



Projekt ECOVA

HRM analýza beta-laktoglobulínového génu kráv slovenského pinzgauského plemena

Martina Miluchová, Anna Trakovická, Radovan Kasarda,
Ondrej Kadlečík, Eva Hazuchová

Katedra genetiky a plemenárskej biológie

Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov SPU Nitra

Cieľom práce bolo zistiť genetickú diverzitu v beta-laktoglobulínovom géne a identifikovať genetickú štruktúru kráv slovenského pinzgauského plemena

Materiál

- Slovenské pinzgauské plemeno má 176 ročnú históriu chovu na Slovensku a v súčasnosti patrí medzi ohrozené populácie.
- Zvieratám bola odoberaná krv z krčnej žily – vena jugularis do skúmavky s antikoagulačným roztokom ACD (0,48 % kyselina citrónová, 1,32 % citrát sodný, 1,47 % glukóza) v pomere 1 : 6 (ACD: krv). Vzorky boli až do zahájenia analýz zmrazené.

Metódy

- High Resolution Melting (HRM) s použitím HRM analyzátora ROTOR-GENE 6000 (prístroj bol zakúpený s finančných zdrojov **projektu č. 26220120015 ECOVA**).

Výhody High Resolution Melting :

- jednoduchší spôsob hľadania nových SNP
- rýchlejšie genotypovanie jedincov
- screening mutácií
- identifikácia nových mutácií
- analýzy metylácie DNA
- detekcia SNP polymorfizmov
- detekcia heterozygotov
- detekcia pomeru získaných somatických mutácií
- ekonomicky výhodnejšia v porovnaní s klasickými metódami (PCR-RFLP, PCR-SSCP)

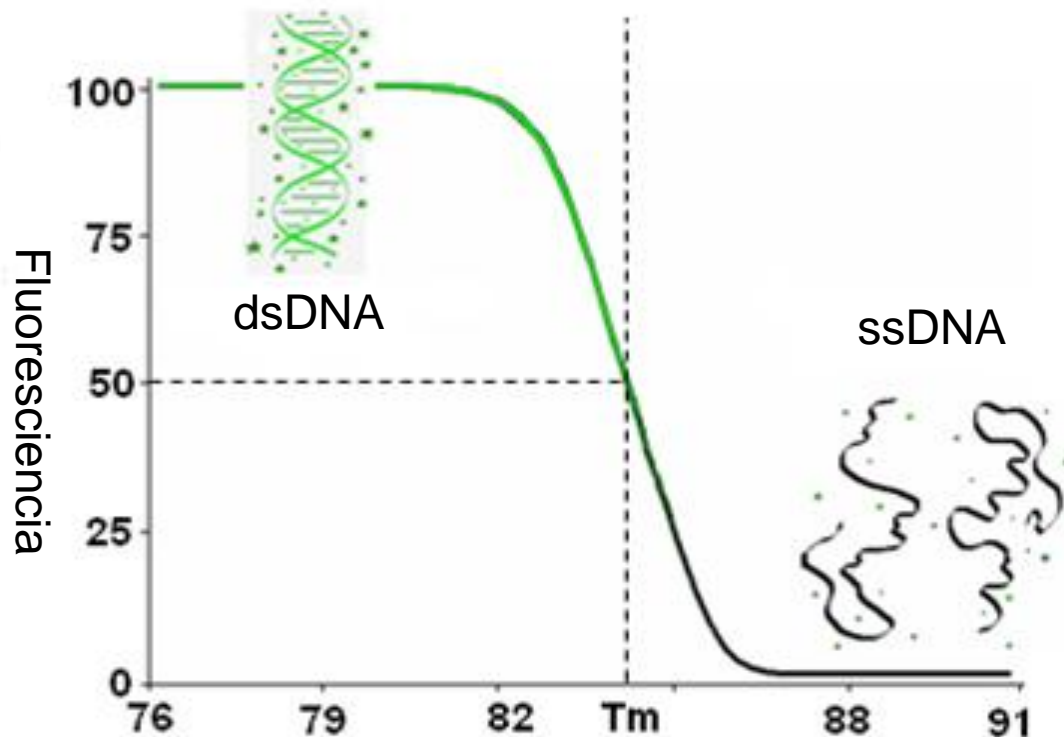
Rotor-Gene™ 6000

- Metóda HRM (High resolution melting) je novšia modifikácia Real-time PCR,
- dokáže prostredníctvom 3. generácie dsDNA interkalujúcich činidiel (Syto9, LC Green a EvaGreen) merať intenzitu fluorescenčného signálu, ktorý je závislý od množstva uvoľnenej interkalačnej farby z dvojzávitnice DNA,
- využíva prvotnú PCR amplifikáciu a jej kvantifikáciu pomocou Real-time PCR metódy a zvýšenia teploty.

