

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Šlechtění, genetiky a výživy

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetický polymorfismus vybraných kódujících lokusů ve
vztahu k technologickým vlastnostem masa

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph. D.

Autor: Bc. Kateřina Koubová

České Budějovice, duben 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma Genetický polymorfismus vybraných kódujících lokusů ve vztahu k technologickým vlastnostem masa, jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 27. 4. 2012

Bc. Kateřina Koubová

Mé poděkování patří především vedoucí práce Ing. Lence Hanusové, Ph.D., za metodické a odborné vedení. Dále pak Ing. Lence Havlíčkové, Ph.D. a všem, kteří mi poskytli informace potřebné pro vypracování této práce.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod.....	8
2. Cíl práce	9
3. Literární přehled.....	10
3.1 Genomika skotu.....	10
3.1.1 Struktura savčího genomu	10
3.1.2 Struktura savčího genu	11
3.1.3 Mapování genomu skotu	12
3.2 Genetické markery dle využití při mapování genomu	13
3.3 Rozdělení markerů dle charakteru jejich polymorfismu	14
3.3.1 Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)	14
3.3.2 SSR - mikrosatelity.....	15
3.3.3 SNP – single nucleotide polymorphism	16
3.4 Základní molekulárně genetické metody detekce a testování polymorfismů DNA.....	17
3.4.1 Polymerázová řetězová reakce	17
3.4.2 Polymorfismus délky restričních fragmentů.....	18
3.5 Geny pro masnou užitkovost a efekt přítomných SNP na kvalitu masa.....	19
3.5.1 Calpain a jeho inhibitor Calpastatin	19
3.6 Technologické vlastnosti masa.....	23
3.6.1 Barva masa	23
3.6.2 Vaznost	24
3.6.3 Křehkost masa	25
4. Materiál a metodika.....	29
4.1 Materiál	29
4.2 Izolace DNA.....	29
4.3 PCR/RFLP	29
4.3.1 PCR.....	30

4.3.2	RFLP	31
4.3.3	Elektroforéza v agarosovém gelu.....	32
4.4	Stanovení křehkosti masa	32
4.5	Statistické vyhodnocení.....	33
5.	Výsledky	34
5.1	Frekvence genotypů a alel	35
5.2	Vyhodnocení vztahu mezi genotypy a hodnotami pro sílu stříhu	36
6.	Diskuze.....	39
7.	Závěr	42
8.	Seznam použitých zkratk.....	43
9.	Použitá literatura	44
10.	Přílohy	55

Abstrakt

V diplomové práci byla provedena genotypizace 162 jatečných býků plemene ČESTR pocházejících z komerčních chovů, která měla za úkol analyzovat potenciaální vliv genu kódujícího calpain I (*CAPNI*) na výslednou křehkost masa. *CAPNI* přítomný na chromozomu *BTA29*, byl ve dřívějších studiích hodnocen jako kandidátní gen pro QTL.

Polymorfismus genu *CAPNI* byl analyzován pomocí metody PCR/RFLP za použití markeru *CAPN530*. Výsledkem celé metody bylo stanovení genotypů. U homozygotů *AA* byl odečten jeden fragment o délce 341 bp, u homozygotů *GG* dva fragmenty o délkách 195 a 146 bp a u heterozygotů *AG* tři fragmenty o délkách 341, 195 a 146 bp.

Výsledky genotypizace byly následně statisticky vyhodnoceny. Ve studované populaci býků bylo zjištěno 11 homozygotů *AA*, 62 homozygotů *GG* a 89 heterozygotů *AG*. Četnější Alela *G* se v populaci vyskytovala s frekvencí 0,657 a méně četná alela *A* pak s frekvencí 0,343. Pro stanovení křehkosti masa u jednotlivých býků bylo zvoleno hodnocení velikosti střižné síly pomocí Warner-Bratzlerova shear testu. Měřeny byly vzorky syrového a grilovaného masa vždy 1., 14. a 28. den po porážce. K vyhodnocení vztahu mezi genotypem a velikostí střižné síly bylo využito statistických metod. V případě syrového masa byl zjištěn významný vliv pouze u síly ve stříhu měřené u vzorků 1. den po porážce. U genotypu *AG* bylo dosaženo nejpříznivějších výsledků pro sledovaný parametr. U vzorků měřených 14. a 28. den po porážce nebyl zjištěn žádný vliv genotypu na sílu ve stříhu, potažmo křehkost masa. U masa grilovaného nebyl zjištěn žádný významný vliv genotypu na sílu stříhu ani v jednom dni měření. Lze konstatovat, že vliv genotypu na křehkost grilovaného masa je u našeho panelu zvířat naprosto minimální a nelze jej statisticky prokázat.

Klíčová slova: křehkost masa, calpain, *CAPNI*, polymorfismus, ČESTR, PCR/RFLPs

Abstract

Within the framework of this diploma, a genotypization of 162 beef cattle of the ČESTR commercial breed from was performed in order to analyze the potential influence of gene coding calpain I (*CAPNI*) on the resulting beef tenderness. *CAPNI* present on the *BTA29* chromosome, was selected in previous studies as a candidate gen for QTL.

Polymorphism of *CAPNI* gene was studied using PCR/RFLP method and *CAPN530* marker. Genotype identification resulted from this procedure. A 341 bp long fragment was present in homozygotes *AA*, two fragments of 195 and 146 bp were present in homozygotes *GG*, and three fragments of 341, 195 and 146 bp were detected in heterozygotes *AG*.

The genotypization output was subsequently statistically evaluated. 11 homozygotes *AA*, 62 homozygotes *GG* and 89 heterozygotes *AG* were detected in the analyzed beef cattle population. More frequent *G* allele occurred in the set with the frequency of 0,657 and *A* allele with the frequency of 0,343. Warner-Bratzler shear test was employed to determine beef tenderness based on the shear force attribute. Samples of raw and grilled beef aging 1, 14 and 28 days after the slaughter were analyzed. Statistical methods were used to evaluate relationship between genotype and detected amount of shear force. In case of raw beef, only the samples aging 1 day after the slaughter showed significant difference in the shear force. The most positive results for the given parameter were achieved in case of *AG* genotype. Samples aging 14 and 28 days after the slaughter showed no difference in shear force and related beef tenderness, indicating no genotype influence. In case of grilled beef, no significant difference in sheer force indicating possible genotype influence was detected at any day of analysis. Genotype influence on grilled beef tenderness within the test animal population is minimal and statistically inconclusive.

Key Words: beef tenderness, calpain, *CAPNI*, *polymorphism*, ČESTR, PCR/RFLPs

1. Úvod

Chov kombinovaného užitkového typu skotu zastává pevnou pozici v živočišné výrobě. Díky vysokým stavům tak výrazně ovlivňuje celkovou produkci hovězího masa. Vzhledem ke značné variabilitě mezi jednotlivci je však nezbytné, aby byla důsledně vyhodnocována výtěžnost i jakost u tohoto typu skotu.

Typickým představitelem kombinovaného užitkového typu chovaného v České republice je český strakatý skot. Jedná se o původní plemeno skotu na území České republiky, jež se v současnosti podílí na celkových stavech skotu v ČR přibližně z jedné poloviny. Chovný cíl plemene je zaměřen na vysokou a hospodárnou produkci kvalitního mléka a masa s požadovanou mléčnou užitkovostí 6 000 až 7 500 kg mléka s obsahem bílkovin nad 3,5 % a masnou užitkovostí s průměrným denním přírůstkem nad 1 300 g v intenzivním výkrmu býků, jatečnou výtěžností nad 58 % při intenzivním růstu do 600 kg a při nízkém podílu ledvinového a pánevního loje. Ve špičkových chovech je těchto parametrů dosahováno již nyní.

Současně aplikovaný systém mléčných kvót tvoří společně s klasifikačním systémem SEUROP, jež je používán k ocenění kvality jatečného skotu, vhodné podmínky pro chov strakatého skotu a plní tak reálná očekávání a potřeby všech chovatelů tohoto plemene.

Hovězí maso patří k nejhodnotnějším druhům masa, především kvůli vysokému obsahu bílkovin, ale i celé řady vitamínů, stopových prvků a dalších biologicky aktivních látek. Mezi hlavní ukazatele kvality hovězího masa spotřebitelé radí senzorické vlastnosti (chuť, vůně, křehkost a šťavnatost) a dietetickou hodnotu (chemické složení) včetně zdravotní nezávadnosti. Z průzkumů vyplývá, že velmi ceněnou vlastností je právě křehkost a ta, potažmo vliv calpainu na její výsledné hodnoty, je náplní této práce. Konkrétně zde byla genotypizována jednonukleotidová substituce – *CAPN530* v kódujících oblastech genu *CAPNI* a analyzován její potenciální vliv na výslednou křehkost masa.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je provést genotypizaci vybraných kódujících lokusů, které jsou v potencionálním vztahu k technologickým vlastnostem masa. Tato genotypizace bude provedena u vybraných jedinců plemene českého strakatého skotu. Analýzy budou provedeny pomocí molekulárně-genetických metod a na základě metod statistických bude provedeno následné vyhodnocení vztahu vybraných lokusů s vybranými technologickými vlastnostmi masa.

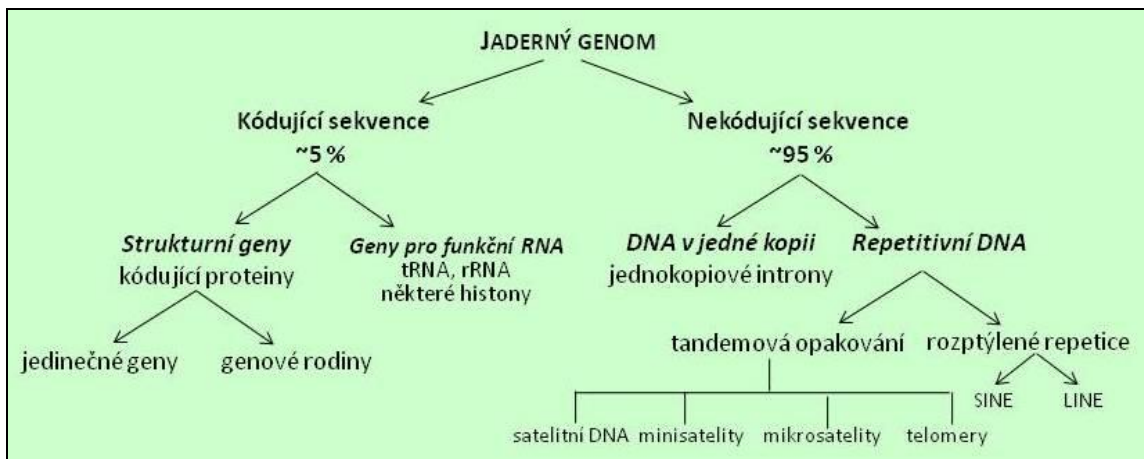
3. Literární přehled

3.1 Genomika skotu

3.1.1 *Struktura savčího genomu*

Pojem genom je chápán jako soubor veškerého genetického materiálu buňky, organismu, druhu či vyšší taxonomické jednotky (Gazdová, 2007). U eukaryotických organismů je genetická informace v podobě DNA (deoxyribonucleic acid) uložena zejména v buněčném jádře (jaderná DNA) a extrachromozomálně pak v mitochondriích (mitochondriální DNA), (Snustat a Simmons, 2009). Převážná část genomu hospodářských zvířat je tvořena nekódujícími sekvencemi (~95%). Tak jako kódující DNA i nekódující úsek může být unikátní, nebo se může v genomu nacházet ve více identických či velmi podobných kopiích. Tyto sekvence DNA s vysokým množstvím kopií se nazývají repetitivní sekvence a pokud jsou jednotlivé kopie sekvenčního motivu v blocích, v řadě za sebou, hovoříme o tandemových repeticích. Mezi jejichž zástupce s nejdelšími repeticemi řadíme satelity, střední minisatelity (také VNTR) a nejkratší repetice tvořené opakováním 1-5 bp (base pair) jsou tzv. mikrosatelity (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Každý gen, nebo anonymní nekódující sekvence má na chromozomu specifické, zpravidla stálé místo, tzv. lokus. Výjimkou jsou rozptýlené sekvence přítomné v jednotlivých kopiích napříč genomem, které se nazývají transpozony a jejichž další členění je mimo rozsah této rešerše. Satelitní DNA je hojná v oblastech centromer a konstitutivního heterochromatinu. Tyto oblasti nebývají zahrnuty v dostupném sestavovaném genomu zpravidla z důvodu problematičnosti jejich sekvenování. Zbývající část genomu (~5%) je tvořena strukturálními geny, které kódují syntézu polypeptidových řetězců (Obr. 1), (Gazdová, 2007).



Obr. 1. Schématické znázornění struktury savčího genomu (upraveno z Gazdová, 2007)

3.1.2 *Struktura savčího genu*

Typický savčí gen se skládá z několika funkčních částí. Na 5' konci je přítomna oblast promotoru a v pozici -26 až 34 před prvním nukleotidem je lokalizován tzv. TATA box (TATAAAA), nazývaný také Goldberg-Hognessův box, který slouží ke správnému navázání RNA polymerasy II a pro iniciaci transkripce. Vzdálenější regulační sekvence je označována jako CAT box a je zhruba -100 nukleotidů proti směru transkripce. Přepisovaná část DNA sekvence se nazývá transkriptom, první přepisovaný nukleotid je značen +1 a iniciační metioninový kodon (ATG) značící začátek translace u všech eukaryotických genů je umístěn zpravidla v pozici +64 (Gazdová, 2007).

Sekvence mezi začátkem transkripce a start kodonem se označuje jako 5'-UTR (nepřekládaný úsek), poté následuje různý počet exonů oddělených introny začínajících donorovým GT a končící akceptorovým AG místem sestřihu. Konec transkribované části DNA je kódován tzv. stop kodonem, který následuje 3'-UTR obsahující sekvenci AATAAA, představující polyadenylační signál. Přibližně 10-30 nukleotidů za ním je řetězec RNA rozštěpen a uvolněn od DNA. Kromě těchto částí se mohou vyskytovat další regulační oblasti řídící genovou expresi. Jedná se o vazebná místa transkripčních faktorů lokalizovaná v promotoru, dále tzv. zesilovače (delší sekvence lokalizované v oblasti před či za genem) nebo zeslabovače (krátké, často se opakující sekvence) transkripce (Kopečný, 2000).

