

**Debreceni Egyetem**

**Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma**

**Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar**

**Állattenyésztéstani Tanszék**

Tanszékvezető: Dr. Komlósi István, egyetemi tanár

**A SZARVASMARHA MELANOKORTIN-1 RECEPTOR GÉN  
MUTÁCIÓINAK KIMUTATÁSA PCR-SSCP MÓDSZERREL**

Simon Ádám László

molekuláris biológia MSc. II. évfolyam

Konzulensek:

Dr. Czeglédi Levente

egyetemi adjunktus

Gulyás Gabriella

predoktor

Debrecen

2013

## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| BEVEZETÉS.....                                                                           | 2  |
| 1. TÉMAFELVETÉS.....                                                                     | 4  |
| 2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS.....                                                          | 5  |
| 2.1. A szarvasmarha szőrszín kialakításában szerepet játszó gének .....                  | 5  |
| 2.1.1. A melanokortin-1-receptor szerepe.....                                            | 5  |
| 2.1.2. Az agouti szignál fehérje .....                                                   | 7  |
| 2.1.3. A pre-melanoszómális fehérje .....                                                | 7  |
| 2.2. DNS alapú módszerek szerepe a szarvasmarha termékek faj és fajtaazonosításában..... | 9  |
| 3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....                                                                 | 12 |
| 3.1. A felhasznált bioinformatikai módszerek .....                                       | 12 |
| 3.2. Az MC1R génváltozatok bázissorrendjének meghatározása DNS szekvenálással .....      | 13 |
| 3.3. A PCR és az allél-specifikus PCR.....                                               | 15 |
| 3.3.1. Az allél specifikus PCR optimalizációja .....                                     | 17 |
| 3.4. Agaróz gélelektroforézis .....                                                      | 18 |
| 3.5. Az egyszálú konformáció polimorfizmus (SSCP) .....                                  | 19 |
| 4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE .....                                                   | 23 |
| 4.1. Az SSCP optimalizációja .....                                                       | 23 |
| 4.1.1. A gél hőmérséklete és a PCR termék guanin-citozin aránya.....                     | 23 |
| 4.1.2. A glicerín hatása.....                                                            | 25 |
| 4.1.3. A PCR termék mérete.....                                                          | 26 |
| 4.1.4. A poliakrilamid gél összetétele. ....                                             | 27 |
| 4.1.5. A puffer koncentráció hatása. ....                                                | 31 |
| 4.2. Az allél-specifikus PCR és az SSCP módszer kombinálása .....                        | 32 |
| 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....                                                   | 33 |
| ÖSSZEFOGLALÁS .....                                                                      | 34 |
| SZAKIRODALOM JEGYZÉK.....                                                                | 36 |
| FÜGGELÉK.....                                                                            | 40 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....                                                                | 42 |
| NYILATKOZAT .....                                                                        | 43 |

## BEVEZETÉS

Az emberiség ősidők óta fogyasztja a szarvasmarha tejét és húsát, illetve az abból készült termékeket, melyek az emberi táplálkozásban fontos szerepet töltenek be fehérje, esszenciális aminosav- és ásványianyag-tartalmuk miatt.

Az Európai Unió kiemelt figyelmet fordít az élelmiszer-biztonságra, mivel gazdaságának nagyon fontos részét képezi az agrár-élelmiszer ágazat. Az Európai Parlament és Tanács 178/2002/EK rendelete definiálja és kötelezően előírja az élelmiszerek nyomon követhetőségét az élelmiszerlánc teljes hosszában.

Az Európai Unió által oltalom alatt álló eredet-megjelöléssel (OEM), vagy oltalom alatt álló földrajzi jelzéssel (OFJ) ellátott állati eredetű élelmiszerekben bizonyos fajták jelenléte vagy hiánya nem megengedett. Az oltalom alatt álló élelmiszerek nem tartalmazhatnak olyan összetevőt, amely alkalmas az OEM-et, illetve OFJ-t viselő termék teljes vagy részleges kiváltására. A hagyományosan az olasz reggiana fajta tejéből készülő OEM parmezán sajtok például nem készülhetnek más fajtából származó tej felhasználásával.

Hazánkban a természetes (extenzív) módon nevelt őshonos magyar háziállatok, a magyar szürkemarkarha és mangalicasertés táplálkozás-élettani szempontból kedvezőbb zsírsav-összetételű és általában jobb minőségű húst produkálnak, mint az intenzív módon tartott fajták. Továbbá ezek a húsok bírnak a legjobb funkcionális tulajdonságokkal, aminek a termékgyártásban van szerepe. A szarvasmarha fajtaazonosítás, és ez által a fogyasztóvédelem szempontjából a hungarikumnak számító magyar szürke húsából készült termékek eredetazonosítása napjaink egyik legfontosabb feladata.

A fogyasztók megtévesztését célzó gyakorlat, hogy az őshonos szarvasmarhafajták felhasználásával készült hús- vagy tejtermékek előállítási költségeit úgy csökkentik, hogy azt a silány minőségű selejt-tehén húzával vagy a tejhasznú fajták tejjével helyettesítik. A fajták azonosítására, és ezáltal a helytelen kereskedelmi gyakorlat felderítésére alkalmas molekuláris genetikai módszerek fejlesztésére folyamatosan szükség van. A genetikai nyomonkövethetőség lehetőséget nyújt egy adott élelmiszer minta vizsgálatakor a kérdéses fajta jelenlétének bizonyítására vagy kizárására.

A fajták vagy egyedek DNS alapú azonosítására két megközelítés létezik. A probablisztikus megközelítés azon a megfigyelésen alapul, hogy az egyazon populációból származó egyedek közt nagyobb valószínűséggel fordulnak elő azonos multilókusz marker genotípusok. A megfelelő marker lokuszok és statisztikai próbák kiválasztása gyakran nehézségekbe ütközik, ezért nem teszi lehetővé a variábilis AFLP és mikroszatelit markerek elemzését a rutinszerű teszteléshez. Ezzel szemben a determinisztikus megközelítés nem igényel statisztikai elemzést. A marker gének olyan allélváltozatainak azonosítását célozza, amelyek fixálódtak az egyes fajtákban. Ilyenek a szőrszint befolyásoló gének és azok mutációi következtében létrejött különböző génváltozatok (DALVIT et al., 2006). A mutáns génváltozatok kimutatására különböző módszereket írtak le, ezek között szerepelnek az egyszerű és költséghatékony PCR alapú eljárások (multiplex PCR, PCR-RAPD, PCR-RFLP, PCR-SSCP) valamint drágább műszer és vegyszerigényű technikák is (valós-idejű PCR, DNS szekvenálás).

## 1. TÉMAFELVETÉS

Mivel a szarvasmarhából készült élelmiszerek árát nagymértékben befolyásolja a fajta szerinti eredetük, ezért szükség van a helytelen kereskedelmi gyakorlat felderítésére képes eljárások kidolgozására, fejlesztésére.

Számos tudományos publikáció beszámolt már arról, hogy a szarvasmarha szőrszín kialakításában szerepet játszó MC1R génváltozatok alkalmas genetikai markernek bizonyulnak a szarvasmarha hús- és tejtermékek faj- és fajta szerinti eredetazonosítását célzó vizsgálatokban (MAUDET és TABERLET, 2002., PARK et al., 2009., ROLANDO és DISTASIO, 2006.)

Célul tűztük ki egy olyan költséghatékony és speciális műszert nem igénylő, ugyanakkor alacsony kimutatási határral rendelkező DNS alapú eljárás kidolgozását, amely lehetővé tenné az összes szarvasmarha MC1R génváltozat kimutatását biológiai mintákból. Az alkalmazni kívánt PCR-SSCP módszer két lépésben (PCR, majd poliakrilamid gélelektroforézis) képes elkülöníteni a szekvencia variációkat, szemben a jelenleg használatos PCR-RFLP módszer kilenc lépésével (két PCR, három restrikciós emésztés, négy agaróz gélelektroforézis).

A módszer felválthatná a munka és költségigényes PCR-RFLP tesztet, így a szarvasmarha hús- és tejtermékek fajta szerinti nyomon követhetősége egyszerűbbé válna. Továbbá a PCR-SSCP módszer egy kiválasztott szarvasmarha populáció MC1R genotípus gyakoriság meghatározása céljából hatékonyabb alternatívát kínálhatna.

## 2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. A szarvasmarha szőrszín kialakításában szerepet játszó gének

#### 2.1.1. A melanokortin-1-receptor szerepe

A korai házasított szarvasmarha-állományokban a szőrszín kezdetekben még nagyon változó volt. Számos fajta esetén sok más jelleggel együtt ez is intenzív szelekció alá került, majd végül a fajták védjegyévé vált. A szőrtakaró színét és mintázatát nem egyetlen, hanem több gén és génváltozat, valamint a köztük kialakuló kölcsönhatások alakítják ki. A szarvasmarhával egyetemben valamennyi emlős szőrtakarójának színéért a melanin jelenléte vagy hiánya a felelős. A melaninnak két változata, az eumelanin a feomelanin található meg az emlősökben. Az eumelanin felelős a fekete és barna, míg a feomelanin a vörösesbarna, vörös, sárgásbarna és a sárga szőrszín kialakulásáért. A melanin és a feomelanin a pigmentsejtek (melanociták) citoplazmájában található melanoszómákban termelődik. A melanoszómák exocitózissal ürülnek a növekvő szőrszáliba és a keratinocitákba. A pigmentsejt előalakok az embrionális fejlődés során vándorolnak a test megfelelő területeire, és csak azok a testtájak válnak később színezetté, ahol a pigmentsejtek előfordulnak (HEARING, 2011). A szarvasmarha 18. kromoszómáján található *extension* (E) lókuszt kódolja az alfa melanocita-stimuláló hormon receptort ( $\alpha$ -MSHR) vagy más néven a melanokortin-1-receptort (MC1R) (KLUNGLAND et al., 1995). A kódoló szekvenciáját egyetlen exon, azaz egyetlen folyamatos közvetlenül átíródó genomiális DNS alkotja. Az MC1R egy 317 aminosavból álló, hét transzmembrán domén szerkezetű, G-fehérjével kapcsolt receptor. A pigmentsejtek sejtmembránjában helyezkedik el, fő feladata a citoplazma tirozináz szintjének szabályozása (VANETTI et al., 1994). A tirozináz, a melanintermelést limitáló enzim; a magas tirozináz szint az eumelanin, míg az alacsony a feomelanin termelésnek kedvez. Miután a melanocita stimuláló hormon (MSH) az MC1R-hoz kötődik, a receptorhoz kapcsolt G-fehérje aktiválja adenilát-cikláz enzimet, aminek hatására a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintje megemelkedik a pigmentsejtek citoplazmájában. Az emelkedett cAMP szint közvetve aktiválja a tirozinázt, ami a tirozint többlépcsős reakció során eumelaninná alakítja. Az eumelanin és feomelanin közös közttermékből (L-3,4-dihidroxifenilalanin) szintetizálódik, de a feomelanin termelés nem igényel további enzimatis reakciókat (HEARING, 2011).

Az MC1R génnek kezdetben három változatát írták le a norvég és izlandi fajtákban (KLUNGLAND et al., 1995). Az  $E^+$  allél nem hordoz mutációt és a fekete-vörös vad típusú színekombinációk kialakításában játszik szerepet. Az  $E^D$  allél a fekete szőrszín kialakításáért felelős: a génváltozat kódoló szekvenciájában bekövetkező pontmutáció (296. T/C csere) eredményeképpen a fehérje 99. aminosava leucinról prolinra cserélődik. A mutáció olyan szerkezeti változást okoz a kialakuló fehérjében, aminek eredményeképpen a receptor MSH jelenléte nélkül is állandóan aktív, a magas tirozináz szint az eumalin termelést fokozza. A „e” allél guanin deléciót hordoz a 310. pozícióban. A deléció korai stop kodont eredményez, a mutáció miatt megváltozott szerkezetű, funkcióképtelen receptor nem képes aktiválni a tirozinázt, ami a feomelanin termelődésének fog kedvezni. A e/e genotípusú egyedek ezért vörös kültakaróval rendelkeznek. Az allélváltozatok dominancia sorrendje:  $E^D > E^+ > e$ . További változatait is leírták az E lókusznak, ám ezek nem befolyásolják a szőrszínt (GRAPHODATSKAYA et al., 2002).

