

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 11

Issue 2

Gödöllő
2015



AZ ADIPONECTIN GÉN EXPRESSZIÓJA MANGALICA, MANGALICA×DUROC ÉS MAGYAR NAGYFEHÉR SERTÉSEK IZOM- ÉS ZSÍRSZÖVETÉBEN

Tempfli Károly¹, Kovács Bálint¹, Posgay Miklós¹, Simon Zoltán², Bali Papp Ágnes¹

¹ Nyugat-magyarországi Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Állattenyésztési Intézet, 9200 Mosonmagyaróvár, Vár 4.

² Olmos és Tóth Kft., 4025 Debrecen, Hatvan u. 6.
tempfli@gmail.com

Összefoglalás

A zsírsejtek által termelt fehérje hormonnak, az adiponectinnek szerepe van a glükoneogenezis gátlásában, valamint a zsírsavak oxidációjának serkentésében. Fajtatiszta szőke mangalica, duroc-kal keresztezett mangalica és fajtatiszta magyar nagyfehér (MNF) hízók hátszalonna és izomszövetéből gyűjtöttünk mintákat az adiponectin gén (*ADIPOQ*) expressziójának meghatározásához. Az RNS-izolálást TRIzol módszerrel végeztük, az expresszió értékelése $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszer alkalmazásával, β -actin referenciagénnel normalizálva történt. Az *ADIPOQ* mindhárom vizsgált csoportnál a zsírszövetben volt aktívabb ($P < 0,05$). A fajtatiszta és keresztezett mangalica, valamint a MNF hátszalonna minták esetében nem volt szignifikáns ($P > 0,05$) különbség a gén kifejeződésében, bár a MNF egyedeknél állapítottuk meg a legalacsonyabb értékeket. Az izombeli kifejeződést illetően a fajtatiszta és keresztezett mangalica esetében szignifikánsan ($P < 0,05$) nagyobb volt az expresszió a MNF-hez viszonyítva. Az *ADIPOQ* nagyobb izombeli kifejeződése a mangalica fajtára jellemző kiemelkedő intramuszkuláris zsírtartalommal magyarázható.

Kulcsszavak: adiponectin, mangalica, magyar nagyfehér, génexpresszió

Adiponectin gene expression in muscle and fat tissues of Mangalica, Mangalica×Duroc, and Hungarian Large White pigs

Abstract

The adipocyte-secreted protein hormone adiponectin plays roles in the regulation of gluconeogenesis and the oxidation of fatty acids. Muscle and backfat tissue samples were collected from purebred and Duroc crossbred Blond Mangalica and Hungarian Large White (HLW) pigs at an abattoir in order to determine the expression level of adiponectin (*ADIPOQ*) gene in the different breeds and tissues. The RNA isolation was carried out by means of the TRIzol protocol, and the expression was normalised to β -actin reference gene and was analysed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. In each of the three groups, the *ADIPOQ* expression was significantly higher ($P < 0.05$) in backfat tissues compared to that in muscle samples. There was no significant ($P < 0.05$) difference between the *ADIPOQ* expression in backfat tissues of purebred and crossbred Mangalica and HLW; however, lowest expression was detected in HLW samples. Muscle *ADIPOQ* expression was significantly ($P < 0.05$) higher in purebred and crossbred Mangalica than in HLW. Variations in muscle *ADIPOQ* expression can be explained by, and contribute to differences in intramuscular fat accumulation between Mangalica and HLW.

Key words: adiponectin, Mangalica, Hungarian Large White, gene expression



Bevezetés

A sertés zsírszövetében, zsírbeépítésében szerepet játszó gének működésében bekövetkező különbségek azonosítása segítséget nyújt a termelés kandidáns génjeinek feltárásához. Napjainkban a zsírszövetre az energiaraktározási funkcióján túlmenően egyre inkább endokrin szervként is tekintenek, hiszen hormontermelésén keresztül hatással van a szervezet egészében végbemenő folyamatokra; például az éhségérzet szabályozása révén a takarmányfelvételre, vagy a luteinizáló hormon-termelés szabályozása révén a reprodukcióra.

