



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εφαρμογή μοριακών δεικτών που σχετίζονται με
παραγωγικά χαρακτηριστικά σε πληθυσμούς χοίρων

Μαρία Καλεμκερίδου

Λάρισα, 2017



UNIVERSITY OF THESSALY
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY
AND BIOTECHNOLOGY

Application of molecular markers
related to productive characteristics in pig
populations

Maria Kalemkeridou

Larissa, 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Μέλος

ΘΕΟΛΟΓΙΑ ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών

Οργανισμών

Μέλος

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΜΑΤΗΣ

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαμούρη Ζήση, Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας. Ευχαριστώ πολύ επίσης την κα. Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρο Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, καθώς και τον κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή για τη συνεχή καθοδήγηση, τη βοήθεια και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου «Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας» για την φιλική τους διάθεση και συνεργασία. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει στη διάρκεια των μαθητικών και φοιτητικών μου χρόνων και την αμέριστη υποστήριξη τους σε κάθε μου επιλογή.

Περίληψη

Ο χοίρος είναι ένα από τα ζώα που χρησιμοποιείται σήμερα για εκμετάλλευση του κρέατος του. Δεδομένης αυτής της μεταχείρισης, είναι απαραίτητες οι συνεχείς βελτιώσεις οι οποίες επιφέρουν υψηλές αποδόσεις τόσο στην παραγωγή, όσο και την ποιότητα του κρέατος που προορίζεται για κατανάλωση. Η ύπαρξη όμως γενετικών πολυμορφισμών που έχουν συσχετιστεί με ασθένειες, όπως η υπερθερμία, η νόσος των οιδημάτων καθώς και η διάρροια απογαλακτισμού, που εμφανίζονται σε πληθυσμούς χοίρων προκαλούν αλλοιώσεις στην ποιότητα αλλά ακόμα και θάνατο σε άτομα του πληθυσμού. Σε αυτή τη μελέτη ελέγχθηκαν οι γονότυποι 83 χοίρων των φυλών Duroc, Large White, Pietrain, Welsh και Landrace για τα γονίδια RYR1 και FUT1 με χρήση μοριακών εργαλείων για να ελεγχθεί αν τα ζώα είναι επιρρεπή στην εμφάνιση των ασθενειών, καθώς επίσης για να υπολογιστούν οι γονοτυπικές και οι αλληλομορφικές συχνότητες του πληθυσμού, με σκοπό την απάλειψη ή τον περιορισμό των επιβλαβών αλληλομόρφων από τον πληθυσμό, που θα οδηγήσει σταδιακά σε αύξηση της συχνότητας των επιθυμητών χαρακτηριστικών.

Abstract

Pigs are some of the animals that currently are used for their meat. In this view, continuous improvements are necessary, resulting in high output in both the production and the quality of the meat intended for consumption. However, the existence of genetic polymorphisms associated with diseases such as Malignant hyperthermia (MH), Edema disease (ED) and Post-weaning diarrhea (PWD) occurring in pig populations cause alterations in quality but even death in individuals. In this study, the genotypes of 83 Duroc, Large White, Pietrain, Welsh and Landrace breeds were tested for the RYR1 and FUT1 genes using molecular tools to check if the animals are susceptible to these diseases as well as to calculate genotypic and the allelic frequencies of the population in order to eliminate or reduce harmful alleles in the population, which will lead to a gradual increase in the frequency of the covetable characteristics.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	5
Abstract	6
1. Εισαγωγή	9
1.1. <i>Sus domesticus</i>	9
1.1.1. Συστηματική κατάταξη χοίρου	11
1.2. Υπερθερμία (Malignant Hyperthermia).....	15
1.2.1. PSE κρέας (Pale Soft Exudative meat).....	16
1.2.2. Γονίδιο RyR1.....	17
1.3. Νόσος των οιδημάτων (Edema Disease) - Διάρροια απογαλακτισμού (Post-Weaning Diarrhea).....	18
1.3.1. Γονίδιο FUT1.....	19
1.4. Μοριακά εργαλεία	20
1.4.1. Μοριακοί δείκτες.....	20
1.4.2. PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	21
1.4.3. Γονοτύπηση SNP με χρήση της μεθόδου MassAssay iPLEX	23
1.4.4. Blast - Basic Local Alignment Search Tool	24
1.4.5. Σχεδιασμός εκκινητών	26
1.5. Σκοπός.....	28
2. Υλικά και μέθοδοι	29
2.1. Υλικά	29
2.2. Μέθοδοι.....	30
2.2.1. Δείγματα.....	30
2.2.2. Απομόνωση DNA	30
2.2.3. PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο RYR1	30
2.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	32
2.2.5. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	33
2.2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	35
2.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο	36
2.2.8. MassARRAY.....	38
3. Αποτελέσματα.....	39
3.1. Απομόνωση	39
3.2. PCR.....	39
3.3. RFLP	40

3.4. Γενετική πληθυσμών - Υπολογισμός γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων	43
4. Συζήτηση.....	45
4.1. Για το γονίδιο RYR1	45
4.2. Για το γονίδιο FUT1	47
5. Βιβλιογραφία.....	50

1. Εισαγωγή

1.1. *Sus domesticus*

Ο κατοικίδιος χοίρος θεωρείται υποείδος του αγριόχοιρου, το οποίο έλαβε το όνομα *Sus scrofa* από τον Carl Linnaeus το 1758, ώστε να καταλήξει να έχει ως επίσημο όνομα το *Sus scrofa domesticus*.

Ο χοίρος είναι ένα μονογαστρικό, παμφάγο αγροτικό ζώο, ιδιαίτερα υψηλής γονιμότητας. Μπορεί να γεννήσει μέχρι 5 φορές μέσα σε δύο έτη, από 10-12 χοιρίδια κάθε φορά. Οι χοίροι εκτρέφονται για την παραγωγή κρέατος και έχουν εντυπωσιακές αποδόσεις. Οι βελτιωμένοι χοίροι έχουν υψηλή απόδοση σε κρέας, περίπου 75-80% του σωματικού τους βάρους και φθάνουν τον ρυθμό ανάπτυξης των 800-900g ανά ημέρα. Τέλος, η ποσότητα τροφής που καταναλώνουν για να παραχθεί 1 kg κρέατος είναι μεταξύ των 2,5 και 3 kg (Σιμιτζής & Στεργίου, 2016).

Τα ζώα που χρησιμοποιούνται σήμερα στις χοιροτροφικές εκμεταλλεύσεις αποτελούν προϊόντα εκτενών διασταυρώσεων, δηλαδή υβρίδια, και όχι απόγονους καθαρόαιμων φυλών (Σιμιτζής & Στεργίου, 2016). Μέσω της επιλογής και των διασταυρώσεων καταβάλλεται συνεχής προσπάθεια να βελτιωθούν οι αναπαραγωγικές ιδιότητες, όπως η συχνότητα των τοκετών και οι μητρικές ιδιότητες, η παχυντική ικανότητα και οι ιδιότητες του σφάγιου και του κρέατος, όσον αφορά το χρώμα, την τρυφερότητα και την υφή του κρέατος.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο χοίρος είναι ένα αγροτικό ζώο γρήγορης ανάπτυξης. Η διάρκεια της κυοφορίας, δηλαδή το διάστημα από τη γονιμοποίηση του θηλυκού μέχρι την γέννηση των χοιριδίων είναι περίπου 114 ημέρες. Τα χοιρίδια παραμένουν με τη μητέρα τους για 3 έως 4 εβδομάδες. Στη συνέχεια και αφού πλέον το μεγαλύτερο μέρος των διατροφικών τους αναγκών καλύπτεται από την κατανάλωση της στερεάς τροφής και όχι τόσο από το γάλα που θηλάζουν, απομακρύνονται από τη μητέρα τους ή αλλιώς απογαλακτίζονται. Από εκεί και πέρα, διατρέφονται με κατάλληλα σιτηρέσια, τα οποία καλύπτουν τις απαιτήσεις τους σε ενέργεια και πρωτεΐνη, έχοντας ως τελικό σκοπό την παραγωγή υψηλής ποιότητας κρέατος. Η περίοδος της πάχυνσης διαρκεί περίπου 20 με 24 εβδομάδες. Από την άλλη, η χοιρομητέρα

μετά τον απογαλακτισμό των χοιριδίων της, επαναγονιμοποιείται συνήθως εντός μίας εβδομάδας, αφού πρώτα έχει εκδηλώσει οίστρο. Συνήθως, η χοιρομητέρα διατηρείται στην εκμετάλλευση για 3 έτη, οπότε αν θεωρήσουμε ότι γονιμοποιείται για πρώτη φορά στην ηλικία των 4-5 μηνών, υπολογίζεται ότι γεννάει κατά μέσο όρο 5 με 6 φορές στην παραγωγική της ζωή (Σιμιτζής & Στεργίου, 2016).

