleus arcuatus, ahol mind orexigén, mind anorexigén neuronok vannak. Az orexigén neuronokat aktiváló legfontosabb jelmolekula a gyomor által szekretált grelin. A grelin által aktivált neuronok NPY (neuropeptid Y) neurotranszmitterrel stimulálják a másodlagos orexigén magcsoportot, a laterális hipotalamikus terület orexigén sejtjeit. A grelin éhségérzetet vált ki. Az anorexigén neuronokat aktiváló legfontosabb jelmolekula a zsírszövet által szekretált leptin. A nucleus arcuatus anorexigén neuronjai MSH-t (melanocita stimuláló hormon) használnak neurotranszmitterként. Az MSH a melanokortin 4 receptoron (MC4-R) keresztül hat és aktiválja a másodlagos anorexigén neuronokat (CONE és mtsai, 1996). Az α -MSH szerepe a legismertebb az energiahomeosztázis fenntartása szempontjából. Bár az α -MSH az MC2R receptoron kívül mindegyik melanokortinhoz képes kötődni, a központi idegrendszerben az MC3R és MC4R

receptorokon keresztül fejt ki hatását. Az α -MSH, vagy az MC3/4R receptor agonista melanotan II csökkenti a felvett táplálék mennyiségét (jóllakottság központ aktivált állapota). Ezzel szemben az MC3/4 receptor antagonistá SHU9119 (jóllakottság központot gátló) magában is képes kiváltani a táplálékfelvétel növekedését (GANTZ és mtsai, 1993)

A MC4R számos egyéb antagonistája ismert, mint például a HS014 és a HS024, amelyek bizonyítják, hogy a MC4R szerepet játszik a táplálékfelvétel szabályozásában. Ezen antagonisták ICV (intracerebroventrikuláris) infúziója stimulálja a táplálkozást, míg a hosszú távú infúziók növelik a táplálék felvételét és elhízáshoz vezetnek (SCHIÖTH, 2001).

Ma már elfogadott tény, hogy a MC4R a hipotalamuszban fejt ki hatását és az energiahomeosztázis szabályozásában vesz részt a leptin receptorral együttesen kortól, nemtől és étrendtől függetlenül (CONE, 2006). A leptin a POMC neuronokban fejt ki a hatását és a leptines kezelés növeli a POMC szintet. Az elektrofiziológia kísérletek azt mutatták, hogy a leptin növeli az akciós potenciál gyakoriságát a POMC neuronokban. A leptin receptor az AgRP neuronokban is kifejti a hatását és a leptines kezelés csökkenti az AgRP szintet. Az SHU9119 ICV-s beadása blokkolta a leptin anorexigén hatását a táplálékfelvétele során, míg nem volt hatással a glükagon-szerű peptid-1 anorexigén hatására (DVOŘÁKOVÁ és mtsai, 2011).

A leptin által szabályozott melanokortin rendszer befolyásolja az energiamérleget a következő módon. Amikor az állatok éheznek a leptin szintjük csökken, a POMC neuronok aktivitása csökken, az AgRP neuronok aktivitása nő, és a MC4R szint csökken. Ez maga után vonja a táplálék felvételének növekedését és az energiakiadások csökkentését. Ezzel szemben, amikor a kísérleti állatokat etetik, a POMC neuronok aktiválódnak, míg az AgRP neuronok gátoltak, és a MC4R szint nő. Ez maga után vonja a táplálék felvételének csökkenését és az energiakiadások növekedését. Az energiahomeosztázis fenntartását ez az érzékeny visszacsatolási rendszer látja el. Ennek a kényes egyensúlynak természetesen számos egyéb tagja is ismert, mint a fent említett grelin vagy a YY3-36, és CCK peptidek, melyek befolyásolják az energiamérleget (DVOŘÁKOVÁ és mtsai, 2011; MEIDTNER és mtsai, 2006).

Szakdolgozatomban a sertés MC4R gén egyetlen exonjában található A1426G egy pontos nukleotid polimorfizmusának (SNP) hatását elemeztem. A vizsgált SNP nem szinonim, aminosavcserét eredményez a génről íródó melankortin 4 receptor fehérjében. Asp298Asn: aszparaginsav van jelen, ha guanin (G), aszparagin pedig, ha adenin (A) található az adott polimorf helyen a DNS-en. A MC4R polimorfizmusa a gén által szabályozott valamennyi folyamatban változásokat, eltéréseket okozhat: hatással lehet például a hátszalonna vastagságára vagy a napi súlygyarapodásra is. A polimorfizmus felhasználható az adott fogyasztói igényekhez alkalmazkodó szelekció során (KIM és mtsai, 2000b).

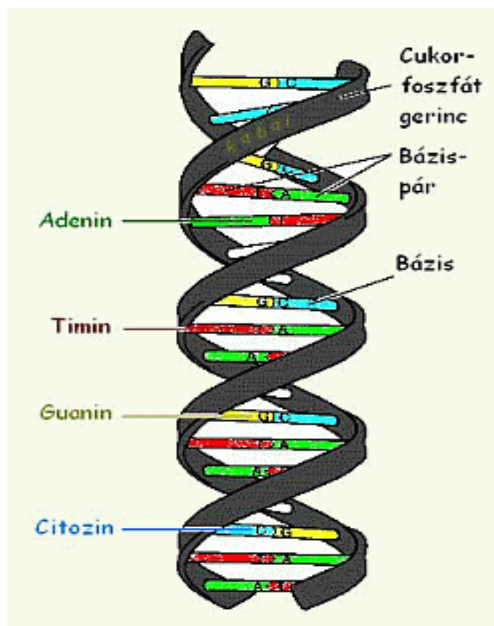
4. AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK ÁLTALÁNOS LEÍRÁSA

Kísérleteim során a következő módszereket, technológiákat használtam:

- PCR (polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció)
- RFLP (restriction fragment length polymorphism, restrikciós fragmentumhossz polimorfizmus)
- agaróz gélelektroforézis

4.1. PCR (polimeráz láncreakció)

Az egyes gének pontos vizsgálatához a mintából (a vizsgálni kívánt DNS-szakaszból, génből) lehetőleg minél többre van szükség. Ezt érhetjük el jelen módszerrel. A PCR (Polymerase Chain Reaction- polimeráz láncreakció) technológia kidolgozása KARY MULLIS nevéhez fűződik, aki munkájáért 1993-ban kapott kémiai Nobel-díjat, bár a módszer kezdetlegesebb, nehezebb kidolgozásához már 1983-ban eljutott (MULLIS és mtsai, 1987). A gének sokszorosítását eleinte a kívánt szakasz baktériumokba való bejuttatásával és azok tenyésztésével, in vivo végezték (SAIKI és mtsai, 1988). A későbbiekben igyekeztek az ezzel járó jelentős munkaigényt kiküszöbölni: az amplifikálást (sokszorosítást) DNS-polimeráz enzim és primerek hozzáadásával, in vitro végezték (SAIKI és mtsai, 1988). A rendelkezésre álló enzimek azonban nem bírták a DNS-szálak szétválasztásához szükséges magas (92-96°C) hőmérsékletet, emiatt az enzimet minden újabb ciklus elején a mintához kellett adni. Ez az eljárás folyamatos figyelmet és rengeteg polimerázt igényelt. A megoldást a problémára egy extrém hőmérsékleti viszonyok közt élő és szaporodó baktérium felfedezése hozta: a Yellowstone-park gejzírjeiből izolált *Thermus aquaticus* polimeráz enzime ugyanis alkalmazkodott a 100 °C körüli környezethez. Ily módon a DNS-szálak szétválasztásához szükséges 92-96 °C-ot károsodás nélkül elviselte, tehát nem kellett minden egyes ciklus elején adagolni. A folyamat így programozhatóvá és minden különösebb felügyelet nélkül elvégezhetővé vált. (ZSOLNAI és mtsai, 2000).