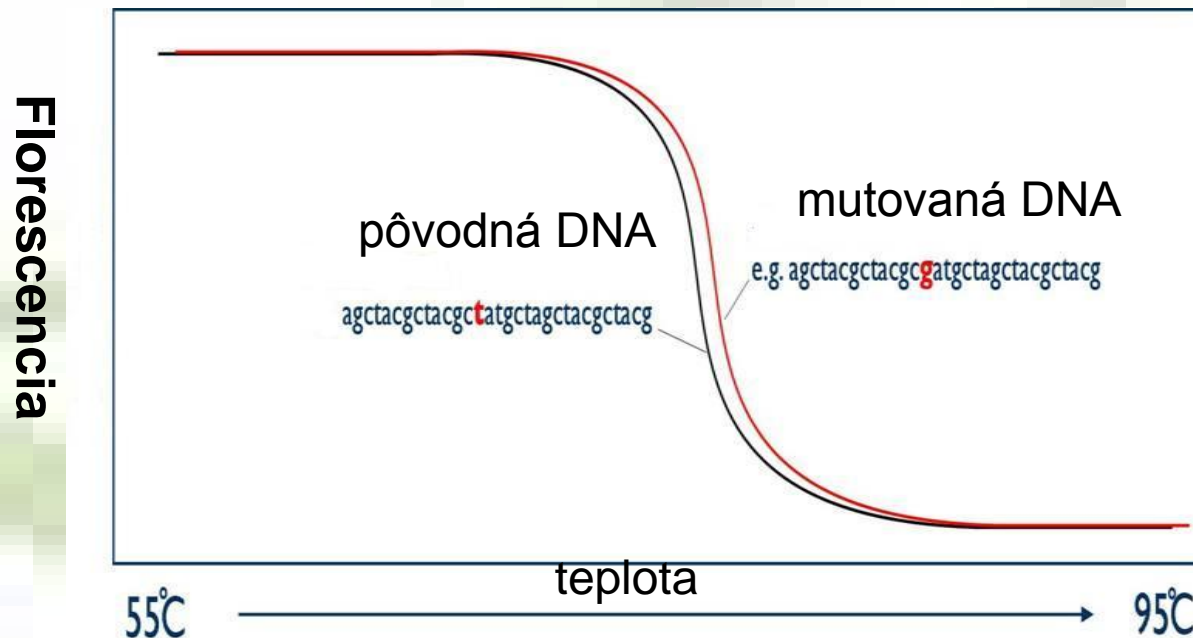


Princíp HRM

- Normalizovaná krivka HRM
- Po PCR dochádza ku analýze krivky topenia PCR produktu, ktorý je zviditeľnený interkalačným fluroescenčným činidlom
- po vzniku ss DNA intenzita flureoscencie klesá



- **Priebeh fluorescence krivky** je závislý od genotypu vzorky,
- Vieme identifikovať heterozygotnú aj mutovanú homozygotnú vzorky ak porovnáme s referenčnou vzorkou



Výsledky

HRM Report Experiment Information

Run Name	HRM LGB
Run Start	4/15/2010 2:42:12 PM
Run Finish	4/15/2010 5:39:19 PM
Operator	Miluchova Martina
Notes	HRM LGB 15.04.2010 samples 8,9,10,11,14
Run On Software Version	Rotor-Gene 1.7.87
Run Signature	The Run Signature is valid.
Gain Green	2,67
Gain HRM	✓