Οι χοίροι είναι κοινωνικά ζώα που τείνουν να ζουν σε ομάδες. Συχνά συγκεντρώνονται για να διατηρήσουν φυσική επαφή, αν και δεν σχηματίζουν φυσικά μεγάλες αγέλες. Συνήθως ζουν σε ομάδες περίπου 8-10 ατόμων στα οποία περιλαμβάνονται ενήλικα θηλυκά, μερικά νεαρά άτομα και λίγα μόνο αρσενικά, τα οποία ενσωματώνονται με τις ομάδες κατά τη διάρκεια του ζευγαρώματος (Algers et al, 2007).

Σε υψηλότερες θερμοκρασίες από αυτές που είναι συνηθισμένοι, ένας τρόπος για να χαθεί η θερμότητα του σώματος τους είναι να καλύψουν το δέρμα τους με λάσπη, κάτι που εξυπηρετεί και άλλες λειτουργίες, όπως την προστασία από το υπεριώδες φως ή σε περίπτωση εγκαυμάτων από τον ήλιο ή και ως μέθοδος απομάκρυνσης των παρασίτων.

Μεγάλη ώθηση στην ανάπτυξη της χοιροτροφίας έχει δώσει η εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης. Πέρα από τα οικονομικά οφέλη, που συνδέονται με τη διατήρηση στην εκμετάλλευση μικρότερου αριθμού κάπρων σε σχέση με τη φυσική οχεία (περίπου 1 για 100 θηλυκά σε σύγκριση με 1 για 20, αντίστοιχα) προσφέρει επίσης ταχύτερη γενετική πρόοδο, αφού δίνει τη δυνατότητα γονιμοποίησης των χοιρομητέρων με σπέρμα κάπρων με πολύ υψηλές κληροδοτικές τιμές, ενώ περιορίζεται και η μετάδοση αναπαραγωγικώς μεταδιδόμενων νοσημάτων και μολύνσεων (Σιμιτζής & Στεργίου, 2016). Βέβαια, η μείωση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων αρσενικών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σημασίας της αναπαραγωγικής τους λειτουργίας, οπότε πρέπει συνεχώς να ελέγχεται η γονιμοποιητική τους ικανότητα, μέσα από την εκτίμηση της ποιότητας του σπέρματός τους, δηλαδή μέσω της εξέτασης της πυκνότητας, κινητικότητας, μορφολογίας και του ποσοστού των ζωντανών σπερματοζωαρίων που αυτό περιέχει.

Άλλος παράγοντας που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι η διατροφή των χοίρων, ανάλογα με το παραγωγικό τους στάδιο. Συνήθως

χρησιμοποιούνται σιτηρέσια με βάση τους δημητριακούς καρπούς, οι οποίοι όμως έχουν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, ώστε να βελτιωθεί η πεπτικότητα τους. Η διατροφική τους συμπεριφορά μπορεί να προσαρμοστεί με βάση τη διαθεσιμότητα, η οποία μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την εποχή, τις καιρικές συνθήκες και την τοποθεσία. Συγκεντρώνουν κυρίως φυτική ύλη, ιδιαίτερα καλλιέργειες, φρούτα, καρπούς με κέλυφος, ρίζες και πράσινα φυτά, καθώς και λουλούδια (Σμιτζής & Στεργίου, 2016).

1.1.1. Συστηματική κατάταξη χοίρου







Η επιστημονική ταξινόμηση των χοίρων παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1) :

Πίνακας 1 : Επιστημονική ταξινόμηση των χοίρων

Βασίλειο	Animalia
Φύλο (ή Συνομοταξία)	Chordata
Κλάση (ή Ομοταξία)	Mammalia
Τάξη	Artiodactyla
Οικογένεια	Suidae
Γένος	Sus
Είδος	<i>S. scrofa</i>
Υποείδος	<i>S. s. Domesticus</i>

Υπάρχουν πολλές φυλές του κατοικίδιου χοίρου (*Sus scrofa domesticus*), κάποιες από τις οποίες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) με τα χαρακτηριστικά τους :

Πίνακας 2 : Φυλές του κατοικίδιου χοίρου (*Sus scrofa domesticus*) και χαρακτηριστικά τους.

Φυλές	Καταγωγή	Ύψος	Βάρος	Χρώμα	
American Yorkshire	United states	-	-	Λευκό	
Bentheim Black Pied	Germany	70– 75 cm (28– 30 in)	180– 250 kg (400– 550 lb)	Μαύρο και λευκό	
British Lop	United Kingdom	-	-	Λευκό	
Celtic pig	Galicia, Spain	80 cm (31 in)	-	Μαύρο και λευκό	
Danish Protest Pig	Germany	92 cm (36 in)	350 kg (770 lb)	Κόκκινο και λευκό	
Duroc	United States	-	-	Κόκκινο ή μαύρο	

Φυλές	Καταγωγή	Ύψος	Βάρος	Χρώμα	
Large White	United Kingdom	-	-	Λευκό	
Pietrain	Wallonia	-	-	Λευκό κηλιδωτό	
Welsh	United Kingdom	-	110–140 kg (240–310 lb)	Λευκό	

Η εκτροφή των χοίρων έχει ως κύριο λόγο την εκμετάλλευση τους για το κρέας τους. Για τον λόγο αυτό γίνονται συνεχείς προσπάθειες βελτίωσης της ποιότητας του κρέατος ρυθμίζοντας παράγοντες όπως η διατροφή των χοίρων και η διαχείριση τους. Ωστόσο, πρόβλημα στην εκτροφή τους μπορεί να προκληθεί από γενετικές ασθένειες που κληρονομούνται στους απογόνους, αυξάνοντας την συχνότητα τόσο των αλληλομόρφων όσο και των γονοτύπων τους στους πληθυσμούς. Στόχος των κτηνοτροφικών μονάδων είναι να μειωθεί στο ελάχιστο δυνατό η συχνότητα αυτών των επιβλαβών αλληλομόρφων. Τέτοιου είδους ασθένειες είναι τα σύνδρομα της υπερθερμίας, της νόσου των οιδημάτων και της διάρροιας απογαλακτισμού που παρουσιάζονται παρακάτω.

Στην ύπαρξη τέτοιων γενετικών κινδύνων απαραίτητη είναι η πρόληψη, η οποία πετυχαίνεται με χρήση μοριακών δοκιμών για την ανίχνευση των επιβλαβών αλληλομόρφων στους πληθυσμούς και την προσπάθεια εξάλειψής τους σε αυτούς.

Τα γονίδια RYR1 και FUT1 έχουν συσχετιστεί με τα σύνδρομα που αναφέρθηκαν, υπερθερμία για το RYR1, νόσος των οιδημάτων και διάρροια

απογαλακτισμού για το FUT1 αντίστοιχα, και με τη χρήση των μοριακών εργαλείων, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω, αναπτύχθηκε μια μεθοδολογία για την ανίχνευση των πολυμορφισμών σε πληθυσμούς χοίρων.

1.2. Υπερθερμία (Malignant Hyperthermia)

Malignant Hyperthermia (MH) ή αλλιώς κακοήθης υπερθερμία είναι μια γενετική διαταραχή των σκελετικών μυών που παρουσιάζεται ως μια υπερμεταβολική απόκριση σε ισχυρά πτητικά αναισθητικά αέρια όπως η αλοθάνη, (Brenig et al, 1992) και σε στρεσογόνους παράγοντες όπως η έντονη άσκηση και η περιβαλλοντική θερμότητα (Rosenberg et al, 2015). Η υπερθερμία επηρεάζει τους ανθρώπους, ορισμένες φυλές χοίρων, σκύλους και άλογα (Jovanovic et al, 2005). Τα κλασικά συμπτώματα της περιλαμβάνουν ταχυκαρδία, ταχύπνοια, (Rosenberg et al, 2015) αυξημένη παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου, κυάνωση, υπερκαλιαιμία, μυϊκή ακαμψία, ασταθή αρτηριακή πίεση και καρδιακή αρρυθμία, τα οποία σχετίζονται με την υπερμεταβολική απόκριση (Ilie et al, 2014). Η υπερθερμία μπορεί να επισημανθεί, με αύξηση της θερμοκρασίας πυρήνα (είναι η θερμοκρασία των δομών βαθιά μέσα στο σώμα, σε αντίθεση με την περιφερειακή θερμοκρασία όπως αυτή της επιδερμίδας) με ρυθμό 1-2 °C κάθε πέντε λεπτά. Μπορεί να εμφανιστεί σοβαρή υπερθερμία σε περίπτωση που η θερμοκρασία πυρήνα είναι μεγαλύτερη από 44 °C, και να οδηγήσει σε σημαντική αύξηση στην κατανάλωση οξυγόνου, παραγωγή CO₂, εκτεταμένη δυσλειτουργία ζωτικών οργάνων και διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη. Σε περίπτωση που η θερμοκρασία του σώματος ξεπεράσει τους 41 βαθμούς κελσίου μπορεί να προκληθεί θανάτωση του οργανισμού (Rosenberg et al, 2015). Ο ανεξέλεγκτος μεταβολισμός οδηγεί σε αναπνευστικές δυσλειτουργίες και στις περισσότερες περιπτώσεις σε μεταβολική οξέωση λόγω της ταχείας κατανάλωσης ενεργειακών αποθεμάτων.