3.1.3 Mapování genomu skotu

Mapování genomu skotu má za cíl vytvořit hustou síť polymorfních markerů a odhalit znaky zemědělského a biologického významu. K identifikaci lokusů s velkým fenotypovým účinkem je mapa genetických markerů rozmístěných v intervalech 5-20 cM (centimorgan) dostačující, ale pro lokusy s výsledným menším vyjádřením ve fenotypu, jako např. QTL (quantitative trait loci) jsou vhodnější intervaly 1-2 cM (Matise *et al.*, 1994). Genetická mapa znázorňuje distribuci DNA genetických markerů v genomu. DNA marker je polymorfní znak, jehož varianty vykazují mendelistickou dědičnost a mohou být v asociaci s variabilitou znaku důležitou pro chovatele. Zpravidla se jedná o jednoduché nukleotidové polymorfismy (SNP), inserce/delece (InDel) nebo mikrosatelity (SSR). Mezi důležité vlastnosti markeru patří kodominantní typ dědičnosti, jednotková heritabilita, snadná identifikace během prenatalního a postnatalního života jedince – i po jeho smrti (Putnová, 2002).

Karyotyp skotu (*Bos taurus*) se skládá z 29 párů autozomů a 1 páru pohlavních chromozomů. Délka genomu skotu bez ohledu na pohlaví byla stanovena na 3 532cM (Barendse *et al.*, 2000). S pomocí technik NGS (next generation sequencing) se v roce 2009 podařilo začlenit skot do „elitní“ skupiny savců, jejichž genom byl kompletně sekvenován (přístupová verze „Btau_4.2“, www.hgsc.bcm.tmc.edu/project-species-m-Bovine.hgsc?pageLocation=Bovine). Bovinní genom o velikosti 2,87 Gb (90%), (Liu *et al.*, 2009) byl dostupný již v roce 2007, avšak postupně byl doplňován o vysoce kvalitní sekvence. Odhaduje se, že obsahuje přibližně 22000 genů (Anson, 2009). Znalost sekvence kompletního genomu umožňuje následně (po opravení chyb vzniklých při jejich čtení) rozklíčovat informace v sekvencích uložené, identifikovat a objasnit funkci jednotlivých genů, jejich interakčních vztahů a způsobu jejich regulace. K identifikaci jednotlivých genů je využívána komparativní analýza za pomoci modelových (nejlépe blízké příbuzných) organismů a detekce nejčastěji ortologních genů v homologních úsecích genomu. Sekvence identifikovaných genů pak mohou být přínosné v různých oblastech specifických zájmů v chovu a šlechtění skotu (Knoll a Vykoukalová, 2002; Gazdová, 2007).

3.2 Genetické markery dle využití při mapování genomu

Za genetické markery jsou považována polymorfní místa v DNA, která vykazují mendelistickou dědičnost a mohou být v asociaci ke sledovaným znakům. O'Brien *et al.* (1999) rozdělil genetické markery do tří skupin:

- I. Markery I. typu - kódující exprimované geny, které mohou být i kaidátními geny pro QTL. Tyto geny se však vyznačují nízkou hladinou polymorfismu, a proto je nelze uplatnit například pro studie diverzity rodin.
- II. Markery II. typu – nekódující vysoce polymorfní sekvence DNA tvořené zejména mikrosatelity (dnes nejvýznamnější markery pro vazbové mapování, 1 až 6 bp) a minisatelity (9 až 60 bp). Vysoký stupeň polymorfismu určuje jejich informativní charakter, který je využíván zejména v populačních studiích.
- III. Do skupiny markerů III typu patří jednonukleotidové polymorfismy (SNP) vyskytující se jak v exonech, tak v intronech, včetně intergenových oblastí. Vyznačují se vysokou hustotou výskytu, malým polymorfismem. Jejich význam vzrostl s nástupem automatických screeningových metod jako je např. microarrays (Gazdová, 2007).

Šlechtitelský proces procházel v průběhu staletí postupnými etapami svého vývoje a metodou zpřesňování. Z počátku se chovatelé orientovali pouze na projev zvířete ve fenotypu a i přes křížení mezi plemeny tvořila selekce uvnitř plemen pevný základ. Identifikace jedinců s vyšší plemennou hodnotou a vyšší užitkovostí byla založena na překonání znaků a vlastností současných rodičů. V posledních desetiletích došlo k hlubšímu poznání struktury DNA, k identifikaci a zmapování účinků určitých genů ovlivňujících komplexní znaky u jednotlivých druhů zvířat (Snustat a Simmons, 2009). Souhrnně řečeno: poznává se genetická informace a hodnotí se efekt její části na masnou užitkovost (Steinhauser, 2000). Díky těmto výzkumům lze jednoznačně determinovat, zda a jakým způsobem variabilita v DNA (polymorfismus) konkrétních zvířat ovlivňuje jejich produkční či jiné ekonomické vlastnosti (Urban, 2009).

V současnosti je prosazována do šlechtitelských záměrů i selekce založena na genetických markerech. Mezi nesporné výhody genetických markerů patří možnost detekce v každém věku zvířete, v embryu, či ve spermatu. Tento fakt je významný

především u znaků týkající se produkce masa, jež se normálně dají hodnotit až po porážce. Dále používání genetických markerů umožňuje analyzovat vlastnosti vyskytující se jen u jednoho pohlaví i u pohlaví druhého. Díky kodominantnímu vztahu mezi jednotlivými variantami markerů můžeme přesně určit všechny genotypy, včetně případných heterozygotů, jež by se fenotypově neprojevíly. Na základě genotypizace provedené pomocí genetických markerů lze cíleně vybírat rodiče, provádět selekci a cíleně tak produkovat zvířata požadovaných genotypů. Díky zařazení genetických markerů do selekčního procesu lze efektivně zvýšit selekční efekt (Steinhauser, 2000). V současné době představuje například microarrays technologie metodu, jak analyzovat expresi všech genů jednoho organismu současně v jedné reakci (Snustat a Simmons, 2009).

Techniky pro genotypizaci

Existuje celá řada molekulárních markerů, které lze použít pro genotypizaci hospodářských zvířat, avšak neexistuje žádná jednotlivá technika, kterou lze aplikovat k zodpovězení všech rozmanitých otázek týkající se genomické analýzy. Každá technika má své přednosti a nedostatky a je nejlépe aplikovatelná za určitých podmínek pro stanovený výzkumný cíl. Typy markerů se liší v informačním rozsahu, který poskytují, počtu detekovaných polymorfismů na jednu reakci a stupni automatizace. Výběr metody také často závisí na stupni požadovaného genetického rozlišení a dostupných technologických a finančních prostředcích. Níže je uveden přehled nejdůležitějších a často používaných technik používaných pro genotypizaci u hospodářských zvířat, ve vztahu k technologickým vlastnostem masa (Knoll a Vykoukalová, 2002; Gazdová, 2007; Snustat a Simmons, 2009).

3.3 Rozdělení markerů dle charakteru jejich polymorfismu

3.3.1 *Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)*

Tato technika vyvinutá v osmdesátých letech (Botstein *et al.*, 1980) umožňuje konstrukci celogenomové mapy a identifikaci alel na základě přítomnosti, nebo absence specifického restrikčního místa. Genomová DNA je štěpena příslušnou restrikční endonukleasou, separována elektroforézou na agarózovém gelu a přenesena (blotována) na pevnou membránu pomocí tzv. Southernova přenosu. Po hybridizaci se značenou sondou a vizualizací lze zjistit polymorfismus ve velikosti

vzniklých restrikčních fragmentů DNA. Jedná se o kodominantní marker umožňující určit, zda je vázaný znak přítomen u určitého jedince v homozygotním, nebo heterozygotním stavu. Přestože je RFLP (restriction fragment length polymorphism) v dnešní době považován spíše za staromódní a časově náročnou markerovací techniku, jedná se stále o velmi účinnou metodu s vysokou vypovídající informační hodnotou. Vzhledem k relativní pracnosti této metody, a také k možným rizikům spojeným s radioaktivním značením pro pracující personál, je dnes upřednostňována spíše její modifikace vzniklá kombinací s PCR (PCR/RFLP), (Brown, 2007; Gazdová, 2007).

3.3.2 SSR - mikrosatelity

Jedná se o polymorfismus v délce sekvence, kam patří mikrosatelity (MS/STRs – short tandem repeats nebo SSRs – simple sequence repeats) a minisatelity (též označované VNTR – variable number tandem repeat). Mikrosatelity jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se opakujících se motivů o délce 1 – 6 nukleotidů (např. (GA)_n, (GATA)_n. Jsou součástí kódujících i nekódujících oblastí genomu. Obvykle se však tato polymorfní místa vyskytují v nekódujících oblastech, jelikož by měnila čtecí rámec odpovídajícího proteinu. (Tautz, 1984).

Je prokázáno, že v průběhu evoluce dochází k prodlužování mikrosatelitových sekvencí, což lze pozorovat už v průběhu několika stovek generací. Další mikrosatelity se ovšem mohou snadno vyštěpit rekombinací. Zdá se ale, že některé mikrosatelitové sekvence získaly časem určitou funkci, která přispívá k jejich udržení v genomu.

Podle složení lze mikrosatelity rozdělit na dokonalé, nedokonalé a složené. Dokonalý mikrosatelit je tvořen souvislým motivem, např. (AG)₂₄, u nedokonalých je tvořen několika různými motivy, např. (AG)₁₄(AT)₃₅ (Weber, 1990). Oblasti přilehlé k mikrosatelitům jsou obvykle unikátní. Lze tedy navrhnout primery, které mohou daný mikrosatelitový marker vyhledávat. Díky malé velikosti a délkovému polymorfismu jednotlivých lokusů se screening provádí jednoduše amplifikací lokusů pomocí PCR z okrajových primerů a následnou elektroforézou. Je to metoda časově nenáročná, dají se tak hodnotit různé lokusy a velký počet vzorků najednou. Mikrosatelity jsou markery kodominantní, takže lze získat od každého jedince dva

typy amplifikátů. To dokazuje jejich vysokou informativnost. Nevýhodou je náročná izolace mikrosatelitových lokusů z genomu, pro získání unikátní okolní sekvence. Avšak ne všechny mikrosatelity jsou informativní a snadno identifikovatelné PCR (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Tyto vysoce polymorfní markery se vyskytují ve všech eukaryotních genomech a v některých genomech prokaryot. Použitelnost SSRs jako genetických markerů je částečně limitována jejich specifitou pro určité taxony. Bylo prokázáno, že stejné markery mohou být někdy používány pro příbuzné druhy. Mikrosatelity se staly dobrým nástrojem pro konstrukci genových map a mají také velké využití v oblasti populační genetiky a molekulární evoluce. Mikrosatelitové markery se získávají buďto prohledáváním známých sekvencí obsažených v databázích nebo izolací z různých typů DNA knihoven (Brown, 2007).

3.3.3 SNP – *single nucleotide polymorphism*

Polymorfismus jednotlivých nukleotidů SNP, někdy také nazývaný jako genetický marker nové generace, se vyskytuje ve formě jednonukleotidových bodových mutací - inserce/delece (tzv. InDels) a na jeho základě lze od sebe například odlišit i jednotlivce uvnitř druhu. Jedná se o nejčastěji se vyskytující DNA polymorfismus napříč genomem. Např. v lidském genomu je odhadován počet minimálně 1,4 mil. SNP (Brown, 2007). Binární charakter a mezigenerační stabilita zvyšuje atraktivitu použití SNP pro QTL mapovací studie a MAS (marker-assisted selection).

Základní metodou detekce SNP je sekvenování, avšak tato technika je časově i finančně náročná, poskytuje více informací, než je potřeba a pokud pochází DNA templát od heterozygota, nedochází k detekci SNP. Široce používanou technikou je PCR/RFLP, také nazývaná jako CAPS (cleaved amplified polymorphis sequence), (Konieczny a Asubel, 1993), tato technika je však limitována následnou štěpnou reakcí po PCR, která omezuje její využití u velkého množství vzorků. Alelově specifická PCR (AS-PCR) je technika založená na použití oligonukleotidových primerů s komplementárním nukleotidem na 3'konci pro daný SNP (Ugozzoli a Wallace, 1991).

Další důležitou technikou k detekci SNP je SSCP (single-stranded conformation polymorphism analysis), (Orita *et al.*, 1989). Diskriminace alel je

založena na změně v sekundární struktuře ssDNA PCR produktu, který se liší v jednom či více nukleotidech. PCR produkt je denaturován a elektroforeticky separován pomocí PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). Odlišnost v elektroforetické mobilitě mezi jednotlivými amplikony předpokládá přítomnost jednonukleotidových polymorfismů (SNPs). Přestože se jedná o velice jednoduchou, přesnou a poměrně levnou techniku, separace pomocí PAGE neumožňuje její využití pro vysoko-efektivní alelickou detekci. Všechna výše zmiňovaná omezení u uvedených technik dala vznik novým technologiím založených na minisekvenování, analýze heteroduplexů a alelově specifické hybridizaci (ASH), (Mohler a Schwarz, 2005).

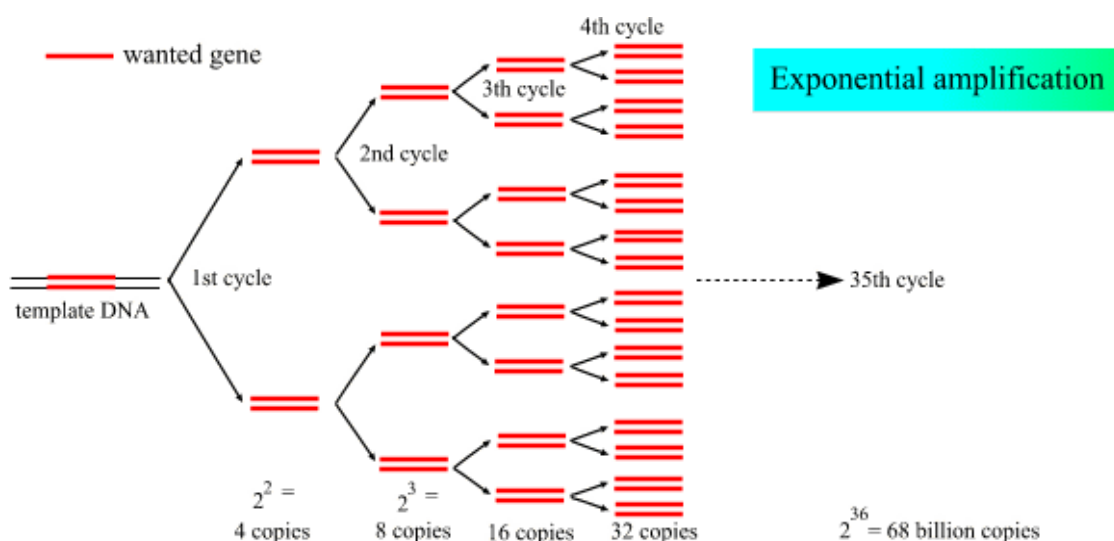
3.4 Základní molekulárně genetické metody detekce a testování polymorfismů DNA

3.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR - polymerase chain reaction)

Polymerasová řetězová reakce, kterou objevil roku 1983 Kary Mullis (prvně publikováno Saiki *et al.*, 1985), je metoda *in vitro* amplifikace specifického fragmentu DNA o známé sekvenci. Podmínkou použití této metody je znalost sekvence v bezprostředním sousedství úseku DNA určeného k amplifikaci. Vlastní sekvence tohoto úseku nám však známá být nemusí. Pomocí této metody je tedy možné selektivně amplifikovat určité oblasti genomu z několika málo kopií do řádově bilionů kopií. PCR nachází široké uplatnění v molekulární biologii a její uplatnění se stále rozšiřuje (přímé klonování DNA, cDNA, tvorba rekombinantní DNA, fingerprinting, *in vitro* mutagenese, detekce přítomnosti cizího genomu, detekce jednotlivých alel atd.) (Brown, 2007).