1. ábra: DNS lánc irányítottsága és felépítése
(http://www.behav.org/gene/dna/dns_01_szerk.htm)

A PCR reakció több alapvető komponenset igényel. Ezek a komponensek:

- DNS-templát: tartalmazza a vizsgálandó, sokszorozandó DNS-szakaszt
- Két primer: meghatározzák a sokszorozandó szakasz végeit
- DNS-polimeráz: egy enzim, amely lemásolja a primerek által közrefogott szakaszt
- Dezinukleozid trifoszfátok (dNTP): ezekből építi fel a komplementer szálát a polimeráz enzim

A különböző élőlények genetikai kódjuk másolását DNS-polimerázokkal végzik. A generációk rövid távú túlélése érdekében a másolásnak pontosnak kell lennie, de a mutáció lehetőségét sem szabad kizárni a környezethez való hosszú távú alkalmazkodás lehetőségének érdekében.

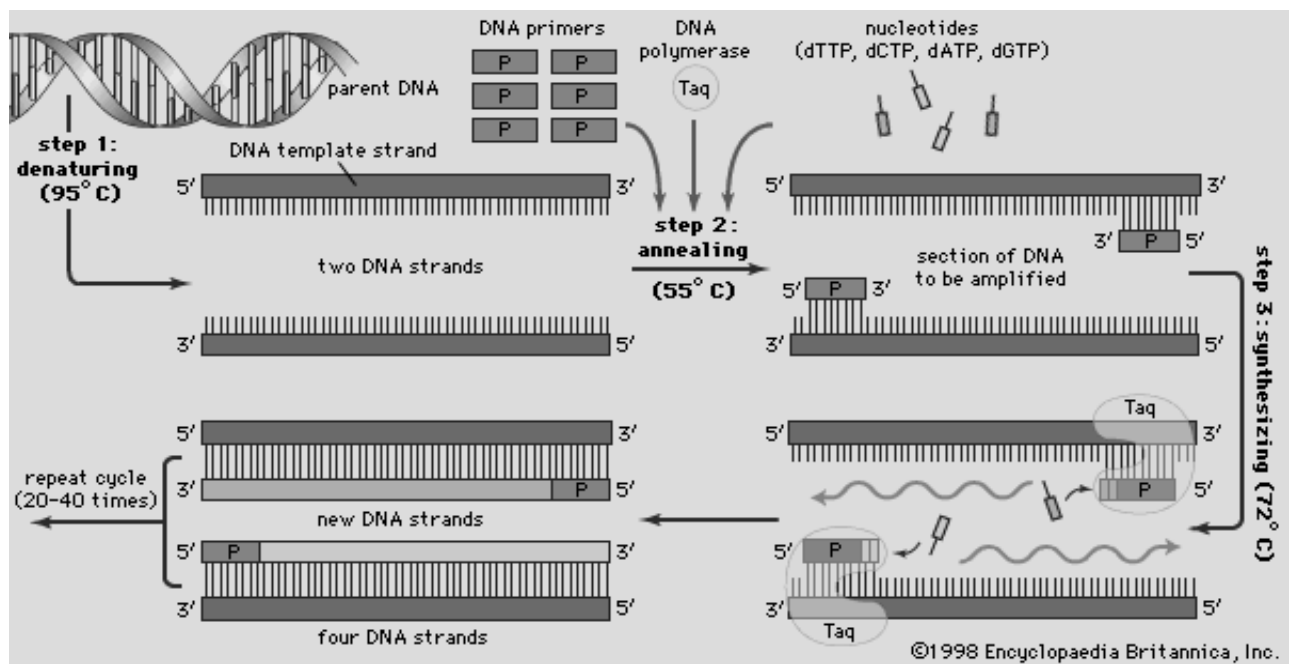
- Puffer: biztosítja az enzim működéséhez szükséges kémiai környezetet (ZSOLNAI és mtsai, 2000)

A reakció az alábbi sorrendben és lépésekkel játszódik le:

- Iniciáció, bevezető denaturáció. Melegítjük a keveréket 95°C-on 2 percig, hogy a DNS-szálak és a primerek egyaránt denaturálódjanak. A kétszálú DNS-t összetartó H-hidak megszüntethetők magas hőmérsékleten, így egyszálú DNS képződik. 94°C-on 1 perc már bőven elegendő a genomikus DNS teljes denaturálódásához (templátképzés). Mivel a genomikus DNS aránya csökken a reakció előrehaladtával, a későbbi ciklusokban nincs igazán szükség a genomikus DNS-re ezért a későbbi ciklusokban elegendő a 92-93°C-on 10-14 másodperc is, a képződött új szálak szétválasztásához, de nem elegendő a genomikus DNS teljes denaturálásához. Ezzel is csökken a primerek rossz helyre való feltapadásának lehetősége.
- Kapcsolódás, vagy feltapadás (annealing). A primerek a szétvált DNS-szálakhoz kötődnek a bennük kódolt pontokon. Melegíteni kell a keveréket 42-65°C-on 30-60 másodpercig. A feltapadás a reakciónak a legfontosabb, specifikitást meghatározó lépése. A denaturáláskor egyszálúvá lett és a hirtelen visszahűtött DNS mérete miatt nem tud elég gyorsan újra egyesülni, viszont lehetővé teszi a feleslegben lévő kis méretű primerek egy részének, hogy azok megtalálják komplementer szekvenciájukat (kiegészítő bázis sorrendet), és ahhoz hozzátapadjanak. A feltapadás valószínűsége különösen függ az első néhány ciklusban a kiindulási célkópiák számától, a rendelkezésre álló időtől és a tapadási hőmérséklettől. A feltapadási hőmérséklet optimuma általában az olvadási hőmérséklet körül van. Ha a feltapadás hőmérséklete igen magas, akkor nem kapunk terméket (a primerek egyszálú állapotban maradnak, képtelenek hozzátapadni a komplementerükhöz), ha alacsony, akkor a feltapadás nem specifikus, sok mellékterméket kapunk. Feltapadás után a láncépítés azonnal elkezdődik.
- Meghosszabbítás vagy növesztés (elongáció). A polimeráz enzim működésbe kezd: elindul a DNS-szakaszok másolása, a hőmérséklet 72-73°C-on 45-60 másodpercig. Az enzim csak ott kezdhet, ahol a primer kötődött a szétvált láncokhoz, mert működéséhez kétszálú DNS-részlet szükséges (általában 20 bázispárnyi rövid kétszálú szakasz is elegendő- ilyen hosszúságúra tervezik a primereket). Ebben a szakaszban játszódik le az új szintézis a már láncindító szekvenciaként viselkedő primer tökéletesen feltapadó 3' végéről. A primerek ellenkező irányítottságúak, mindig a rájuk jellemző szálát választják ki, ezért a komplementer templát szálakon, de egymással szemben növekszenek.

- Ismételjük meg a denaturációt, feltapadást és a meghosszabbítási reakciókat 30-35-ször. Ciklusról ciklusra haladva az adott DNS-szakasz megduplázódik, így akár minimális kiindulási mennyiségről is rengeteg másolatot kapunk.
- Végso lánchosszabbítás, ebben a lépésben a mintákat 72°C-on tartjuk kb. 5 percig.
- Rövid idejű tárolás 4°C-on. Ez akkor hasznos, ha nem tudunk a program végénél jelen lenni, így a reakciótermék sérülésmentesen tárolható ezen a hőmérsékleten a gélelektroforézisig (ZSOLNAI és mtsai, 2000).

A PCR elvi alapja:



2. ábra: PCR elvi alapja A PCR-ciklus sematikus ábrája. 1. lépés: denaturáció 94-96 °C-on. 2. lépés: kapcsolódás 50-65 °C-on. 3. lépés: lánchosszabbítás 72 °C-on. Az első ciklus végén megduplázódik a primerek által határolt szakasz. Az eredményül kapott két DNS-szál a következő ciklus templátja lesz, azaz minden ciklusban megkétszereződik az adott DNS-szakasz mennyisége.