Το σύνδρομο είναι πιθανό να είναι θανατηφόρο αν δεν θεραπευτεί. Στους χοίρους το σύνδρομο κληρονομείται με αυτοσωματικό υπολειπόμενο τρόπο και έχει ποικίλη διεισδυτικότητα (Brenig et al, 1992). Τα πειραματικά στοιχεία δείχνουν σαφώς ότι τα συμπτώματα της MH σχετίζονται με την ανεξέλεγκτη απελευθέρωση του ενδοκυτταρικού Ca²⁺ από το σαρκοπλασματικό δίκτυο του σκελετικού μυός. Η ανεξέλεγκτη αύξηση του ενδομυϊκού ασβεστίου εμφανίζεται ως αποτέλεσμα του μη φυσιολογικού μεταβολισμού των

σκελετικών μυών που εκδηλώνεται ως ενεργοποίηση της συστολής των μυών, αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και παραγωγή CO₂, υδρόλυση ATP και παραγωγή θερμότητας (Rosenberg et al, 2015). Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η ενεργοποίηση των βιοχημικών διεργασιών που σχετίζονται με την δραστηριοποίηση των μυών και οδηγεί σε παθοφυσιολογικές αλλαγές. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το σύνδρομο προκαλείται από μια μετάλλαξη στον υποδοχέα της ρυανοδίνης(RyR).

Σε χοίρους, η MH αναφέρεται επίσης ως σύνδρομο άγχους χοίρου (Porcine Stress Syndrome - PSS). Οι φυλές των χοίρων Pietrain, Portland-China και Landrace είναι αυτές που εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο σύνδρομο αυτό, καθώς και οι φυλές Large White, Yorkshire και Hampshire.

1.2.1. PSE κρέας (Pale Soft Exudative meat)

Το PSE κρέας είναι ένα από τα κύρια προβλήματα που αντιμετωπίζει η βιομηχανία κρέατος όσον αφορά την ποιότητα του κρέατος, και εμφανίζεται στο χοιρινό, το βόειο κρέας αλλά και στα πουλερικά. Η φυλή, το φύλο, το είδος, ο χειρισμός των ζώων πριν και μετά τη σφαγή είναι μεταξύ των κυριότερων παραγόντων που συμβάλλουν στην πρόκληση του PSE κρέατος. Η έκθεση των ζώων σε οξύ στρες λίγο πριν τη σφαγή οδηγεί στην εμφάνιση του PSE κρέατος. Η πρόκληση του σχηματισμού του PSE κρέατος ενισχύεται ιδιαίτερα στην περίπτωση που το ζώο νοσεί από το σύνδρομο της υπερθερμίας (MH) ή ακόμα και αν είναι φορέας του συνδρόμου αυτού, καθώς αυτό έχει χαρακτηριστεί ως υπερμεταβολική απόκριση σε στρεσογόνους παράγοντες. Συνεπώς η έκθεση των ζώων ακόμα και σε ήπια κατάσταση στρες, πριν από τη σφαγή, οδηγεί στο σχηματισμό του PSE κρέατος. Η οξίνιση εμφανίζεται στους μεταθανάτιους μύες λόγω της διάσπασης του γλυκογόνου στο γαλακτικό οξύ. Στα κρέατα PSE, ο ρυθμός οξίνισης μετά τη σφαγή αυξάνεται ταχύτερα από το φυσιολογικό και ενώ ακόμα η θερμοκρασία του σφαγίου είναι υψηλή οι τιμές το pH στο μυ μειώνονται. Ο συνδυασμός χαμηλού pH και υψηλής θερμοκρασίας στο κρέας προκαλεί τη μετουσίωση ορισμένων πρωτεϊνών των μυών που οδηγούν σε

μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού (Ilie et al, 2014). Αυτό συμβαίνει επειδή τα μυο-ινίδια εξάγουν το υγρό στον εξωκυτταρικό χώρο, ο οποίος αυξάνεται σε όγκο. Όταν τεμαχίζεται τέτοιο κρέας, το υγρό απελευθερώνεται. Μια μεγάλη ποσότητα εκκρίσεων αντανακλά την κακή ικανότητα συγκράτησης νερού όπως συμβαίνει στο PSE κρέας. Το PSE κρέας εμφανίζεται λιγότερο κόκκινο, όπως είναι σε φυσιολογικές συνθήκες, και πιο κίτρινο (Adzitey et al, 2011).

Συνοπτικά τα γεγονότα που οδηγούν στο σχηματισμό του PSE κρέατος:

1. Οξύ στρες στο ζώο πριν από τη σφαγή
2. Αυξημένος ρυθμός γλυκόλυσης μετά τη σφαγή που οδηγεί σε μείωση του pH
3. Αποχρωματισμένο κρέας και μαλακό στην υφή
4. Αυξημένη συγκέντρωση γλυκογόνου στους μύες και παρατεταμένη διάρκεια γλυκόλυσης
5. Μετουσίωση πρωτεϊνών
6. Μεγάλος εξωκυτταρικός χώρος
7. Χαμηλή ικανότητα κατακράτησης νερού
8. Αποχρωματισμός από κόκκινο σε κίτρινο κρέας

1.2.2. Γονίδιο RyR1

Το γονίδιο RyR1, που κωδικοποιεί για τον υποδοχέα ρυανοδίνης 1, ο οποίος είναι κανάλι απελευθέρωσης ασβεστίου στους σκελετικούς μύες, χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 6 των χοίρων και συγκεκριμένα στη θέση 6p11-q21 (Ilie et al, 2014).

Η γενετική ανωμαλία στους χοίρους οφείλεται στον υποδοχέα ρυανοδίνης (RYR1) που εντοπίζεται στο σαρκοπλασματικό δίκτυο. Αυτό προκαλείται από μια σημειακή μετάλλαξη. Συγκεκριμένα γίνεται υποκατάσταση από C σε T στο νουκλεοτίδιο στη θέση 1843 του γονιδίου, η οποία οδηγεί στην υποκατάσταση του αμινοξέος αργινίνης (Arg) σε κυστεΐνη (Cys) στη θέση 615 (Ilie et al, 2014).

Οι χοίροι που φέρουν το αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη στο γονίδιο RYR1 παρουσιάζουν ανεξέλεγκτη απελευθέρωση του Ca^{2+} . Η απελευθέρωση υψηλών επιπέδων Ca^{2+} από το το σαρκοπλασματικό δίκτυο στο σαρκόπλασμα προκαλεί την αύξηση του ρυθμού της γλυκόλυσης μετά από τη θανάτωση του ζώου και είναι υπεύθυνη για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης PSE κρέατος στους χοίρους που φέρουν την μετάλλαξη αυτή. Η αυξημένη συγκέντρωση κυτοσολικού Ca^{2+} επιταχύνει τη γλυκόλυση αυξάνοντας την δραστηριότητα των ΑΤΡασών που ενεργοποιούνται από το Ca^{2+} , και λειτουργούν ως συμπαράγοντες σε αντιδράσεις της γλυκολυτικής οδού. Σε σύγκριση με τους χοίρους που φέρουν τα φυσιολογικά αλληλόμορφα ή ακόμα και οι ετερόζυγοι, οι χοίροι που είναι ομόζυγοι για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι πιο επιρρεπείς στην ανάπτυξη του PSE κρέατος λόγω του μεγαλύτερου κινδύνου πρόκλησης στρες πριν από την θανάτωση τους. Η άμεση αντίδραση των χοίρων αυτών σε καταστάσεις στρες είναι η ταχεία αύξηση της γλυκογονόλυσης. Μετά το στρες, η επινεφρίνη διεγείρει την παραγωγή cAMP για να αυξήσει την παραγωγή ενέργειας μέσω της γλυκογονόλυσης (Rosenberg et al, 2015).

1.3. Νόσος των οιδημάτων (Edema Disease) - Διάρροια απογαλακτισμού (Post-Weaning Diarrhea)

Edema Disease (ED) ή αλλιώς η νόσος των οιδημάτων και Post-Weaning Diarrhea (PWD) γνωστή ως η διάρροια απογαλακτισμού μετά από τον απογαλακτισμό στους χοίρους προκαλούνται από τοξίνες που παράγονται από τα εντεροτοξικά βακτήρια *Escherichia Coli* (Enterotoxigenic E.Coli - ETEC) και τα νευροτοξικά βακτήρια (Verotoxigenic E.coli - VTEC), τα οποία προκαλούν την διάρροια απογαλακτισμού και τη νόσο των οιδημάτων αντίστοιχα. Τα στελέχη E.coli F18 υπάρχουν σε 2 παραλλαγές, τα E.coli F18ab και E.coli F18ac, όπου τα b και c είναι οι αντιγονικοί καθοριστές (Wang et al, 2011).