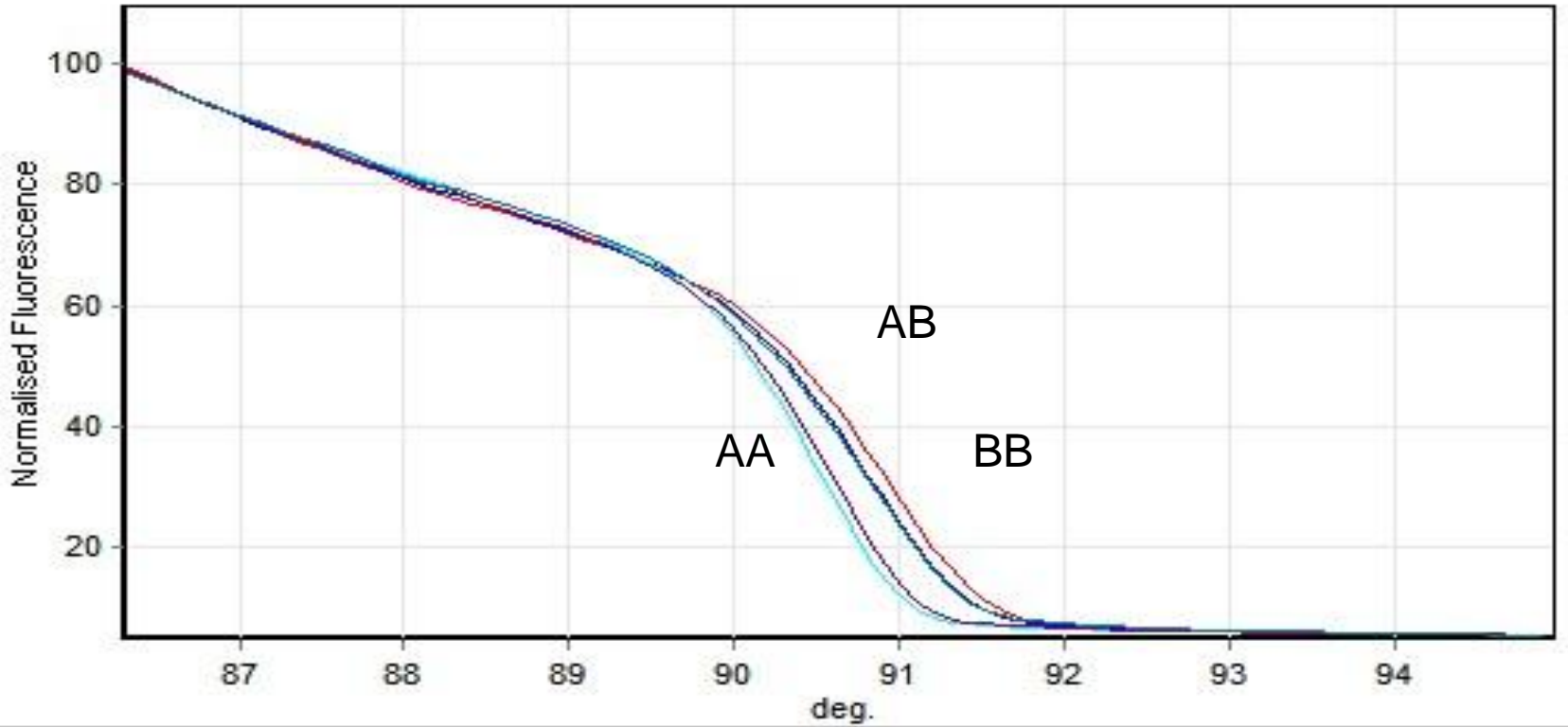
HRM Analysis Information

¹ Confidence Threshold	90 %
² Normalisation Region 1	86.31 - 87.21
³ Normalisation Region 2	94 - 95
Sample Page	Page 1

¹ Prahová hodnota zhody

^{2,3} Normalizovaná oblasť teplôt

Normalizačný graf pre HRM analýzu



No.	Colour	Name	Genotype	Confidence %
1	Red	8	AB	100,00
3	Blue	9	BB	97,03
5	Cyan	10	AA	91,82
6	Purple	11	AA	100,00
7	Teal	14	BB	100,00