Későbbi kutatások szerint az  $E^+$  allél további három változatra bontható. Holstein-fríz, vörös holstein, szimentáli és brown-swiss fajták MC1R génjének szekvenálása alapján fedezték fel az  $E^1$  allélt, ami a kódoló szekvencia 667. pozíciójában C/T cserét hordoz, a fehérje aminosav szekvenciájának 223. pozíciójában lévő arginin triptofánra cserélődik. A mutáció a harmadik intracelluláris hurkot érinti (ROUZAUD et al., 2000). Az  $E^2$  allél 12 bázispár duplikációt tartalmaz a 650. nukleotidtól kezdődően, amely alanin, arginin, glicin, izoleucin beékelődését eredményezi szintén a fehérje harmadik intracelluláris hurkában, de a szőrszínt tekintve nem okoz fenotípusos változást. A brown-swiss fajtában feltételeztek egy harmadik  $E^3$  jelölésű allélt, ami nem hordoz mutációt a 667. pozícióban és nem tartalmazza a 12 bázispár duplikációt (GRAPHODATSKAYA et al., 2000). A farmakológiai vizsgálatok során az  $E^1$  valamint az  $E^2$  receptor dózis-függő módon reagált a MSH stimulálására, míg az  $E^D$  és az „e” receptor változat válaszképtelennek bizonyult (GRAPHODATSKAYA et al., 2002). A szarvasmarha MC1R génváltozatok kialakításában szerepet játszó mutációkat és a szőrszín fenotípusára gyakorolt hatásukat az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: Az MC1R génváltozatok kialakításában szerepet játszó mutációk

| Allél          | A mutáció pozíciója | A mutáció típusa | Pigmenttermelés         | A szőrtakaráó fenotípusa |
|----------------|---------------------|------------------|-------------------------|--------------------------|
| E <sup>D</sup> | 296.                | T/C tranzíció    | csak eumelanin          | fekete                   |
| e              | 310.                | G deléció        | csak feomelanin         | vörös                    |
| E <sup>1</sup> | 667.                | C/T tranzíció    | eumelanin és feomelanin | vad-típus                |
| E <sup>2</sup> | 650.                | TGCCCCGGGGCAT*   |                         |                          |
| E <sup>3</sup> | nem hordoz          | nincs változás   |                         |                          |

\*12 bázispár duplikációja

### 2.1.2. Az agouti szignál fehérje

Az agouti szignál fehérje (ASIP) az MSH-al ellentétes hatást fejt ki, mivel az MC1R-hoz kötődve meggátolja annak kapcsolódását. A fehérjét kódoló génnek eddig egy funkciót befolyásoló mutációját írták le. Egy olyan retrotranszpozábilis elem beépülését fedezték fel az ASIP gén 5' nemkódoló régiójában, ami a normand fajta sávozott kültakaró mintázatával hozható összefüggésbe (GIRARDOT et al., 2006). Feltételezésük szerint az MC1R E<sup>+</sup> allélváltozatát, és a mutáns ASIP gént együtt kell hordoznia az egyednek a jellegzetes csíkos fenotípus kialakulásához, mivel ASIP csak a működőképes MC1R receptorral tud antagonizálni. A vizsgálatban szereplő montbéliarde egyedek is hordozták az ASIP mutációt, de mivel MC1R genotípusok minden esetben e/e ezért esetükben nem alakul ki a normand fajtára jellemző sáv mintázat.

### 2.1.3. A pre-melanoszómális fehérje

A melanin a jellegzetes rostos szerkezetű második fázisú melanoszómákban termelődik és tárolódik. Az első fázisú vagy más néven pre-melanoszómák érését a szállító és feldolgozó funkciójú pre-melanoszómális fehérje (PMEL) végzi. A PMEL szignál peptid régiójában bekövetkező leucin deléció hatására funkcióképtelen fehérje jön létre. A deléció fehérje változatai számos fajban (házi egér, házi tyúk, ló) a kültakaró színének hígulását okozzák. Hat jól elkülöníthető színváltozat figyelhető meg a skót felföldi marhában (SCHMUTZ és DREGER, 2013). A mindkét kópiában funkcióképes PMEL génnel rendelkező skót felföldi marha fekete (E<sup>D</sup> allél jelen van) vagy vörös színű („e” allél van

jelen). A PMEL mutáció hatására kialakuló színváltozatok intermedier öröklésmentet mutatnak. A leucin delécióra nézve homo- és heterozigóta egyedek az MC1R genotípusoktól függően lehetnek szürkésbarna (+/del | E<sup>D</sup>/\_), ezüstbarna (del/del | E<sup>D</sup>/\_), sárgászörös (+/del | E<sup>+</sup>/E<sup>+</sup>; E<sup>+</sup>/e; vagy e/e) vagy krémszínűek (del/del | E<sup>+</sup>/E<sup>+</sup>; E<sup>+</sup>/e; vagy e/e).

## 2.2. DNS alapú módszerek szerepe a szarvasmarha termékek faj és fajtaazonosításában

A molekuláris biológia egyik nagy kihívása, hogy pontos és megbízható módszereket fejlesszen a DNS szekvencia variációk gyors kimutatásához. Az elmúlt évtizedekben különböző eljárások jöttek létre a taxonómiai csoportok, fajok és fajták biológiai mintákból történő azonosítása érdekében. Fő jellemzőinek köszönhetően vált a DNS, a molekuláris faj és fajtaazonosítás fontos eszközévé. Mivel rendkívül stabil és hosszú felezési idővel rendelkező molekula, olyan biológiai mintákból is visszanyerhető, amit intenzív hőmérséklet és mechanikai stresszhatás ért (mint például a feldolgozott élelmiszerek), mindeközben eredeti információ tartalma nem változik meg (szemben a fehérjékkel). Továbbá minden olyan biológiai szövetben és folyadékban előfordul, amiben sejtmaggal (vagy mitokondriummal, kloroplasztisszal) rendelkező sejtek találhatóak (DALVIT et al., 2006.)

A hagyományos polimeráz láncreakció (PCR) módszer módosított változata a multiplex PCR, aminek segítségével egyszerre sokszorosíthatunk fel két vagy több DNS szakaszt, termékenként két különböző primerpárt alkalmazva. MAFRA et al. (2004) olyan multiplex polimeráz láncreakción alapuló módszert fejlesztettek ki, amelynek segítségével tehéntejet detektálhatunk juhsajtból. A módszer során a mitokondriális 12S és 16S rRNS gének kerülnek felsokszorosításra a fajra jellemző, különböző termékméretekből. Az eljárást sikeresen alkalmazták a nyers, pasztörizált és porlasztva szárított tehéntej kimutatására és mennyiségi meghatározására. A multiplex PCR egyszerű és érzékeny módszernek bizonyult, akár 0,1% (v/v) tehéntej kimutatására képes különböző sajtmintákból. A sávintenzitásokon alapuló, tehéntej mennyiségi meghatározása pedig 1-50% (v/v) között lehetséges.

Az oltalom alatt álló eredet-megjelöléssel bíró francia sajtokban (pl. beaufort) az abundance, montbéliarde és tarentaise marhafajtákon kívül más fajtából származó tej jelenléte nem megengedett. Az olcsóbb holstein-fríz fajta tejével elkövetett csalás megállapítása érdekében a kutatók csak az erre a fajtára jellemző molekuláris markerek keresésébe kezdtek (MAUDET és TABERLET, 2002). Ennek során DNS szekvenálással a fentebb említett fajták néhány szörszint befolyásoló génjének (c-kit, MGH, TYRP1, MC1R) szekvenciáját állapították meg. Egyedül az MC1R gén mutatott fajra jellemző variációt a négy szarvasmarhafajta között. A holstein-fríz tejben található E<sup>D</sup> allél azonosítására fluoreszcensen jelölt allél-specifikus PCR módszerrel alapuló eljárást fejlesztettek ki. Az

automata DNS szekvenáló műszerrel a fluoreszcens jel és a termék méret alapján az allélváltozatok azonosíthatóak. A módszer a holstein-fríz tejre nézve 1% (v/v) kimutatási érzékenységgel bír, míg annak mennyiségéről nem ad információt.

Bövény-, szarvasmarha- és juhtej fajta szerinti elkülönítését lehetővé tevő PCR-RFLP-on alapuló technikát dolgozott ki ABDEL és AHMED (2006). A tejből izolált mitokondriális DNS citokróm-b és a fajra jellemző ismétléseket (species-specific repeat, SSR) hordozó régióját PCR segítségével sokszorozította fel. Az SSR régió fajra jellemző PCR termék mérete a juhtej azonosítását tette lehetővé, ezt követően az azonos termékkel rendelkező szarvasmarha és bövény citokróm-b szekvenciákat restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerrel különböztették meg egymástól. Ennek során a felszaporított termékeket restrikciós endonukleáz kezelésnek vetik alá, az így létrejött fajra jellemző, eltérő méretű DNS fragmenseket agaróz gélelektroforézissel választják el, majd azonosítják. A szarvasmarhára jellemző PCR termék nem tartalmazta a kísérlet során használt TaqI restrikciós enzim felismerő helyét, így az a bövényre jellemző fragmenstől méret alapján megkülönböztethetővé vált. A PCR-RFLP technika fő hátránya, hogy a restrikciós enzim felismerő helyében, akár fajtan belül megjelenő mutációk a fragmensek megjelenését vagy eltűnését okozhatják, ami téves eredményekhez vezethet. Előnye, hogy a vizsgálatokhoz nem szükséges kontroll mintákat használni (PEREIRA et al., 2008).

Szintén PCR-RFLP technikán alapuló módszert fejlesztett ki marhahúsminták eredetellenőrzése céljából ROLANDO és DISTASIO (2006). Először restrikciós emésztéssel meghatározták a piemonte, blonde d'aquitane, olasz-fríz és aosta red pied fajták MC1R allél gyakoriságát. Az MC1R allélváltozatok megkülönböztetése két restrikciós enzim által kialakított, allélra jellemző fragmens hosszon alapul. Az MspAI1 restrikciós enzimmel az E<sup>D</sup> allél különíthető el az E<sup>+</sup> és „e” változatoktól, míg az MspI enzim használatával az „e” allél az E<sup>+</sup> és E<sup>D</sup> alléloktól. A négy fajta genotípus gyakorisága szerint az aosta red pied fajta kivételével (aminek genotípus változatai más fajtákban is előfordulnak) módszer képes három fajtát egyértelműen megkülönböztetni egymástól. A kidolgozott módszer a húsminták analízise során 18%-uknál mutatott eltérést a címkén megjelölt fajtáktól. Az eredmények szerint az MC1R lokusz hatásos genetikai markernek bizonyult a marhahús fajta szerinti eredetazonosításában.

A véletlenszerűen felszaporított polimorf DNS módszerrel fajtára jellemző RAPD profilt hozhatunk létre. A különböző primerpárokkal tetszőlegesen kiválasztott genomiális DNS szakaszokat PCR segítségével felszaporítjuk, az elektroforézist követően fajtára jellemző DNS mintázat figyelhető meg. RAPD technikán alapuló vizsgálata során a kísérletbe bevont tíz szarvasmarhafajta közül két őshonos olasz fajtánál alakult ki egyedi sávmintázat. Az RAPD módszer előnye, hogy a PCR primerek tervezéséhez nem igényel előzetes információt a felszaporítani kívánt DNS szekvenciáról (CIRILLO, 2012).

PARK et al. (2009) valós-idejű (real-time) PCR használatával, MC1R génváltozatok alapján, sikeresen különböztette meg a koreai őshonos hanwoo szarvasmarhafajtát az importált holstein-fríz fajtától. A kvantitatív PCR végrehajtására alkalmas gép a PCR termék mennyiségével arányos fluoreszcens jelet valós időben detektálja (a felszorzás és a detektálás egy időben zajlik). A módszer jelentős előnye, hogy képes a vizsgált mintában jelenlévő specifikus DNS szekvencia kiindulási mennyiségét akár pikogrammnyi kimutatási határral detektálni. Hátrányai a korlátozott multiplexálhatóság, valamint a műszerek és reagensek nagyobb költségeiből adódnak. A vizsgálatban szereplő 295 húsmintából 259-ben azonosították a hanwoo fajtára jellemző MC1R allélt (a 296. pozícióban nem hordoz mutációt) míg 36 minta esetén a holstein fajtára jellemző génváltozatot ( $E^D$  allél) detektáltak.

### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. A felhasznált bioinformatikai módszerek

A szarvasmarha MC1R gén szekvenciáját (1. függelék) az amerikai National Center for Biotechnology Information (NCBI) nukleotid adatbázisából töltöttük le (I2). A DNS szekvenáláshoz és a PCR-SSCP-hez használt primereket a Primer3web alkalmazással (KORESSAAR és REMM, 2007), az allél-specifikus primereket az OligoAnalyzer 3.1 (I3) program segítségével terveztük meg (2-4. táblázat).