Τα βακτήρια E.coli F18 προσκολλώνται με την βοήθεια των ινιδίων

στους υποδοχείς (E.coli f18 receptors) των μικρολαχνών των εντεροκυττάρων στα πρόσθια τμήματα του λεπτού εντέρου, στο οποίο υπάρχουν πολλαπλές προεκβολές οι οποίες αυξάνουν την απορροφητική επιφάνεια (Wang et al, 2011). Μετά από τον αποικισμό ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός τους και η παραγωγή των τοξινών.

Όταν οι νευροτοξίνες (verotoxin - shiga-like toxin), που παράγονται από παθογόνα στελέχη E.coli στο λεπτό έντερο, μεταφέρονται στο αίμα, επιδρούν στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων καθώς απορροφούνται από τα λεία μυικά κύτταρα των αρτηριολίων και συνεπώς προκαλείται υπέρταση και βλάβη του βλενογόνου τους που οδηγεί στη νόσο των οιδημάτων. Η καταστροφή των επιθηλιακών κυττάρων στα μικρά αγγεία οδηγεί σε θρόμβωση, αιμορραγία, εμφάνιση οιδήματος σε βλέφαρα, μύτη και αυτιά, καθώς ακόμα και υποδόρια οιδήματα στην κεφαλή βλάπτοντας ζωτικά όργανα λόγω αιμορραγίας, όπως ο εγκέφαλος. Τα ζώα που εμφανίζουν αυτά τα συμπτώματα παρουσιάζουν σοβαρή δύσπνοια πριν πεθάνουν.

Το σύνδρομο της διάρροιας απογαλακτισμού (PWD) προσβάλλει τους χοίρους 3-7 ημέρες μετά από τον απογαλακτισμό, καθώς οι χοίροι οι οποίοι είναι μεγαλύτεροι των 8 εβδομάδων φαίνονται να εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε λοιμώξεις. Στην περίοδο περίπου 7 ημερών μετά τον απογαλακτισμό εμφανίζονται αλλαγές στη μορφολογία και τη λειτουργία του εντέρου. Συγκεκριμένα υπάρχει διαταραχή της ισορροπίας της χλωρίδας του λεπτού εντέρου. Τα συμπτώματα αυτού του συνδρόμου είναι η υδαρής διάρροια με άμεση συνέπεια την ταχεία αφυδάτωση, η αδυναμία μετακίνησης, η ανορεξία και η πολυδιψία. Παρατηρείται υψηλή θνησιμότητα, με μέγιστες τιμές στις 6 έως 10 ημέρες μετά από τον απογαλακτισμό.

1.3.1. Γονίδιο FUT1

Το γονίδιο FUT1 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 6 των χοίρων (Meijerink et al, 1997), στη θέση 6q11 και βρίσκεται σε κοντινή θέση με το γονίδιο που προκαλεί το σύνδρομο άγχους των χοίρων (Porcine Stress Syndrome - PSS).

Μέσω ανάλυσης σύνδεσης, εκτιμήθηκε ότι ο πολυμορφισμός του FUT1 γονιδίου εντοπίζεται σε απόσταση μικρότερη από 1 centiMorgan από την περιοχή που κωδικοποιεί τον υποδοχέα του E.coli F18. Για αυτό, το γονίδιο θεωρείται υποψήφιο γονίδιο που ελέγχει την έκφραση του υποδοχέα για τα βακτηριακά στελέχη (Meijerink et al, 1997).

Στο γονίδιο FUT1 γίνεται υποκατάσταση από A σε G στη νουκλεοτιδική θέση 307, η οποία προκαλεί υποκατάσταση του αμινοξέος στη θέση 103 από αλανίνη (Ala) σε θρεονίνη (Thr) (Luo et al, 2010). Η μετάλλαξη σημείου που συμβαίνει προκαλεί μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου FUT1 στα άτομα που είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη (GG) καθώς και σε εκείνα που είναι ετερόζυγα (GA) καθιστώντας τα ευαίσθητα στο ETEC F18. Τα ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο (AA) αντιθέτως, είναι ανθεκτικά (Liu et al, 2015).

Το ένζυμο που κωδικοποιείται από το γονίδιο FUT1, είναι από τα βασικά ένζυμα που εμπλέκονται στο σχηματισμό των αντιγόνων του αίματος για τους χοίρους σύμφωνα με το σύστημα AO, που είναι αντίστοιχο με το σύστημα ABO των ανθρώπων. Η πρωτεΐνη FUT1 εκφράζεται σταθερά σε 11 ιστούς με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους πνεύμονες, το στομάχι και τον γαστρεντερικό σωλήνα.

1.4. Μοριακά εργαλεία

1.4.1. Μοριακοί δείκτες

Οι μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας και φυλογενετικών αναλύσεων διαφορετικών φυτικών ειδών ή πληθυσμών συγκεκριμένων ειδών.

Για να επιλέξουμε, μέσα από ένα πληθυσμό, συγκεκριμένα άτομα που έχουν ορισμένους επιθυμητούς χαρακτήρες, σε μοριακό επίπεδο, χρησιμοποιούνται οι μοριακοί δείκτες. Υπάρχουν δύο κατηγορίες μοριακών δεικτών, οι DNA-δείκτες και οι πρωτεϊνικοί δείκτες. Οι DNA-δείκτες αφορούν

τόσο το πυρηνικό όσο και το εξωπυρηνικό DNA, μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό.

Για την επιλογή των μοριακών δεικτών τα κριτήρια είναι πολλά και σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά τους, όπως, ο πολυμορφισμός, η εξειδίκευση για ορισμένο γενετικό τόπο, αλλά και με τη διαδικασία παραγωγής τους. Σχετικά με τη διαδικασία παραγωγής τους, θα πρέπει να δίνουν αποτελέσματα τα οποία είναι επαναλήψιμα, να έχει μικρό κόστος εφαρμογής, καθώς και να απαιτούν μικρή ποσότητα DNA.

Στους πρωτεϊνικούς δείκτες, που εμφανίσθηκαν πριν από τους DNA δείκτες, ανήκουν τα ισοένζυμα και τα αλλοένζυμα, μεταξύ των οποίων υπάρχουν μικρές διαφορές. Τα ισοένζυμα είναι διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου που καταλύουν την ίδια αντίδραση, αλλά διαφέρουν ελάχιστα στην αμινοξική τους σύσταση ή στην δομή τους, τόσο ώστε να μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους με ηλεκτροφόρηση ή χρωματογραφία. Τα αλλοένζυμα αποτελούν διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα που βρίσκονται στον ίδιο γενετικό τόπο.

Στους DNA-δείκτες ανήκουν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Η διαδικασία των RFLP περιλαμβάνει την απομόνωση και τη πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το διαχωρισμό των τμημάτων του DNA με ηλεκτροφόρηση αгарόζης, τα οποία συνήθως έχουν μέγεθος 2-10 kb, την υβριδοποίησή τους κατά Southern με ειδικό σημαντή για ορισμένο γενετικό τόπο και τέλος την ανίχνευση τυχόν πολυμορφισμού με αυτοραδιογραφία ή μη ραδιενεργή σήμανση. Οι δείκτες RFLP, υπάρχουν άφθονοι στα περισσότερα γονιδιώματα, όπου είναι τυχαία διασκορπισμένοι, οι ζώνες που παράγουν μπορεί να αποδοθούν σε γενετικούς τόπους και αλληλόμορφα, υπάρχει συγκυριαρχία αλληλομόρφων, ενώ τα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι επαναλήψιμα. Γενικά πρόκειται για χρονοβόρα και τεχνικά δύσκολη διαδικασία, με υψηλό κόστος εφαρμογής, και πρόσθετο κόστος σε περίπτωση που δεν υπάρχουν κατάλληλοι σημαντές. Απαιτεί μεγάλη συγκέντρωση DNA (5-10μg) μεγάλου μοριακού βάρους.

1.4.2. PCR - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για την ενίσχυση ενός μόνο αντιγράφου ή μερικών αντιγράφων ενός τμήματος DNA δημιουργώντας χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA. Είναι ένας εύκολος, φθηνός και αξιόπιστος τρόπος να πολλαπλασιαστεί επανειλημμένα ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA.

Η PCR ενισχύει μια συγκεκριμένη περιοχή ενός κλώνου του DNA-στόχου. Οι περισσότερες μέθοδοι PCR ενισχύουν τμήματα DNA μεταξύ 0,1 και 10 kbp, αν και μερικές τεχνικές επιτρέπουν την ενίσχυση τμημάτων μεγέθους έως 40 kbp. Η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος προσδιορίζεται από τα διαθέσιμα υποστρώματα στην αντίδραση, τα οποία περιορίζονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση.