(http://faculty.unlv.edu/wmojica/PCR_LAB2.htm)

Készülékek

Az első PCR készülékben maximum 48, esetleg 96 mintát lehetett egyszerre felszorzozni. Mára már egyre több laborban használnak 384, sőt akár 1536 mintát befogadó készülékeket. Egyre gyorsabb készülékek kerülnek forgalomba, amelyek egyre kisebb térfogatokkal képesek dolgozni. A készülékek kialakításánál már szempont az automata minta összeállító rendszerekkel való kompatibilitás (ZSOLNAI és mtsai. 2000).

Előnyök és hátrányok

A PCR előnyei: érzékenysége nagy (pl. baktérium fertőzés élelmiszerben vagy Y kromoszómát tartalmazó sejt kimutatása anyai vérből kivitelezhető bármilyen DNS-t tartalmazó mintából, esetleg mintaelőkészítés nélkül is, közvetlenül a vérből a meghatározás gyors, maximum néhány órát vesz igénybe), egyszerű berendezéssel elvégezhető.

Sajnos a nagy érzékenység hátrányként is értelmezhető, például ha a keresztszennyezésre, a levegőben lévő más mintákból származó aerosolra gondolunk.

Reakció gátlók (inhibitorok) és erősítők (enhancerek)

Néhány vegyület illetve egy-egy paraméter értékének adott intervalluma a PCR enzimreakciót a végtermékek képződése felé tolja el (enhancerek), mások pedig a végtermékek képződését akadályozzák (inhibitorok).

Egy átlagos reakcióban a primerek, a célszekvencia, a polimeráz és a nukleotidok mennyisége olyan egyensúlyban vannak, hogy azok bármelyikének, vagy azok tulajdonságaira ható, járulékos vegyszer koncentrációjának megváltoztatása a reakció menetét drasztikusan befolyásolja. Néhány reakciókomponens pontos mechanizmusa, másokénak pedig csak a tapasztalati hatása ismert.

A magnézium ion erősen kötődik a nukleinsavak és nukleotidok negatív töltésű cukorfoszfát részéhez, ezért ha a beépülő nukleotid és/vagy a célszekvencia mennyisége túl magas, az Mg ionokat kivonja az oldatból, ami a Mg függő polimeráz enzim működését rontja illetve leállítja. Általánosságban a szabad Mg_2^+ koncentráció növelése az adott határokon belül intenzívebb sávokat produkál, de kevésbé specifikus termékek képződésének kedvez, míg a csökkentése a specifikusság növelését segíti elő.

EDTA vagy más kelátképző vegyszerek alkalmazása megváltoztatja a szabad Mg_2^+ mennyiségét. Az Fe_2^+ vérminták révén kerülhet a preparátumba. Jelenléte a reakciót gátolja.

A K^+ mennyiségének növelésével a reakció specifitása csökken és 100mM felett már gátol, koncentrációjának duplázásával a DNS szál olvadási hőmérséklete 5°C-kal nő. A reakció blokkolása esetén a lefedett foszfátcsoportokkal a H-híd kötések annyira dominálóvá válnak, hogy a szálak már 94°C-on sem képesek szétválni. A K ion átmérője hasonló az ammónium ionéhoz, de az NH_4^+ koncentrációjának növelésével a specifikusság nő.

A pH optimális értéke 8-9 között lehet. A hatékonyság növelhető a pH növelésével, de a specifikusság ezzel párhuzamosan csökken.

Egyéb adalékanyagokat is lehet használni a reakció javítására, de hatásuk a célszekvencia összetételétől függően változhat (ZSOLNAI és mtsai. 2000).

4.2. RFLP (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)

Egy laboratóriumi technika, melynek során a különböző élőlényeket azonosíthatjuk a feldarabolt DNS-ük mintázata alapján. Ha két organizmus különbözik az adott restrikciós enzim hasítóhelyek közti távolságban, akkor a DNS fragmentumok hossza is különbözni fog a restrikciós enzimes emésztés után. Ezek különbözősége alapján különíthetjük el a fajokat, sőt akár egyedeket is egymástól.

Restrikciós endonukleázok (RE) azok az enzimek, amelyek a DNS-t az adott nukleotid szekvencia felismerése után hasítják. Ezek a felismerő helyek gyakran 4-6 bázispárból állnak. Általában minél rövidebb egy ilyen szekvencia, annál több darab keletkezik. Ha a molekulák

szekvenciája eltérő, akkor eltérő nagyságú darabokat kapunk. Ezeket a fragmenteket gélelektroforézis segítségével különíthetjük el. A restrikciós enzimeket több különböző baktériumtörzs segítségével állítják elő; eredetileg ez valószínűleg a baktériumok vírustámadások elleni védekező mechanizmusának része. Mindkét láncot hasítják. A hasítás tompa, azaz blunt (ha a RE a DNS két szálát ugyanazon a helyen vágja), vagy ragadós, azaz sticky (túlnyúló 3' ill. 5' vég párosítatlan nukleotidokkal) véget eredményez (OROSZ, 1980).

Ritkán vágó enzimek azok a restrikciós enzimek, amelyek felismerő szekvenciájuk gyakoriságának megfelelően kevés helyen vágják a genomiális DNS-t. Gyakran vágó restrikciós enzimek jellemzően rövidebb DNS szekvenciákat ismernek fel, mely szekvenciák sokszor fordulnak elő a DNS láncban.

Emésztésnek (digestion) nevezik azt az enzimreakciót, amikor a restrikciós enzim a DNS-t a felismerő helyeknek megfelelően feldarabolja. A restrikciós enzimeknek kulcsszerepük van a sejtek védelmében az idegen eredetű nukleinsavval szemben, valamint a géntechnológiában (OROSZ, 1980).

4.3. Gélelektroforézis

A DNS különböző méretű fragmentumainak elválasztására szolgáló technika, mely a fragmentumok elektromos térben való mozgékonyaságán alapul. Az elektroforézis ionos töltésű molekulák elválasztását jelenti elektromos erőter (és a legtöbb esetben elválasztó mátrix alkalmazásával, felületi töltéssűrűség és/vagy molekulatömeg) alapján. Az elektroforézis az egyetlen olyan elválasztástechnikai módszer, mely három jellemző, a felületi töltéssűrűség, a molekulatömeg és az alak alapján képes elválasztani egymástól a minta alkotórészeit. Mivel a különböző hosszúságú DNS fragmentek töltéssűrűség-különbsége igen kicsi, és többnyire alakjuk is hasonló, ezért elválasztásuk méret alapján, egyenáram hatására létrejövő vándorlás közbeni szűréssel történik.

Mivel a DNS fragmentumok általában negatív töltést hordoznak, elektromosság hatására a pozitív töltésű elektróda (anód) felé mozognak el. A nagy darabok viszonylag lassabban mozognak a gélben, míg a kisebbek gyorsabban átjutnak a gél szerkezetén. A gélbe juttatott

mintákat UV-fényben látható festékkel jelöljük (pl. ethidium-bromiddal). UV- megvilágítás során látható, hogy melyik minta meddig „futott”, ebből pedig következtethetünk a méretére. Ez alapján különíthetjük el a vizsgált génekben az esetleges polimorfizmusokat: eltérő hosszúságúakra darabolják őket a restrikciós endonukleázok (ZSOLNAI és mtsai. 2000).

Agaróz

Az agaróz vörös algából kivont, a nagyobb stabilitás, az alacsonyabb olvadáspont és a nukleinsavakat bontó enzimektől való mentesség elérése céljából kémiaailag módosított poliszacharid.

Az agaróz nem mérgező, géljei könnyen, a megfelelő mennyiségű agaróz port meleg fürdőben feloldva, formába öntve majd lehűtve képezhetőek. Hagyományos gélelektroforézissel akár 40-50kb méretű DNS fragmentek is elválaszthatóak egymástól, míg az úgynevezett pulsed field gélelektroforézissel a megabázis mérettartományba eső kromoszómadarabok is elkülöníthetőek (ZSOLNAI és mtsai. 2000).