2. táblázat: A PCR-SSCP vizsgálathoz használt primerpárok

| megnevezés  | 5'-3' szekvencia      | termékméret (bp) | termék GC tartalma (%) |
|-------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| mc1r_shortF | TGGAGACGGCAGTCATGC    | 408*             | 62,50                  |
| mc1r_shortR | GCTGCCTCTTCTGGAGCC    |                  |                        |
| mc1r_F4     | TCTGACTTGCTGGTGAGCGTC | 448**            | 62,28                  |
| mc1r_R3     | GAATGGGGCGCTGCCTCTTC  |                  |                        |

\*,e" változat esetén 407, E<sup>2</sup> esetén 420 bp \*\*,e" változat esetén 447, E<sup>2</sup> esetén 460 bp

3. táblázat: Az AS-PCR vizsgálathoz használt reverz primerek

| megnevezés    | 5'-3' szekvencia                              | termékméret (bp) |
|---------------|-----------------------------------------------|------------------|
| mc1r_del2long | CTCGATCTGAATGACTCGTCGATATGCCTGGGTGGCCAGGACAAG | 108              |
| mc1r_int2     | CCTGGGTGGCCAGGACATC                           | 82               |

4. táblázat: A DNS szekvenáláshoz használt primerpár

| megnevezés | 5'-3' szekvencia    | termékméret (bp) |
|------------|---------------------|------------------|
| mc1r_seq2F | GAGGTGTCCATCCCTGACG | 837*             |
| mc1r_seq2R | GCACTGCAGCACCTCTTG  |                  |

\*,e" változat esetén 836, E<sup>2</sup> esetén 849 bp

### 3.2. Az MC1R génváltozatok bázissorrendjének meghatározása DNS szekvenálással

Az 5. táblázatban szereplő, előzetesen PCR-RFLP módszerrel meghatározott (Gulyás Gabriella nyomán) szarvasmarhafajta minták genotípusát DNS szekvenálással ellenőriztük. Majd ezt követően kontroll mintaként használtuk fel az MC1R gén alléljainak PCR-SSCP módszerrel történő meghatározásához.

5. táblázat: A DNS szekvenálással ellenőrzött kontroll minták

| Fajta         | Genotípus                      |
|---------------|--------------------------------|
| holstein-fríz | E <sup>D</sup> /E <sup>D</sup> |
| magyar szürke | E <sup>1</sup> /E <sup>1</sup> |
| gatacko       | E <sup>2</sup> /E <sup>2</sup> |
| busa          | E <sup>3</sup> /E <sup>3</sup> |
| red angus     | e/e                            |

A gradiens PCR-hoz és a PCR termék tisztításához használt reakcióelegy összetételét a 6. táblázatban mutatom be.

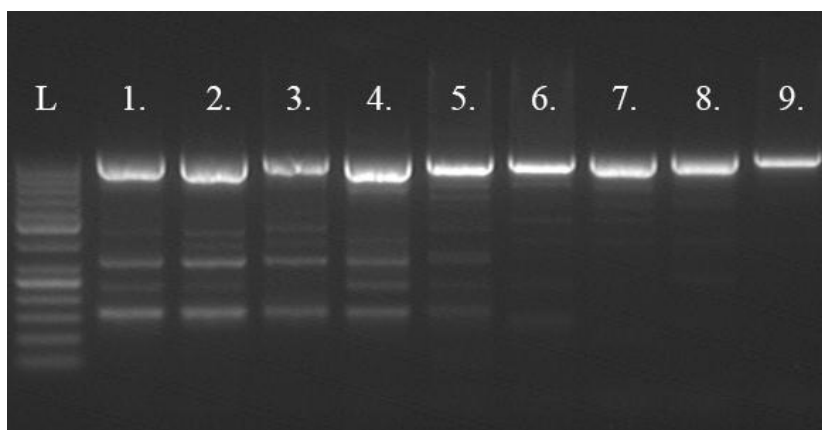
6. táblázat: A gradiens PCR-hoz és a PCR termék tisztításához használt reakcióelegy összetétele

| Összetevő                                              | Végkoncentráció |
|--------------------------------------------------------|-----------------|
| 5X Colorless GoTaq Flexi <sup>®</sup> puffer (Promega) | 1X              |
| dNTP mix (Fermentas)                                   | 200 µM          |
| MgCl <sub>2</sub> oldat (Promega)                      | 3 mM            |
| Forward primer (Sigma)                                 | 0,2 µM          |
| Reverse primer (Sigma)                                 | 0,2 µM          |
| GoTaq Flexi <sup>®</sup> DNS polimeráz (Promega)       | 0,025 U/µl      |
| DNS                                                    | 0,5 ng/µl       |

A megfelelő primer tapadás hőmérséklet kiválasztásához gradiens PCR programot alkalmaztunk, DNA Engine<sup>®</sup> Thermal Cyclor (Biorad) segítségével (7. táblázat). Az optimális primer tapadás hőmérsékletet 1. ábrán bemutatott gradiens PCR gélképét alapján, 63 °C-ban határoztuk meg.

7. táblázat: A gradiens PCR reakció körülményei

| Szakasz                | Hőmérséklet (°C) | Időtartam (perc) | Ciklusszám |
|------------------------|------------------|------------------|------------|
| Kezdeti denaturáció    | 95               | 2                | 1          |
| Denaturáció            | 95               | 0,5              | 35         |
| Primer tapadás         | 55-63            | 0,5              |            |
| Lánchosszabbítás       | 72               | 1                |            |
| Végso lánchosszabbítás | 72               | 5                | 1          |



| #  | 1. | 2.   | 3.   | 4.   | 5.   | 6.   | 7. | 8.   | 9. |
|----|----|------|------|------|------|------|----|------|----|
| °C | 55 | 55,7 | 56,3 | 57,3 | 58,5 | 59,8 | 61 | 62,4 | 63 |

L: GeneRuler™ 50 bp DNS létra (Thermo Scientific)

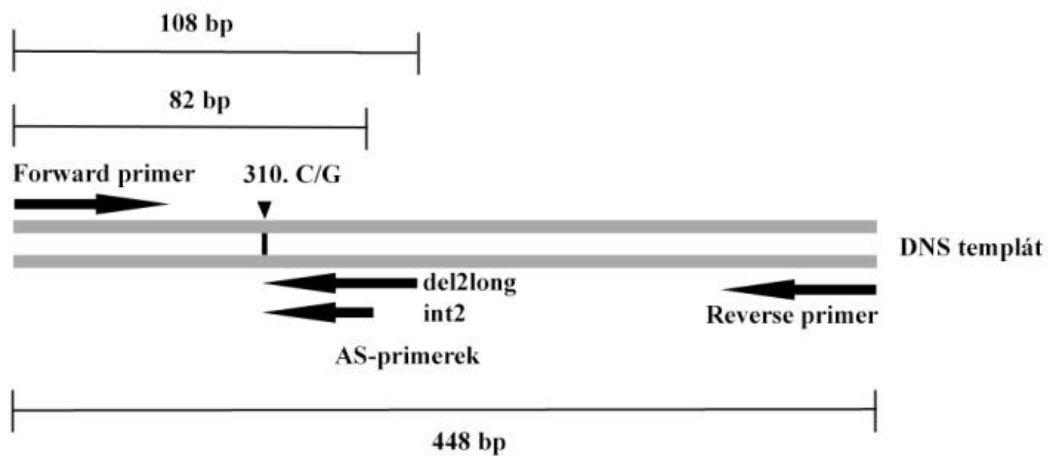
1. ábra: A szekvenáláshoz használt seq2F-seq2R primerpár gradiens PCR gélképe

A DNS szekvenáláshoz szükséges a PCR termék tisztítása, mivel a PCR reakcióelegyben maradt dNTP-ok és a primerek megzavarhatják a szekvenálási reakciót. A tisztítást a PCR Advanced PCR Clean Up™ (Viogene) kittel végeztük a gyártó utasításai szerint. A tisztított PCR termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük, a minták koncentrációját NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific) spektrofotométer segítségével határoztuk meg, azok koncentrációját egységesen 5 ng/μl-re állítottuk be. A minták szekvenálását a Eurofins MWG Operon végezte (2. függelék).

### 3.3. A PCR és az allél-specifikus PCR

A polimeráz láncreakció (PCR) felfedezése a molekuláris biológia, a kriminalisztikai tudomány és a molekuláris genetika hatalmas fellendülését tette lehetővé (Kary Bank Mullis, kémiai Nobel-díj 1993). A PCR segítségével *in vitro* szelektíven felsokszorozíthatjuk a kiválasztott duplaszálú DNS molekulát. A már megfelelő mennyiségben jelen lévő DNS terméket ezután további vizsgálatoknak vethetjük alá. A PCR során két oligonukleotid primert használunk, amikkel kijelölhető a másolni kívánt DNS szegmens. A PCR reakció három különböző szakaszra osztható fel, mind más hőmérsékletet igényel. *Egyszálúsítás (denaturáció)*: a magas hőmérséklet hatására (95 °C) a DNS molekula két szála elválk egymástól. *Primer tapadás (hibridizáció)*: az egyszálúsítás során szétválasztott két szál hőmérsékletét csökkentjük. A primerek a DNS-hez tapadnak és ez által kijelölik az új DNS szál szintézisének kezdőpontjait. A primerek tapadás hőmérséklete a primerek hosszától és szekvenciájuktól is függ. *Lánchosszabbítás (polimerizáció)*: a DNS polimeráz kötődik a minta szálhoz tapadt primerek 3'-OH csoportjához és dezoxiribonukleotid-trifoszfátok (dNTP) beépítésével megkezd az új DNS szál szintézisét 5'→3' irányban, mintaként használva a DNS komplementer szálát. A *Thermus aquaticus* baktériumból izolált hőstabil Taq polimeráz lánchosszabbításhoz szükséges optimális hőmérséklete 72 °C. A ciklikus denaturáció-hibridizáció-polimerizáció 20-40-szer ismétlődik, a harmadik ciklustól kezdve a PCR termék mennyisége exponenciálisan növekszik. Az így felsokszorozott termék agaróz vagy poliakrilamid gélen választható el, DNS festék és UV-fény segítségével detektálható. (FÉSÜS et al., 2000).

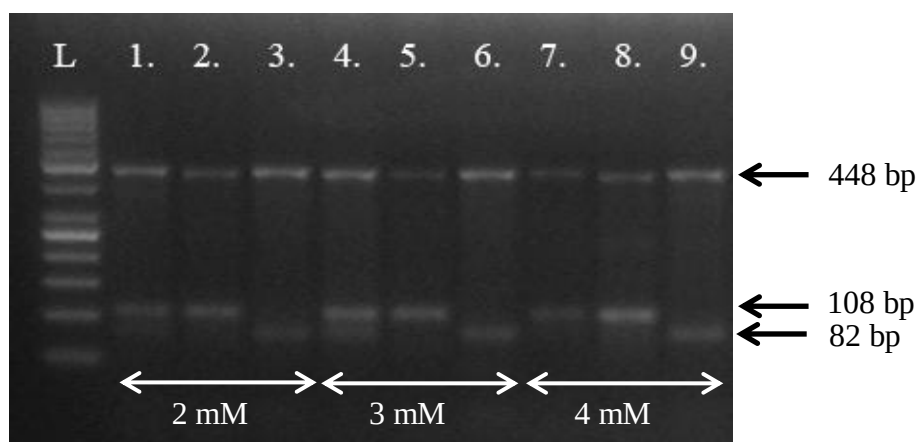
Az allél-specifikus PCR (AS-PCR) eljáráshoz a del2long reverz primert úgy terveztük meg, hogy annak 3' vége a keresett pontmutációval legyen komplementer. Előfordulhat azonban, hogy egyetlen bázis cseréje nem különbözteti meg megbízhatóan a két allélváltozatot (előfordulhat, hogy a Taq polimeráz megkezdí a lánchosszabbítást a primer 3' végén található nem komplementer bázis ellenére is). Ezért egy második nem komplementer bázist vezettük be az allél-specifikus primerek 3' végeire, amivel kizárható a nem specifikus felszaporítás lehetősége (FÉSÜS et al., 2000). Ha a vizsgálni kívánt mintában jelen van a 310. pozícióban delécióval tartalmazó géneváltozat („e” allél), akkor a felszaporított termék mérete 108 bázispár (a del2long 5' végén 26 nem komplementer bázis található, az így kialakult méretkülönbség már detektálható agaróz gélelektroforézissel is). Ha nincs jelen, egyetlen 82 bázispár méretű terméket kapunk. Ha a „e” allél mellett más géneváltozat ( $E^+$ ,  $E^D$ ) is jelen van, akkor a felszaporított termékek mérete 82 és 108 bázispár lesz (2. ábra). A közös forward (F4) és a reverz primer (R3) által kijelölt termék mérete 448 bázispár, ez a termék lehetővé teszi a géneváltozatok további elkülönítését SSCP technikával.