Templátem je ssDNA obsahující požadovaný úsek, který chceme amplifikovat (tzv. amplikon). Metoda je založena na extenzi primerů, které se připojují na komplementární úseky DNA a tím zároveň vymezují úsek DNA k amplifikaci. Prekurzory DNA tvoří deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) sloužící k syntéze polynukleotidového řetězce, které se s přidaným termostabilním enzymem *Taq* polymerasou stávají zárodkem pro syntézu nového vlákna. Poměr C, G, A, T by měl být ve stejném množství. Nezbytnou složkou reakční směsi je dostatečné množství Mg^{2+} či jiných iontů. Průběh reakce je tvořen třemi po sobě jdoucími kroky

lišícími se pouze teplotními podmínkami. Dvouvláknová DNA je nejprve denaturována na dvě jednovláknové templátové (matricové) molekuly DNA působením teploty $\sim 95^{\circ}\text{C}$. První kolo denaturace trvá déle, neboť je potřeba denaturovat celou genomovou DNA. Druhým krokem je tzv. annealing, v tomto kroku je reakční směs zchlazena na teplotu $35\text{-}65^{\circ}\text{C}$ (dle použitého primeru) a jsou připojeny specifické oligonukleotidové primery k 5' koncům cílové ssDNA. Třetím krokem je tzv. elongace, při níž dochází k syntéze nových vláken pomocí termostabilní DNA polymerasy ($60\text{-}72^{\circ}\text{C}$) ve směru $5' \rightarrow 3'$. V každém cyklu přibývá množství nasyntetizovaných sekvencí exponenciální řadou (2^n ; n = počet cyklů), jak je vidět na Obr. 2 (Brown, 2007).



Obr. 2. Exponenciální amplifikace v PCR (Vierstraete, 1999).

3.4.2 Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP - restriction fragment length polymorphism)

Jedná se o propojení dvou výše uvedených technik. Pomocí PCR se na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence (např. úsek genu). Tento fragment DNA se štěpí souborem restričních endonukleas (Botstein *et al.*, 1980). V případě bodové mutace v restričním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik fragmentů DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém, nebo PAGE gelu. Vizualizace DNA se provádí pomocí ethidium bromidu. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Mezi nevýhody patří to, že pravděpodobnost detekce mutace (polymorfismu) je relativně nízká a závisí na počtu použitých enzymů. Metoda je

vhodná pro geny s větším polymorfismem nebo nekódující sekvence (analýzy intronů), (Knoll a Vykoukalová, 2002).

3.5 Geny pro masnou užitkovost a efekt přítomných SNP na kvalitu masa

Odlišnosti na úrovni DNA způsobené přítomností jednonukleotidových polymorfismů mohou přispět při genetické charakterizaci populací hospodářských zvířat. Jejich detekce může pomoci v identifikaci možných hybridizačních (nebo mutačních) událostí tak, jako detekci evolučních trendů. Variace v oblasti exonu může vést ke změně kódované aminokyseliny, která ovlivňuje exprimovaný protein, zatímco změny v oblasti intronu nemění sekvence aminokyselin a jejich proteinů, avšak mohou hrát významnou roli při genovém sestřihu či při vazbě regulačních proteinů v průběhu transkripce. U hospodářských zvířat mohou být tyto malé změny v DNA spojeny s ekonomickými vlastnostmi, které jsou řízeny mnoha geny malého účinku. Z obecného genového modelu vyplývá, že pouze malé množství genů může být z velké části variabilní (Lande, 1981) a takovéto geny mají vliv na biologii daných znaků a stávají se kandidátními geny pro molekulární markerování. Další možností je také jejich propojení s možnými QTLs, které z velké části ovlivňují variabilitu daných znaků.

Mezi analyzované genetické markery mající významný vztah ke kvalitě masa a jatečné výtěžnosti patří např. calpain (*CAPN*) – vliv na křehkost, calpastatin (*CAST*), myostatin (*MSTN*), jehož mutace způsobuje svalovou hypertofii/hyperplazii, dvojí osvalení, ovlivňuje výtěžnost a skladbu JUT (jatečně upravené tělo), growth hormone (*GH*), jež má vztah k růstovým schopnostem, kompozici JUT a kvalitě masa, leptin (*LEP*) ovlivňující příjem krmiva, masnou užitkovost a ukládání tuku, thyroglobulin (*TG*), atd. (Ježková, 2010, Gazdová, 2007).

3.5.1 *Calpain (calcium activated neutral protease - CAPN) a jeho inhibitor Calpastatin (CAST)*

Křehkost masa je důležitým kritériem, které má vliv na chuťové vlastnosti hovězího masa a významně tak ovlivňuje celkové hodnocení jeho kvality u konzumentů. Z tohoto důvodu se tento znak stal klíčovým faktorem používaným při selekci na masnou užitkovost. Mnoho environmentálních faktorů může mít vliv

na finální křehkost masa, přesto se zdá, že genetický aspekt může také sehrávat významnou roli (Shackelford *et al.*, 1994). Za účelem determinovat vliv dědičnosti na postmortální křehkost byla realizována rozsáhlá studie s použitím segregující populace telat pro detekci QTL ovlivňujících tento znak. Výsledky této studie prokázaly přítomnost dvou lokusů majících vliv na křehkost masa testovanou pomocí Warner-Bratzlerova shear testu (WBSF). Jeden lokus byl mapován v centrální části chromozomu *BTA15* (Keele *et al.*, 1999) a druhý na konci telomerického úseku chromozomu *BTA29* (Casas *et al.*, 2000). Komparativní analýza naznačuje částečnou homologii těchto lokusů s lidským chromozomem *HSA11* (Barendse *et al.*, 1997; Kappes *et al.*, 1997), který byl zkoumán pro přítomnost genů ovlivňujících vývoj a metabolismus svalové hmoty s cílem nalézt možné kandidátní geny mající vliv na texturu masa.

V provedených studiích byl prokázán vliv kalcium-dependentního proteasového systému na procesu posmrtného zrání masa (Koohmaraie, 1996) a současně byl posuzován gen kódující velkou podjednotku mikromolekulárních aktivovaných calpainů, jako kandidátní gen pro QTL.

Rozpad myofibrilárních proteinů a v důsledku i křehnutí masa je ovlivňováno přítomností calpainového systému (*CAPN*) a jeho inhibitorů, jako je např. specifický endogenní inhibitor calpastatin (*CAST*).

Calpainy je superrodina 14 cysteinových proteas, přičemž systém calpainů kosterního svalstva se skládá minimálně ze tří proteas. Důležitou roli zde hraje i calpastatin, který funguje jako inhibitor calpainů a může tak negativně ovlivnit proces tenderizace (Koohmaraie and Geesink, 2006; Moudilou *et al.*, 2010). Neutrání proteasy aktivované Ca^{+2} ionty zvané calpainy, se vyskytují univerzálně ve všech živočišných buňkách. Ve svalu se calpainy nachází v cytoplasmě a buněčné membráně. Calpain II se většinou nachází v cytosolu, zatímco calpain I je v 70% vázán na myofibrily (Xu *et al.*, 2009). Dřívější výzkumy ukázaly, že calpain I je v 66% situován na Z-linii a zbytek je v I-pásmu (20%) a A-pásmu (14%). Calpain II je v 52% na Z-linii, v I-pásmu (27%) a A-pásmu (21%), (Koohmaraie, 1994; Kumamoto *et al.*, 1992). Calpain III je v největší míře lokalizován v blízkosti sarkomery poblíž Z- a M-linie. Lokalizace calpastatinu (konkrétně c inhibitoru calpainu) ve svalové buňce je podobná jako u calpainů (Nowak, 2011). Calpastatin je

další z ústředních složek ovlivňující postmortální zrání masa. Jeho vzrůstající aktivita vede k potlačení aktivity calpainu I, což má negativní vliv na křehkost masa.

Calpain I je kódovaný genem *CAPN1*, calpain II genem *CAPN2*, calpain III genem *CAPN3* a calpastatin genem *CAST*. Calpains I a II se skládají z velkých specifických katalytických podjednotek a malé regulační podjednotky kódovaných genem *CAPN4* (Moudilou *et al.*, 2010). Ve velké podjednotce lze rozlišit čtyři domény (I – IV) a v malé pak dvě domény (V a VI). Doména I funguje jako inhibitor proteolytických činností. Doména II má katalytickou funkci a ve IV doméně byly potvrzeny oblasti, které by mohly být zodpovědné za vázání Ca^{2+} iontů. Na zbytky glycinu bohatá doména V má silně hydrofobní charakter. Doména VI, podobně jako IV, obsahuje čtyři oblasti vázající ionty vápníku (Carragher a Frame, 2002). Calpain III je jeden polypeptid, jehož velká podjednotka je homologní s velkou podjednotkou calpainu I a II (Koochmaraie a Geesink, 2006). Calpastatin obsahuje 4 inhibiční domény, z nichž každá může inhibovat aktivitu calpainu. V těchto doménách jsou tři oblasti A, B, C schopné interagovat s calpainem. Region nacházející se mezi regionem A a C – region B, poté blokuje aktivní místo calpainu (Kemp *et al.*, 2010). Činnost calpainového systému závisí na mnoha faktorech, jako jsou pH, teplota a především na koncentraci vápenatých iontů (Nowak, 2011).

Geny kódující calpastatin (*CAST*) a calpain I (*CAPN1*) jsou považovány za důležité funkční kandidáty mající vliv na finální křehkost hovězího masa. *CAST* gen byl mapován na chromozomu *BTA7* (Bishop *et al.*, 1993) a gen *CAPN1* byl detekován v telometrickém úseku chromozomu *BTA29*, na stejné pozici, kde byla detekována přítomnost QTL vztahujících se ke křehkosti masa (Smith *et al.*, 2000). Kódující oblast *CAPN1* je tvořena 2 948 bp a vykazuje 91% identitu k lidskému *CAPN1*. Hypotetický protein skládající se ze 716 aminokyselin a ukazuje 97% podobnost (95% identitu) k lidskému *CAPN1*, jež je tvořen ze 714 aminokyselin. Strukturní analýza genu *CAPN1* prokázala přítomnost minimálně 19 exonů a 17 intronů, o celkové velikosti sekvence tohoto genu 11 055 bp (Smith *et al.*, 2000).

Nejnovější studie zaměřené na detekci faktorů regulujících genovou expresi calpastatinu ukazují, že je tento gen regulován na úrovni několika promotorů (1xa, 1xb, které jsou v tandemu a 1u, který je v oblasti 3' konce distálně k 1xa a 1xb) ovlivňujících 5 exon (Meyers a Beever, 2008). Rozdíly mezi transkripční aktivitou

těchto promotorů pro gen calpastatin mezi jednotlivými druhy i v rámci odlišných reakcí na stimulační podněty, mají pravděpodobně vliv na různou úroveň exprese calpastatinu, která přispívá k odlišnostem v křehkosti masa (Kemp *et al.*, 2010; Nowak, 2011).

S použitím techniky PCR/RFLP lze identifikovat polymorfismus v úsecích těchto genů, který má vliv na jejich aktivitu. Chung *et al.* (2001) detekoval s použitím restriktivního enzymu *XmnI* přítomnost nového štěpného místa v šestém intronu genu *CAST*, která může napomoci při genotypizaci jedinců s odlišnou calpastatinovou enzymatickou aktivitou. Smith *et al.* (2000) detekoval polymorfismus v podobě přítomnosti dvou jednonukleotidových záměn (SNPs) přítomných na 12 intronu genu *CAPNI*. Jiná studie prokázala přítomnost dvou jednonukleotidových substitucí (SNPs) v kódujících oblastech genu *CAPNI* mající vliv na křehkost hovězího masa. Tyto dvě jednonukleotidové mutace *CAPN316* (AF252504:g.5709C>G, v exonu 9) a *CAPN530* (AF248054:g.4558A>G, v exonu 14) způsobují AK záměnu, a to Gly316Ala a Val530Ile, která má vliv na křehkost masa u masných plemen (Page *et al.*, 2002, 2004; Corva *et al.*, 2007). Rincón a Medrano (2006) popsali PCR/RFLP techniku pro genotypizaci polymorfismu *CAPN530* za použití enzymu *PstI*. Další studie prokázala epistatické působení mezi dvěma QTLs (způsobené přítomností SNPs), jež spolu nejsou ve vazbě a ovlivňují stejný znak (křehkost masa), (Barendse *et al.*, 2007). Tato studie byla vypracována díky možnosti provedení genových testů na základě detekce SNP u genu *CAPN:c.947G>C* a u genu *CAST (CAST:c.155C>T)* pro tyto QTLs. Detekce těchto mutací může sloužit jako užitečný model pro studium vztahu gen-gen u QTL, jelikož tyto QTLs mají obecně malý fenotypický efekt.

Uvedené studie detekující SNPs či QTLs hrají v současnosti významnou roli, jelikož přímá role calpainu I a calpastatinu na postmortální zrání masa je dobře známa (Whipple *et al.*, 1990; Koohmaraie, 1996), avšak různé DNA varianty těchto genů (*CAPNI* chr. 29 a *CAST* chr. 7) ovlivňují výslednou křehkost masa (Drinkwater *et al.*, 2006; Morris *et al.*, 2006; Van Eenennaam *et al.*, 2007).

3.6 Technologické vlastnosti masa

Stavba masa a jeho chemické složení ovlivňuje jeho chemické i organoleptické vlastnosti. Mezi nejvýznamnější vlastnosti masa patří chutnost, textura, barva, vaznost a křehkost (Pipek, 1993). Kvalita masa se dá definovat jako součet nutričních, sensorických (barva, chutnost, vůně, šťavnatost a křehkost), technologických (vhodnost masa ke zpracování, podíl masa, tuku) a hygienicko-toxických vlastností (škodlivé látky, celkový zdravotní stav a welfare).