Emberben az adiponectin különböző alléljait összefüggésbe hozták az inzulinrezisztencia, a 2-es típusú cukorbetegség és a kóros elhízás kialakulásának kockázatával, továbbá fordított arányosságot figyeltek meg az adiponectin vérplazmában mért szintje és a testzsír aránya között (Wang és mtsai, 2006; Daniele és mtsai, 2008).

Vizsgálataink célkitűzése volt, hogy az adiponectin (*ADIPOQ*) gén működését összehasonlítsuk szőke mangalica, duroc-kal keresztezett mangalica és magyar nagyfehér sertések hátszalonnájában és izomszövetében.

Anyagok és módszerek

Az RNS-alapú vizsgálatok egyik kritikus pontja a mintavétel, hiszen a DNS-nél sokkal instabilabb és a környezetünkben általánosan elterjedt RNS-bontó enzimek (RNázok, ribonukleázok) által veszélyeztetett RNS-állomány a vágást követően rövid időn belül degradálódhat; ennek elkerülése érdekében a mintavételt a vágást követő legfeljebb 45 percen – egy órán belül végeztük.

A vágóhídi mintavétel során csoportonként 5-5 állattól (hízó koca) gyűjtött 1,5-2 g közötti hátszalonna- és izommintákat műanyag fagyasztócsövekbe (VWR International) helyeztük és az adatok rögzítését (egyed fajtája, azonosító száma, szövet típusa) követően azonnal folyékony nitrogénbe (-196°C) mártottuk. A szállítás és a feldolgozásig történő tárolás is a mintagyűjtő nitrogéntartályban történt. A vizsgálatba vont csoportok élő tömege között nem volt szignifikáns ($P > 0,05$) különbség (120-135 kg).

Az RNS izolálását a TRIzol módszer alapján végeztük (Chomczynski és Sacchi, 1987), TRIreagent (Life Technologies), kloroform és 1-bróm-3-klórpropán (VWR International) felhasználásával.

Egy extrakció során hozzávetőleg 100-150 mg hátszalonna és izommintát dolgoztunk fel. A kinyert RNS mennyisége jellemzően nagyobb volt izom esetében: 500-1500 ng/ μl , a zsírszövet 70-150 ng/ μl -jéhez viszonyítva. A minták koncentrációját 50 ng/ μl -re állítottuk be.

Az izolált RNS mennyiségét Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) spektrofotométerrel állapítottuk meg. A spektrofotométer kis mennyiségű (1-2 μl) mintában méri a koncentrációt, továbbá 230, 260 és 280 nm-en elemzi a minták abszorbanciáját, az adatokból pedig arányszámokat képez. A 260/280 és a 260/230 nm-en mért abszorbancia-arányokból következtethetünk az izolátum tisztaságára is.

Megfelelő tisztaságúnak tekintettük a legalább 1,8 feletti 260/280 és 260/230 értékekkel jellemzett RNS-izolátumokat. Az izolált teljes RNS integritását agaróz gélelektroforézis segítségével értékeltük.

A valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR) eredményét befolyásoló potenciális DNS-szennyezés elkerülése érdekében a tisztított RNS-izolátumokat DNáz kezelésnek vetettük



alá, amely során az RQ1 RNase-free DNase kítet (Promega) alkalmaztuk. A reakcióelegyet legalább 30 percig 37°C-on tartottuk, majd a DNáz enzimet 65°C-on inaktívtuk.

Reverz transzkripció alkalmazásával az izolált teljes RNS-ről cDNS-t állítottunk elő iScript cDNA synthesis (Bio-Rad Laboratories) kít segítségével. A cDNS szintézishez 500 ng RNS-t használtunk fel. A cDNS előállítását oligo(dT) és random hexamer primerek keverékével történt. Az előállított cDNS-t 1:100 arányban hígítottuk a qPCR alkalmazását megelőzően. Az optimális hígítási mérték kiválasztásához és a PCR hatékonyságának megítéléséhez standard hígítási sorokat készítettünk.

A β -actin és az ADIPOQ génszakaszok amplifikálása az 1. táblázatban bemutatott primerek felhasználásával történt.