2. ábra: Az „e” allél kimutatására szolgáló allél-specifikus PCR elve

### 3.3.1. Az allél specifikus PCR optimalizációja

Teszteltük, hogy a négy primer együttes alkalmazásakor mi a primerek mennyiségének ideális egymáshoz viszonyított aránya, mivel olyan reakciót végeztünk, aminek során mind a három PCR terméket azonos anyagmennyiségben kell felszorzosítanunk. Ezt követően meghatároztuk az AS-PCR-hoz szükséges optimális  $MgCl_2$  koncentrációt. A DNS polimeráz kofaktora a magnézium, az optimálisnál alacsonyabb koncentrációban alkalmazva a reakció hatásfoka gyengül, az optimálisnál magasabb koncentrációban csökkentheti a reakció specificitását (3. ábra).



3. ábra: A magnézium-klorid hatása az allél-specifikus primerek specificitására

1. 4. 7. minta: mind az öt génváltozatot tartalmazta; 2. 5. 8. minta: csak az „e” génváltozat tartalmazta; 3. 6. 9. minta: az „e” kivételével az összes génváltozatot tartalmazta L: GeneRuler™ 50 bp DNS létra (Thermo Scientific)

Az 3. ábra alapján megállapítottuk, hogy az allél-specifikus primerek génváltozat megkülönböztető képessége 3 mM  $MgCl_2$  használatakor a leghatásosabb. Mind az öt génváltozat jelenlétében, a 2 és 4 mM koncentrációban alkalmazott  $MgCl_2$  az  $E^+$  és  $E^D$  változatokra specifikus termék (82 bp) gyenge jelet adott, ami biológiai minták vizsgálata esetén álnegatív eredményhez vezetne.

A 8. táblázatban mutatom be az optimalizált AS-PCR során használt reakcióelegy összetételét, a 9. táblázatban pedig az AS-PCR reakció körülményeit.

8. táblázat: Az optimalizált AS-PCR során használt reakcióelegy összetétele

| Összetevő                                          | Végkoncentráció |
|----------------------------------------------------|-----------------|
| 5X Green GoTaq Flexi <sup>®</sup> puffer (Promega) | 1X              |
| dNTP mix (Fermentas)                               | 200 µM          |
| MgCl <sub>2</sub> oldat (Promega)                  | 3 mM            |
| (F4) Forward primer (Sigma)                        | 0,3 µM          |
| (R3) Reverse primer (Sigma)                        | 0,075 µM        |
| del2long primer (Sigma)                            | 0,3 µM          |
| int2 primer (Sigma)                                | 0,6 µM          |
| GoTaq Flexi <sup>®</sup> DNS polimeráz (Promega)   | 0,025 U/µl      |
| DNS                                                | 0,5 ng/µl       |

9. táblázat: Az AS-PCR reakció körülményei

| Szakasz                | Hőmérséklet (°C) | Időtartam (perc) | Ciklusszám |
|------------------------|------------------|------------------|------------|
| Kezdeti denaturáció    | 95               | 2                | 1          |
| Denaturáció            | 95               | 0,5              | 35         |
| Primer tapadás         | 66,4             | 0,5              |            |
| Lánchosszabbítás       | 72               | 0,5              |            |
| Végső lánchosszabbítás | 72               | 5                | 1          |

### 3.4. Agaróz gélelektroforézis

A felszaporított PCR termékeket az alábbi összetételű agaróz gélben választottuk el:

3% (m/v) agaróz (SeaKem<sup>®</sup> LE agaróz, Lonza), 1X Trisz-ecetsav-EDTA puffer (AccuGENE<sup>™</sup> 50X TAE puffer, Lonza), 1X DNS festék (GelRed<sup>™</sup> 10000X, Biotium)

Az elektroforézishez Wide Mini-Sub<sup>®</sup> Cell GT (Biorad) készüléket használtuk, erre PowerPac<sup>™</sup> Basic (Biorad) tápegységgel 10 V/cm állandó feszültséget kapcsolunk. A kapott DNS mintázatokat UV fény segítségével tettük láthatóvá (UVIpro Silver), és számítógép segítségével dokumentáltuk.

### 3.5. Az egyszálú konformáció polimorfizmus (SSCP)

Az SSCP módszert először 1989-ben írták le (ORITA et al., 1989). A DNS szekvencia variációk kimutatásának egyik legnépszerűbb eszköze. Több mint 13000, a módszerrel kapcsolatos publikáció jelent meg az NCBI PubMed adatbázisában 2013 októberéig (I1).

A módszer elve a következő: a polimeráz láncreakció segítségével szelektíven felszaporított duplaszálú DNS molekulákat magas hőmérsékleten (90-97 °C között) egyszálúvá alakítjuk. A hőmérséklet csökkentésével denaturálószer (formamid) jelenlétében az egyszálú DNS molekula intramolekuláris hidrogénhidak kialakulása közben háromdimenziós szerkezetet (konformációt) vesz fel. A kialakuló szerkezet az egyszálú DNS hosszától és bázissorrendjétől egyaránt függ, mivel a DNS molekulát két, egymást kiegészítő, de szekvenciájában eltérő szál építi fel, ezért mindkét szál eltérő konformációt vesz fel. Ha a PCR termékek egy része mutációt tartalmaz, négy különböző egyszálú DNS jöhet létre a denaturáció után, amik ezt követően négy különböző konformációt vehetnek fel. A kialakult konformerek háromdimenziós szerkezete méretben és alakban is eltérhet, emiatt különböző sebességgel vándorolhatnak a poliakrilamid gélben. A módszer előnye, hogy speciális műszert és vegyszereket nem igényel valamint egyszerűen kivitelezhető. Hátránya, hogy nem ad felvilágosítást a mutáció pontos helyéről, csupán a jelenlétéről. Az utóbbi miatt a futtatás során ismert szekvenciájú kontroll mintákkal kell összehasonlítani az ismeretlen összetételű, analizálni kívánt mintát. Továbbá a megfelelő futtatási körülmények empirikus meghatározása szükséges a különböző genváltozatok kimutatása érdekében, mivel a mai napig nem létezik megfelelő elméleti modell, ami meg tudná jósolni az egyszálú DNS háromdimenziós szerkezetének kialakulását és evégett az SSCP analízis kimenetelét (MENOUNOS, 2010).

A 10. táblázatban az SSCP analízishez használt PCR reakcióelegy összetételét, a 11. táblázatban pedig az SSCP analízishez használt PCR reakció körülményeit mutatom be.

10. táblázat: Az SSCP analízishez használt PCR reakcióelegy összetétele

| Összetevő                                          | Végkoncentráció |
|----------------------------------------------------|-----------------|
| 5X Green GoTaq Flexi <sup>®</sup> puffer (Promega) | 1X              |
| dNTP mix (Fermentas)                               | 200 µM          |
| MgCl <sub>2</sub> oldat (Promega)                  | 3 mM            |
| Forward primer* (Sigma)                            | 0,2 µM          |
| Reverse primer* (Sigma)                            | 0,2 µM          |
| GoTaq Flexi <sup>®</sup> DNS polimeráz (Promega)   | 0,025 U/µl      |
| DNS                                                | 0,5 ng/µl       |

\*Az alkalmazott primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza

11. táblázat: Az SSCP analízishez használt PCR reakció körülményei

| Szakasz                | Hőmérséklet (°C) | Időtartam (perc) | Ciklusszám |
|------------------------|------------------|------------------|------------|
| Kezdeti denaturáció    | 95               | 2                | 1          |
| Denaturáció            | 95               | 0,5              | 35         |
| Primer tapadás         | 64               | 0,5              |            |
| Lánchosszabbítás       | 72               | 0,5              |            |
| Végső lánchosszabbítás | 72               | 5                | 1          |

### *Poliakrilamid gélelektroforézis*

Felhasznált vegyszerek:

- 10X TBE puffer (890 mM Trisz-bórsav, 20 mM EDTA, pH: 8.3; Sigma)
- 40% (m/v) 37,5:1 akrilamid:bisz-akrilamid arányú oldat (2,6 %C) (Sigma)
- 40% (m/v) 49:1 akrilamid:bisz-akrilamid arányú oldat (2 %C) (Sigma)
- glicerín (Sigma)
- ammónium-perszulfát (Sigma)
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin; Sigma)

40 ml végtérfogatú gél készítettünk (a különböző poliakrilamid gélek összetételét a 12. táblázat tartalmazza), majd hozzáadtunk 400 µl 10% (m/v)-os ammónium-perszulfát oldatot, valamint 20 µl TEMED-et. A két oldat végkoncentrációja minden esetben 0,1% (m/v) és 0,05% (v/v) volt.

### *A PCR termékek egyszálúsítása formamid oldattal*

A 9 µl formamid tartalmú töltőoldathoz (95% (v/v) formamid (Sigma), 5% (v/v) brómfenol kék/xilén cianol (Sigma)) 1 µl PCR terméket adtunk. Az elegyet 95 °C-on 5 percig denaturáltuk, majd azonnal jégre helyeztük. A formamid és az alacsony hőmérséklet megakadályozza a komplementer szálak összekapcsolódását.

A poliakrilamid gélelektroforézist a PROTEAN® II xi Cell (Biorad) elektroforézis készülékkel végeztük. Az elektroforézis állandó hőmérsékletét, ezáltal a kísérletek reprodukálhatóságát a folyadék keringető termosztát biztosította (VWR 1160S). A 160x200x0,75 mm formátumú poliakrilamid gélre PowerPac™ Universal (Biorad) tápegység segítségével minden esetben 20V/cm állandó feszültséget kapcsoltunk.

12. táblázat: A poliakrilamid gél összetétele és az alkalmazott elektroforetikus körülmények

| #   | %T | %C  | glicerín % (v/v) | időtartam (óra) | (°C) | TBE (X) | ábra               |
|-----|----|-----|------------------|-----------------|------|---------|--------------------|
| 1.  | 10 | 2,6 | -                | 25              | 10   | 0,5     | -                  |
| 2.  | 10 | 2,6 | -                | 17              | 10   | 0,5     | 4. (a)             |
| 3.  | 10 | 2,6 | -                | 17              | 22   | 0,5     | 4.(b); 5.(a)       |
| 4.  | 10 | 2,6 | 2,5              | 17              | 22   | 0,5     | 5. (b); 6.; 8. (a) |
| 5.  | 10 | 2,6 | 5                | 17              | 22   | 0,5     | 5. (c)             |
| 6.  | 15 | 2,6 | 2,5              | 17              | 22   | 0,5     | 8. (b)             |
| 7.  | 10 | 2   | 2,5              | 17              | 22   | 0,5     | 9. (a); 8. (c)     |
| 8.  | 15 | 2   | 2,5              | 17              | 22   | 0,5     | 8. (d)             |
| 9.  | 10 | 2   | 2,5              | 17              | 22   | 1       | 9 (b)              |
| 10. | 15 | 2   | 2,5              | 17              | 22   | 1       | -                  |

|     |              |     |     |     |      |        |
|-----|--------------|-----|-----|-----|------|--------|
| 11. | 37,5% (v/v)* | -   | 25* | 10* | 0,6* | 7. (a) |
| 12. | MDE® gél     | 2,5 | 25  | 10  | 0,6  | 7. (b) |

\*Gulyás Gabriella nyomán

Az előzetes kísérletek a futtatás során alkalmazott feszültséget 300-500 V tartományon belül vizsgálták és az optimális értéket 400 V-ban állapította meg Gulyás Gabriella. A

hagyományos poliakrilamid gél felbontását nem növelte tovább a hosszú (25 órás) futtatási idő, 17 óra elegendőnek bizonyult.

### *Ezüstfestés*

Az elektroforézist követően a DNS sávokat ezüstfestéssel tettük láthatóvá (BENBOUZA et al., 2006), mivel az interkalálódó festékek az egyszálú DNS-t nem festik. A módszer érzékenysége: 1 pg DNS/mm<sup>2</sup>. A folyamat négy lépésből áll:

1. Fixálás: 10% (v/v) abszolút etanol (VWR), 0,5% (v/v) ecetsav (Sigma)

Az 500 ml végtérfogatú fixáló oldat tartalma: 50 ml abszolút etanol, 2,5 ml ecetsav, kiegészítjük 500 ml-re desztillált vízzel. A gél 5 percig rázógépen, a fixáló oldatban tartottuk, majd desztillált vízzel mostuk.

2. Festés: 0,15% (m/v) AgNO<sub>3</sub> (Sigma), 750 µl 37% (v/v)-os formaldehid (Sigma)

Az 500 ml végtérfogatú festőoldat tartalma: 75 ml 1% (m/v)-os AgNO<sub>3</sub> oldat, 750 µl 37% (v/v) formaldehid, kiegészítettük 500 ml-re desztillált vízzel. A gél 7 percig rázógépen, a festő oldatban tartottuk, majd 500 ml desztillált vízzel 15 másodpercig mostuk.