3.6.1 Barva masa

Barva masa je pro konzumenta na první pohled velmi nápadný znak, podle kterého posuzuje jakost masa a masných výrobků. Červenou barvu masa způsobují hemová barviva myoglobin a hemoglobin. Obsah hemových barviv v mase je individuální a v rámci různých živočišných druhů se pohybuje obvykle v rozmezí 100 až 10000 mg.kg⁻¹. Myoglobin je globulární protein, který je složen z jednoho bílkovinného řetězce (globinu) a jedné barevné skupiny (hemu), proto je schopen transportovat jen jednu molekulu O₂. Reverzibilně váže a přenáší kyslík v myocytech. Hemoglobin je červené krevní barvivo (chromoprotein), které zajišťuje transport O₂ z plic do tkání a transport CO₂ a protonů z periferních tkání do dýchacích orgánů. Jedná se o tetramerní protein složený ze čtyř peptidových řetězců a čtyř hemových skupin, reaguje podobně jako myoglobin. Podíl hemoglobinu přitom závisí na tom, jak kvalitně je maso vykrveno. Základem molekuly hemu, je porfyrinový skelet s centrálně vázaným atomem železa Fe²⁺. Změny barvy masa souvisejí právě s reakcemi na atomu železa. Buď dochází k vazbě určitých molekul na tento centrální atom, aniž by při tom došlo ke změně valence železa, nebo naopak dochází k oxidaci, kdy železo přejde na trojmocnou formu Fe³⁺. Hem se díky této vlastnosti podílí na redoxních reakcích různých metabolických drah. Mezi další vlastnost hemu patří jeho schopnost vázat dvouatomární plyny, kdy se jako ligand může na železo vázat molekulární kyslík (vzniká červený oxyhemoglobin), který chrání atom železa před oxidací. Při sníženém parciálním tlaku kyslíku převládne oxidace železa na Fe³⁺ a myoglobin se změní na hnědý až šedohnědý metmyoglobin. Následně pak dojde k oxidaci myoglobinu na metmyoglobin, přičemž z jedné molekuly oxyhemoglobinu se uvolní tolik kyslíku, kolik je potřeba k oxidaci čtyř molekul myoglobinu na metmyoglobin.

Při skladování masa dochází ke vzniku metmyoglobinu, jež podléhá následné oxidaci za vzniku zelených barviv choleglobinu, verdoglobinu a verdohemu. Následuje transformace na biliverdin (zelené barvivo), který redukuje na bilirubin (červený). Tepelné opracování masa způsobí denaturaci globinu a změnu barvy masa na hnědou až šedohnědou. Barviva tepelně opracovaného masa se obecně nazývají hemichromy. Díky přidávku dusitanů si masné výrobky udržují růžovou barvu (Pipek, 1993).

3.6.2 Vaznost

Schopnost masa vázat vlastní i přidanou vodu při působení nějaké síly či jiného fyzikálního namáhání, je definovaná jako vaznost a patří mezi nejvýznamnější technologické vlastnosti (Pipek, 1993). Vaznost se obvykle vyjadřuje jako podíl vody vázané (hydratační a imobilizovaná) k celkovému obsahu vody v mase. V libové svalovině je obsaženo až 75% vody. Ta je ve zde vázána různým způsobem a různě pevně. Nejpevněji je vázána tzv. hydratační voda (voda vázána v mono a multimolekulární vrstvě na hydrofilní skupiny proteinů). Další podíl vody zahrnuje část imobilizovanou mezi jednotlivými strukturálními částmi svaloviny a zbytek je volně pohyblivý v mezibuněčných prostorech. Vaznost ovlivňuje celá řada faktorů: intravitální vlivy, pH, obsah solí a některých iontů, stupeň desintegrace vláken, průběhem posmrtných změn v mase, atd křehkost (Pipek, 1993).

Zásadní význam pro vaznost má náboj bílkoviny, který je právě hodnotou pH ovlivňován. Při hodnotě pH izoelektrického bodu (přibližně 5,0) lze pozorovat výrazné minimum vaznosti. Pomocí okyselení či zalkalizování svaloviny směrem od izoelektrického bodu, dochází ke změně disociace funkčních skupin bílkovin a změní se rozložení nábojů na molekule bílkoviny. Díky následnému rozštěpení některých z příčných elektrostatických vazeb dojde k oddalování peptidových řetězců, což umožní další imobilizaci vody ve vzniklém prostoru. V mase a masných výrobcích se pH pohybuje v rozmezí hodnot 4 až 7 (nejčastěji 5,5 až 6). Vliv solí na vaznost masa závisí na vzájemných interakcích iontů solí, iontů bílkovin a pH. Anionty na kyselé oblasti od izoelektrického bodu způsobují zahuštění bílkovinné struktury s následným poklesem vaznosti, zatímco na bazické straně od izoelektrického bodu naopak ruší přitažlivé síly skupin sousedních peptidových řetězců, což vaznost zvyšuje. Vliv kationtů má přesně opačný účinek. Z intravitálních

vlivů na vaznost masa lze zmínit vliv pohlaví, věku a způsobu chovu. Během posmrtných změn dochází k výraznému kolísání hodnot vaznosti. Ta, nejprve vlivem okyselení a tvorbě pevné struktury během *rigor mortis* klesá, a následně se zvyšuje během procesu zrání masa (Pipek, 1993). Mezi klasické metody analýzy vaznosti masa patří lisovací metoda podle Grau-Hamma, dále pak zjišťování objemu uvolněné masné šťávy, či hodnocení ztráty masné šťávy samovolným odkapáváním nebo hodnocení schopnosti udržet vodu při tepelné úpravě (Ingr, 1996).

3.6.3 Křehkost masa

Z hodnocení spotřebitelů vyplývá, že křehkost masa je považována za jednu z nejvýznamnějších vlastností kvality masa, přičemž z průzkumů vyplývá, že spotřebitelé jsou ochotni zaplatit vyšší cenu hovězího masa, pokud bude zaručena odpovídající křehkost (Nowak, 2011). Ta je ovlivňována různými faktory před porážkou (věk, pohlaví, plemeno, výživa, stupeň stresu před porážkou), po porážce (procesy *rigor mortis* a zrání masa), jakož i strukturou, stavem a chemickým složením masa (Destefanis *et al.*, 2008). Problém křehkosti se týká hlavně masa hovězího. To vyžaduje nejméně 14 dnů skladování v chladicích podmínkách pro získání finální křehkosti, zatímco u vepřového masa stačí 5 až 7 dnů a jehněčího 7 až 10 dnů (Koohmaraie a Geesink, 2006). Koohmaraie a Geesink (2006) uvádí, že během procesu zrání masa dochází ke změnám v mikro a ultrastruktuře svalových vláken (oslabení myofibril, fragmentace, změny v oblasti Z-linie a I-pásma), degradaci hlavní struktury cytoskeletonu a také k degradaci myofibrilárních a cytoskeletárních proteinů. Tyto změny vedou k získání finální křehkosti masa. Mnoho studií vede k závěru, že křehkost závisí na vlivu některých enzymů, jako jsou cathepsiny a calpainy. Jiné studie zase výslednou křehkost připisují vlivu proteasomů a další se přiklání ke kaspasám. (Kemp *et al.*, 2010).

Nicméně mnoho vědců připisuje tuto roli systému calpainů (Kemp *et al.*, 2010; Nowak, 2011). Proto je tato studie zaměřená na analýzu calpainu, resp. jeho vlivu na výslednou křehkost masa. Hlavní úlohu v posmrtné proteolýze a křehnutí masa tedy hraje systém calpainů (především calpain I a calpastatin) a v neposlední řadě též proteasomy a kaspasy (Nowak, 2011). Ačkoliv bylo provedeno mnoho výzkumů k objasnění mechanismů křehnutí masa a faktorů zodpovědných za iniciaci a průběh tohoto procesu, neexistuje zatím studie, která by kompletně objasnila

veškeré principy tohoto komplikovaného procesu. Existují dvě základní teorie - enzymatická a neenzymatická. Mnoho studií dokládá, že za tenderizaci jsou zodpovědné právě enzymy (proteasy) a podporuje tak enzymatickou teorii křehnutí masa. Aby se mohl proteasový systém podílet na posmrtné proteolýze a křehnutí masa, musí splňovat některá základní kritéria: proteasy musí být endogenní k buňkám kosterní svaloviny, musí být schopny napodobit postmorální změny v myofibrilách *in vitro* a musí mít přístup k myofibrilám ve tkáni (Nowak, 2011).

Množství výzkumů potvrdilo ve svalech přítomnost proteolytických systému, které se mohou podílet na posmrtné proteolýze a tenderizaci: systém calpainů, cathepsinů a proteosomů (hlavně pak MPC - multicatalytic proteinase complex, nazývaný 20S proteasom), (Dransfield *et al.*, 1992a,b; Koohmaraie, 1996; Koohmaraie a Geesink, 2006; Kemp *et al.*, 2010).

Křehkost masa se hodnotí buď sensoricky nebo objektivně jako síla ve stříhu [N], naměřená podle Warner-Bratzlerova shear testu (viz. obr. 3.), křehkost (Pipek, 1993).



Obr. 3. Warner-Bratzlerův shear test (Stable micro systems at the forefront of fish texture testing, 2011).

Mechanismus proteolytických funkcí calpainu doposud nebyl zcela objasněn. Velmi často jsou vědomosti o tomto mechanismu získané pomocí dílčích důkazů založených na měření aktivity pročištěného enzymu získané prostřednictvím

proteinu, funkcí inhibitorů a aktivátorů, změnami koncentrace a lokalizace intracelulárního calpainu a calpastatinu či účinků aktivovaného calpainu v izolovaných buňkách. Při studiu produktů degradace přítomných proteinů ve svalech během zrání a produktů, které jsou produkovány během *in vitro* inkubace myofibril s calpainem, lze určit vliv calpainů na proces tenderizace.

Činnost calpainového systému ovlivňuje množství faktorů, např. pH, teplota a především koncentrace vápenatých iontů (Nowak, 2011). Jako první navrhl teorii o mechanismu tenderizace masa Dransfield (1992a, c, 1994a, b). Podle tohoto autora není calpain I v mase po porážce aktivní právě kvůli nízké koncentraci vápenatých iontů, která v sarkoplasmě dosáhne hodnot menších než 10^{-7} mol. Aktivace calpainu I se objevuje asi 6 hodin po porážce (pH 6.1 až 6.3), následně koncentrace vápenatých iontů vzroste na hodnotu 10^{-4} mol. Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v sarkoplasmě probíhá prostřednictvím aktivace kalciových pump nebo prostřednictvím proteolytického působení na sarkoplazmatické retikulum (Dransfield, 1992a, c, 1994a, b). Podle jiných výzkumů potřebuje, calpain I ke své aktivaci 3 až 50 mmol/l iontů vápníku a calpain II 0,4 až 0,8 mmol/l vápníku k dosažení poloviny své maximální aktivity. Koncentrace iontů vápníku v živém svalu dosáhne 0,2 mmol/l, a to je úroveň mnohem nižší než úroveň nezbytně nutná k aktivaci calpainu I (Kurebayashi *et al.*, 1993).

Po porážce se koncentrace volného vápníku v buňce postupně se zvyšuje až na 100 mmol/l (Jeacocke, 1993). Hopkins a Thompson (2001) dokázali, že koncentrace vápenatých iontů po porážce při pH 5,5 v *longissimus lumborum* (LL) a *longissimus thoracis* (LT) ovcí dosáhne 110 mmol/l, což bylo dostatečné pro aktivaci calpainu I. Aktivace enzymu pod vlivem vápenatých iontů způsobuje hydrolýzu obou dílčích jednotek. V důsledku hydrolýzy, velká podjednotka změní svou hmotnost v rozmezí 80 do 76 kDa, zatímco menší podjednotka od 30 do 18 kDa (Dransfield, 1999; Moudilou *et al.*, 2010). Další autolýza způsobuje vznik fragmentů z velkých podjednotek, které mají ještě menší hmotnost a ztrácí enzymatickou aktivitu. Byly určeny i optimální podmínky pro aktivaci calpainů. Při stanovení *in vitro* je to: pH 7.2 až 7.8 a teplota 25 °C (Dransfeld, 1999; Kanawa *et al.*, 2002). Nicméně, během zrání, je maso drženo v mnohem nižších teplotách (chlazené) a pH dosahuje kolem 5.5 až 5.7. Výzkumy ukazují, že čisté myofibrily jsou degradovány calpainem I při teplotě 4 °C a pH 5,6 v přítomnosti 100 mmol/l chloridu vápenatého

(Huff-Lonergan *et al.*, 1996). Thomson *et al.* (1996) ukázali, že aktivita calpainu I klesala několik prvních dní po porážce a korelovala se zvyšováním výsledné křehkosti. Studium produktů degradace proteinů přítomných ve svalu během zrání, a také produktů, které vznikají v průběhu *in vitro* inkubace myofibril s calpainy, lze určit vliv calpainů na proces tenderizace.

Účinky calpainů na svalové myofibrily jsou dobře známé. Díky vlivu calpainů dochází k odstranění Z linie, což způsobuje degradaci myofibril. Calpain uvolní ze Z linie α -actinin, aniž by způsobil jeho degradaci, zato však způsobí degradaci tropomyosinu, T a I troponinu a základních cytoskeletárních proteinů (Koohmaraie, 1992, 1994; Homma *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1995a; Takahashi, 1996; Tornberg, 1996; Koohmaraie a Geesink, 2006; Kemp *et al.*, 2010).

Stupeň degradace těchto cytoskeletárních proteinů určuje křehkost masa. Předpokládá se, že systém calpainů v kosterních svalovině, odpovědný za tenderizaci masa může být tvořen z dalších enzymů, které jsou stále ještě neznámé (Hanna *et al.*, 2008; Moldoveanu *et al.*, 2008; Nowak, 2011).

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

Pro tuto studii bylo vybráno 162 jatečných býků plemene českého strakatého skotu pocházejících z komerčních chovů. Průměrný věk býků při porážce dosahoval 551 dní. Analyzovány byly vzorky krve těchto jedinců odebrané v období od roku 2007 do roku 2009. Odběry krve proběhly do zkumavek obsahujících roztok EDTA (pH = 8) a byly uskladněny při teplotě - 20° C.

4.2 Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována pomocí klasické „proteinase“ metody dle navrženého postupu ze vzorků srážlivé krve vybraných býků.