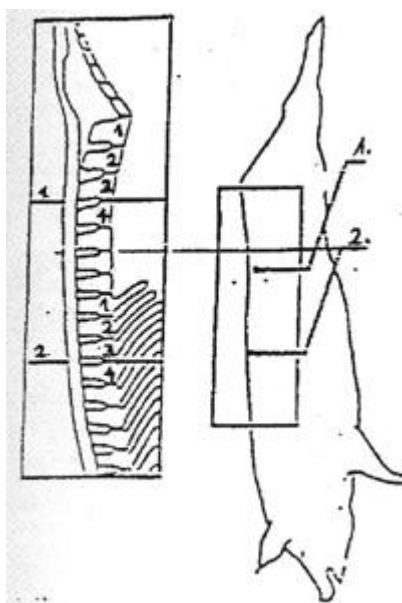
Mobilitást befolyásoló tényezők

Egy adott mintának a mobilitását (a gélben az adott idő alatt megtett vándorlási távolság értéke) elsősorban a minta tulajdonságai, másodsorban az elektroforetikus rendszer tulajdonságai (pl. az alkalmazott térerő, a gél koncentrációja, a puffer típusa és a koncentrációja) határozzák meg. A puffer koncentrációjának növelésével fajlagosan kevesebb áram jut a DNS fragmentumok mozgására, így az elválasztás lelassul, valamint a fejlődő hő a gél fizikai stabilitását veszélyezteti, a sávok diffúzióját növeli, a felbontást rontja (ZSOLNAI és mtsai. 2000).

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálataim során 60 mangalica×duroc F₁ kocahízó és 10 fajtatiszta szőke mangalica ártány vágási adatait gyűjtöttem és dolgoztam fel. Az elemzésbe vont állatok az Olmos és Tóth Kft. nyíribronyi telepéről származtak, az egyedek vágási adatait pedig a Surjányhús Kft. törökszentmiklósi vágóhídján gyűjtöttük. Az G746A MC4R polimorfizmus allélgyakoriságának mangalica fajtában való felméréséhez a vágási adatokkal rendelkező 10 egyed mellett további 10 szőke mangalica tenyészkán genotípusát határoztam meg.

A vágási adatok gyűjtését gyakorlott szakemberek végezték a hivatalos minősítési eljárás előírásait figyelembe véve. A testtömeg és a különböző húsrészek (jobb és bal sonka, lapocka) mérését hitelesített mérleggel végeztük. A színreflexiók érték, a karaj- és szalonnavastagság megállapításához Fat-o-Meater szúrószondát alkalmaztak. A szalonnavastagság 1 paraméter mérése a hasított sertés bal oldalán, a 3. és a 4. ágyékcsigolya között, a gerincvonaltól 8 cm-re oldalirányban történt (3. ábra). A szalonnavastagság 2 és a karajátmérő felvételére szintén a baloldali féltesten, a 3. és a 4. borda között, a gerincvonaltól oldalirányban 6 cm-re került sor (MgSzH, Sertés Teljesítményvizsgálati Kódex, 2009; Magyar Közlöny, 2011).



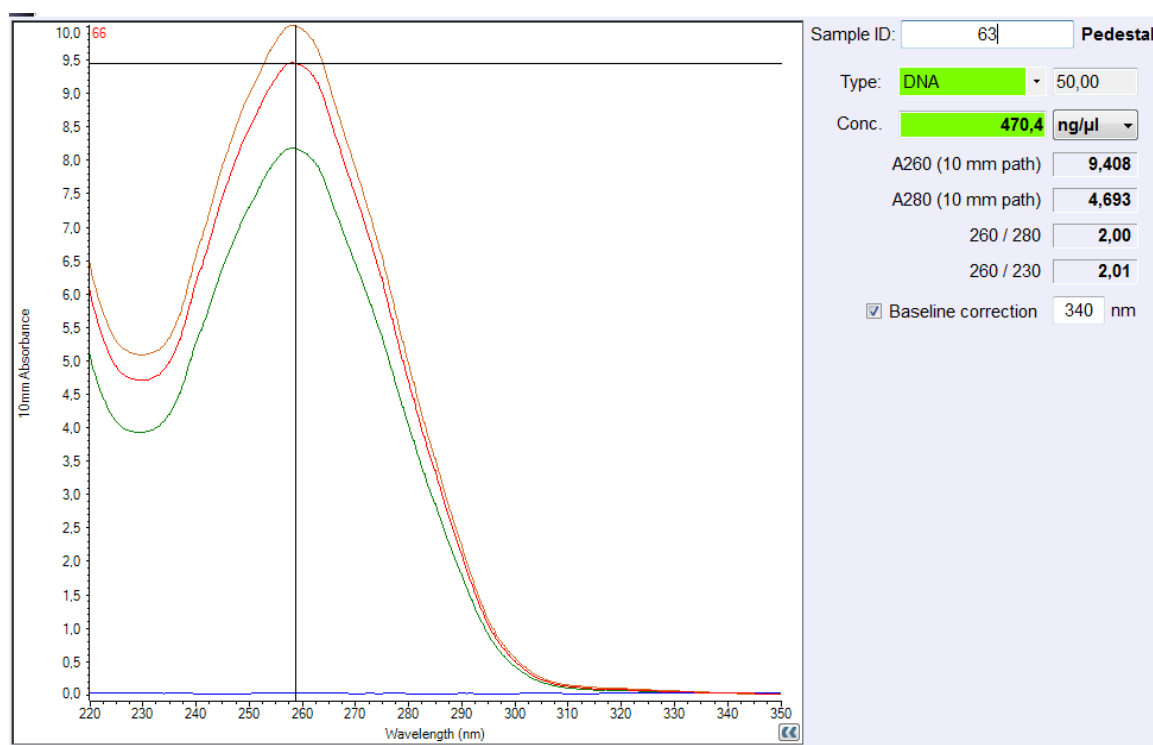
3. ábra: Fat-oMeater mérési pontok a sertés féltesten (136/2011. (XII. 22.) VM rendelet)

Kísérleteimben DNS-forrásként szőrtüszőmintákat használtam fel, melyeket a vágás előtt steril, zárható zacskókba gyűjtöttünk a vizsgálandó sertésektől. A szőrmintákat, majd a tisztított DNS-t is -20°C-on tároltuk a felhasználásig. A DNS-t Promega Wizard Genomic DNA Purification kit segítségével izoláltam a következő protokoll szerint:

- egyedenként 15-20 szőrtüszőből indultam ki, melyeket steril, 1,5 ml-es Eppendorf kémcsövekbe helyeztem
- 500 µl NLS (Nuclei Lysis Solution) hozzáadása
- 55°C-on inkubálni 1-2 órán át, időnként megrázogatni, és óránként egyszer Vortex-szel is összekeverni
- 200 µl fehérjekicsapó oldatot (PPS-Protein Precipitation Solution) adni a sejtoldathoz és összekeverni Vortex-szel 10-20 mp-ig, majd jégen hűteni
- centrifugálni 13 000-15 000 g-n 4 percig, szobahőmérsékleten. A fehérje sárgásbarnás, esetleg fehér pellet formájában jelenik meg
- a felülúszót, ami a DNS-t tartalmazza, át kell tenni egy steril, 1,5 ml-es Eppendorf centrifugacsőbe, amibe 600 µl szobahőmérsékletű izopropanolt mértem. Megjegyzés: ebben a lépésben maradhat némi felülúszó az eredeti csőben, ami tartalmazhat fehérjét. Ezt az oldatot célszerű a csőben hagyni, nehogy szennyezzük a DNS oldatot a kicsapott fehérjével
- óvatosan, felfordításokkal kell összekeverni, amíg a fehér, cérnaszerű DNS nem látszódik
- centrifugálni 1 percig 13 000-15 000 g-n, szobahőmérsékleten. Fehér pellet fog látszani
- lefölnözi a felülúszót, és a mintához adni 70%-os hűtött etanolt (egy mintatérfogatnyit, ez esetben 600 µl- t). Óvatosan meg kell forgatni a csövet párszor, hogy a DNS pellet lemosódjon a centrifugacső oldaláról. Ezután újabb centrifugálás következik 1 percig 15 000 g-n
- óvatosan leszívni az etanolt, vágott végű pipetta hegygel (A DNS pellet ilyenkor könnyen elmozdulhat az alkoholban, könnyen ki lehet szívni a pipettával.)
- ezután a csövet tiszta itatóspapírra kell fordítani, és szárítani a pelletet 10-15 percig
- 50 µl DNS RS-t (Rehydration Solution) adni a csőbe és 1 órán át 55°C-on inkubálni vízfürdőben, hogy a DNS visszaoldódjon. Időnként meg kell mozgatni az oldatot (Lehetséges a DNS-t rehidratálni egész éjszaka 4°C-on vagy szobahőmérsékleten is.)
- a tisztított DNS-t -20°C-on tároltuk a felhasználásig.