3. Előhívás: 1,5% (v/v) NaOH (VWR), 1,2 ml 37% (v/v)-os formaldehid (Sigma)

A 600 ml végtérfogatú előhívó oldat tartalma: 60 ml 15%-os NaOH oldat, 1,2 ml 37% (v/v) formaldehid, kiegészítettük 600 ml-re desztillált vízzel. 100 ml előhívó oldatot öntöttünk a gélre, a kicsapódott ezüstöt tartalmazó oldatot leöntöttük. A gél 3-5 percig rázógépen, az előhívó oldatban tartottuk, amíg a DNS sávok kontrasztját a háttérhez képest már megfelelőnek ítéltük.

4. Leállítás: 10% (v/v) abszolút etanol (VWR), 0,5% (v/v) ecetsav (Sigma)

Az 500 ml végtérfogatú fixáló oldat tartalma: 50 ml abszolút etanol, 2,5 ml ecetsav, kiegészítettük 500 ml-re desztillált vízzel. A gél 2 percig rázógépen, a leállító oldatban tartottuk.

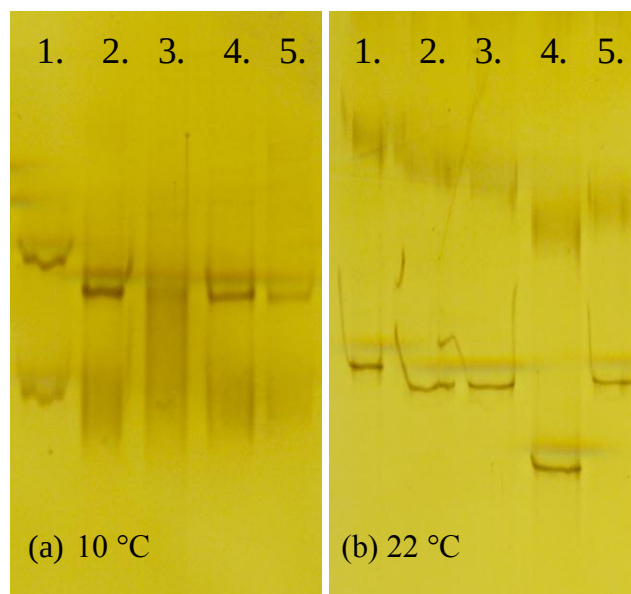
A leállítást követően a géleket lapolvasó és számítógép segítségével dokumentáltuk.

## **4. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE**

### **4.1. Az SSCP optimalizációja**

#### **4.1.1. A gél hőmérséklete és a PCR termék guanin-citozin aránya.**

Az SSCP módszer a viszonylag magas guanin-citozin (GC) arányú (50% <) termékek vizsgálatakor a legérzékenyebb (HIGHSMITH et al., 1999). Az általunk vizsgált PCR fragmensek GC tartalmát a 2. táblázat foglalja össze. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a guanin-citozin bázisok három hidrogénhíd kialakítására képesek, a több hidrogénhíd által stabilizált konformer biztosabb (és ezért valószínűleg specifikusabb) háromdimenziós szerkezetet alakít ki. A közepes GC tartalmú minták alkalmazásakor szükségessé válhat a gél hűtése (4-10 °C) az elektroforézis folyamán. A magas GC arányú termékek több stabil konformációs állapotot vehetnek fel alacsony hőmérsékleten, az így kialakuló elmosódott DNS sávok megnehezíthetik a gélkép kiértékelését. Az optimális futtatási hőmérséklet megállapítása céljából érdemes az elektroforézist alacsony hőmérsékleten (4-15°C), valamint szobahőmérsékleten (22°C) egyaránt elvégezni (BITENC és MARC, 2001., MENOUNOS, 2010).



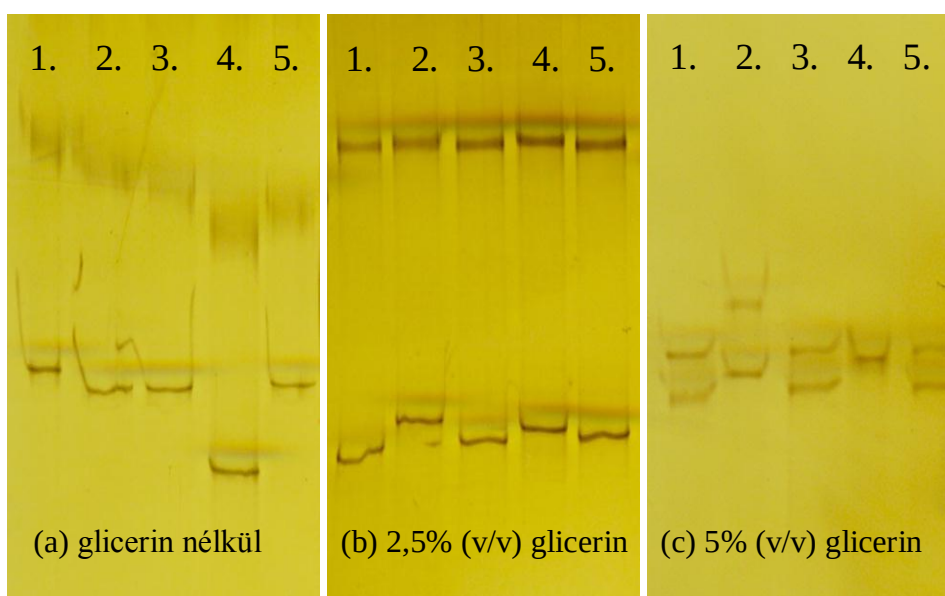
4. ábra: A gél hőmérsékletének az egyszálú konformerek stabilitására kifejtett hatása

Genotípusok: **1:**  $E^1/E^1$ ; **2:**  $E^2/E^2$ ; **3:**  $E^3/E^3$ ; **4:**  $E^D/E^D$ ; **5:**  $e/e$ . A termékek felsokszorozását az F4-R3 primerpárral végeztük. A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza.

A 4. ábrán bemutatott kísérletek eredményei alapján megállapítottuk, hogy az alacsony hőmérsékleten végzett elektroforézis a lassabb mobilitású konformerek, míg a szobahőmérsékletű a gyorsabb konformerek stabilitásának kedvez. Továbbá a szobahőmérsékleten végzett futtatás az  $E^D$  genotípusú minták mobilitásának növekedéséhez vezetett és általánosan javította a sávok élességét (az egyszálú konformerek stabilitását). A további kísérleteket 22 °C futtatási hőmérsékleten végeztük.

#### 4.1.2. A glicerín hatása

Több vizsgálat is beszámolt már arról, hogy a szekvencia variációk elválasztásának érzékenységét növeli, ha a poliakrilamid gélhez 5-10% (v/v) glicerint keverünk (BITENC és MARC, 2001). A glicerín és a bórsav ionok reakciójának következtében csökken a gél pH értéke. A több protont ( $H^+$ ) tartalmazó közeg gyengíti a DNS molekula negatív töltésű foszfát csoportjai között fellépő elektrosztatikus taszító hatást. Így a pH csökkenése az egyszálú konformerek harmadlagos szerkezetének nagyobb stabilitásához vezet, ami növeli a módszer érzékenységét (HAYASHI, 1999). A kísérleti tapasztalatok szerint a glicerín csökkentheti az elektroforetikus mozgékonyt (TESCHAUER et al., 1996).



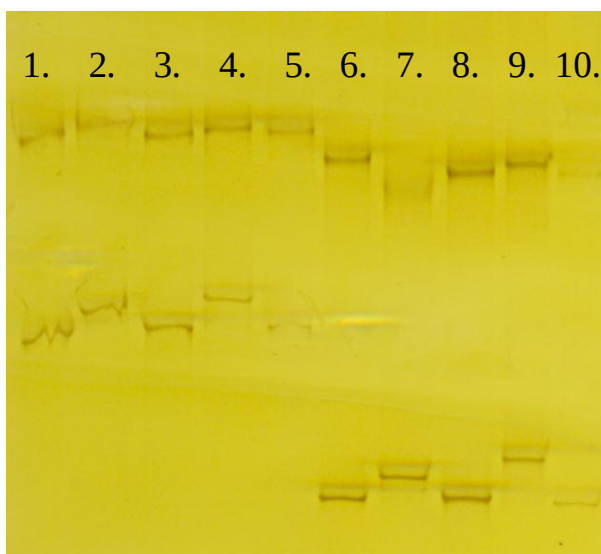
5. ábra: A glicerín koncentrációjának hatása

Genotípusok: 1:  $E^1/E^1$ ; 2:  $E^2/E^2$ ; 3:  $E^3/E^3$ ; 4:  $E^D/E^D$ ; 5:  $e/e$ . A termékek felszorzását az F4-R3 primerpárral végeztük. A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza.

A 5. ábra alapján elmondható, hogy a glicerín 2,5% (v/v) hozzáadásával, szobahőmérsékletű futtatás esetén javult a lassabb mobilitású konformerek stabilitása, éles sávokat kaptunk. Nagyobb koncentrációban 5% (v/v) alkalmazva az eltérő konformerek által létrehozott sávok egymáshoz közelebb helyezkednek el (egymáshoz viszonyított mobilitásuk lecsökkent), ami esetünkben rontja az elválasztás hatékonyságát. Optimális glicerintartalomnak a 2,5% (v/v)-ot határoztuk meg.

#### 4.1.3. A PCR termék mérete

A módszer érzékenysége jelentősen csökken a vizsgálni kívánt PCR termék méretének növelésével. A 200 bázispárnál rövidebb termékek esetén a kimutatás érzékenysége 90-100%. Közel 80%-os érzékenység érhető el a 300 és 450 bázispár (bp) mérettartományú termékek vizsgálatakor, ami a megfelelő elektroforetikus körülmények meghatározásával (optimalizáció) tovább növelhető (JORDANOVA et al., 1997). Az SSCP analízis során általunk vizsgálni kívánt PCR termékek méretét az 2. táblázat foglalja össze. A módszer érzékenysége és a termék méret között fennálló fordított arányosság miatt, a mc1r\_shortF és mc1r\_shortR primerek használatával a PCR termék méretét a lehető legrövidebbre terveztük. Restrikciós emésztés segítségével a 200 bp körüli mérettartomány elérhetővé válna, ám ez a lépés az eljárás költség- és időigényét jelentősen megnövelné.



6. ábra: A PCR termék méretének hatása az elválasztás hatékonyságára

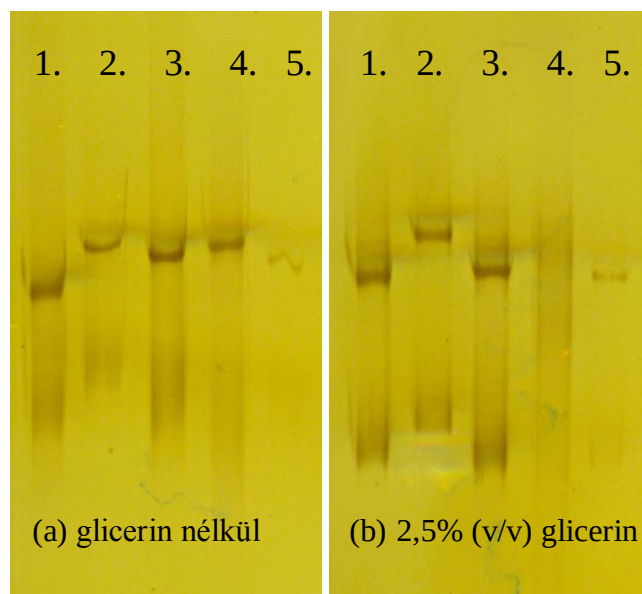
**1-5:** Az F4-R3 primerpárral végzett PCR-SSCP mintázata. Genotípusok: **1:**  $E^1/E^1$ ; **2:**  $E^2/E^2$ ; **3:**  $E^3/E^3$ ; **4:**  $E^D/E^D$ ; **5:** e/e. **6-10:** A shortF-shortR primerpárral végzett PCR-SSCP mintázata. Genotípusok: **6:**  $E^1/E^1$ ; **7:**  $E^2/E^2$ ; **8:**  $E^3/E^3$ ; **9:**  $E^D/E^D$ ; **10:** e/e A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza.

A 6. ábra alapján megállapítottuk, hogy a PCR termék mérete jelentős hatást gyakorol az egyszálú konformerek mobilitására. Valamennyi, 40 bázispárral rövidebb termék (6-10.) genotípustól függetlenül nagyobb utat tesz meg a gélben, ami növeli a felbontást. A további vizsgálatokat a shortF-shortR primerpárral végeztük. Az  $E^1$ ,  $E^3$  és az „e” genotípusú minták nem különíthetők el egymástól.