Do eppendorfky bylo převedeno 50 µl krve a přidáno 500 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8). Vzorek byl následně promíchán a stočen při 14000 rpm po dobu 5 min. Po odstranění segregovaného supernatantu, bylo opětovně přidáno 500 µl TE pufru a celý postup následně opakován třikrát. Po odstranění supernatantu odděleného po posledním stáčení, se k výslednému peletu leukocytů přidalo 100 µl lyzační směsi (20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,5% Tween 20; proteinasa K (20 mg/ml)). Následně se vzorky inkubovaly v termostatu přes noc, při stálé teplotě 54 °C. Po inkubaci se vzorek opatrně promíchal špičkou a výtěžek izolované DNA se ověřoval pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu. Do každé jamky bylo napipetováno 5,0 µl vzorku obarveného 5,0 µl bromfenolové modři.

4.3 PCR/RFLP

Analýza vzorků metodou PCR/RFLP proběhla dle metodiky – Calpain, mutace CAPN530 (Rincón a Medrano, 2006).

4.3.1 PCR

Sekvence primerů použitých pro PCR (5'–3'), (Rincón a Medrano, 2006) byla následující:

Forward primer (1): CGT TTC TTC TCA GAG AAG AGC GCA GGG A

Reverse primer (2): CCT GCG CCA TTA CTA TCG ATC GCA AAG T

Pomocí PCR proběhla *in vitro* amplifikace požadovaného úseku DNA. Prvním krokem byla příprava reakční směsi, viz. tab. 1.

komponent	množství
<i>Taq</i> pufr	2,0 µl
25 mM MgCl ₂	2,0 µl
dNTP's	2,5 µl
primer 1	1,0 µl
primer 2	1,0 µl
DNA	2,0 µl
<i>Taq</i> DNA polymerasa (1U/µl)	2,0 µl
H ₂ O	12,5 µl
Celkový objem	25,0 µl

Tab. 1. PCR - reakční směs pro 1 vzorek

Pro zvýšení výnosu PCR, byl oproti původnímu protokolu nahrazen 1,0 µl vody 1,0 µl DMSO. Veškerá příprava PCR master mixu i manipulace s *Taq* polymerasou probíhaly na chladícím stojánku. Připravený master mix (*Taq* pufr, MgCl₂, dNTP's, primer 1, primer 2, H₂O) byl převeden do předem popsáných, sterilních eppendorfek a následně bylo do každé z nich přidáno 2,0 µl izolované DNA. Vzorky byly vloženy do termocykleru (Biometra T3000 thermocycler) a navolil se požadovaný program (viz. Příloha 2.). Po počáteční asi 2 min trvající denaturaci (sloužící k inaktivaci PK) se přidala naředěná *Taq*-polymerasa a následně započala vlastní PCR reakce. Ta, se svými 35 cykly, trvala přibližně 2,5 hod, viz. tab. 2. Po ukončení reakce udržoval termocykler vzorky při konstantní teplotě 4° C.

Výtěžek amplifikované DNA se ověřoval elektroforézou na 2,5% agarosovém gelu obarveným ethidium bromidem a vizualizací pod UV světlem. Do každé jamky

bylo napipetováno 5,0 µl vzorku smíchaného s 5,0 µl bromfenolové modři, přičemž v první jamce byl pro kontrolu pouštěn marker *PUC19 DNA/MspI (Hpa II)*. Pozitivní výsledek amplifikace prezentovala přítomnost bandu o velikosti 341 bp.

počáteční denaturace	95° C	pauza	Taq polymerasa
denaturace	95° C	45 s	35 cyklů
annealing	64° C	1 min	
annealing	72° C	1 min	
finální extenze	72° C	5 min	
	4° C	pauza	

Tab. 2. Průběh PCR reakce

4.3.2 RFLP

Produkty PCR získané použitím standardního protokolu, byly štěpeny pomocí restriční endonukleasy *PsyI*. Ke každému vzorku, se přidalo určené množství *PsyI* a kompatibilního pufru, jak je uvedeno v tab. 3. S enzymy se opět manipulovalo pouze na chladícím stojánku. Následovala inkubace při 37 °C přes noc. Naštípané fragmenty byly rozděleny pomocí elektroforézy na 3% agarózovém gelu obarveným ethidium bromidem. Opět se do každé jamky pipetovalo 5,0 µl vzorku obarveného bromfenolovou modří v poměru 1:1, přičemž v první jamce se pouštěl marker *PUC19 DNA/MspI (Hpa II)*. Výsledky elektroforézy byly vizualizovány pod UV světlem.

komponent	množství
Restriční endonukleasa <i>PsyI</i> (10 U/µl)	1,0 µl
Pufř	1,7 µl
PCR produkt	20,0 µl
Celkový objem	22,7 µl

Tab. 3. RFLP - reakční směs pro 1 vzorek

Následná genotypizace byla stanovena dle následujících velikostí jednotlivých fragmentů: 341 bp (alela A), 195 a 146 bp (alela G).

4.3.3 Elektroforéza v agarosovém gelu

Agarosový gel byl připraven dle běžné metodiky v závislosti na stanovené koncentraci, dle tab. 4.

%	objem	agarosa	1x TBE	ethidium bromid
1	100 ml	1,0 g	100 ml	14 µl
2,5	100 ml	2,5 g	100 ml	14 µl
3	100 ml	3,0 g	100 ml	14 µl

Tab. 4. Příprava agarosových gelů o různé koncentraci

Elektroforéza byla prováděna v horizontální elektroforézní aparatuře za následujících podmínek: 1%, 2% gel – 110 V po dobu 40 min, 3% gel – 80 V po dobu 60 min. Jako elektrolyt do elektroforetické vany byl vždy použit 1x TBE pufr. Do každé jamky bylo napipetováno 5,0 µl vzorku a 5,0 µl barvy. K odečtení výsledků byl použit marker *PUC19 DNA/MspI (Hpa II)*.

Složení 1x TBE pufu:

180 g TRIS

55 g kyseliny borité

800 mL destilované vody

40 ml EDTA

Odměřené reagenty byly doplněny destilovanou vodou do objemu 1l.

4.4 Stanovení křehkosti masa

Pro stanovení křehkosti masa u jednotlivých býků bylo zvoleno metody hodnocení velikosti střížné síly pomocí Warner-Bratzlerova shear testu (viz. Příloha 3.). Výsledky tohoto testu byly získány ve spolupráci s katedrou speciální zootechniky Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, kde byly stanoveny. K analýze byly využity vzorky *musculus longissimus dorsi*.

Analyzovány byly vzorky syrového a grilovaného masa vždy 1., 14. a 28. den po porážce.

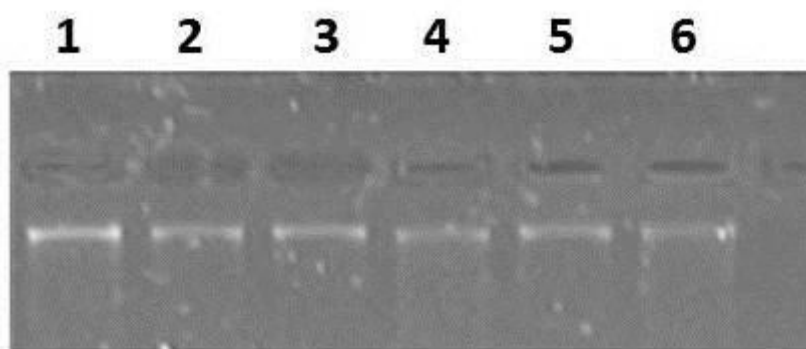
4.5 Statistické vyhodnocení

Výsledky genotypizace získané metodou PCR/RFLP byly následně statisticky vyhodnoceny. Byly určeny frekvence genotypů a alel v námi studovaném souboru zvířat a spočtena Hardy-Weinbergova rovnováha.

Dále byl vyhodnocen vztah mezi genotypy a velikostí střížné síly jako ukazatelem technologické vlastnosti masa – křehkosti. K vyhodnocení tohoto vztahu bylo využito funkce ANOVA v programu Statistica.

5. Výsledky

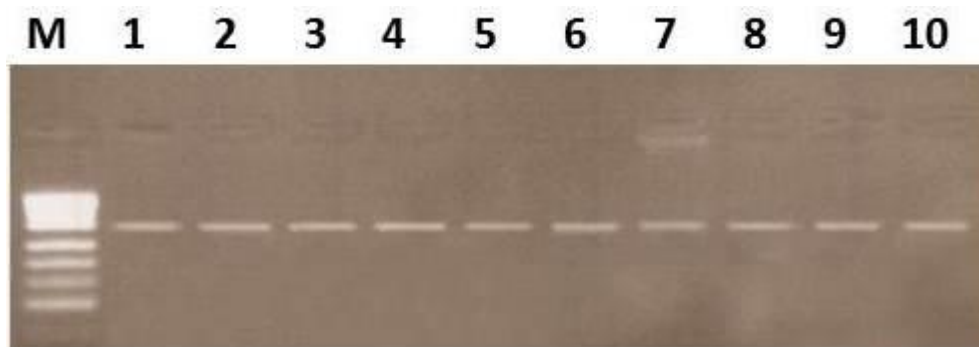
V diplomové práci byly provedeny genetické analýzy lokusu *CAPNI* u 162 jatečných býků plemene českého strakatého skotu, pocházejících z komerčních chovů v České republice. Ze vzorků krve těchto býků byla následně pomocí klasické proteinasové metody vyizolována DNA. Při izolaci DNA nebyly ani u jednoho ze vzorků zjištěny podstatné problémy a izolace byla u všech vzorků úspěšná, jak lze spatřit na obr. 4.



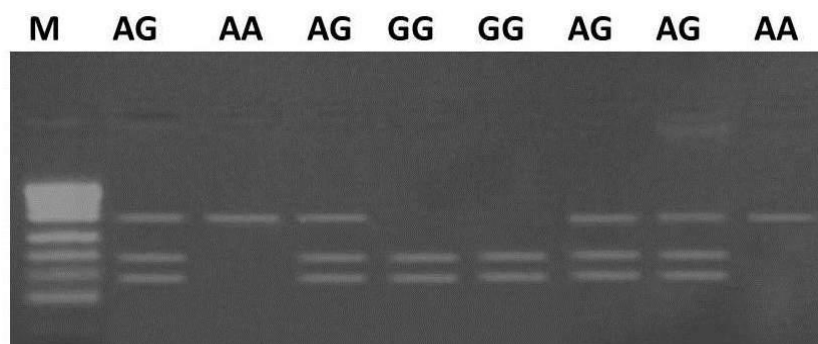
Obr. 4. Vizualizace výtěžku genomové DNA

Metodou PCR/RFLP byla provedena genotypizace těchto vzorků v lokusu *CAPNI*. Po úspěšné amplifikaci PCR produktu byly získány fragmenty o délce 341 bp (viz. obr. 5.).

Výsledkem celé metody bylo stanovení genotypů. U jedinců s genotypem *AA* byl na agarosovém gelu po elektroforéze přítomen 1 fragment o délce 341 bp. U homozygotních jedinců *GG* se na gelu nacházely 2 fragmenty o délkách 195 a 146 bp. Heterozygoté *AG* byli prezentováni přítomností 3 fragmentů o délkách 341, 195 a 146 bp, které jsou vidět na obr. 6.



Obr. 5. Vizualizace výtěžku PCR



Obr. 6. Vizualizace PCR/RFLP

5.1 Frekvence genotypů a alel

Ve studovaném panelu býků bylo zjištěno 11 homozygotů *AA*, 89 heterozygotů *AG* a 62 homozygotů *GG*. Nejméně četným byl tedy homozygotní genotyp *AA* s frekvencí 0,068. Ze zbývajících genotypů byl jako méně četný s frekvencí 0,383 zastoupen homozygotní genotyp *GG*. Nejčetnější genotyp *AG* se v panelu testovaných zvířat vyskytoval s četností 0,549. Ze získaných výsledků lze usuzovat na velmi malé zastoupení homozygotních jedinců s ohledem na převažující výskyt heterozygotů. Z hlediska zastoupení jednotlivých alel je zřejmá výrazná převaha alely *G*, která se v populaci vyskytovala s frekvencí 0,657. Frekvence výskytu alely *A* byla 0,343. Genotypové a alelické frekvence jsou uvedeny v tab. 5.

Frekvence	Genotyp			Alela	
	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>
absolutní P	11	89	62	111	213
relativní	0,068	0,549	0,383	0,343	0,657
očekávaná (absolutní) O	19,059	73,014	69,927		
d=(P-O)	-8,059	15,986	-7,927		
d ² / očekávaná (absolutní)	3,408	3,500	0,899		
Chí kvadrát χ^2	7,807				

Tab. 5. Genotypové a alelické frekvence v námi sledované populaci

Pro výpočet testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy byl pro gen se třemi genotypy a dvěma alelami zvolen stupeň volnosti $df = 2$ a hladina významnosti $p < 0,01$.

Hladina významnosti	Stupeň volnosti df				
	1	2	3	4	5
0,05	3,84	5,99	7,81	9,48	11,07
0,01	6,35	9,21	11,34	13,27	15,08

Tab. 6. Tabulkové hodnoty chí kvadrátu

Populace je pro daný lokus v genetické rovnováze, pokud platí $\chi^2_{\text{tab.}} > \chi^2_{\text{vyp.}}$. Mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi byl zjištěn průkazný rozdíl. Vzhledem k tomu, že hodnoty $\chi^2_{\text{vyp.}} (7,807) > \chi^2_{\text{tab.}} (9,21)$, populace pro daný lokus je v genetické rovnováze.

5.2 Vyhodnocení vztahu mezi genotypy a hodnotami pro sílu stříhu

Pomocí metody ANOVA byly statisticky vyhodnoceny vztahy mezi jednotlivými genotypy v lokusu *CAPNI* a silou ve stříhu, jako měřitelnou hodnotou technologické vlastnosti masa – křehkosti. Byly testovány vztahy mezi genotypy a silou ve stříhu u syrového a grilovaného masa, a to 1., 14. a 28. den po porážce. Průměry jednotlivých skupin jsou vypsány v tab. 7 a 8.

Z tabulky 7. lze vyčíst, že nejvyšší průměrná hodnota síly ve stříhu u syrového masa byla zjištěna u genotypu AA 1. den po porážce. Nejnižší průměrná hodnota v téže skupině byla zaznamenána u genotypu AG opět 1. den po porážce. Ve skupině sledování 1. den po porážce byl tedy zjištěn největší rozdíl mezi nejvyšší a nejvyšší průměrnou hodnotou síly stříhu u odlišných genotypů. Nejvyšší rozdíl mezi průměrnými hodnotami síly stříhu v závislosti na genotypu byl u syrového masa vypočten ve 14. dni po porážce.