Τα συστατικά και τα αντιδραστήρια που απαιτεί μια αντίδραση PCR:

- Ένα πρότυπο DNA που περιέχει την περιοχή στόχο για ενίσχυση
- Μια DNA πολυμεράση (ένζυμο)
- Δύο εκκινητές DNA που είναι συμπληρωματικοί προς τα 3 'άκρα καθενός από τους κλώνους sense και anti-sense του DNA στόχου επιλεκτικοί εκκινητές που είναι συμπληρωματικοί προς την περιοχή στόχου DNA
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια ή dNTPs, τα οποία είναι τα δομικά στοιχεία από τα οποία η DNA πολυμεράση συνθέτει την νέα αλυσίδα DNA
- Ένα ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχει κατάλληλο χημικό περιβάλλον για τη βέλτιστη δραστηριότητα και τη σταθερότητα της DNA πολυμεράσης
- Δισθενή κατιόντα μαγνησίου (Mg)
- ddH₂O

Η αντίδραση συνήθως διεξάγεται σε τελικό όγκο 50 μl σε μικρούς σωλήνες αντίδρασης και πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά, και τα οποία είναι:

1. Αποδιάταξη: Οι δύο αλυσίδες του DNA διαχωρίζονται με θέρμανση σε θερμοκρασία 94-95° C για περίπου 30 sec έως 1 min.
2. Υβριδισμός εκκινητών: Με μείωση της θερμοκρασίας στους 55-65° C για περίπου 30 sec έως 1 min, οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA.
3. Επιμήκυνση: Για τη σύνθεση της νέας αλυσίδας αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 72° C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης. Η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία DNA ως εκμαγείο.

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές. Η PCR εκτελείται στον θερμικό κυκλοποιητή (Thermal cycler), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

1.4.3. Γονοτύπηση SNP με χρήση της μεθόδου MassAssay iPLEX

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην επέκταση εκκινητών και προσφέρει ειδικότητα σε 2 επίπεδα. Αρχικά γίνεται μια αντίδραση PCR με χρήση συγκεκριμένων εκκινητών για ένα τόπο, όπου οι ολιγο-νουκλεοτιδικοί εκκινητές υβριδοποιούνται ανοδικά της πολυμορφικής θέσης που πρόκειται να γονοτυπηθεί. Στην τεχνική iPLEX οι εκκινητές και το ενισχυμένο DNA-στόχος επωάζονται με διδεοξυνουκλεοτίδια τα οποία έχουν υποστεί τροποποίηση της μάζας τους. Η επέκταση των εκκινητών γίνεται σύμφωνα με την αλληλουχία της περιοχής. Με τη χρήση της φασματομετρίας μάζας MALDI-TOF προσδιορίζεται η μάζα του εκτεταμένου εκκινητή. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζονται τα αλληλόμορφα της πολυμορφικής θέσης.

Η τεχνική αυτή μπορεί να διακριθεί σε 4 διακριτά στάδια από την προετοιμασία των δειγμάτων DNA μέχρι την λήψη των αποτελεσμάτων γονοτύπησης. Τα στάδια αυτά είναι τα εξής:

1. Αντίδραση PCR

Το DNA δείγμα αφού δεχθεί μια προετοιμασία, τοποθετείται σε ειδικά για την τεχνική αυτή πλακίδια τα οποία φέρουν τα κατάλληλα πηγαδάκια όπου θα ολοκληρωθεί η αντίδραση. Μαζί με το DNA στα πηγαδάκια τοποθετείται και το DNA master mix το οποίο περιέχει τα συστατικά που απαιτούνται για την αντίδραση σε αναλογίες σύμφωνα με το πρωτόκολλο, το οποίο καθορίζει και τις συνθήκες της αντίδρασης PCR.

2. Αντίδραση SAP (Shrimp alkaline phosphatase)

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται για να απομακρυνθούν τα μη ενσωματωμένα dNTPs από το ενισχυμένο τμήμα. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται, η φωσφατάση, αποφωσφορυλιώνει τα dNTPs διασπώντας τις φωσφοδικές ομάδες στο 5' άκρο. Η τεχνική γίνεται στα ειδικά πηγαδάκια όπου τοποθετούνται το ενισχυμένο τμήμα DNA μαζί με το SAP master mix.

3. Primer extension - iPLEX

Η διαδικασία αυτή γίνεται για να αποκαλυφθούν τα SNP σε ενισχυμένα με PCR τμήματα DNA.

4. Εντοπισμός των επιθυμητών προϊόντων στα SpectroCHIP

Σαν αποτέλεσμα της τεχνικής αυτής είναι η παραλαβή των εκτεταμένων προϊόντων από το SpectroCHIP. Το CHIP τοποθετείται στο φασματογράφο μάζας και κάθε σημείο στη συνέχεια πυροβολείται με λέιζερ υπό κενό σύμφωνα με την MALDI-TOF μέθοδο.

1.4.4. Blast - Basic Local Alignment Search Tool

Το BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, είναι ένας αλγόριθμος που χρησιμοποιείται στη βιοπληροφορική για τη σύγκριση αλληλουχιών βιολογικής σημασίας, όπως οι αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών ή τα νουκλεοτίδια των αλληλουχιών DNA. Μια αναζήτηση στο BLAST δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης μιας αλληλουχίας επερώτησης (query sequence) με μια βιβλιοθήκη ή μια βάση δεδομένων ακολουθιών και να αναγνωρίσει αλληλουχίες που μοιάζουν με την αλληλουχία επερώτησης.

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι BLAST, ανάλογα με την ακολουθία επερώτησης, καθώς και τη βάση δεδομένων όπου γίνεται η αναζήτηση. Συγκεκριμένα υπάρχουν οι εξής 5 τύποι, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) :

Πίνακας 3 : Οι τύποι του Blast.

Τύποι BLAST	Ακολουθία επερώτησης	Βάση δεδομένων
BlastN	Νουκλεοτιδική	Νουκλεοτιδική
BlastP	Πρωτεϊνική	Πρωτεϊνική
BlastX	Νουκλεοτιδική που μεταφράζεται σε πρωτεϊνική	Πρωτεϊνική
TBlastN	Πρωτεϊνική	Νουκλεοτιδική που μεταφράζεται σε πρωτεϊνική
TBlastX	Νουκλεοτιδική που μεταφράζεται σε πρωτεϊνική	Νουκλεοτιδική που μεταφράζεται σε πρωτεϊνική

Στο BLAST:

- Η ακολουθία επερώτησης είναι μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων ή πρωτεϊνών κυρίως σε FASTA μορφή
- Γίνεται σύγκριση χαρακτήρων με όλες τις ακολουθίες στη βάση δεδομένων
- Χρησιμοποιούνται στατιστικά στοιχεία για τον εντοπισμό στατιστικώς σημαντικών αντιστοιχιών

Το BLAST είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα προγράμματα βιοπληροφορικής για την αναζήτηση αλληλουχιών. Ο ευρετικός αλγόριθμος που χρησιμοποιεί είναι πολύ πιο γρήγορος από άλλες προσεγγίσεις.

Χρήσεις του BLAST:

Το BLAST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διάφορους σκοπούς, όπως την ταυτοποίηση των ειδών, τη φυλογένεση, τη χαρτογράφηση του DNA και τη σύγκριση μεταξύ αλληλουχιών.

- Προσδιορισμός ειδών

Με τη χρήση του BLAST, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ένα είδος ή να βρεθούν ομόλογα είδη.

- Εντοπισμός τομέων

Σε μια αλληλουχία πρωτεϊνών, μπορούν να εντοπιστούν γνωστο εντός της ακολουθίας ενδιαφέροντος

- Δημιουργία φυλογένεσης

Χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μέσω του BLAST, μπορεί να δημιουργηθεί ένα φυλογενετικό δέντρο χρησιμοποιώντας την ιστοσελίδα BLAST.

- Χαρτογράφηση DNA

Το BLAST μπορεί να συγκρίνει τη χρωμοσωμική θέση της αλληλουχίας ενδιαφέροντος με τις σχετικές αλληλουχίες στη βάση δεδομένων.

- Σύγκριση

Το BLAST μπορεί να εντοπίσει κοινά γονίδια σε δύο είδη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για χαρτογράφηση.

1.4.5. Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές (Primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Επειδή ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR, για αυτό πρέπει να τηρούνται οι εξής αρχές:

- Μέγεθος των εκκινητών

Οι εκκινητές είναι συνήθως ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων. Εκκινητές μικρότερου μεγέθους οδηγούν σε μη ειδικό υβριδισμό, ενώ μεγαλύτεροι εκκινητές έχουν μεγαλύτερη ειδικότητα, αλλά αυξάνεται και η πιθανότητα

δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού.