#### 4.1.4. A poliakrilamid gél összetétele.

A poliakrilamid gélmátrixot két fő tulajdonsággal jellemezhetjük. A teljes monomer százalék (%T) megadja az akrilamid monomer és az N,N'-metilénbiszakrilamid (a keresztkötő monomer) tömegének a gél teljes térfogatához viszonyított arányát. A keresztkötő százalékkal (%C) a keresztkötő tömegszázalékban kifejezett arányát adhatjuk meg a monomerek teljes tömegéhez viszonyítva. A keresztkötő mennyisége az alkalmazott akrilamid monomernek rendszerint 1-2%-a. A keresztkötő mennyiségének csökkentése általánosan növeli a szekvencia variációk kimutatásának valószínűségét, mivel az így létrehozott nagyobb pórusátmérőjű gél hatékonyabban választja el a nagyméretű egyszálú konformereket (LEUNG et al., 2008). Nem lehet előre megjósolni az egyszálú DNS mozgékonyágát a poliakrilamid gélben, azok gyorsabb vagy épp lassabb vándorlási sebességre tehetnek szert az azonos hosszúságú duplaszálú DNS-el szemben. Kiindulási pontként 10 %T összetételű gélmátrixot használtunk. 10 %T alatt a nagy formátumú gél kezelhetetlenné vált (az ezüsfestés során könnyen elszakadt).

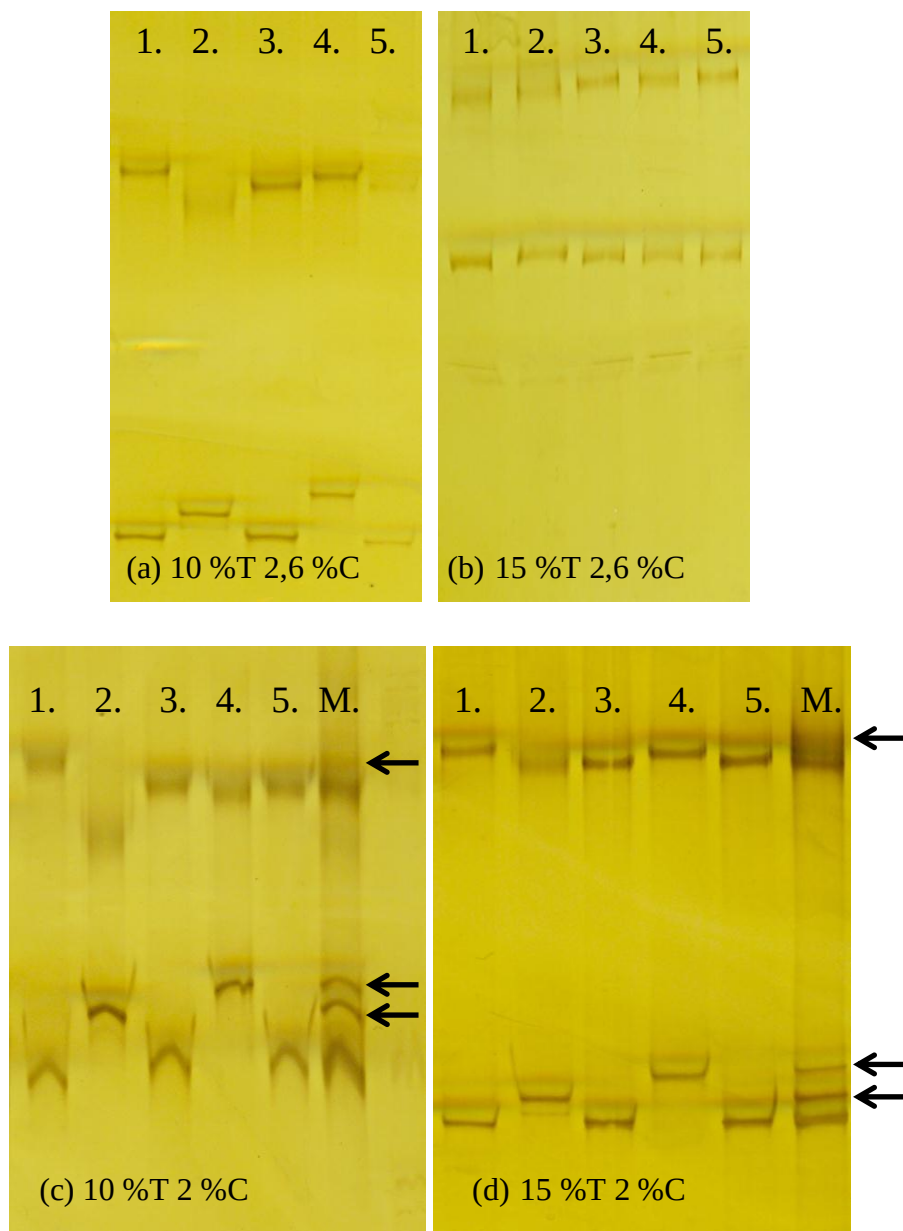
MDE<sup>®</sup> gél oldat (Lonza) egy speciális összetételű, heteroduplex és SSCP analízishez kifejlesztett poliakrilamid-szerű gélmátrix. Sok esetben felülmúlja a klasszikus poliakrilamid gélek érzékenységét (GUPTA és AGARWAL, 2003). Mivel egységenkénti ára jóval drágább, ezért az MDE<sup>®</sup> géllal nem állt módunkban kipróbálni az optimalizáció során vizsgált összes elektroforetikus körülményt.



7. ábra: MDE<sup>®</sup> gél oldat használatakor kapott sávmintázatok

Genotípusok: 1: E<sup>1</sup>/E<sup>1</sup>; 2: E<sup>2</sup>/E<sup>2</sup>; 3: E<sup>3</sup>/E<sup>3</sup>; 4: E<sup>D</sup>/E<sup>D</sup>; 5: e/e. A termékek felszorzását a shortF-shortR primerpárral végeztük. A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza.

Az MDE<sup>®</sup> gél oldat alkalmazásakor a 2,5% (v/v) glicerín alkalmazása rontotta az elválasztás hatékonyságát, mivel az E<sup>1</sup>, E<sup>3</sup> és az „e” változatok közt nem alakult ki detektálható mobilitás különbség (7. ábra). Ezzel szemben a glicerint nem tartalmazó MDE<sup>®</sup> gél használatakor, az E<sup>1</sup> változat elkülöníthető volt az E<sup>3</sup> és az „e” változatoktól, de az E<sup>3</sup> és az „e” géntípusok közt nem alakult ki mobilitás különbség. A speciális gélmátrix alkalmazása nem növelte az érzékenységet.



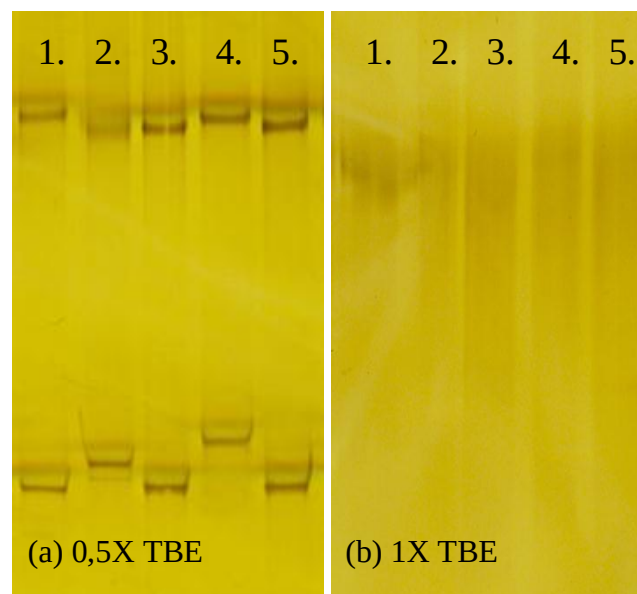
8. ábra: Az akrilamid monomer (%T) és a keresztkötő (%C) koncentrációjának hatása az elválasztás hatékonyságára.

Genotípusok: **1:**  $E^1/E^1$ ; **2:**  $E^2/E^2$ ; **3:**  $E^3/E^3$ ; **4:**  $E^D/E^D$ ; **5:**  $e/e$ ; **M:** mind az öt génváltozatot tartalmazó mix. A termékek felsokszorozását a shortF-shortR primerpárral végeztük. A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza.

Az 10% T és 2,6% C összetételű gélmátrix (a) használatakor az egyes génváltozatok lassabb mobilitású konformerei közt nem alakult detektálható mobilitás különbség (8. ábra). Az  $E^1$ ,  $E^3$ , „e” génváltozatok gyorsabb mobilitású konformerei közt csekély mobilitás különbség alakult ki, ami a heterozigóta minták megbízható kiértékelését nem tenné lehetővé. Az akrilamid monomer koncentrációjának növelésekor (b) az egyszálú termékek csak rövid utat tettek meg a gélben, a génváltozatokat nem lehet elkülöníteni egymástól. Hosszabb futtatási idő ugyan növelhetné az elválasztás hatékonyságát, azonban az időhatékonyság szempontjából rontaná a módszer alkalmazhatóságát. A szakirodalomban leírt megfigyelést igazolja, hogy a keresztkötő koncentrációjának csökkentése esetén (c), (d) nőtt a kimutatás érzékenysége, mivel az  $E^1$ ,  $E^2$  és  $E^D$  génváltozatok a mobilitás különbségekből adódó, detektálható, egyedi sávmintázatot vettek fel (nyíllal jelölt).

#### 4.1.5. A puffer koncentráció hatása.

A puffer biztosítja az állandó pH-t, az elektroforézishez szükséges vezető ionokat, valamint védi a DNS-t az enzimatis degradációtól. Az SSCP kísérletek többségében használt puffer a Trisz-Bórsav-EDTA (TBE). A leggyakrabban alkalmazott a normál 1X (89 mM Trisz-Bórsav, 2 mM EDTA) illetve a csökkentett 0,5X (44,5 mM Trisz-Bórsav, 1 mM EDTA) koncentrációk. Az ionerősség megváltoztatása, pozitív vagy negatív hatással lehet az elválasztás hatékonyságára (TESCHAUER et al., 1996; SPINARDI et al., 1991., GUPTA-AGARWAL, 2003).

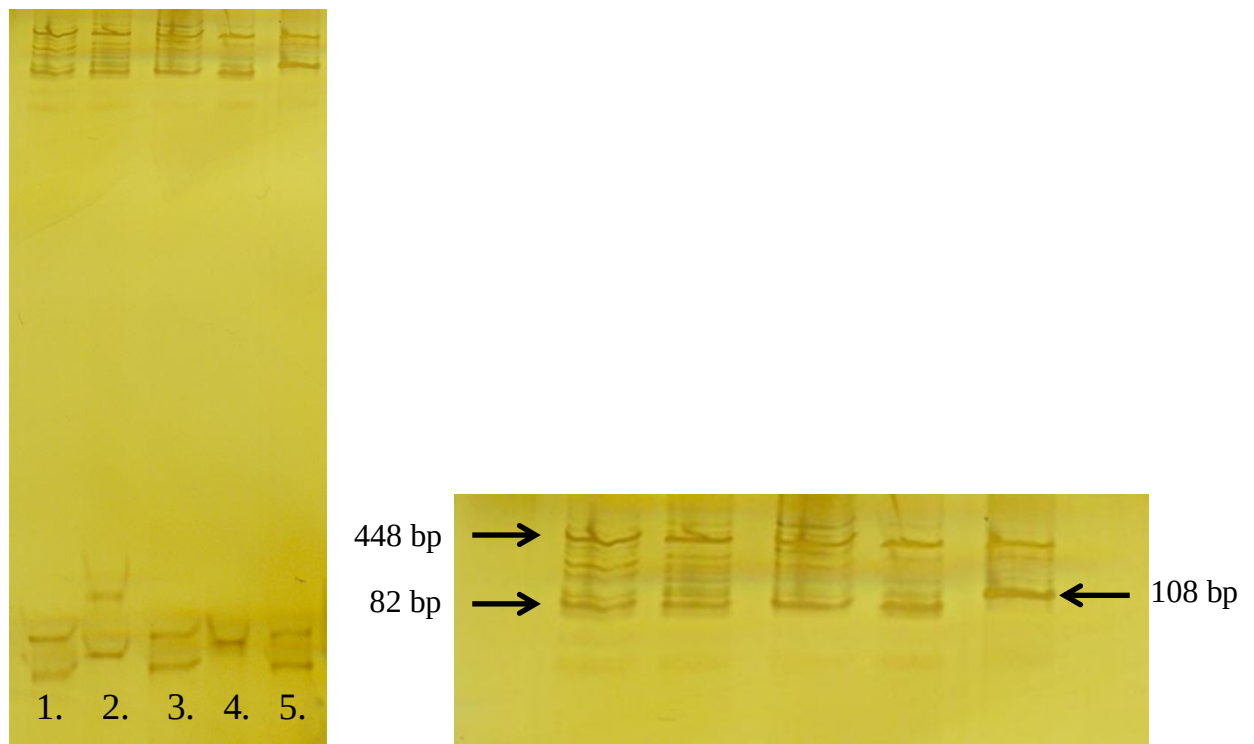


9. ábra: A puffer koncentrációjának hatása az elválasztás hatékonyságára

Genotípusok: 1:  $E^1/E^1$ ; 2:  $E^2/E^2$ ; 3:  $E^3/E^3$ ; 4:  $E^D/E^D$ ; 5:  $e/e$ . A termékek felsokszorozását a shortF-shortR primerpárral végeztük. A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza.