1. táblázat. Az expressziós vizsgálatok során alkalmazott primerek

Gén	Szekvencia (5'–3')	Hossz
β -actin ¹	F: CCAGGTCATCACCATCGG; R: CCGTGTGGCGTAGAGGT	158 bp
ADIPOQ ²	F: CGAGAAGGGTGAGAAAGGAG; R: TAGGCGCTTCTCCAGGTTC	123 bp

Table 1. Sequences of the applied primers

¹ Luo és mtsai (2009), ² Cirera és mtsai (2013)

A vizsgálatok során Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System-et használtunk átlátszó („clear”) plate-ekkel. A reakciók összeállítása a következő volt: 10 μ l SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad Laboratories), 1-1 μ l forward és reverse primer, 1 μ l cDNS és nukleázmentes víz 20 μ l-ig.

A reakciók beállításai a következők voltak az ADIPOQ esetében: 95°C 1 percig, majd 40, kétlépcsős ciklus 95°C-on 5 s-ig és 60°C-on 5 s-ig. A referenciagénként alkalmazott β -actin kapcsolódási hőmérséklete az aktuális vizsgált gén hőmérsékletével egyezett meg. A különböző hőmérsékleteken végzett reakciók esetében a β -actin amplifikáció hatékonysága 95 \pm 7% volt.

Az eredmények értékelése során az SPSS v.16 program t-próbáját használtuk, az egyes átlagok közötti különbségeket P<0,05 szinten tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények és értékelés

Mindhárom vizsgált csoportban az ADIPOQ expressziója a zsírszövetben szignifikáns (P<0,05) mértékben meghaladta az izomban megállapított értéket.

Az ADIPOQ izombeli expressziója szignifikánsan (P<0,05) nagyobb volt fajtatiszta és duroc-kal keresztezett mangalica esetében, mint magyar nagyfehér sertéseknél.

Az izomszövetben való fokozott kifejeződés hátterében a fajtatiszta és a keresztezett mangalica esetében az intramuszkuláris zsírsejtek ADIPOQ-termelése állhat. Az ADIPOQ hosszú hátizomban való kifejeződéséről számoltak be Ding és mtsai (2004) a Lee Sung taiwani fajta esetében, míg keresztezett lapály \times yorkshire \times duroc egyedeknél izomban nem fejeződött ki a gén. Összefüggés figyelhető meg az ADIPOQ izombeli expressziója és az intramuszkuláris zsírtartalom között is: 2,55% körüli izomközötti zsír esetén detektálható volt mRNS, míg 1,6% körül még nem.



Az *ADIPOQ* túlnyomórészt zsírszövetbeli kifejeződése nem kizárólag a sertésre jellemző, hasonló expressziós mintázatot írtak le embernél és egereknél is (Maeda és mtsai, 1996; Hu és mtsai, 1996).

A mangalica duroc fajtával való keresztezéseiben is megjelenő fokozott zsírfelhalmozási hajlam megnyilvánul a modern fajták húsához viszonyított magasabb izomközötti zsírtartalomban, ami hozzájárulhat az *ADIPOQ* izomszövet-beli megjelenéséhez, nagyobb kifejeződéséhez is.

1. ábra. Az *ADIPOQ* expressziója mangalica (MAN), mangalica×duroc (MAN×DUR) és magyar nagyfehér (MNF) sertések zsír- és izomszövetében.