- Αλληλουχία των εκκινητών

Οι εκκινητές πρέπει να έχουν απόλυτη συμπληρωματικότητα προς την αλληλουχία στόχο, αλλά ταυτόχρονα ελάχιστη έως καθόλου συμπληρωματικότητα μεταξύ τους. Ο υβριδισμός μεταξύ των εκκινητών οδηγεί στο σχηματισμό διμερών εκκινητών (Primer dimers) που έχουν μέγεθος 30-50 bp και μειώνουν την αποτελεσματικότητα της PCR. Επίσης, η ύπαρξη περιοχών συμπληρωματικότητας μέσα στον εκκινητή αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δευτερογενών δομών που μειώνουν την αποτελεσματικότητα του υβριδισμού στην αλληλουχία στόχο.

- Η θερμοκρασία αποδιάταξης των εκκινητών

Η θερμοκρασία αποδιάταξης, Melting temperature (T_m), είναι η θερμοκρασία στην οποία το 50% των μορίων DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη μορφή. Η T_m εξαρτάται από το μέγεθος της αλληλουχίας και τη σύσταση των βάσεων της αλληλουχίας. Υψηλό ποσοστό σε βάσεις G και C αυξάνει την T_m , καθώς οι βάσεις G και C ενώνονται με τις συμπληρωματικές τους στο δίκλωνο DNA με τρεις δεσμούς υδρογόνου, σε αντίθεση με τις βάσεις A και T που ενώνονται με δύο δεσμούς υδρογόνου. Στην αντίδραση PCR η T_m των εκκινητών κυμαίνεται τυπικά στους 58-68 ° C. Οι δύο εκκινητές δεν πρέπει να έχουν πολύ διαφορετικές T_m μεταξύ τους, με μια διαφορά μικρότερη των 3-5 ° C να θεωρείται αποδεκτή. Υπάρχουν πολλοί τύποι για τον υπολογισμό της T_m των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών. Ένας από τους ευρύτερα χρησιμοποιούμενους είναι ο ακόλουθος: $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$.

- Οι εσωτερικές δομές

Η απόδοση της αντίδρασης PCR μειώνεται δραματικά στις περιπτώσεις που οι εκκινητές υβριδοποιούνται μεταξύ τους και σχηματίζουν δομές φουρκέτας ή ομοδιμερίζονται.

1.5. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η γονοτύπηση εκτρεφόμενων χοίρων για τους πολυμορφισμούς στα γονίδια RYR1 και FUT1 που έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση των συνδρόμων της υπερθερμίας (MH) και της νόσου των οιδημάτων (ED) και τη διάρροια απογαλακτισμού (PWD) αντίστοιχα, ώστε να σχεδιαστεί μελλοντικά ένα σύστημα διασταυρώσεων που θα οδηγήσει στην αύξηση των συχνοτήτων για τα επιθυμητά αλληλόμορφα. Η γονοτύπηση γίνεται μέσω χρήσης συμβατικών μεθόδων PCR/RFLP αλλά και μεθόδων νέας γενιάς, όπως το Sequenom MassArray.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία :

Acetic Acid

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

Ammonium persulfate

NaCl

dNTPs

EDTA

EtOH

Proteinase K

NaOH

Formaldehyde

MgCl₂

NaBH₄

Potassium Acetate

TEMED

AgNO₃

100bp Ladder

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 83 δείγματα χοίρων *Sus domesticus* από τα οποία τα 8 ήταν της φυλής Duroc, τα 50 Large White , τα 4 Pietrain, τα 5 Welsh και τα 6 Landrace.

2.2.2. Απομόνωση DNA

Πρώτο βήμα στην πειραματική διαδικασία είναι να απομονωθεί το γενετικό υλικό που θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια. Για την απομόνωση του DNA από τα δείγματα αίματος των χοίρων χρησιμοποιήθηκε το kit NucleoSpin Tissue από την εταιρία Macherey-Nagel και τηρήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την ολοκλήρωση της απομόνωσης του DNA ελέγχεται ποιοτικά η επιτυχία της διαδικασίας με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v.

2.2.3. PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο RYR1

Για την ενίσχυση του τμήματος του RYR1 γονιδίου πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), για την οποία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές (πίνακας 4) :

Πίνακας 4 : Οι εκκινητές για το γονίδιο RYR1 για την αντίδραση PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία
RYR-R1	5' - GGGTGGTGGAGGGTTCT - 3'
RYR-F1	5' - CAAGTGCCCTCACACACCTT - 3'

Για τον σχεδιασμό των εκκινητών αρχικά αναζητήθηκε η δοσμένη ονοματολογία του πολυμορφισμού (reference SNP ID, rs) από βάση δεδομένων SNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) η οποία είναι rs344435545 και καθορίζει τη θέση πολυμορφισμού και την αλληλουχία εκατέρωθεν. Χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) για το είδος *Sus scrofa* με την τιμή rs που αναφέρεται παραπάνω πάρθηκε η αλληλουχία του γονιδίου για τον σχεδιασμό των εκκινητών. Με το primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) σχεδιάστηκαν οι εκκινητές σύμφωνα με τις παραμέτρους που δόθηκαν, όπως για το μέγεθος του PCR προϊόντος (PCR product) το οποίο ορίστηκε 200-350 bp, και η θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (Primer melting temperature- Tm) στις τιμές 53-60°C. Στο τελευταίο στάδιο του σχεδιασμού ελέγχθηκε η υβριδοποίηση των εκκινητών σε διαφορετική θέση από την επιθυμητή, η οποία θα οδηγούσε σε λανθασμένα αποτελέσματα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η σύσταση του διαλύματος της αντίδρασης PCR (πίνακας 5) :

Πίνακας 5 : Σύσταση διαλύματος για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες per PCR tube (50μl)
Buffer Kappa Taq	10x	1x	5 μl
MgCl ₂	50mM	2mM	1 μl
Εκκινητής Forward	50pM	1pM	0,7 μl
Εκκινητής Reverse	50pM	1pM	0,7 μl
DNA πολυμεράση	5 U/μL	1 U	0,2 μl

(Kappa Taq)			
dNTPs	10mM	0,2mM	1 μl
DNA εκμαγείο	100 ng		
ddH ₂ O	μέχρι τα 50 μl		

Οι συνθήκες για την ενίσχυση του τμήματος του γονιδίου RYR1 είναι οι εξής:

Στάδιο 1

Αρχική αποδιάταξη : 89°C για 4 min

Στάδιο 2

Βήμα 1 - Αποδιάταξη: 95°C για 20 sec

Βήμα 2 - Υβριδοποίηση: 57 °C για 20 sec

Βήμα 3 - Επιμήκυνση: 72°C για 20 sec

Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους

Στάδιο 3

Βήμα 1 - Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 min

Βήμα 2 - Συντήρηση των δειγμάτων: 4 °C

Στη συνέχεια τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

2.2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης πραγματοποιείται διαχωρισμός των τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους.

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε 1x TAE , στο οποίο διαλύθηκε η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης ανάλογα με την επιθυμητή περιεκτικότητα σε αγαρόζη, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρέπει να διαχωριστούν. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι για να πολυμεριστεί.

Για πηκτή αγαρόζης 1% w/v, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για την οπτικοποίηση του DNA μετά από την απομόνωση του, διαλύονται 0,3gr και 0,6gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για πηκτή αγαρόζης 2% w/v, η οποία χρησιμοποιείται για ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων τμημάτων DNA για έλεγχο της ποιότητας τους, διαλύονται 0,6gr και 1,2gr αγαρόζης σε 50ml και 100ml 1x TAE Electrophoresis Buffer αντίστοιχα.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων προστίθενται 3μl loading buffer στο καθένα από αυτά. Όταν το τμήμα DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθεί προέρχεται από απομόνωση χρησιμοποιούνται 3μl από αυτό, ενώ όταν το DNA είναι ενισχυμένο με την τεχνική της PCR χρησιμοποιούνται 5μl αυτού. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100-150 volts και ακολουθεί παρατήρηση της πηκτής σε λάμπα υπεριώδους φωτός.

2.2.5. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Για την πέψη των τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση HhaI. Στην παρακάτω εικόνα, η οποία έχει ληφθεί από την βάση δεδομένων για περιοριστικές ενδονουκλεάσες REBASE, φαίνονται όλες οι πληροφορίες που χαρακτηρίζουν το ένζυμο, καθώς και η θέση περιορισμού του.