Az izolálást követően a visszaoldott DNS mennyiségét és minőségét NanoDrop 2000 spektrofotométer segítségével vizsgáltam meg (1. ábra).

A spektrofotométer 1-2 µl-nyi mintában megállapítja a koncentrációt, továbbá a 260/280 és 260/230 arányszámokból következtethetünk az izolátum tisztaságára is. A készülék 230, 260 és 280 nm-en elemzi a minták abszorbanciáját, az adatokból pedig arányszámokat képez. Megfelelő tisztaságúnak tekinthető a legalább 1,8 feletti 260/280 és 260/230 értékekkel jellemzett minta. 260 nm-en a nukleinsavak abszorbanciája a legnagyobb, ennél a hullámhossznál látjuk a NanoDrop görbe csúcsait tiszta minták esetében. 280 nm-en tehát a fehérjék abszorbanciája jelentős, míg 230 nm-en a tisztítás során használt szerves vegyületek abszorbanciája nőhet meg, ha ezek a tisztított mintában is megtalálhatók. Spektrofotométer segítségével meghatározható a DNS koncentrációja és információt nyerünk a minta esetleges szennyeződéseiről is, azonban nem kapunk megbízható képet a DNS integritásáról, ehhez célszerű agaróz gélben megvizsgálni a tisztított nukleinsavat.



4. ábra: DNS tisztítás ellenőrzése és koncentráció meghatározása NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (saját felvétel).

A tisztított DNS MC4R gént tartalmazó szakaszát PCR reakcióval sokszorozítottam fel, majd emésztési reakciónak vetettem alá.

A PCR összeállítása során Promega PCR Mastermixet használtam, ami tartalmazta a polimeráz enzimet (*Taq*), a dezoxiribonukleozid trifoszfátokat (dNTP), a magnézium-kloridot ($MgCl_2$) és a reakciópuffert. Ezenkívül a specifikus primereket és a DNS-templátot kellett a reakcióhoz adni. Az egyes reakcióösszetevők végső koncentrációját a 2. táblázatban foglaltam össze. A vizsgálatokhoz a következő MC4R primereket használtam (KIM és mtsai, 2000b):

Forward: 5'-TAC CCT GAC CAT CTT GAT TG-3'

Reverse: 5'-ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G-3'

KOMPONENS	MENNYISÉG	VÉGSŐ KONCENTRÁCIÓ
2x PCR Mastermixben: $MgCl_2$ <i>Taq</i> DNA polimeráz dNTP	12,5 μ l	1x
		1,5 mM
		0,6 u
		200 μ M
Primer (forward)	1 μ l	0,4 μ M
Primer (reverse)	1 μ l	0,4 μ M
DNS templát	1 μ l	100 ng
Nukleázmentes víz	9,5 μ l	

2. táblázat: a mintánként 25 μ l-es reakció összeállítása és az egyes komponensek végső koncentrációja.

A PCR ThermoHybaid Px2 készülékben játszódott le a 3. táblázatban bemutatott program szerint.

Bevezető denaturáció	95°C	2 perc	1 ciklus
Deanturáció	95°C	1 perc	25-30 ciklus
Annealing (primerek feltapadása)	55°C	1 perc	25-30 ciklus
Lánchosszabbítás	72°C	1 perc	25-30 ciklus
Végső lánchosszabbítás	72°C	5 perc	1 ciklus
Tárolás (opcionális)	4°C	végteleníthető	

3. táblázat: az egyes PCR lépések beállításai.

A *TaqI* restrikciós enzimmel alkalmazott emésztési reakciót a 4. táblázatban leírtak szerint állítottam össze. Az emésztési reakciókat ThermoHybaid Px2 készülékben állítottuk be és 65°C-on játszódtak le. Az emésztés során keletkezett fragmentumok: 156 és 70 bázispár (bp) GG, 226, 156 és 70 bp AG, valamint 226 bp hosszúságúak AA genotípus esetében (5. ábra).

KOMPONENS	MENNYISÉG
Nukleázmentes víz	9 µl
10X puffer	2 µl
Acetilált BSA (bovine serum albumin) 10µg/µl	0,2 µl
PCR termék	8 µl
Restrikciós enzim (10 u/µl)	0,8 µl
Teljes mennyiség	20 µl

4. táblázat: az emésztési reakció összeállítása

A felsokszorozott mintákat és az emésztés utáni fragmentumokat gélelektorforézis segítségével tettük láthatóvá.

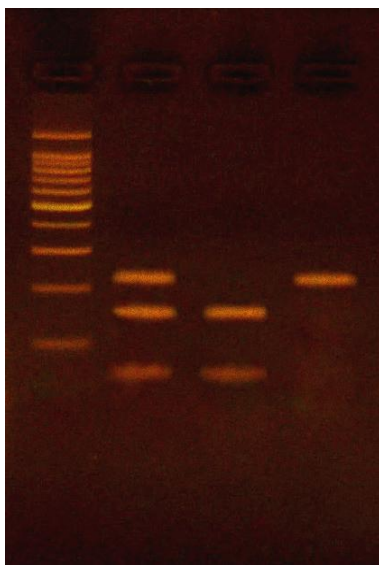
A 2%-os gél elkészítéséhez használt anyagok:

- 0,4 g Promega agaróz
- 20 ml 1x TBE puffer
- 3 μ l etídium-bromid.

A gélbe juttatott mintákat 70 V-on futtattuk legalább 30 percig, majd a gél UV fénybe helyezve dokumentáltuk az eredményeket.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A vizsgált keresztezett és fajtatiszta mangalica állományban is megtalálható volt az Asp298Asn (G746A) polimorfizmus (2. ábra). Három genotípust különítettem el a mangalica×duroc állomány 60 egyedénél (GG, AG és AA), míg a 20 fajtatiszta mangalicánál csak két genotípus (GG és AG) fordult elő.



5. ábra: agaróz gélben elkülönített genotípusok (saját felvétel). 1. sáv: 100 bázispáros DNS-létra. Viszonyítási alapul szolgál az emésztési fragmentek hosszának megállapításához. 2. sáv: AG genotípus. 3. sáv: GG genotípus. 4. sáv: AA genotípus.

Az allél- és genotípus-gyakoriságokat a 6. és 7. táblázatban foglaltam össze a két különböző csoport esetében. A kapott arányokat SPSS Statistics 16.0 szoftverrel, chi-négyzet teszt segítségével vettem össze a Hardy-Weinberg egyenlet alapján várható eloszlásokkal, majd értékeltem a köztük lévő különbségeket. A kapott és várt értékek között nem volt szignifikáns különbség ($p < 0,05$) az egyik csoportban sem, tehát Hardy-Weinberg egyensúly figyelhető meg az adott polimorfizmusra.