A normál ionerősségű TBE puffer alkalmazása életlen, elmosódott sávokat eredményezett (9. ábra). Az 1X (89 mM Trisz-Bórsav, 2 mM EDTA) TBE koncentráció az MC1R génváltozatok kimutatására alkalmatlannak bizonyult.

#### 4.2. Az allél-specifikus PCR és az SSCP módszer kombinálása



10. ábra: Az allél-specifikus PCR és az SSCP módszer kombinálása

Genotípusok: 1:  $E^1/E^1$ ; 2:  $E^2/E^2$ ; 3:  $E^3/E^3$ ; 4:  $E^D/E^D$ ; 5:  $e/e$ ; A futtatási körülményeket a 12. táblázat tartalmazza. Egy órával az SSCP futtatás befejezése előtt a mintákat ismét, ezúttal kétszálú formában (denaturáció nélkül) vittük fel a gélre.

Mivel az  $E^3$  és „e” génváltozatok nem vettek fel egyedi sávmintázatot az SSCP eljárás során, ezért az optimalizált allél-specifikus PCR-t alkalmaztuk a két génváltozat megkülönböztetése érdekében (10. ábra). Ha a vizsgált minta tartalmazza az „e” génváltozatot, akkor azt a 108 bp méretű termék jelenlétével azonosíthatjuk (5. minta). Az F4 és az R3 primerek által létrehozott termék nagy mérete csökkentette az SSCP vizsgálat érzékenységét, ami nem teszi lehetővé az  $E^1$  és  $E^3$  allélváltozatok megkülönböztetését.

## 5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A kísérletek során használt öt kontroll minta genotípusát DNS szekvenálással ellenőriztük. Két, méretben eltérő PCR terméket létrehozó primerpárt terveztünk, amik közrefogják az MC1R gén szörszint befolyásoló összes mutációt. Meghatároztuk az alkalmazott SSCP módszer optimális körülményeit, amelyek használatával az  $E^1$ ,  $E^2$ ,  $E^D$  génváltozatok megkülönböztethetők az  $E^3$  és „e” változattól:

- A PCR termék mérete: 408 bázispár
- A gél hőmérséklete: 22 °C
- A poliakrilamid gél összetétele: 10 %T és 2 %C
- Adalékanyag (glicerín) koncentrációja: 2,5% (v/v)
- A pufferkoncentráció: 0,5X
- Az alkalmazott feszültség és futtatási idő: 400 V, 17 óra

Az „e” és  $E^3$  változatok megkülönböztetése az optimalizált paraméterek mellett is sikertelennek bizonyult. Az „e” génváltozat szekvenciája egyetlen bázis deléciójában tér el a mutációt nem hordozó génváltozattól. Feltételezésünk szerint ez a különbség vagy nincs hatással a kialakuló nagyméretű termék térbeli szerkezetére, vagy ha hatással is van, az nem okoz detektálható mobilitás különbséget a poliakrilamid gélelektroforézis során.

Allél-specifikus primereket terveztünk az „e” allélváltozat kimutatása céljából, meghatároztuk az optimális  $MgCl_2$  koncentrációt és a primer arányokat. A módszer alkalmas az „e” allél megkülönböztetésére az  $E^D$  és  $E^+$  allélokkal szemben. Azonban az (F4) és a reverz (R3) primerek által létrehozott termék nagy mérete csökkentette az SSCP vizsgálat érzékenységét és nem tette lehetővé az  $E^1$  és  $E^3$  allélváltozatok megkülönböztetését. Az allél-specifikus PCR alkalmazása a shortF és shortR primerek használatakor sikertelennek bizonyult.

Javaslatunk szerint az „e” és az  $E^3$  allél multiplex PCR reakciót követő SSCP analízis során elkülöníthetővé válna. Ennek során két primerpár alkalmazásával egy-egy rövid, 170-250 bázispár méretű terméket egyszerre sokszorosítanánk fel. Az egyik primerpár által közrefogott PCR termék az  $E^D$  vagy az „e” allélra jellemző mutációt hordozná, míg a másik az  $E^2$  vagy  $E^1$  mutációkat. Ebben a mérettartományban az SSCP módszer érzékenysége közel 100%.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Az élelmiszer termékek nyomon követhetőségéről az Európai Unió szigorú jogszabályokban rendelkezik, ami előírja azok megfelelő címkézését. Azonban a szarvasmarha tej- és hústermékek címkézési rendszeren alapuló eredetvédelme a tisztességtelen kereskedelmi gyakorlattal (átcímkézés vagy helyettesítés olcsóbb előállítási költségű fazonos összetevőkkel) könnyen kijátszható. A faj és fajta specifikus marker gének és azok különböző változatainak kimutatására képes molekuláris genetikai módszerek alkalmazása lehetővé teszi a biológiai és élelmiszer minták eredetazonosítását.

Jelen dolgozat a szarvasmarha szőrszint befolyásoló melanokortin-1 receptor génváltozatok kimutatására alkalmas PCR-SSCP módszer optimalizációjával foglalkozik. A módszer alapelve, hogy a szekvenciában bekövetkezett akár egyetlen bázisnyi eltérés is megváltoztathatja az egyszerűsített DNS háromdimenziós szerkezetét a mutációt nem hordozó génváltozattal szemben. A szerkezeti eltérések szekvenciára jellemző, egyedi elektroforetikus mobilitáshoz vezetnek a poliakrilamid gélben, így az egyes génváltozatok elkülöníthetővé válnak. Mivel a mai napig nem létezik megfelelő elméleti modell, ami meg tudná jósolni az egyszerű DNS háromdimenziós szerkezetének kialakulását és evégett a különböző génváltozatok mobilitását az SSCP analízis során. A különböző szekvencia variációk optimális megkülönböztetése érdekében a kimutatás érzékenységét befolyásoló tényezők empirikus meghatározása szükséges.

A különböző szarvasmarha fajtákból izolált, a vizsgálathoz szükséges öt kontroll minta genotípusát DNS szekvenálással ellenőriztük. Az SSCP vizsgálat optimalizációjának célja, hogy az előzetesen PCR segítségével felszaporított, mutációt hordozó négy MC1R génváltozat ( $E^D$ ;  $E^1$ ;  $E^2$ ; „e”) egy-egy egyedi sávmintázatot vegyen fel az analízis során a mutációt nem hordozó génváltozattal ( $E^3$ ) szemben. Az alábbi, a módszer érzékenységét befolyásoló körülményt vizsgáltuk: a PCR termék mérete; a futtatási hőmérséklet; a gélmátrix akrilamid és bisz-akrilamid koncentrációjának hatása; adalékanyag (glicerin) alkalmazása.

Az optimális futtatási hőmérséklet megállapítása érdekében az elektroforézist 10 és 22°C állandó hőmérsékleten is elvégeztük. A szobahőmérsékleten végzett futtatás általánosan javította az egyszerű konformerek stabilitását, ami a DNS sávok élességében mutatkozott meg.

Az adalékanyag glicerín hatására javult a lassabb mobilitású konformerek stabilitása, éles sávokat kaptunk szemben a glicerint nem tartalmazó géllal. Míg a két eltérő DNS konformer egymáshoz viszonyított mobilitását nem befolyásolta lényegesen a 2,5% (v/v)-ban használt glicerín, addig az 5% (v/v)-ban alkalmazott koncentráció jelentősen csökkentette azt.

Megvizsgáltuk a PCR termék méretének a kimutatás érzékenységére gyakorolt hatását. Ennek során két, méretben eltérő (408 és 448 bp) PCR terméket használtunk. A 40 bp-al rövidebb termékek genotípustól függetlenül nagyobb utat tettek meg a gélben, valamint a két DNS konformáció közt nagyobb mobilitás különbség alakult ki, ami növelte a felbontást. A termékméret csökkentése nem alakított ki egyedi sávmintázatot az E<sup>1</sup>; E<sup>3</sup> és „e” változatok esetében.

A poliakrilamid gél összetételének módosításakor azt tapasztaltuk, hogy a keresztkötő N,N'-metilénbiszakrilamid mennyiségének csökkentése javította az elválasztás hatékonyságát az által, hogy elősegítette a különböző génváltozatok mobilitás különbségéből adódó egyedi sávmintázat kialakítását.

Megvizsgáltuk, hogy a puffer koncentráció milyen hatást gyakorol az elválasztás hatékonyságra és megállapítottuk, hogy a normál ionerősségű TBE puffer alkalmazása életlen, elmosódott sávokat eredményez, az MC1R génváltozatok kimutatására alkalmatlannak bizonyult.

Az optimalizált paraméterek alkalmazása ellenére az E<sup>3</sup> és „e” génváltozatok elkülönítése eredménytelennek bizonyult. Amennyiben a javaslatunkban leírt módon sikerül megkülönböztetni mind az öt génváltozatot, akkor az MC1R génváltozatok kimutatásán alapuló PCR-SSCP módszer egy egyszerű, és költséghatékony eljárást jelenthetne a szarvasmarha termékek fajta szerinti eredetazonosításában.

## SZAKIRODALOM JEGYZÉK

ABDEL-RAHMAN, S. M. - AHMED, M. M. M. (2007) Rapid and sensitive identification of buffalo's, cattle's and sheep's milk using species-specific PCR and PCR-RFLP techniques. Food Control. 18, 1246-1249 p.

BITENC, D. - MARC, J. (2001) Optimization of single-stranded conformation polymorphism (SSCP) analysis for screening for the estrogen receptor-alpha gene polymorphism P325P. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 39, 612-614 p.

BENBOUZA, H. - JACQUEMIN, J-M. - BAUDOIN, J-P. - MERGEAI, G. (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 10, 77-81 p.

CIRILLO, A. - DEL GAUDIO, S. - DI BERNARDO, G. - GALANO, G. - GALDERISI, U. - CIPOLLARO, M. (2012) A new SCAR marker potentially useful to distinguish Italian cattle breeds. Food Chemistry. 130, 172-176 p.

DALVIT, C. - DE MARCHI, M. - CASSANDRO, M. (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. Meat Science. 77, 437-449 p.

FÉSÜS, L. - KOMLÓSI, I. - VARGA, L. - ZSOLNAI, A. (2000) Molekuláris genetikai módszerek alkalmazása az állattenyésztésben. Bp. Agroinform Kiadó és Nyomda Kft., 190 p.

GIRARDOT, M. - GUIBERT, S. - LAFORET, M. - GALLARD, Y. - LARROQUE, H. - OULMOUDEN, A. (2006) The insertion of a full-length *Bos taurus* LINE element is responsible for a transcriptional deregulation of the Normande Agouti gene. Pigment Cell Research. 19, 346-355 p.

GRAPHODATSKAYA, D. - JOERG, H. - STRANZINGER, G. (2000) Polymorphism in the MSHR gene of different cattle breeds. Veterinarni medicina. 45, 290-295 p.

GRAPHODATSKAYA, D. - JOERG, H. - STRANZINGER, G. (2002) Molecular and pharmacological characterisation of the MSH-R alleles in Swiss cattle breeds. *Journal of receptor and signal transduction research*. 22, 421-430 p.

GULYÁS, G. (2009) Az MC1R gén polimorfizmusának jelentősége a szarvasmarhafajták meghatározásában. Diplomadolgozat, Debreceni Egyetem.

GUPTA, A. - AGARWAL, S. (2003) Efficiency and cost effectiveness: PAGE-SSCP versus MDE and Phast gels for the identification of unknown beta thalassaemia mutations. *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology*. 56, 237-239 p.

HAYASHI, K. (1999) Recent enhancements in SSCP. *Genetic Analysis-Biomolecular Engineering*. 14, 193-196 p.

HEARING, V. J. (2011) Determination of melanin synthetic pathways. *The Journal of investigative dermatology*. 131, E8-E11 p.

HIGHSMITH, W. - NATARAJ, A. - JIN, Q. - O'CONNOR, J. - EL-NABI, S. - KUSUKAWA, N. - GARNER, M. (1999) Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: Evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis*. 20, 1195-1203 p.