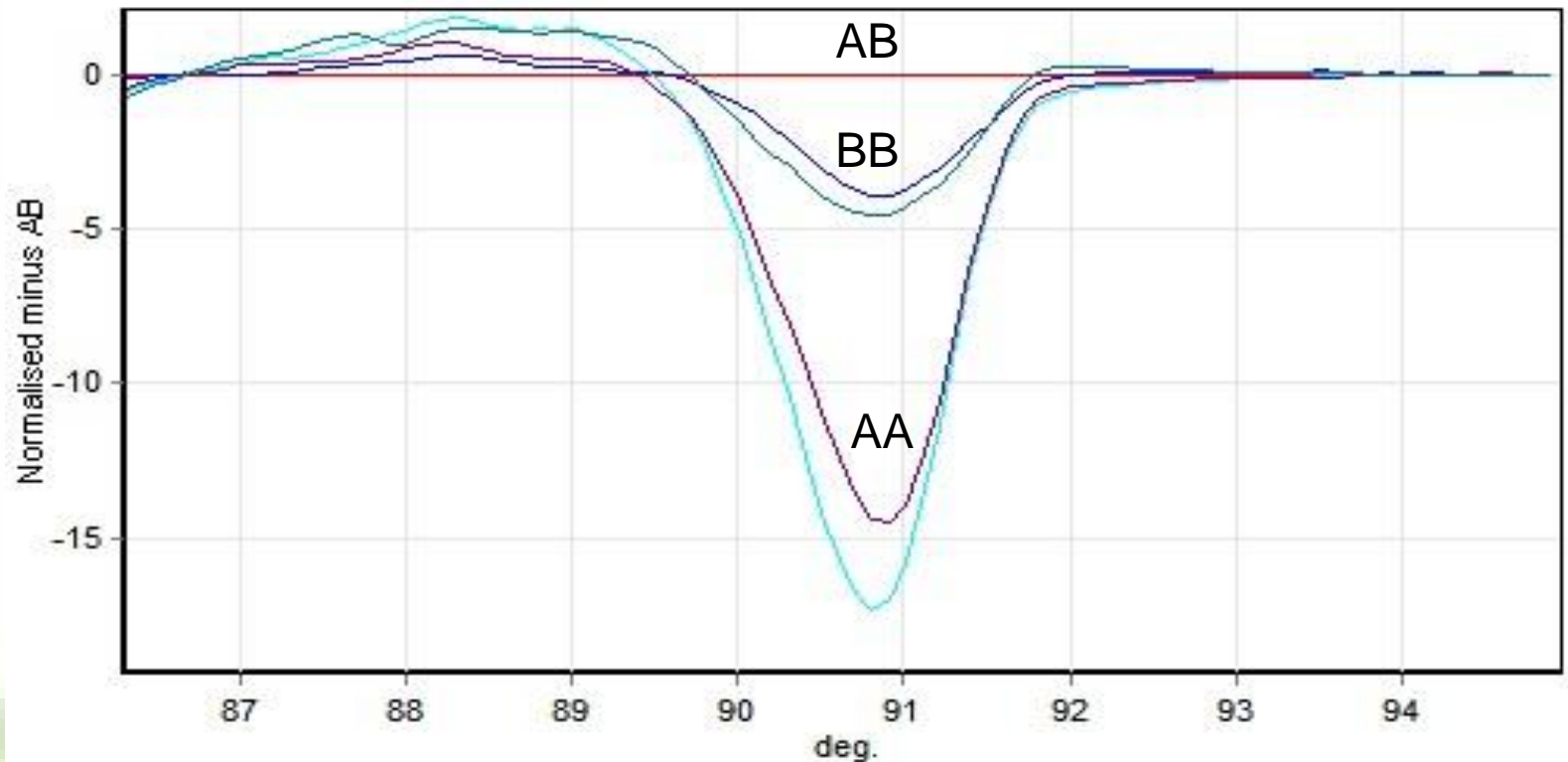
Genotypové zhody –

Genotyp AA bol určený so zhodou 91,82 % u vzorky č.10 a 100 % u vzorky č. 11

Genotyp BB bol určený so zhodou 97,03 % u vzorky č. 9 a 100% u vzorky č.14

Genotyp AB bol určený u vzorky č.8 so 100 % presnosťou.

Diferenciačný graf



No.	Colour	Name	Genotype	Confidence %
1	Red	8	AB	100,00
3	Blue	9	BB	97,03
5	Cyan	10	AA	91,82
6	Purple	11	AA	100,00
7	Teal	14	BB	100,00

Pre lepšie znázornenie boli vzorky prevedené do diferenciačného grafu a z neho vidieť porovnanie medzi jednotlivými genotypmi, pričom za vzor bol použitý heterozygotný genotyp AB (červená čiara).

Záver

- V populácii slovenského pinzgauského plemena bol potvrdený genetický polymorfizmus *BLG* génu.
- V populácii sa vyskytujú genetické varianty *BLG^A* a *BLG^B*.
- Vyhodnotením diferenciačného grafu po HRM analýze boli definované genetické rozdiely jednotlivými genotypmi *BLG^{AA}*, *BLG^{AB}* a *BLG^{BB}*.
- Výsledky HRM analýzy beta- laktoglobulínového génu budú opublikované vo vedeckom časopise *Acta Fytotechnica et Zootechnica*

Pod'akovanie

- Tento príspevok bol vytvorený realizáciou projektu č. ITMS 26220120015 **Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity (ECOVA)**, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja
- Materiálne náklady boli financované z projektu **VEGA 1/0061/10 Genetické hodnotenie produkcie a kvality mäsa v špeciálnych odvetviach živočíšnej výroby**