A fajtatiszta csoportban kapott magasabb chi-négyzet érték valószínűleg az alacsony egyedszám miatt alakult ki. Az alacsony egyedszám játszhatott szerepet abban is, hogy nem fordult elő homozigóta A egyed az elemzett mangalicák között. A Hardy-Weinberg eloszlás tesztelése és egyéb populációgenetikai vizsgálatok fontos szerepet játszhatnak a fajtafenntartást végző szervezetek esetében, hiszen felhasználhatók a fajta diverzitásának ellenőrzésére és monitorozására. Az egyensúlyi állapottól való eltérések esetén fokozott figyelmet kell fordítanunk a veszélyeztetett allélok vagy változatok megőrzésére.

A MC4R genotípusok és a vágási tulajdonságok közötti összefüggések vizsgálatára LSD (least significant difference) tesztet használtam, a csoportok közötti különbségeket pedig $p < 0,05$ szinten tekintettem szignifikánsnak. Az F_1 csoportban a genotípus és a hústermelési adatok összefüggéseit az 5. táblázatban tüntettem fel.

Vizsgált tulajdonságok átlaga ± szórás (SD)	MC4R genotípus (n)			
	GG (30)	AG (27)	AA (3)	Összes (60)
JST	11,64 ± 0,78	11,61 ± 0,89	12,10 ± 0,81	11,65 ± 0,82
BST	11,67 ± 0,74	11,60 ± 0,82	11,84 ± 0,60	11,65 ± 0,76
NSG	701,67 ± 54,1	715,19 ± 60,7	753,33 ± 32,2	710,33 ± 50,68
Színref.	34,67 ± 2,86a	36,96 ± 4,99b	42,33 ± 4,72c	36,08 ± 4,37
KV	55,09 ± 5,20	53,61 ± 6,86	50,51 ± 12,00	54,17 ± 6,26
SZ1	41,37 ± 4,8a	45,07 ± 3,8b	47,00 ± 2,6b	43,32 ± 4,6
SZ2	37,97 ± 4,8a	41,42 ± 5,6b	47,67 ± 3,8c	40,01 ± 5,6
JLT	7,21 ± 0,40	7,11 ± 0,49	7,40 ± 0,75	7,17 ± 0,46
BLT	7,16 ± 0,42	7,26 ± 0,54	7,49 ± 0,94	7,22 ± 0,49
ÉS	140,53 ± 6,93	139,96 ± 8,07	147,33 ± 4,61	140,61 ± 7,45
ÉH	239,43 ± 15,61	237,41 ± 13,13	238,33 ± 7,09	238,47 ± 14,10

5. táblázat: a MC4R genotípusok és a vágóhídon gyűjtött adatok közötti összefüggés

¹ JST: jobb sonka tömege [kg]; BST: bal sonka tömege [kg]; NSG: napi súlygyarapodás a hizlaldában [g]; Színref: karajnál mért színreflexió érték (FOM); KV: karaj vastagsága [mm]; SZ1: első helyen mért szalonnvastagság [mm]; SZ2: második helyen mért szalonnvastagság [mm]; JLT: jobb lapocka tömege [kg]; BLT: bal lapocka tömege [kg]; ÉT: élősúly [kg]; ÉH: teljes élethossz [nap]

a,b,c: Az azonos soron belül eltérő betűkkel jelölt értékek közötti különbség szignifikáns ($p < 0,05$)

Szignifikáns ($p < 0,05$) összefüggést figyeltem meg a genotípus és mindkét szalonnavastagság, továbbá a karajnál felvett szíreflexiós értékek között. Ezek az eredmények alátámasztják az A allél szerepét a zsírbeépítésre hajlamosabb fenotípus kialakításában (HOUSTON és mtsai, 2004). A homozigóta G egyedeknél figyelhető meg a legkisebb reflexiós érték, ennél a genotípusnál volt a legsötétebb a hús.

A többi vizsgált tulajdonság esetében a csoportok közötti különbség nem volt statisztikailag igazolható. Az A allél pozitív hatását figyelhetjük meg a napi súlygyarapodás, a lapocka és a sonka tömegének alakulására is. Fordított összefüggés mutatkozott azonban a karaj vastagsága és a genotípus között: a vizsgált populációban a G allél volt előnyös hatással erre a tulajdonságra.

A genotipizálást követően kiszámítottam az F_1 populáció és a 20 mangalica allél- és genotípusgyakoriságát (6. és 7. táblázat). A két csoportban mért gyakoriságok csak kis mértékben térnek el egymástól: az F_1 -ben mindössze 4,5%-kal magasabb az A allél gyakorisága. Az eltérés oka valószínűleg, hogy a duroc fajtában jellemzően gyakori az A allél: megközelítőleg 70% (PIÓRKOWSKA és mtsai, 2010).

A mangalica fajtacsoportra jellemző intenzív zsírtermelés hátterében az itt vizsgált MC4R polimorfizmuson kívül más gének és változataik vehetnek részt, hiszen a kedvezőbb húsformákat előállító duroc fajtában lényegesen nagyobb gyakorisággal fordul elő a zsírteremléssel és növekedési eréllyel párosított mutáció. Ezt a gyakoriságbeli különbséget tekintve arra következtethetünk, hogy a polimorfizmus szerepe a növekedési erély és hízekonyság fokozásán keresztül érvényesülhet elsősorban, és így közvetve lehet hatása a zsírtermelés alakulására.

Allélgyakoriság [%]	Genotípusgyakoriság*	χ^2	p
G = 73 A = 27	GG = 50 (52,5)	0,99	0,61
	AG = 45 (40)		
	AA = 5 (7,5)		

6. táblázat: MC4R allél- és genotípusgyakoriság az F₁ csoportban, valamint a Hardy-Weinberg egyensúly feltételeit vizsgáló chi-négyzet teszt eredménye (szabadságfok /df/ = 2)

* A vizsgált állomány %-ában kifejezve. Zárójelben a Hardy-Weinberg egyenlet alapján várható gyakoriságot tüntettem fel szintén %-ban

A mangalica csoportban mért 22%-os A allélgyakoriság jóval meghaladja a korábban egy romániai tenyésztésben megfigyelt 9%-ot (CIOBANU és mtsai, 2001). A két állomány közti különbség oka lehet az állatok eltérő származása, vagy akár a limitált mintaszámok is.

Allélgyakoriság [%]	Genotípusgyakoriság [%]*	χ^2	p
G = 78 A = 22	GG (11) = 55 / 60	1,69	0,37
	AG (9) = 45 / 35		
	AA (0) = 0 / 5		

7. táblázat: MC4R allél- és genotípusgyakoriság a mangalica csoportban (10 ártány és 10 szőke mangalica tenyészkán)

* A vizsgált állományban %-ában kifejezve. A kapott és a Hardy-Weinberg egyenlet alapján várható gyakoriságot szintén %-ban, elválasztójellel tüntettem fel

A polimorfizmus gyakoriságának összehasonlítása után a két csoport termelési eredményeit is elemeztem. A vizsgálatban t-tesztet használtam, amely alkalmas két csoport közti különbségek statisztikai kimutatására. Az eredményeket tekintve (9. táblázat) egyértelműen megállapítható, hogy az F₁ genotípus sokkal gazdaságosabb termelés megvalósítását teszi lehetővé. Szinte az összes vizsgált mutatót tekintve szignifikáns (p < 0,05) különbség mutatkozott.

Genotípus (n)	A vizsgált tulajdonságok átlagai ± szórás értékek (SD) ¹									
	JST	BST	NSG	Szín	SZ1	SZ2	JLT	BLT	ÉS	ÉH
F ₁ (60)	11,65 ± 0,82a	11,65 ± 0,76a	710,33 ± 56,8a	36,08 ± 4,37a	43,32 ± 4,68a	40,01 ± 5,60	7,17 ± 0,46a	7,22 ± 0,49a	140,61 ± 7,45a	238,47 ± 14,1a
Mangalica (10)	9,34 ± 1,71b	9,39 ± 1,72b	589,00 ± 57,4b	20,33± 6,69b	52,02 ± 9,73b	43,56± 7,16	6,04 ± 1,03b	6,06 ± 1,03b	128,40 ± 7,47b	260,00 ± 14,1b

9. táblázat: Az F₁ és a mangalica csoportok eredményeinek összevetése.