JORDANOVA, A. - KALAYDJIEVA, L. - SAVOV, A. - CLAUSTRES, M. - SCHWARZ, M. - ESTIVILL, X. - ANGELICHEVA, D. - HAWORTH, A. - CASALS, T. - KREMENSKY, I. (1997) SSCP analysis: A blind sensitivity trial. *Human mutation*. 10, 65-70 p.

KLUNGLAND, H. - VAGE, D. - GOMEZRAYA, L. - ADALSTEINSSON, S. - LIEN, S. (1995) The Role of Melanocyte-Stimulating Hormone (MSH) Receptor in Bovine Coat Color Determination. *Mammalian Genome*. 6, 636-639 p.

KORESSAAR, T. - REMM, M. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*. 23, 1289-1291 p.

LEUNG, K. H. – YIP, S. P. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis In: WALKER, J. M. (2008) *Molecular Biomethods Handbook*, Second Edition. USA. Springer, 117-131 p.

- MAFRA, I. - FERREIRA, I. - FARIA, M. - OLIVEIRA, B. (2004) A novel approach to the quantification of bovine milk in ovine cheeses using a duplex polymerase chain reaction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 4943-4947 p.
- MAUDET, C. - TABERLET, P. (2002) Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphism. *Journal of dairy science*. 85, 707-715 p.
- MENOUNOS, P. G. Mutation Detection by Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. In: PATRINOS, G. P. (2010) *Molecular Diagnostics*, Second Edition. USA. Elsevier, 45-58 p.
- ORITA, M. - SUZUKI, Y. - SEKIYA, T. - HAYASHI, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 5, 874-879 p.
- PARK, J. - SHIN, J. - LEE, D. - SONG, J. - SUH, H. - CHANG, U. - KIM, J. (2009) Identification of Hanwoo (Native Korean Cattle Breed) Beef by Real-time PCR Using the MC1R Gene in 5 Provinces of South Korea. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 29, 668-672 p.
- PEREIRA, F. - CARNEIRO, J. - AMORIM, A. (2008) Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent patents on DNA & gene sequences*. 2, 187-199 p.
- ROLANDO, A. - DI STASIO, L. (2006) MC1R gene analysis applied to breed traceability of beef. *Italian Journal of Animal Science*. 5, 87-91 p.
- ROUZAUD, F. - MARTIN, J. - GALLET, P. - DELOURME, D. - GOULEMOT-LEGER, V. - AMIGUES, Y. - MENISSIER, F. - LEVEZIEL, H. - JULIEN, R. - OULMOUDEN, A. (2000) A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R). *Genetics Selection Evolution*. 32, 511-520 p.
- SCHMUTZ, S. M. - DREGER, D. L. (2013) Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle. *Animal Genetics*. 44, 9-13 p.

SPINARDI, L. - MAZARS, R. - THEILLET, C. (1991) Protocols for an Improved Detection of Point Mutations by SSCP. Nucleic acids research. 19, 4009-4009 p.

TESCHAUER, W. - MUSSACK, T. - BRAUN, A. - WALDNER, H. - FINK, E. (1996) Conditions for single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis with broad applicability: A study on the effects of acrylamide, buffer and glycerol concentrations in SSCP analysis of exons of the p53 gene. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. 34, 125-131 p.

VANETTI, M. - SCHONROCK, C. - MEYERHOF, W. - HOLLT, V. (1994) Molecular-Cloning of a Bovine MSH Receptor which is Highly Expressed in the Testis. FEBS letters. 348, 268-272 p.

#### **Internetes hivatkozások:**

I1: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

I2: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_174108.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_174108.2)

I3: <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/default.aspx>

I1 Letöltés dátuma: 2013.02.10.

I2 Letöltés dátuma: 2013.09.08.

I3 Letöltés dátuma: 2013.02.10.

## FÜGGELÉK

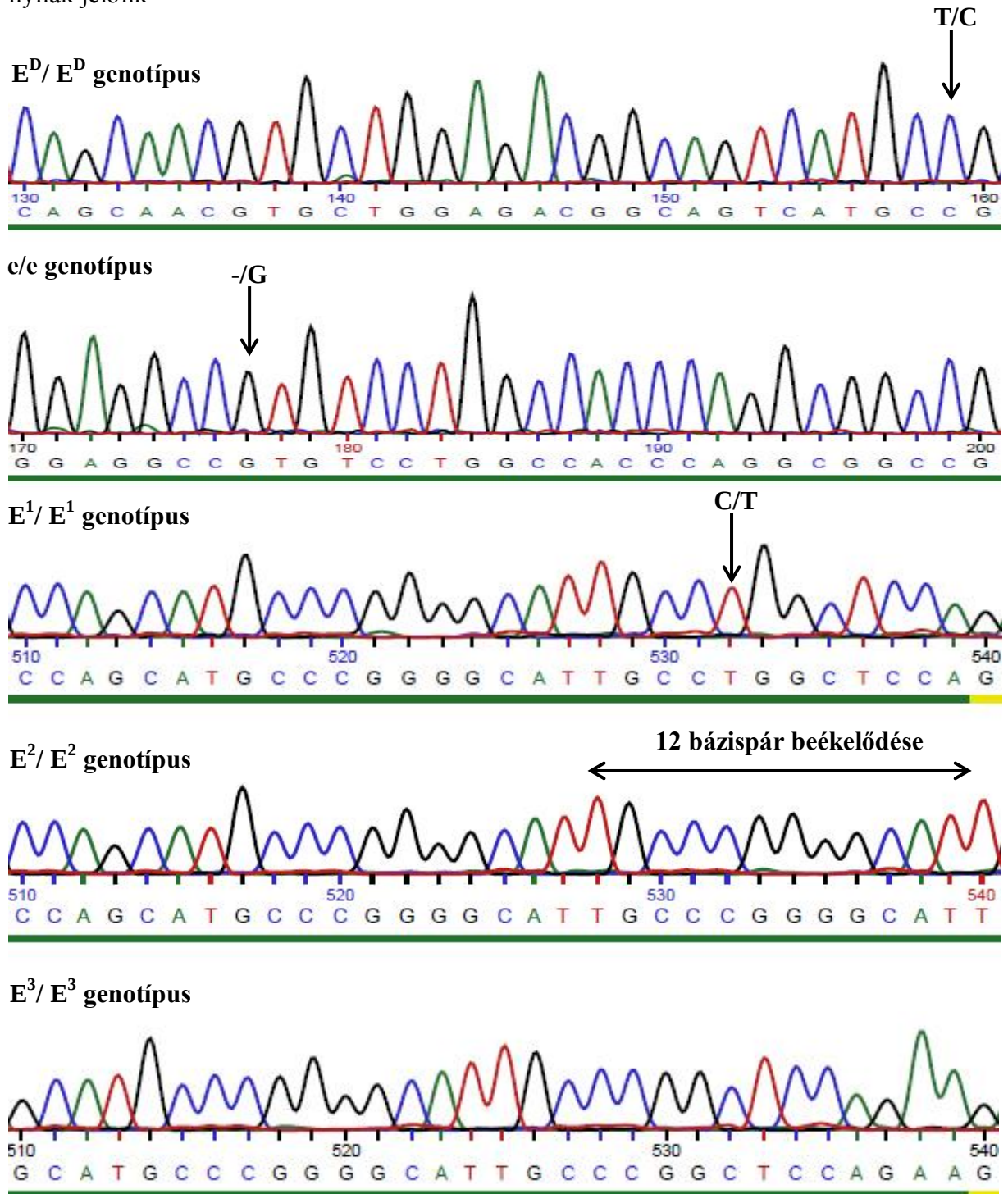
### 1. függelék:

A szarvasmarha (*Bos taurus*) MC1R gén referencia szekvenciája (E<sup>D</sup> genotípus). NCBI azonosító: NM\_174108.2. Kódoló DNS szekvencia: 284-1237. A kódoló régióban bekövetkezett mutációkat (296. T/C tranzíció; 310. G deléció; 650. 12 bp duplikáció és 667. C/T tranzíció) pirossal jelöltük.

```
1 ctaccgcggc ccggttaaggc aggaggtccc cacaggacag gaggaggcaa gcggcccaga
61 aatgtctgcc tgtgggcaac cgcacatcca gggaagaggt ggggaggcgg actgagaaca
121 gaagagcgaa gccgcgcca gagggctggc ccataagct tggggccatg cctgggccga
181 ctttgtcca gccagggagg ggaggtgtga ggcccctccc aggggagcca tgagttgagc
241 aggaccctga gagcaagcac cccttcctgc tccctgcggg acgatgcctg cacttggtc
301 ccagaggcgg ctgctgggtt cccttaactg cacgccccca gccaccctcc ccttcaccct
361 ggcccccaac cggacggggc ccagtgcct ggaggtgtcc atccctgacg ggctctttct
421 cagcctgggg ctggtgagtc tcgtggagaa cgtgctggta gtggctgcca ttgccaagaa
481 ccgcaacctg cactccccca tgtactactt tatctgctgc ctggctgtgt ctgacttgct
541 ggtgagcgtc agcaacgtgc tggagacggc agtcatgcg ctgctggagg cgggtgtcct
601 ggccaccag gcggccgtgg tgcagcagct ggacaatgtc atcgacgtgc tcactctcgg
661 atccatggtg tccagcctct gcttcctggg tgccattgct gtggaccgct acatctccat
721 cttctacgcc ctgcggtacc acagtgttgt gacactgccc cgagcgtgga ggatcattgc
781 ggccatctgg gtggccagca tcctcaccag cctgctcttc atcacctact acaaccacaa
841 ggtcatcctg ctgtgcctcg ttggcctctt catagctatg ctggccctga tggccgtcct
901 ctacgtccac atgctggccc gggcctgcca gcaTgccccgg ggcatTgccc ggctccagaa
961 gaggcagcgc cccattcatc agggctttgg cctcaagggc gctgccaacc tcaccatcct
1021 gctgggcgtc ttcttcctct gctggggccc cttcttcctg cacctctcgc tcactgtcct
1081 ctgccccag caccacacct gtggctgcat cttcaagaac ttcaacctct tcctggccct
1141 catcatttgc aacgccattg tggacccct catctatgcc ttccgcagcc aggagctccg
1201 gaagacgctc caagaggtgc tgcagtgtc ctggtgaggg tggcagtgcc gtcgtgtgcc
1261 ccaggcctgt gaggccaggg cagtcccttg acaaagagga tcggctagac catccctgaa
1321 ggtgagggtg cacaggcctt tggggcctga gaggggaatc tcaggactct ccaggaggct
1381 gtgcagaatg aggaggctgg ggagatggtg gggcatggcc tcccacacct agaaaggagg
1441 gccccacccc ctccatctgg ggccccactc tggggccggt gccacacccc cccccacccc
1501 aaagctgtgg gaagtcccgc tccaaggact tcatgaccag cacaggagga ggtggggccc
1561 acagtggggg gcttttctct tctaacgtc tgtggtgact gggagccggg ctgagcccgt
1621 ctgccagcag cacatgcatt cggcagacac ccagccagg cctgctctgg ggaaccagca
1681 gccaatatgc aggctccagg gccaggaagc agtgcagcag tattaataaa cgtgatgctt
1741 ggtgcaacct caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

## 2. függelék:

A PCR-SSCP kísérletek során használt kontroll minták elektroferogramjai. A mutációkat nyilak jelölik



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

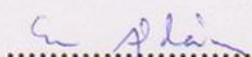
Köszönettel tartozom témavezetőimnek **Dr. Czeglédi Leventének** az Állattenyésztési Tanszék egyetemi adjunktusának valamint **Gulyás Gabriella** predoktorának, amiért megalapozták a szarvasmarha MC1R génváltozatok kimutatásán alapuló, fajtaazonosítást célzó kutatásokat. Köszönöm a kísérletek megtervezésében és az eredmények kiértékelésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket.

Továbbá köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Jávor András** intézetvezető egyetemi tanárnak, aki lehetőséget biztosított a kísérletes munkám elvégzésére az **Állatgenetikai Laboratóriumban**.

Hálával tartozom az **Állatgenetikai Laboratóriumban** dolgozó, az **Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola PhD hallgatóinak**, amiért elsajátíthattam tőlük a munkám során alkalmazott laboratóriumi módszereket.

## NYILATKOZAT

Simon Ádám László, büntetőjogi és fegyelmi felelősségem tudatában kijelentem és aláírással igazolom, hogy a diplomadolgozat saját munkám eredménye. A felhasznált irodalmat korrekt módon kezeltem, a diplomamunkára vonatkozó jogszabályokat betartottam.

  
.....

Aláírás

Születési idő: 1990.02.22.