HhaI

Type II restriction enzyme
subtype: P

Recognition Sequence: [help?](#)
GCG[↓]C

5' .. G C G ↓ C .. 3'
3' .. C ↑ G C G .. 5'

REBASE Enz Num 1117 entered Jan 1 1976 ... modified Jun 29 2011

Acronym: [Hha](#)
Prototype: HhaI
Org #: [1478](#)
Organism: [Haemophilus haemolyticus](#)
Organism type: [bacteria](#)
Organism source: [ATCC 10014](#) ([ATCC LINK](#))
Growth Temperature: 37 °C
Experimental Evidence: [biochemistry](#)
Exhibits star activity
Single-stranded cleavage: y
Enzyme gene cloned
Enzyme gene sequenced
Enz Comment: Specific Activity is > 1,700,000 per mg
Molecular Weight: 27764

sites on
Adeno2: 375
Lambda: 215
pBR322: 31
PhiX174: 18
SV40: 2

Το τμήμα DNA συνολικά έχει μέγεθος 224 bp. Η περιοριστική ενδονουκλεάση, φυσιολογικά, κόβει στη θέση 90 του τμήματος και προκύπτουν δύο τμήματα DNA μεγέθους 90 και 134 bp. Όταν γίνεται η μετάλλαξη, χάνεται η θέση περιορισμού για το ένζυμο HhaI στο τμήμα των 224 bp, και συνεπώς δεν πραγματοποιείται η πέψη του τμήματος στα αντίστοιχα τμήματα μεγέθους 90 bp και 134 bp.

Συμπέρασμα των παραπάνω είναι ότι στο ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο άτομο (CC) μετά από την επώαση με την περιοριστική ενδονουκλεάση θα έχει ολοκληρωθεί η πέψη και στα 2 αλληλόμορφα δίνοντας 2 ζώνες μεγέθους 90 bp και 134 bp. Στο ετερόζυγο άτομο (CT), το οποίο έχει ένα φυσιολογικό και ένα αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη, θα εμφανίζεται πρότυπο 3 ζωνών μεγέθους 90 bp, 134 bp και 224bp. Αντίστοιχα στο ομόζυγο για το αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη άτομο (TT) θα εμφανιστεί πρότυπο μόνο μιας ζώνης μεγέθους 224 bp .

Σε κάθε σωληνάριο erppendorf όπου γίνεται η πέψη προστέθηκαν τα συστατικά σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6) :

Πίνακας 6 : Σύσταση του διαλύματος πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση.

DNA (PCR Product)	Αρχική συγκέντρωση	Τελική	1 μl
HhaI	20U/ul	3U	0,15 μl
CutSmart Buffer	10x	1x	1 μl
ddH ₂ O	μέχρι τα 10 μl		

Ακολούθησε επώαση overnight (O/N) των erppendorf με τα δείγματα στους 37°C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για το ένζυμο.

2.2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης γίνεται διαχωρισμός με βάση το μοριακό βάρος καθώς αυτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός. Τα μόρια με μεγάλο μοριακό βάρος έχουν μικρή κινητικότητα, ενώ μόρια με μικρό μοριακό βάρος κινούνται ταχύτερα, για αυτό και δημιουργείται μια κλασμάτωση στην πηκτή που παρατηρείται μετά τη χρώση της.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης αρχικά πρέπει να γίνει η παρασκευή της. Για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης 12% χρησιμοποιούνται τα συστατικά με τη σύσταση όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 7) :

Πίνακας 7 : Σύσταση των συστατικών για την παρασκευή της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Ακρυλαμίδα	7,5 γραμμάρια
Bis-ακρυλαμίδα (N,N-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδιο)	0,2 γραμμάρια
Ουρία	8 γραμμάρια
10x TBE Buffer	6,5 ml
TEMED	62,5μl
APS 20% w/v	375μl
ddH ₂ O	Έως 62,5 ml

Η bis-ακρυλαμίδα, συντελεί στον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ των αλυσίδων των πολυμερών του ακρυλαμιδίου. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα τρισδιάστατο πολυμερές πλέγμα, το μέγεθος των πόρων του οποίου εξαρτάται από τον βαθμό πολυμερισμού και είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης των μονομερών του ακρυλαμιδίου. Το υπερθειϊκό αμμώνιο, ή αλλιώς APS χρησιμοποιείται ως καταλύτης έναρξης σχηματισμού των ελεύθερων ριζών, ενώ ο φωτοχημικός καταλύτης, N,N, τετραμεθυλοεθυλενοδιαμίνη, που είναι γνωστός ως TEMED, αποσυνθέτει το

υπερθειϊκό ιόν και δίνει ελεύθερες ρίζες, που διαδίδονται σε άλλα μόρια ακρυλαμίδιου προς σχηματισμό του πολυμερούς.

Αρχικά, με τη χρήση του ηλεκτρονικού ζυγού, ζυγίζονται η ακρυλαμίδη, η bis-ακρυλαμίδη και η ουρία και τοποθετούνται σε ένα ποτήρι ζέσεως. Σε αυτό προστίθεται το 10x TBE buffer και ένα μέρος από το συνολικό όγκο του ddH₂O και αναδεύονται. Στη συνέχεια, με τη χρήση διηθητικού χαρτιού γίνεται διήθηση του διαλύματος σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώνεται με τον υπόλοιπο όγκο ddH₂O μέχρι τα 62,5ml. Στο τέλος προστίθενται το APS 20%w/v και το TEMED, με ήπια ανάδευση, τα οποία θα επιταχύνουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης, και το διάλυμα ακρυλαμίδης τοποθετείται σε ειδική κατασκευή για κάθετη ηλεκτροφόρηση για να πολυμεριστεί, σε περίπου 30 λεπτά. Η συσκευή αυτή αποτελείται από δύο πλάκες (τζάμια) που ευθυγραμίζονται στην κάτω επιφάνεια της συσκευής και διαχωρίζονται μεταξύ τους από ειδικά τμήματα (αποστάτες) που δημιουργούν ενδιάμεσα κενά όπου θα τοποθετηθεί το διάλυμα ακρυλαμίδης (spacers). Ημιτελής ή λανθασμένη ευθυγράμμιση θα οδηγήσει σε διαρροή του διαλύματος διαμέσου των θέσεων επαφής, πριν τη στερεοποίηση της πηκτής.

Για την ηλεκτροφόρηση της πηκτής, μετακινείται αυτή σε συσκευή κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης, όπου προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα των ηλεκτροδίων, 1x TBE buffer. Σε κάθε δείγμα που πρόκειται να φορτωθεί στην πηκτή προστίθενται 3μl loading buffer. Επίσης, σε κάθε πηκτή, πριν από τα δείγματα φορτώνεται και ένας μάρτυρας μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 220-250 volts σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες.

2.2.7. Χρώση πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση της πηκτής πολυακρυλαμίδης ακολουθεί χρώση της έτσι ώστε το αποτέλεσμα να είναι οπτικά ορατό. Για τη

χρώση είναι απαραίτητα 3 διαφορετικά διαλύματα, των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται παρακάτω μαζί με τα βήματα παρασκευής τους.

Διάλυμα 1

Σε ογκομετρικό σωλήνα προστίθενται 400ml ddH₂O (2 x 200ml) και 500μl οξικού οξέος (acetic acid) και αναδεύονται.

Διάλυμα 2

Σε διαφορετικό ογκομετρικό σωλήνα προστίθενται 200ml ddH₂O και 0,3gr νιτρικού αργύρου (AgNO₃). Στο σωλήνα τοποθετήθηκε μαγνήτης για την συνεχή ανάδευση του διαλύματος μέχρι να διαλυτοποιηθεί ο νιτρικός άργυρος.

Διάλυμα 3

Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 200ml ddH₂O, 3gr υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH), 1ml φορμαλδεύδη και 0,01gr βοροϋδρίδιο του Νατρίου (NaBH₄). Το NaBH₄ προστίθεται τελευταίο από τα συστατικά καθώς είναι διαβρωτικό.

Αρχικά, αφαιρούνται από την πηκτή τα τζάμια που σχηματίζουν την κατασκευή και αυτή τοποθετείται σε ειδικό δοχείο για να ακολουθήσει η χρώση. Στο πρώτο βήμα της χρώσης η πηκτή εμβαπτίζεται σε 200ml διαλύματος 1 και αναδεύεται για 2 λεπτά. Το διάλυμα 1 απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Στο δεύτερο βήμα στην πηκτή προστίθενται το διάλυμα 2 με τον νιτρικό άργυρο και η πηκτή αναδεύεται για 15 λεπτά. Στη συνέχεια γίνονται 2 πλύσεις με ddH₂O για 2 λεπτά η κάθε μια. Στο τρίτο και τελευταίο βήμα προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν τα κλάσματα της ηλεκτροφόρησης (ζώνες). Αφού ολοκληρωθεί και η τελευταία πλύση της πηκτής με ddH₂O, αυτή αποθηκεύεται σε μεμβράνη για να είναι εύκολη η παρατήρηση της.