		Průměr u syrového masa		
Výběr	Počet	1. den	14. den	28. den
<i>GG</i>	61	4,411193	4,42702	4,603349
<i>AG</i>	89	4,198768	4,47553	4,699401
<i>AA</i>	11	4,981528	4,611176	4,921254

Tab. 7. Výsledky ANOVA – průměrné hodnoty u jednotlivých genotypů

Dle údajů uvedených v tabulce 8. lze říci, že nejvyšší průměrná hodnota síly stříhu ve skupině grilovaného masa byla zjištěna u genotypu *GG* 1. den po porážce. Nejnižší průměrná hodnota v téže skupině byla stanovena u genotypu *AG* 28. den po porážce. V závislosti na době zrání lze říci, že nejvyrovnanější průměrné hodnoty síly stříhu mezi jednotlivými genotypy vykazovala skupina měřená 1. den po porážce. Největší rozdíly mezi průměrnými hodnotami síly stříhu nalezneme ve skupině s dobou zrání 28 dní.

		Průměr u grilovaného masa		
Výběr	Počet	1. den	14. den	28. den
<i>AA</i>	11	19,84203	12,66365	12,13675
<i>AG</i>	89	19,47584	11,97355	10,81663
<i>GG</i>	61	20,44398	12,99491	11,35123

Tab. 8. Výsledky ANOVA – průměrné hodnoty u jednotlivých genotypů

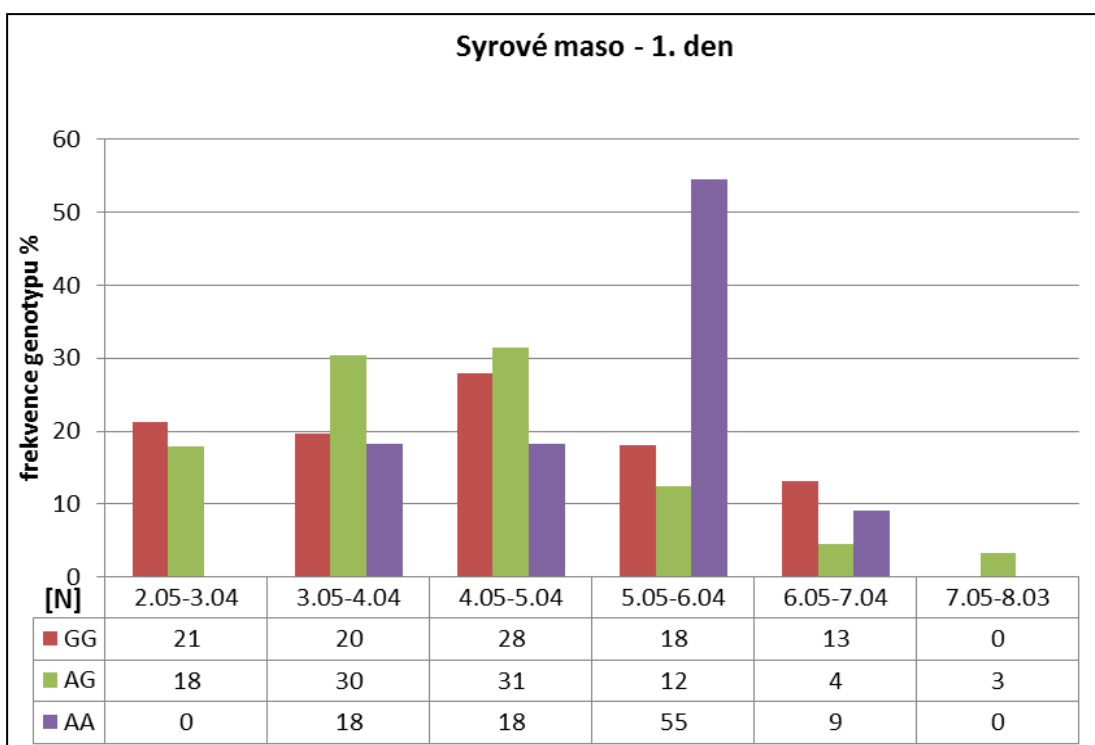
V případě syrového masa byl zjištěn významný vliv genotypu v lokusu *CAPNI* pouze u síly stříhu měřené u vzorků 1. den po porážce ($P < 0,01$), viz. graf 1. Hodnoty střížné síly dosahovaly u genotypu *AG* hodnot v průměru o 5,06 % nižších než u genotypu *GG* a o 18,64% nižších než vykazoval genotyp *AA*. Z vypočítaných hodnot lze konstatovat, že z hlediska naměřené střížné síly vychází genotyp *AG* 1. den po porážce nejlépe.

Výsledky analýzy ANOVA jsou uvedeny v tabulce 8. U vzorků měřených 14. a 28. den po porážce nebyl zjištěn žádný vliv genotypu na sílu ve stříhu, potažmo křehkost masa.

Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Mezi výběry	32,92226	2	16,46113	10,37449	6,03E-05	3,056366
Všechny výběry	238,004	159	1,586693			
Celkem	270,9262	161				

Tab. 9. Výsledky ANOVA u syrového masa 1. den po porážce

U masa grilovaného nebyl zjištěn žádný významný vliv genotypu na sílu stříhu ani v jednom dni měření. Lze tedy říci, že vliv genotypu na křehkost grilovaného masa je u našeho panelu zvířat naprosto minimální. Lépe řečeno, nelze jej statisticky prokázat.



Graf 1. Srovnání průměrných hodnot síly ve stříhu všech genotypů 1. den po porážce

Pro srovnání dosahovaných hodnot střížné síly mezi jednotlivými genotypy 1. den po porážce u syrového masa, byl vytvořen histogram četností (viz. graf 1.). Hodnoty naměřené pomocí WBSF [N] byly rovnoměrně rozděleny do šesti intervalů. Poté byly do histogramu zaneseny hodnoty procentuálního výskytu jednotlivých genotypů pro každý interval naměřených hodnot. Z histogramu je např. dobře patrný nulový výskyt genotypu AA v intervalech naměřené střížné síly 2,05 až 3,04 N a 7,05 až 8,03 N, stejně jako nejvyšší výskyt tohoto genotypu v hodnotách 5,05 až 6,04 N.

6. Diskuze

V diplomové práci byla metodou PCR/RFLP provedena genotypizace u 162 jatečných býků plemene ČESTR za použití markeru *CAPN530*. Ve studované populaci býků bylo zjištěno 11 homozygotů *AA*, 89 heterozygotů *AG* a 62 homozygotů *GG*.

Analýza frekvence genotypů a alel ve vybraném lokusu *CAPN1* poskytla výsledky, jež ukázaly výraznou převahu genotypů, obsahujících alelu *G* – tj. homozygotního genotypu *GG* a heterozygotů *AG*. Podíl těchto dvou genotypů činil 93,2 % z celé populace. Těmto výsledkům odpovídají i frekvence jednotlivých alel. Zde je převažující alelou alela *G* s frekvencí 0,657. Alela *A* potom byla zastoupena v populaci s frekvencí 0,343. Vzhledem k velmi nízké četnosti alely *AA*, a tím i ze statistického hlediska příliš malého souboru jedinců s touto alelou, by bylo nejvhodnější homozygoty *AA* do celkové statistické analýzy nezahrnovat, jako to udělali např. Corva *et al.* (2007), který výzkum prováděl na skupině volů plemene Hereford, Angus a jejich kříženců s min 80% podílem těchto plemen. Velmi vzácný výskyt genotypu *AA* pro *CAPN530* dokládá ve své práci i Pinto *et al.* (2010). Ten ve své studii u skotu Nellore hodnotu pro výskyt genotypu *AA* jako menší než 1 % ve studované populaci.

Výsledky provedených analýz jsou velmi podobné výsledkům, kterých dosáhl ve své studii Page *et al.* (2004). V této práci se zabýval dvěma odlišnými populacemi, z nichž jednu tvořil panel 362 potomků 23 býků registrovaných u American Simmental Association (ASA) a druhou potom představovala populace Germ Evaluation Cycle VII (Cycle VII) z USDA Meat Animal Research Center, v níž byli zastoupeni potomci plemenných býků 7 vybraných plemen masného skotu (konkrétně Angus, Charolais, Gelbvieh, Hereford, Limousin, Red Angus a Simmental). U populace ASA byla frekvence alely *A* stanovena na hodnotu 0,37, což je velmi blízko výše zjištěným hodnotám. Převažující alelou tedy v populaci ASA stejně jako v mnou studované populaci byla alela *G*. U populace Cycle VII byla převaha alely *G* ještě výraznější. Zde měla menšinová alela *A* zastoupení pouze ve 28 %. Lze tedy říci, že výsledky frekvencí alel v mnou studované populaci se výrazně shodují s výsledky u populace ASA a poněkud liší od výsledků populace Cycle VII.

Tento fakt může mít původ v plemenném zastoupení u jednotlivých populací. Námí studovaná populace a populace ASA zahrnuje jedince simentálského plemene, což je plemeno kombinované. Populace Cycle VII je složena ze zástupců různých plemen, s převahou plemen masných.

Curi *et al.* (2009) provedl genotypizaci *CAPN530* u 6 genetických skupin skotu (Nelore, Angus x Nelore, Canchim, Brangus (9/16 *B. taurus* + 7/16 *B. indicus*), Braunvieh (3/4 *B. taurus* + 1/4 *B. indicus*, Rubia Gallega x Nelore). Frekvence alely *A* byla výrazně nižší než u alely *G*, přičemž nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve frekvencích alel mezi jednotlivými genetickými skupinami. Genotyp *AA* měl nejnížší výskyt napříč všemi skupinami. Genotyp *GG* převažoval ve všech skupinách, pouze ve skupině Rubia Gallega x Nelore měl nejčastější četnost výskytu genotyp *AG*. V rozporu s dřívější studií, jejíž výsledky ukázaly naprostou absenci alely *A* u bráhmanského skotu *B. indicus* (Casas *et al.*, 2005), Curi *et al.* (2009) prokázal 21.9% frekvenci alely *A* u Nelore *B. indicus*. Výsledky dosažené analýzou napříč plemeny i skupinami plemen (Page *et al.*, 2004; White *et al.*, 2005; Corva *et al.*, 2007) ukazují, že frekvence alely *A* u *CAPN530* dosahuje nižších hodnot. A to jak u *B. taurus*, tak u *B. indicus* (Curi *et al.*, 2009). Nicméně, žádná z výše uvedených studií, u nichž byla cílovými skupinami plemena *B. taurus*, neprokázala lokus jako monogenní, s nulovým výskytem alely *A*, jak je tomu u plemen *B. indicus*.

Pokud se zaměříme na vztah mezi genotypem v potenciálním markeru *CAPN530*, prokázala naše studie statisticky významný vztah mezi genotypem a hodnotou síly stříhu u syrového masa 1. den po porážce. Existuje celá řada studií, které námí stanovené výsledky potvrzují. Takovými studiemi jsou například práce Page *et al.*, (2002, 2004) a Corva *et al.* (2007). Ti rovněž prokázali evidentní asociaci mezi polymorfismem a křehkostí masa. Zajímavé je, že mezitím co Page *et al.* (2002, 2004) hlásí příznivý efekt alely *G* na křehkost masa, Corva *et al.* (2007) prokázal nižší, a tedy žádanější výsledky stříhové síly v závislosti na genotypu *AG* ve srovnání s *GG*. To je v souladu i s naším výzkumem, jež prokázal hodnoty střížné síly u syrového masa 1. den po porážce u genotypu *AG* v průměru o 5,06 % nižší než u genotypu *GG*. Tento fakt je o to pozoruhodnější, že práce Page *et al.* (2002) využívala jako studovaného panelu plemenných býků amerického simentálského plemene, tedy plemene výrazně příbuzného s námí studovaným českým strakatým skotem. Corva *et al.* (2007) oproti tomu pracoval výhradně s masnými plemeny.

Přesto jsou výsledky studie na masných plemenech podobnější našim výsledkům, než studie prováděné na plemeni stejného užitkového typu.

White *et al.* (2005) došel k závěrům, že současné studie neprokázaly výraznou asociaci mezi genotypem *CAPN530* a křehkostí masa. V současnosti se využívá i jiných markerů, jako například SNP *CAPN4751*, který ukázal velký potenciál jako ukazatel křehkosti masa skotu *B. taurus*, *B. indicus* a *B. indicus* x *B. taurus* (White *et al.*, 2005; Van Eenennaam *et al.*, 2007).

Allais *et al.* (2011) prováděl obdobnou studii, ovšem s využitím více markerů (tří pro *CAST* a čtyř pro *CAPNI*). Asociační analýza zahrnovala populaci tří masných plemen: Charolaise, Limousin a Blond d'Aquitaine. Výsledky genotypizace odpovídaly ostatním studiím, kdy genotyp *AA* dosahoval nejmenší frekvence výskytu napříč všemi třemi plemeny. Největší zastoupení pak vykazoval u plemen Limousin a Blond d'Aquitaine genotyp *AG*, pouze u plemene Charolaise měl největší frekvenci výskytu genotyp *GG*. Frekvence výskytu početnější alely *G* dosahovala hodnot 76% u Charolaise a 64% u Limousin a Blond d'Aquitaine. U býků Charolaise byla potvrzena signifikantní asociace mezi markerem *CAPN530* a naměřenými hodnotami střižné síly.

Pokud by se uvažovalo o dalším výzkumu v této oblasti, navrhovala bych následující inovace. Především odběry nových vzorků krve k rozšíření testované populace a tím i souboru dat pro statistickou analýzu. Díky tomu by data byla snáze statisticky hodnotitelná s větší vypovídající hodnotou. Dále by stálo za to zvážit hlubší analýzu a analýzu interakcí mezi jednotlivými SNP použitím více markerů. Vzhledem k tomu, že sledovaná vlastnost je silně polygenní a jednotlivé QTL spolu výrazně interagují, dá se uvažovat i o hlubší analýze interakcí mezi jednotlivými geny ovlivňujícími finální křehkost masa. A to jak v rámci systému calpainů a jejich inhibitoru calpastatinu, tak i dalších proteolytických systémů (proteasomy a kaspasy), jež se dle posledních výzkumů také podílí na tenderizaci masa (Nowak, 2011). Studie by pak mohla poskytnout unikátní data v rámci plemene ČESTR, navíc vztažená k podmínkám ČR, kde má tento skot velmi výrazné zastoupení.

Casas *et al.* (2005) do svého výzkumu zahrnul 3 různé populace býků, přičemž první skupina zahrnovala skot skupiny *B. taurus* (kříženci plemen Hereford, Angus, Red Angus, Limousin, Charolais, Gelbvieh a Simmental), druhá křížence skupin

7. Závěr

V současné době nastává v chovatelské a šlechtitelské praxi odklon od tradičního šlechtění zaměřeného výhradně na kvantitativní ukazatele. Trend novodobého šlechtění se postupně zaměřuje i na ukazatele kvality. Jedním z takových ukazatelů jsou u chovu skotu v masné produkci technologické vlastnosti masa, zejména vlastnosti zaměřené na konečného spotřebitele. Takovou vlastnost prezentuje i křehkost masa, udávající konzumentsky vyhledávanou snažší manipulaci se syrovým masem a současně vyšší chutnost. Jelikož se jedná o vlastnost komplexní, v podstatě nepopsatelnou fyzikálními parametry, nahrazuje se v asociačních studiích pouhou měřitelností tzv. síly stříhu.