¹ JST: jobb sonka tömege [kg]; BST: bal sonka tömege [kg]; NSG: napi súlygyarapodás a hizlaldában [g]; Szín: karajnál mért színreflexiók értéke; KV: karaj vastagsága [mm]; SZ1: első helyen mért szalonnavastagság [mm]; SZ2: második helyen mért szalonnavastagság [mm]; JLT: jobb lapocka tömege [kg]; BLT: bal lapocka tömege [kg]; ÉS: élősúly [kg]; ÉH: élethossz [nap]

a,b: Az azonos oszlopon belül eltérő betűkkel jelölt értékek közötti különbség szignifikáns (p < 0,05)

A fajtatizsza mangalicák a mintegy 22 nappal hosszabb termelési időszakban is gyengébb élősúlyt, sonka- és lapockatömeget állítottak elő a keresztezett egyedeknél. Fokozottabb volt viszont a zsírbeépítés a mangalicában, ez megállapítható a szalonnavastagság értékeinek összevetéséből. A két csoport közti különbség a vágóhídon is szemmel látható volt (6. ábra). A mangalica egyedek szalonnájának az állaga is különbözött az F₁-ekétől: a puhább, szinte folyékony zsír kialakításában valószínűleg a magasabb telítetlen (MUFA és PUFA egyaránt) zsírsav-arány játszik szerepet.



6. ábra: Mangalica és mangalica×duroc sertések hátszalonna-vastagságának összevetése. A fajtatiszta és keresztezett egyedek között jelentős különbség figyelhető meg a szalonna vastagságán kívül állagában is (saját felvételek).

A MC4R polimorfizmus vizsgálatának eredményei sikerrel felhasználhatók lehetnek a mangalica × duroc végtermékelőállító keresztezésben mint a szalonnavastagság vagy akár a hússzín markere. A genetikai információkra alapozott célzott szelekció során kiválaszthatjuk a legkedvezőbb profilú egyedeket mind mangalica mind pedig duroc fajtából, így gazdaságosabb hizlalás érhető el.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgálataimban 60 mangalica × duroc F₁ kocahízó és 10 fajtatizta szőke mangalica ártány vágóhídi és termelési adatait dolgoztam fel (napi testtömeggyarapodás a hizlaldában, szalonnavastagság 1-2, karajátmérő, sonka és lapocka tömege, színreflexiós érték, vágás előtti élösúly).

Statisztikai módszerekkel elemeztem a melanokortin receptor 4 (MC4R) Asp298Asn genotípus és a gyűjtött adatok közötti összefüggéseket. Meghatároztam a két csoportban az allél- és genotípus-gyakoriságot. Az Asp298Asn gyakoriságának felméréséhez további 10 fajtatizta szőke mangalica tenyészkán mintáját vontam be a vizsgálatba. A genotípus meghatározásához szükséges DNS-t szőrtüszőből izoláltam, majd PCR-RFLP (polimeráz láncreakció-restrikciós fragmenthossz polimorfizmus) módszert használtam *TaqI* restrikciós enzimmel.

Az allél- és genotípusgyakoriság felmérése után chi-négyzet tesztet használtam a Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) vizsgálatára. A vizsgált fajtatizta mangalica (n=20) és F₁ (n=60) csoport esetében sem volt szignifikáns ($p < 0,05$) eltérés a HWE-től. A keresztezett állományban kis mértékben emelkedett az A allél gyakorisága.

Az F₁ csoportban szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget állapítottam meg az egyes genotípusok között a színreflexiós értékek, valamint a szalonnavastagság 1 és 2 esetében. Az A allél pozitív hatását figyeltem meg a napi súlygyarapodás, a lapocka és a sonka tömegének alakulására is, de ezeknél az adatoknál a különbség nem volt szignifikáns. Fordított összefüggés mutatkozott a karaj vastagsága és a genotípus között: a vizsgált populációban a G allél volt előnyös hatással erre a tulajdonságra.

A fajtatizta mangalica és az F₁ csoport termelési eredményeit összevetve egyértelműen megállapítható, hogy az F₁ genotípus sokkal gazdaságosabb termelés megvalósítását teszi lehetővé. Szinte az összes vizsgált mutatót tekintve szignifikáns ($p < 0,05$) különbség mutatkozott a keresztezett és a fajtatizta egyedek között.

Az eredményeink alapján a polimorfizmus sikerrel használható a mangalica × duroc állomány szalonnavastagságának, vagy hússzínének alakításában is.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. 136/2011. (XII. 22.) VM rendelet a vágósertések vágás utáni minősítéséről és a hasított féltestek kereskedelmi osztályba sorolásáról. Magyar Közlöny, 157: 38633–38642.
2. BARB, C. R. – ROBERTSON, A. S. – BARRETT, J. B. – KRAELING, R. R. – HOUSEKNECHT, K. L. (2004) The role of melanocortin-3 and -4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig. *Journal of Endocrinology*, 181: 39–52.
3. BUTLER, A. A. – MARKS, D. L. – FAN, W. – KUHN, C. M. – BARTOLOME, M. – CONE, R. D. (2001) Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nature Neuroscience*, 4: 605–611.
4. CHHAJLANI, V. – WIKBERG, J. E. (1992) Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett*, 309: 417–420.
5. CIOBANU, D. C. – DAY, A. E. – NAGY, A. – WALES, R. – ROTHSCCHILD, M. F. – PLASTOW, G. S. (2001) Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. *Genetics, Selection, Evolution*, 33: 417–432.
6. CONE, R. D. (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrinology Reviews*, 27: 736–749.
7. CONE, R.D. – LU, D. – KOPPULA, S. – VAGE, D.I. – KLUNGLAND, H. – BOSTON, B. – CHEN, W. – ORTH, D. N. – POUTON, C. – KESTERSON, R. A. (1996) The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Progress in Hormone Research*, 51: 287–317.
8. DAVOLI, R. – BRAGLIA, S. (2008) Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 6: 313–321.
9. DE KONING, D. J. – JANSSEN, L. L. G. – RATTINK, A. P. – VAN OERS, P. A. M. – DE VRIES, B. J. – GROENEN, M. A. M. – VAN DER POEL, J. J. – DE GROOT, P. N. – BRASCAMP, E. W. – VAN ARENDONK, J. A. M (1999) Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genetics*, 152: 1679–1690.
10. DEVOL, D. L. – MCKEITH, F. K. – BECHTEL, P. J. – NOVAKOFSKI, J. – SHANKS, R. D. – CARR, T. R. (1988) Variation in composition and palatability traits and relationships

between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses. *Journal of Animal Science*, 66: 385–395.

11. DVOŘÁKOVÁ, V. – STUPKA, R. – ŠPRYSL, M. – ČÍTEK, J – OKROUHLÁ, M. – KLUZÁKOVÁ, E. – KRATOCHVÍLOVÁ, H. (2011): Effect of the missense mutation Asp298Asn in MC4R on growth and fatness traits in commercial pig crosses in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 56: 176–180.

12. FERNANDEZ, X. – MONIN, G. – TALMANT, A. – MOUROT, J. – LEBRET, B. (1999) Influence of intramuscular fat content on the quality of pig meat-1. Composition of the lipid fraction and sensory characteristics of m. longissimus lumborum. *Meat Science*, 53: 59–65.

13. FORTIN, A. – ROBERTSON, W. M. – TONG, A. K. W. (2005) The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. *Meat Science*, 69: 297–305.