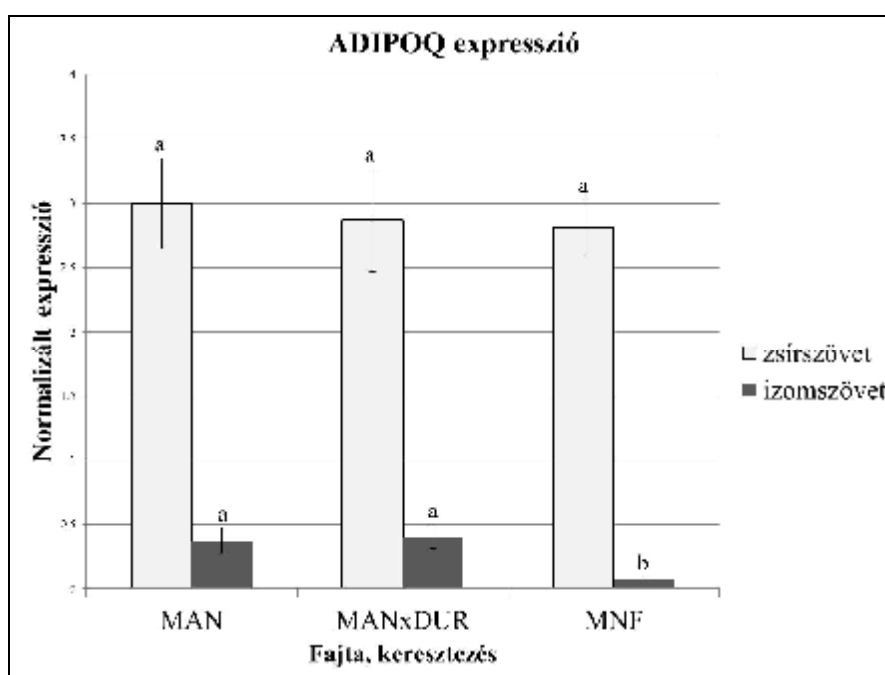


Figure 1. Expression of *ADIPOQ* in backfat and muscle tissue of Mangalica (MAN), Mangalica×Duroc (MAN×DUR), and Hungarian Large White (MNF) pigs

A zsíryanycserében szerepet játszó gének azonosítása humán biológiai szempontból is kiemelkedő jelentőségű, hiszen az elhízás világszerte jelentős egészségügyi problémát jelent. Az adiponectin e tekintetben is egy kulcsfontosságú adipokin (zsírsejtek által termelt mediátor), hiszen védő hatással bír az elhízáshoz köthető anyagcserezavarok kialakulásával szemben. Állatkísérletek során megfigyelték, hogy az adiponectin javítja az inzulin-érzékenységet, ami által potenciálisan használható lehet a cukorbetegség visszaszorításában; ezenkívül az adiponectin gyulladáscsökkentő és szívvédő hatását is leírták (Daniele és mtsai, 2008; Wang és mtsai, 2006; Gable és mtsai, 2006).



Irodalomjegyzék

- Chomczynski, P., Sacchi, N.* (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162. 156–159.
- Cirera, S., Jensen, M.S., Elbrond, V.S., Moesgaard, S.G., Christoffersen, B.O., Kadarmideen, H.N., Skovgaard, K., Bruun, C.V., Karlskov-Mortensen, P., Jorgensen, C.B., Fredholm, M.* (2013): Expression studies of six human obesity-related genes in seven tissues from divergent pig breeds. *Animal Genetics*, 45. 59–66.
- Daniele, A., Cammarata, R., Masullo, M., Nerone, G., Finamore, F., D'Andrea, M., Pilla, F., Oriani, G.* (2008): Analysis of adiponectin gene and comparison of its expression in two different pig breeds. *Obesity*, 16. 1869–1874.
- Ding, S.T., Liu, B.H., Ko, Y.H.* (2004): Cloning and expression of porcine adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 genes in pigs. *Journal of Animal Science*, 82. 3162–3174.
- Gable, D.R., Hurel, S.J., Humphries, S.E.* (2006): Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 188. 231–244.
- Hu, E., Liang, P., Spiegelman, B.M.* (1996): AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry*, 271. 10697–10703.
- Luo, H.F., Wei, H.K., Huang, F.R., Zhou, Z., Jiang, S.W., Peng, J.* (2009): The effect of linseed on intramuscular fat content and adipogenesis related genes in skeletal muscle of pigs. *Lipids*, 44. 999–1010.
- Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y., Matsubara, K.* (1996): cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apMI (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221. 286–289.
- Wang, Y., Lam, K.S.L., Xu, A.* (2006): Adiponectin as a therapeutic target for obesity-related metabolic and cardiovascular disorders. *Drug Development Research*, 67. 677–686.