Cílem této práce bylo stanovit vliv genotypu, ve vybraném potenciálním markeru, na sílu ve stříhu u syrového a grilovaného masa a tím prokázat asociaci mezi genetickým založením v daném lokusu a výslednou křehkostí masa.

Pro tuto studii bylo využito jedinců kombinovaného plemene českého strakatého skotu, chovaných na maso. U těchto jedinců byly provedeny molekulárně genetické analýzy lokusu *CAPNI*, konkrétně markeru *CAPN530*. Dále byly získány výsledky WBSF testu, při kterém byly pro jednotlivé jedince stanoveny hodnoty síly stříhu na vzorcích *m. longissimus dorsi*. Následně byly statisticky vyhodnoceny výsledky analýz a ověřen potenciální vztah mezi genotypy ve zmiňovaném markeru a empirickými daty pro sílu stříhu. Naše závěry ukazují, že v určité době zrání masa (konkrétně 1. den po porážce) lze pozorovat statisticky významný vztah mezi uvedenými veličinami.

Vzhledem k rozsahu dané problematiky je nezbytně nutné ověřit daný vztah rovněž s ostatními markery, které se v lokusu pro calpain nacházejí. Zde je nutné se zaměřit zejména na markery, které jsou ve vazbě s námi studovaným lokusem. Nespornou další součástí případné navazující studie představuje i studium epistatických vztahů mezi námi studovaným markerem *CAPNI* a lokusy, které mají regulační vztah k námi studovanému markeru.

8. Seznam použitých zkratk

AK - aminokyselina
ASH - allele specific hybridization
AS-PCR - allele-specific PCR
bp – base pair
CAPN – calcium activated neutral protease
CAST - calpastatin
cDNA - complementary DNA
DMSO - dimethyl sulfoxide
DNA - deoxyribonucleic Acid
dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid
GH - growth hormone
JUT - jatečně upravené tělo
LEP - leptin
LL - *longissimus lumborum*
LT - *longissimus thoracis*
MAS - marker-assisted selection
MPC - multicatalytic proteinase complex
STR - short tandem repeats
MSTN - myostatin
NGS – next generation sequencing,
PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis
PCR - polymerase chain reaction
PK - proteinase K
QTL - quantitative trait loci
RFLP - restriction fragment length polymorphism
RNA - ribonucleic acid
SNP - single nucleotide polymorphism
SSCP - single-strand conformation polymorphism
ssDNA - single-stranded DNA
SSR - simple sequence repeats
VNTR - variable number tandem repeats
WBSF - Warner-Bratzler shear force

9. Použitá literatura

Allais, S., Journax, L., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-Capel, C., Renand, G. (2011). Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *J. Anim. Sci.*, 89: 1-11.

ANSON, Adam. The Cattle site.com [online]. Secrets of the Genome: a New Bovine Story. May 2009 [cit. 2011-10-15]. Dostupné z WWW: <<http://www.thecattlesite.com/articles/1963/secrets-of-the-genome-a-new-bovine-story>>.

Barendse, V., Harrison, B. E., Hawken, R. J., Ferguson, D. M., Thompson, J. M., Thomas, M. B., Bunch, R. J. (2007). Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. *Genetics*, 176: 2601-2610.

Barendse, W. J. (1997). A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mamm. Genome*, 8: 21-28.

Barendse, W. J. (2000). Assessing lipid metabolism. Patent number: 6383751. Filing date: Jul 18, 2000. Issue date: May 7, 2002.

Bishop, M. D., Koohmaraie, M., Killefer, J., Kappes, S. (1993). Rapid communication: restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *J. Anim. Sci.*, 71: 2277 [cit. 201-03-15]. Dostupné z: <http://jas.fass.org/content/71/8/2277.full.pdf>.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.

Brown T. A. (2007). Klonování genů a analýza DNA. Olomouc, Univerzita Palackého v Olomouci, 389s. ISBN 978-80-244-1719-6.

Carragher N. O., Frame M. C. (2002). Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34: 1539–1543.

Carragher N. O., Frame M. C. (2002). Calpain: a role in cell transformation and migration. *J. Biochem. Cell Biol.*, 34: 1539–1543.

Casas, E., Shackelford, S. D., Keele, J. W., Stone, R. T., Kappes, S. M., Koohmaraie, M. (2000). Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.*, 78: 560–569.

Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P. L., Brenneman, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennet, G. L., Chase Junior, C. C. (2005). Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. of Animal Sc.*, 83: 13-19.

Corva, P., Soria, L.; Schor, A., Villarreal, E.; Cenci, M. P., Motter, M.; Mezzadra, C., Melucci, L., MIQUEL, C., Paván, E.; Depetris, G., Santini, F.; Naón, J.G. (2007). Association of *CAPNI* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Gen. and Mol. Bio.*, 30: 1064-1069.

Curi, R. A., Fortes, M. R. S., Chardulo, L. A. L., Silveira, A. C., Arrigoni, M. D. B., Martins, C. L., Assumpção, M. E. O. D. A., de Oliveira, H. N. (2009). Genetic polymorphisms related to meat traits in purebred and crossbred Nelore cattle. *Pesq. agropec. Bras.*, 12: 1660-1666.

Destefanis G., Brugiapaglia A., Barge M. T., Dal Molin E. (2008). Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner–Bratzler shear force. *Meat Sci.*, 78: 153–156.

Dransfield E. (1992c). Modelling *post-mortem* tenderisation - III: Role of calpain I in conditioning. *Meat Sci.*, 31: 85–94.

Dransfield E. (1994a). Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. *Meat Sci.*, 36: 105–121.

Dransfield E. (1994b). Modelling *post-mortem* tenderisation - V: Inactivation of calpains. *Meat Sci.*, 37: 391–409.

Dransfield E. (1999). Meat tenderness-the μ -calpain hypothesis. *ICoMST*, 45: 220–228.

Dransfield E., Etherington D. J., Taylor M. A. J. (1992b). Modelling *post-mortem* tenderisation - II: Enzyme changes during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Sci.*, 31: 75–84.

Dransfield E., Wakefield D. K., Parkman I. D. (1992a). Modelling *postmortem* tenderisation - I: Texture of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Sci.*, 31: 57–73.

Drinkwater, R. D., Li, I., Lenane, G. P., Davis, R. Shorthose *et al.* (2006). Detecting quantitative trait loci affecting beef tenderness on bovine chromosome 7 near calpastatin and lysyl oxidase. *Aust. J. Exp. Agr.*, 46: 159–164 [cit. 2012-4-23].
Dostupné z: <http://era.deedi.qld.gov.au/1146/1/DrinkwaterDetectingQuantitative-sec.pdf>.

Gazdová, V. (2007). Identifikace SNPs asociovaných s produkcí masa skotu. [Dizertační práce] MZLU v Brně.

Hanna R. A., Campbell R. L., Davies P. L. (2008). Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, 456: 409–412.

Homma N., Ikeuchi Y., Suzuki A. (1995). Levels of calpain and calpastatin in meat subjected to high pressure. *Meat Sci.*, 41: 251–260.

Hopkins D. L., Thompson J. M. (2001). Inhibition of protease activity 2. Degradation of myofibrillar proteins, myofibril examination of free calcium levels. *Meat Sci.*, 59: 199–209.

Huff-Lonergan E., Mitsuhashi T., Beekman D. D., Parrish F. C., Olson D. G., Robson R. M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by μ -calpain at low pH and temperature is similar to degradation in *post mortem* bovine muscle. *J. Anim. Sci.*, 74: 993–1008.

Choudhary, V., Kumar, P., Bhattacharya, T. K., Bhushan, B., Sharma, A. (2005). DNA polymorphism of leptin in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Gen. and Mol. Biology*, 28: 740-742 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-47572005000500014&script=sci_arttext.

Chung, H. Y., Davis, M. E., Hines, H. C. (2001). Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene. *An. Genetics*, 32: 53 [cit. 2012-03-17]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2052.2001.06471.x/full>.

Ingr, I. (1996). Technologie masa. Brno, MZLU, 290 s. ISBN: 80-7157-193-8.

Jeacocke R. E. (1993). The concentrations of free magnesium and free calcium ions both increase in skeletal muscle fibres entering *rigor mortis*. *Meat Sci.*, 35: 27–45.

Ježková, A., (2010). Vše o chovu masného skotu. *Agroweb.cz*, [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: http://www.agroweb.cz/Vse-o-chovu-masneho-skotu__s45x45768.html.

Kanawa R., Ji J. R., Takahashi K. (2002). Inactivity of μ -calpain throughout *post mortem* aging of meat. *J. Food Sci.*, 67: 635–638.

Kappes, S. M., J. W. Keele, R. T. Stone, R. A. McGraw, T. S. Sonstegard, T. P. L. Smith, N. L. Lopez-Corrales, and C. W. Beattie. (1997). A second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.*, 7: 235–249.

Kawachi, H., Yang, S. H., Hamano, A., Matsui, T., Smith, S. B., Yano, H. (2007). Molecular cloning and expression of bovine (*Bos taurus*) leptin receptor isoform mRNAs. *Comparative Biochemistry and Physiol.*, 148: 167-173.

Keele, J. W., S. D. Shackelford, S. M. Kappes, M. Koohmaraie, and R. T. Stone. (1999). A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. *J. Anim. Sci.*, 77: 1364–1371 [cit. 2012-04-03]. Dostupné z: <http://jas.fass.org/content/77/6/1364.full.pdf>.

Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J., Parr T. (2010). Tenderness. An enzymatic view. *Meat Sci.*, 84: 248–256.

Knoll, A., Vykoukalová, Z. (2002). Molekulární genetika zvířat (metody detekce polymorfizmů DNA genů). MZLU, Brno, 110 s.

Konieczny A., Ausubel F. (1993). A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.*, 4: 403–410 [cit. 2012-04-11]. Dostupné z: <http://molbio.mgh.harvard.edu/ausubelweb/publications/pdf/AndrzejKonieczny1993ThePlantJournal.pdf>.

Koohmaraie M. (1992). The role of Ca⁺² – dependent proteases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochemie*, 74: 239–245.

Koohmaraie M. (1994). Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Sci.*, 36: 93–104.

Koohmaraie M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation processes of meat. *Meat Sci.*, 43: 193 –201.

Koohmaraie M., Geesink G. H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.*, 74: 34–43.

Koohmaraie, M. (1992b). Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effect on myofibrils with μ -calpain. *J. Anim. Sci.*, 70: 3697–3708.

Koohmaraie, M. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.*, 43: 193-201. [cit. 2012-04-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0309174096000654>.

Kopečný, M. (2000). Polymorfismus vybraných kandidátních genů pro znaky jatečné hodnoty prasat. [disertační práce] MZLU, Brno.

Kumamoto T., Kleese W. C., Cong J., Goll D. E., Pierce P. R., Allen R. E. (1992). Localization of the Ca^{+2} - dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted and denervated rat skeletal muscle. *Anat. Rec.*, 232: 60–77.

Kurebayashi N., Harkins A. B., Baylor S., M. (1993). Use of fura red as an intracellular calcium indicator in frog skeletal muscle fibers. *Biophys. J.*, 64: 1934–1960.

Lande, R. (1981). The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics*, 99: 541-553.

Lifton R. P., Goldberg M. L., Karp R. W., Hogness D. S. (1978). "The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: functional and evolutionary implications". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 42: 1047–1051.

Liu, Y., Qin, X., Song, X-Z. H., Jiang, H., Shen, Y., Durbin, K. J., Lien, S., Kent, M. P., Sodeland, M., Ren, Y., Zhang, L., Sodergren, E., Havlak, P., Worley, K. C., Weinstock, G. M., Gibbs, R. (2009). *Bos taurus* genome assembly. *BMC Genomics* 10: 180.

Matise, T. C., Perlin, M., Chakravarti, A., (1994). Automated construction of genetic linkage map using an expert system (MultiMap): A human genome linkage map.

Nature Genetics, 6: 384-390 [cit. 2012-04-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8054979>.

Meyers S. N., Beever J. E. (2008). Investigating the genetic basis of pork tenderness: Genomic analysis of porcine CAST. *Anim. Genet.*, 39: 531–543.

Mohler, V., Schwarz, G. (2005). Genotyping tools in plant breeding: from restriction fragment length polymorphism to single nucleotide polymorphisms. *Biotech. in Agric. and For.*, 55: 28-38.

Moldoveanu T., Gehring K., Green D. R. (2008). Concerted multi-pronged attack by calpastatin to occlude the catalytic cleft of heterodimeric calpains. *Nature*, 456: 404–408.

Morris, C. A., N. G. Cullen, S. M. Hickey, P. M. Dobbie, B. A. Veenvliet *et al.* (2006). Genotypic effects of calpain 1 and calpastatin on the tenderness of cooked m. longissimus dorsi steaks from Jersey x Limousin, Angus and Hereford-cross cattle. *Anim. Genet.*, 37: 411–414.

Moudilou E. N., Mouterfi N., Exbrayat J. M., Brun C. (2010). Calpains expression during *Xenopus laevis* development. *Tissue Cell*, 42: 275–281.

Nagata, T., Lörz, H., In: Widholm, J., (Eds) *Biotechn. in agric. and for.*, Springer [cit. 2012-04-15]. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/content/n6w6g1831q6m782k/>.

Nowak, D. (2011). Enzymes in Tenderization of Meat – The System of Calpains and Other Systems – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61: 231 - 237.

O'Brien, S. J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W. J., Nash, W. G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copelad, N. G., Jenkins, N. A., *et al.*, (1999). The promise of comparative genomics in Mammals, *Science*, 286, 458-480.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 2766–2770.

Page, B. T., Casas, E., Heaton, M. P., Cullen, N. G., Hyndman, D. L., Morris, C. A., Crawford, A. M., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Keele, J. W., Smith, T. P. L. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J Anim. Sci.*, 80: 3077-3085.

Page, B. T., Casas, E., Quaas, R. L., Thallman, R. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., White, S. N., Bennett, G. L., Keele, J. W., Dikeman, M. E., Smith, T. P. (2004). Association of markers in the bovine CAPN1 gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. *J. of animal sc.*, 82: 3474-3481.

Pinto, L. F. B., Ferraz, J. B. S., Meirelles, F. V., Eler, J. P., Rezende, F. M., Carvalho, M. E., Almeida, H. B., Silva, R. C. G. (2010). Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Gen. and Mol. Bio.*, 9: 1431-1442.