14. GANTZ, I. – MIWA, H. – KONDA, Y. – SHIMOTO, Y. – TASHIRO, T. – WATSON, S. J. – DELVALLE, J. – YAMADA, T. (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 15174–15179.

15. HALMY L. (2006) Ajánlható a mangalica termékek fogyasztása a korszerű táplálkozási ajánlások alapján? A Magyar Elhízástudományi Társaság 7. Kongresszusa, Budapest.

16. HOLLÓ G. – SEREGI J. – SEENGER J. – REPA I. (2003) A mangalica sertés különböző szöveteinek zsírsavösszetétele az élőtömeg függvényében. *A hús*, 13: 145–148.

17. HOUSTON, R. D. – CAMERON, N. D. – RANCE, K. A. (2004) A melanocortin four receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected Large White pig populations. *Animal Genetics*, 35: 386–390.

18. KIM, K. S. – LARSEN, N. J. – ROTHSCILD, M. F. (2000a): Rapid communication: linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene. *Journal of Animal Science*, 78: 791–792.

19. KIM, K. S. – LARSEN, N. – SHORT, T. – PLASTOW, G. – ROTHSCILD, M. F. (2000b): A missense variant of the porcine melanocortin- 4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*, 11: 131–135.

20. KIM, K. S. – REECY, J. M. – HSU, W. H. – ANDERSON, L. L. – ROTHSCCHILD, M. F. (2004) Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 26: 75–86.
21. LUGASI A. (2006) A mangalica húsmínősége és táplálkozási jelentősége. A Magyar Elhízástudományi Társaság 7. Kongresszusa, Budapest.
22. MAGENIS, R. E. – SMITH, L. – NADEAU, J. H. – JOHNSON, K. R., MOUNTJOY, K. G. – CONE, R. D. (1994) Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mammalian Genome*, 5: 503–508.
23. MEIDTNER, K. – WERMTER, A. K. – HINNEY, A. – REMSCHMIDT, H. – HEBEBRAND, J. – FRIES, R. (2006) Association of the melanocortin 4 receptor with feed intake and daily gain in F2 Mangalitsa × Piétrain pigs. *Animal Genetics*, 37: 245–247.
24. Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal, Állattenyésztési Igazgatóság (2009) Sertés Teljesítményvizsgálati Kódex.
25. MULLIS, K. B. – FALOON, A. – FRED, A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335–350.
26. OOSTEROM, J. – GARNER, K. M. – DEN DEKKER, W. K. – NIJENHUIS, W. A. – GISPEN, W. H. – BURBACH, J. P. – BARSH, G. S. – ADAN, R. A. (2001) Common requirements for melanocortin-4 receptor selectivity of structurally unrelated melanocortin agonist and endogenous antagonist, Agouti protein. *Journal of Biological Chemistry* 276:931–936.
27. OROSZ L. (1980) Klasszikus és molekuláris genetika, Akadémia Kiadó, Budapest
28. ÓVILO, C. – FERNÁNDEZ, A. – RODRÍGUEZ, M. C. – NIETO, M. – SILIÓ L. (2006) Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Science*, 73, 42–47.
29. PIÓRKOWSKA, K. – TYRA, M. – ROGOZ, M. – ROPKA-MOLIK, K. – OCZKOWICZ, M. – ROZYCKI M. (2010): Association of the melanocortin-4 receptor (MC4R) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. *Meat Science*, 85: 297–301.

30. QI, L. – KRAFT, P. – HUNTER, D. J. – HU, F. B. (2008) The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change and diabetes risk in women. *Human Molecular Genetics*, 17: 3502–3508.
31. RADNÓCZI L. (2006) A fajtatizsza mangalica standardja. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 55: 225–231.
32. RESURRECCION, A. V. A. (2004) Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. *Meat Science*, 66: 11–20.
33. SAIKI, R. K. – GELFAND, D. H. – STOFFEL, S. – SCARF, S. J. – HIGUCHI, R. – HORN, G. T. – MULLIS, K. B. – ERLICH, H. A. (1988) Primer-directed enzymic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–491.
34. SCHIÖTH, H. B. (2001) The physiological role of melanocortin receptors. *Vitamins and Hormones*, 63: 195–232.
35. SELKIRK, J. V. – NOTTEBAUM, L. M. – LEE, J. – YANG, W. – FOSTER, A. C. – LECHNER, S. M. (2007) Identification of differential melanocortin 4 receptor agonist profiles at natively expressed receptors in rat cortical astrocytes and recombinantly expressed receptors in human embryonic kidney cells. *Neuropharmacology*, 52: 459–466.
36. SELLIER, P. (1998): Genetics of meat and carcass traits. In: ROTSCCHILD, M. F. – RUVINSKY, A.: *The Genetics of the Pig*. Wallingford, UK: CAB International, 463–510.
37. SMITH, A. I. – FUNDER, J. W. (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrinology Review*, 9: 159–179.
38. SZABÓ P. (2006) A mangalica reneszánsza. *Állattenyésztés és takarmányozás*, 55: 203–216.
39. SZAKÁLY Z. – KALMÁR S. – SARUDI CS. – SZABÓ G. G. – BERKE SZ. – SZENTE V. – SZIGETI O. (2008) Kiemelt állati eredetű hungarikumok marketing lehetőségeinek elemzése. Zárójelentés a T049548 OTKA kutatásról. Kaposvár-Budapest, 1–13.
40. SZENTE V. – POPOVICS A – TÓTH P. – SZAKÁLY Z. (2011): Miért egyedi és különleges a mangalica? *Élelmiszer, Táplálkozás és Marketing*, 8: 67–68.

41. TEMPFLI K. – TÓTH P. – SIMON Z. – SZŰCS E. – BALI PAPP Á. (2012) A sertéshús telítetlen zsírsavtartalmának növelése és hatásai a zsíryanycsere genetikai szabályozására. Magyar Állatorvosok Lapja, 134: 150–156.
42. TÓTH P. (2009): Mangalica – egy ősi fajta új utakon. V. Táplálkozásmarketing Konferencia előadások összefoglalói, Kaposvár, 31.
43. URL¹: (http://www.behav.org/gene/dna/dns_01_szerk.htm)
44. URL²: (<http://mek.oszk.hu/02100/02185/html/314.html#316>)
45. URL³: (<http://tudastar.elelmiszerklub.hu/2012/03/ksh-sertesallomany-2012-februar.html>)
46. URL⁴: (http://faculty.unlv.edu/wmojica/PCR_LAB2.htm)
47. URL⁵: (<http://www.mangalicatenyesztok.hu>) Mangalicatenyésztők Országos Egyesületének honlapja
48. VAN DEN MAAGDENBERG, K. – STINCKENS, A. – CLAEYS, E. – SEYNAEVE, M. – CLINQUART, A. – GEORGES, M. – BUYS, N. - DE SMET, S. (2007) The Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. Animal, 1: 1089–1098.
49. YA-XIONG TAO (2010) The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology:Endocrine Reviews, 31: 506–543.
50. ZENGŐ Á. (2003): A mangalica jelene és jövője. Őstermelő, 7: 102–103.
51. ZSOLNAI A. (2000) Molekuláris genetikai módszerek. In: FÉSÜS L. – KOMLÓSI I. – VARGA L. – ZSOLNAI A. (2000) Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Agroinform Kiadó, Budapest.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek Prof. Dr. Bali Papp Ágnes egyetemi tanárnak és Tempfli Károly Phd hallgatónak, akik lehetővé tették számomra, hogy a kutatócsoportjukban dolgozhassam, megismertettek a téma alapjaival és önfeláldozóan, megdönthetetlen lelkesedéssel és állandó támogatásukkal irányították a munkámat.

Szeretném kifejezni megbecsülésemet, szívből jövő szeretetemet és köszönetemet családtagjaimnak, akik szeretetükkel állandó támogatást nyújtottak egyetemi tanulmányaim során és szakdolgozatom elkészítésének teljes ideje alatt türelmet, megértést tanúsítottak irántam!