Pipek P. (1993). Technologie masa I. Praha, VŠCHT, 212 s. ISBN: 80-7080-174-3.

Putnová, L. (2002). Molekulárně genetická variabilita v kandidátních QTL pro reprodukci prasat. [dizertační práce] MZLU v Brně.

Rincón, G., Medrano, J. F. (2006). Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine *CAPN1* gene. *Animal Genetics* 37: 293-307 [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2006.01430.x/full>.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230: 1350-1354.

Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Cundiff, L. V., Gregory, K. E., Rohrer, G. A., and Savell, J. W. (1994). Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine postrigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. *J. Anim. Sci.* 72: 857–863 [cit. 2012-03-19]. Dostupné z: <http://jas.fass.org/content/72/4/857.full.pdf>.

Smith, T. P., Casas, E., Rexroad, C. E., Kappes, S. M., Keele, J. W. (2000). Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 78: 2589-2594 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://jas.fass.org/content/78/10/2589.full.pdf+html>.

Snustat, D. P., Simmons, M. J. (2009). Genetika. Brno, Masarykova univerzita, 871 s. ISBN: 978-80-210-4852-2.

Stable micro systems at the forefront of fish texture testing. (2011). *Stable Micro Systems User News*, [cit. 2012-05-04]. Dostupné z: http://www.textureanalyser.co.uk/UserNews/Jun2011/user_news_0611.htm.

Steinhauser L., *et al.* (2000). Hygiena a technologie masa. Tišnov, Vydavatelství potravinářské literatury Steinhauser-Last, 464 s. ISBN: 80-900260-7-9.

Takahashi K. (1996). Structural weakening of skeletal muscle tissue during *post-mortem* ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. *Meat Sci.*, 43: 67–80.

Tautz, D., Renz, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. *Nucl. Acids Res.*, 12: 4127 – 4138.

Taylor R. G., Geesing G. H., Thompson V. F., Koohmaraie M., Goll D. E. (1995). Is Z-disk degradation responsible for *post mortem* tenderization? *J. Anim. Sci.*, 73: 1351–1367.

Thomson B. C., Dobbie P. M., Singh K., Speck P. A. (1996). *Postmortem* kinetics of meat tenderness and the components of the calpain system in bull skeletal muscle. *Meat Sci.*, 44: 151–157.

Tornberg E. (1996). Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Sci.*, 43: 175–191.

Ugozzoli, L., Wallace, R. B. (1991). Allele-specific polymerase chain reaction. *Methods: A companion to Methods in Enzymol.*, 2: 42-48.

Urban, T. (2009). Virtuální svět genetiky 3 - principy genetiky populací a kvantitativních znaků. *QTL & MAS - aplikace genetických markerů ve šlechtění* [online]. [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl3.html>.

Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E. (2007). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. Anim. Sci.* 85: 891–900 [cit. 2012-04-11]. Dostupné z: <http://jas.fass.org/content/85/4/891.full>.

Van Eenennaam, A. L.; Li, J., Thallman, R. M.; Quaas, R. L., Dikeman, M. E.; Gill, C. A., Franke, D. E.; Thomas, M. G. (2005). Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J. of Animal Sci.*, 85: 891-900, 2007.

Vierstraete, A., (1999). Principle of the PCR. [cit. 2012-04-19]. Dostupné z: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>.

Weber, J. L. (1990). Informativeness of human (dC – dA) – (dG – dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524 – 530 [cit. 2012-04-11]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/088875439290285Z->.

Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, E., Crouse, J. D., Hunt, M. C., *et al.* (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.*, 68: 2716–2728 [cit. 2012-04-17]. Dostupné z: <http://www.animal-science.org/content/68/9/2716.full.pdf+html>.

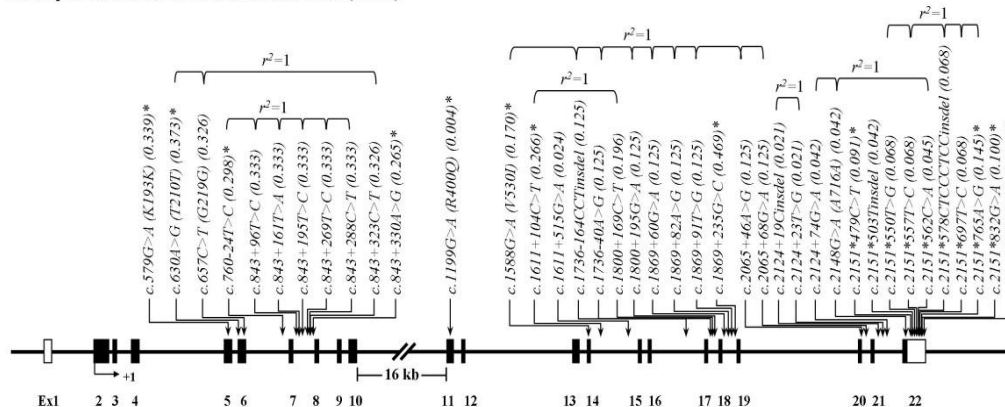
White, S. N., Casas, E., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D.; Koohmaraie, M., Riley, D. G.; Chase Junior, C. C., Johnson, D. D.; Keele, J. W., Smith, T. P. L. (2005). A new single nucleotide polymorphism in *CAPNI* extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J. of Animal Sci.*, 83: 2001-2008.

Xu, X.-X., Shui, X., Chen, Z.-H., Shan, Ch.-Q., Hou, Y.-N., Cheng, Y.-G. (2009). Development and application of a real-time PCR method for pharmacokinetic and biodistribution studies of recombinant adenovirus. *Mol. Biotechnol.*, 43: 130–137.

10. Přílohy

Příloha 1. Genetická mapa CAPN1

A. Map of CAPN1 on bovine chromosome 29 (27 kb)



B. Haplotypes in CAPN1

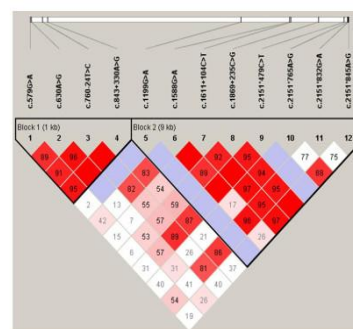
Block1

Haplotype	Polymorphisms	Freq.
Block1_ht1	c.579G>A (K193K) (0.339)* c.630A>G (G210T) (0.373)* c.700-24T>C (0.298)* c.843+330A>G (0.265)*	0.351
Block1_ht2	c.579G>A (K193K) (0.339)* c.630A>G (G210T) (0.373)* c.700-24T>C (0.298)*	0.322
Block1_ht3	c.579G>A (K193K) (0.339)* c.630A>G (G210T) (0.373)*	0.274
Block1_ht4	c.579G>A (K193K) (0.339)*	0.020
Others(1)		0.028

Block2

Haplotype	Polymorphisms	Freq.
Block2_ht1	c.1199G>A (R400Q) (0.004)* c.1588G>A (V5330I) (0.170)* c.1611+104C>T (0.266)* c.1611-515G>A (0.024) c.1736-164CC>Tinsdel (0.125) c.1736-40A>G (0.125) c.1800+169C>T (0.196) c.1800+195G>A (0.125) c.1869+60G>A (0.125) c.1869+82A>G (0.125) c.1869+91T>G (0.125) c.1869+235G>C (0.469)* c.2065+46A>G (0.125) c.2065+68G>A (0.125) c.2124+19C>Tinsdel (0.021) c.2124+23T>G (0.021) c.2124-74G>A (0.042) c.2148G>A (A176A) (0.042) c.2151+479C>T (0.091)* c.2151+503Tinsdel (0.042) c.2151+555T>G (0.068) c.2151+557T>C (0.068) c.2151+562C>A (0.045) c.2151+578CTCC>C>Tinsdel (0.068) c.2151+697T>C (0.068) c.2151+765A>G (0.145)* c.2151+832G>A (0.100)* c.2151+845A>G (0.163)*	0.478
Block2_ht2	c.1199G>A (R400Q) (0.004)* c.1588G>A (V5330I) (0.170)* c.1611+104C>T (0.266)* c.1869+235G>C (0.469)* c.2151+479C>T (0.091)* c.2151+832G>A (0.100)* c.2151+845A>G (0.163)*	0.152
Block2_ht3	c.1199G>A (R400Q) (0.004)* c.1588G>A (V5330I) (0.170)* c.1611+104C>T (0.266)*	0.095
Block2_ht4	c.1199G>A (R400Q) (0.004)* c.1588G>A (V5330I) (0.170)*	0.090
Block2_ht5	c.1199G>A (R400Q) (0.004)*	0.088
Block2_ht6	c.1199G>A (R400Q) (0.004)* c.1588G>A (V5330I) (0.170)*	0.033
Block2_ht7	c.1199G>A (R400Q) (0.004)* c.1588G>A (V5330I) (0.170)* c.1611+104C>T (0.266)*	0.032
Others(2)		0.032

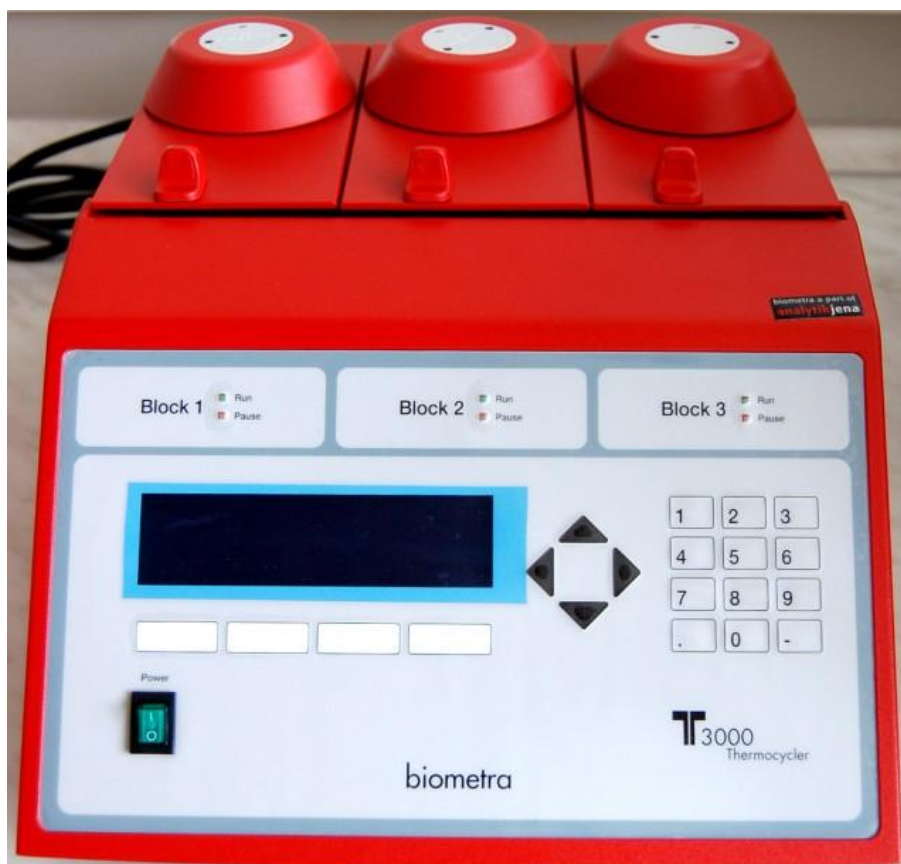
C. LDs among CAPN1 polymorphisms



Zdroj:

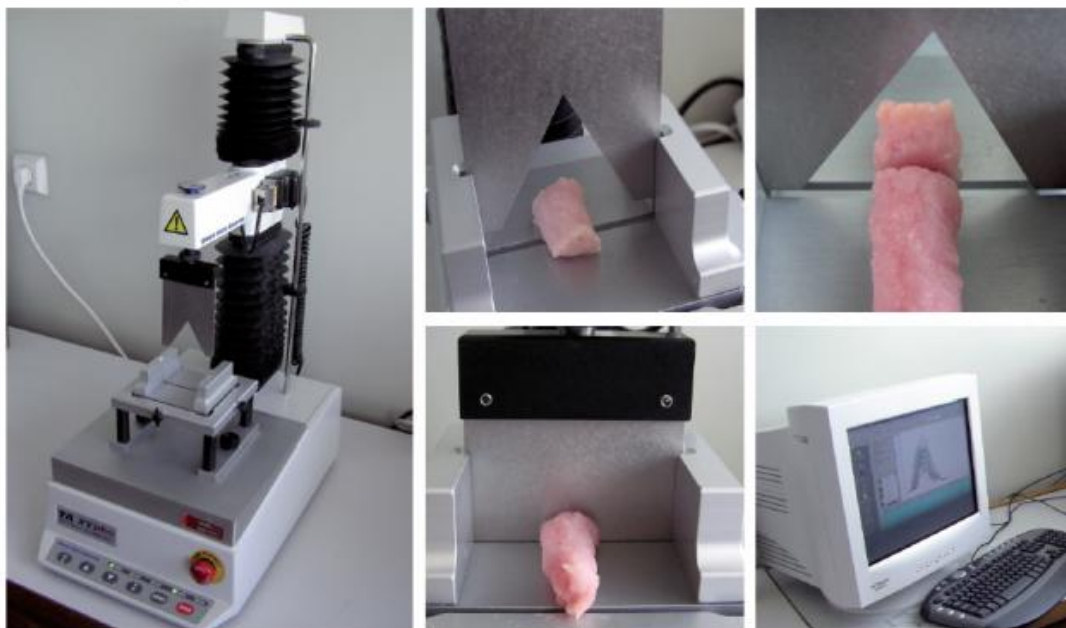
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9913&chr=29&query=uid%28-1922868023,2146522068%29&QSTR=281661\[gene_id\]&maps=gene_set&cmd=focus](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps.cgi?taxid=9913&chr=29&query=uid%28-1922868023,2146522068%29&QSTR=281661[gene_id]&maps=gene_set&cmd=focus)

Příloha 2. Thermocycler T-3000 (Whatman Biometra, Göttingen, Germany)



Zdroj: <http://www.b4i.cz/jihoceska-univerzita-v-ceskych-budejovicich/zemelska-fakulta/katedra-genetiky-slechtenu-a-vyzivy-zvirat/laborator-molekularni-genetiky-hospodarskych-zvirat/t3000-thermocycler-biometra> [online: 23. 4. 2012].

Příloha 3. Měření křehkosti masa (WBSF)



Zdroj: <http://www.b4i.cz/jihoceska-univerzita-v-ceskych-budejovicich/zemedelska-fakulta/katedra-specialni-zootechniky/laborator-kvality-masa/stanoveni-textury-masa> [online: 22. 4. 2012].