Για το γονίδιο FUT1

2.2.8. MassARRAY

Για την γονοτύπηση του SNP του γονιδίου FUT1 αρχικά προετοιμάστηκε το δείγμα DNA για να αποσταλεί στην εταιρία BGI που εφαρμόζει την τεχνική αυτή. Το DNA που αποστάλθηκε έπρεπε να περιλαμβάνει 150 νουκλεοτίδια εκατέρωθεν της πολυμορφικής θέσης, δηλαδή να τηρεί το εξής σχέδιο :

150 νουκλεοτίδια [A/G] 150 νουκλεοτίδια

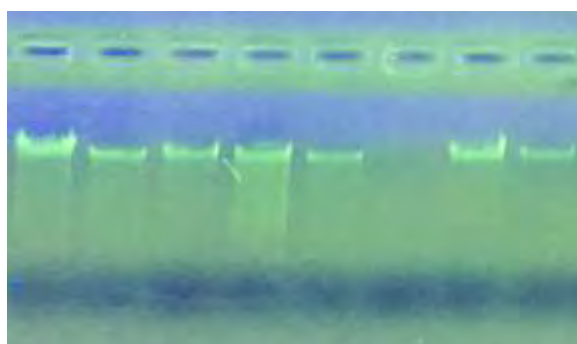
Η αλληλουχία που ακολουθεί, αποστάλθηκε στην εταιρία έτσι ώστε να εφαρμοστεί το Sequenom MassArray, το οποίο αποτελεί μέθοδο νέας γενιάς. Στη μέθοδο αυτή, όπως περιγράφηκε στην αντίστοιχη ενότητα, **Γονοτύπηση SNP με χρήση της μεθόδου MassAssay iPLEX**, πραγματοποιείται αντίδραση PCR με χρήση συγκεκριμένων εκκινητών οι οποίοι υβριδοποιούνται ανοδικά της πολυμορφικής θέσης που προορίζεται για γονοτύπηση. Η αλληλουχία, η οποία περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό που μελετήθηκε είναι η εξής :

```
CCATATTCTGCCTGGCGGGCACGCCGGTACACCCCAACGCCTCCGATTCTGTCCCAAGCAT  
CCTGCCTCCCTTTCCGGGACCTGGACTATTTACCCGGATGGCCGGTTTGGGAACCAGATGG  
GACAGTATGCCACGCTGCTGGCCCTG[A/G]CGCAGCTCAACGGCCGCCAGGCCTTCATCCA  
GCCTGCCATGCACGCCGTCCTGGCCCCCGTGTTCGCATCACGCTGCCTGTCTGGCGCCCCG  
AGGTAGACAGGCACGCTCCTTGGCGGGAGCTGGAGCTTCACGACTGGATGTCCG
```

3. Αποτελέσματα

3.1. Απομόνωση

Από την ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v πήραμε το παρακάτω αποτέλεσμα, όπου φαίνονται οι ζώνες του τμήματος DNA που απομονώθηκε.

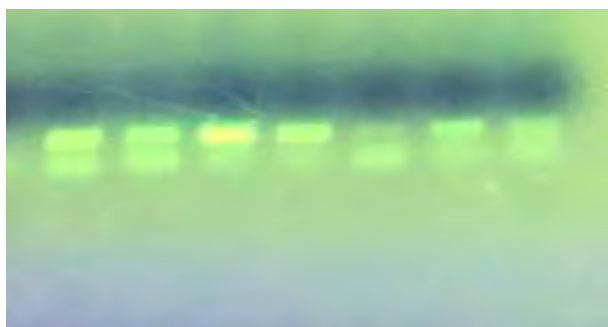


Εικόνα 1 : Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων DNA μετά από απομόνωση.

Για το γονίδιο RYR1

3.2. PCR

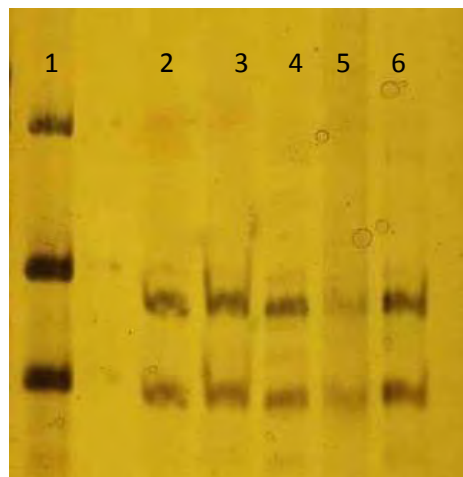
Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών, όπως αναφέρθηκε στην πειραματική διαδικασία παραπάνω, ενισχύθηκε ένα τμήμα του γονιδίου RYR1. Για τον έλεγχο της επιτυχίας της διαδικασίας που εκτελέστηκε, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, στην οποία ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα PCR.



Εικόνα 2 : Ηλεκτροφόρηση ενισχυμένου DNA με PCR.

3.3. RFLP

Τα προϊόντα PCR, τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v, επώστηκαν overnight με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, το ένζυμο HhaI, σε θερμοκρασία 37°C. Στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή ακρυλαμίδης 12% μαζί με μάρτυρα μοριακού μεγέθους τμημάτων DNA (100bp ladder), σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες και αφού ολοκληρώθηκε η χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο παρατηρήθηκαν τα πρότυπα ζωνών που εμφανίστηκαν στην πηκτή, για να χαρακτηριστούν οι οργανισμοί ως προς το γονότυπο τους για το γονίδιο ενδιαφέροντος, RYR1.



Εικόνα 3 : Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων μετά από πέψη με το ένζυμο HhaI.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα το δείγμα 1 είναι ετερόζυγο με ένα φυσιολογικό και ένα αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα (2-6) είναι ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο.

Για το γονίδιο FUT1

Αφού ολοκληρώθηκε η μέθοδος νέας γενιάς MassARRAY, η εταιρία που είχε αναλάβει την γονοτύπηση απέστειλε τα αποτελέσματα για τα δείγματα DNA που είχε λάβει.

Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα προσδιορίστηκαν οι γονότυποι για όλα τα δείγματα του πειράματος τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8).

Πίνακας 8 : Πληροφορίες για τα 83 δείγματα χοίρων της μελέτης, καθώς και οι γονότυποι τους για τα γονίδια RYR1 και FUT1.

Αριθμός δείγματος	Κωδικός δείγματος	Φυλή	Γονότυπος	
			RYR1	FUT1
1	694	Duroc	CC	GG
2	680	Duroc	CC	GG
3	6473	LWM	CT	AA
4	6307	LWM	CC	AG
5	6447	LWF	CC	GG
6	6534	LWF	CC	GG
7	8484	Pietrain	CC	GG
8	7141	Welsh	CC	GG
9	6511	LWF	CC	AG
10	6545	LWF	CC	AG
11	702	Duroc	CC	GG
12	6480	LWM	CC	GG
13	6378	LWF	CC	AG
14	6306	LWM	CC	GG
15	7105	Welsh	CC	GG
16	690	Duroc	CC	AG
17	2026	Landrace	CC	GG
18	6381	LWF	CC	GG
19	6496	LWM	CC	AG
20	6373	LWM	CC	AG
21	691	Duroc	CT	AA
22	6280	LWF	CC	GG
23	2044	Landrace	CC	GG
24	6379	LWF	CC	GG
25	663	Duroc	CC	AG
26	6398	LWF	CC	AA
27	6446	LWF	CC	GG
28	668	Duroc	CC	GG
29	5180	LWM	CC	GG
30	6490	LWM	CC	GG

32	2056	Landrace	CC	GG
33	6380	LWF	CC	GG
34	2053	Landrace	CC	GG
35	670	Duroc	CC	GG
36	6364	LWF	CC	AG
37	6397	LWF	CC	AG
38	6315	LWM	CC	AG
39	6547	LWF	CC	GG
40	6488	LWM	CC	GG
41	2059(2052)	Landrace	CC	GG
42	6445	LWF	CC	GG
43	7159	Welsh	CC	GG
44	6487	LWM	CC	GG
45	7150	Welsh	CC	GG
46	3221	Pietrain	CC	GG
47	0111501	LWF	CC	GG
48	0117305	LWF	CC	GG
49	7098	Welsh	CC	GG
50	0100901	LWF	CC	GG
51	0116206	LWF	CC	GG
52	0107106	LWF	CC	AG
53	0110101	LWF	CC	AG
54	0116305	LWF	CC	GG
55	0101304	LWF	CT	AG
56	0102202	LWF	CC	GG
57	0100301	LWF	CC	GG
58	0115602	LWF	CC	GG
59	0115804	LWF	CC	AG
60	8041	Pietrain	CC	GG
61	0100603	LWF	CC	AG
62	0107404	LWF	CC	GG
63	4975	LWMeat	CC	AG
64	0100403	LWF	CC	GG
65	0112302	LWF	CC	AG
66	0115503	LWF	CC	GG
67	0105202	LWF	CC	AG
68	6375	LWF	CC	AG
69	0102404	LWF	CC	GG
70	0113902	LWF	CC	GG
71	0102506	LWF	CC	GG
72	0552	Duroc	CC	GG

73	2042	Landrace	CC	GG
74	8468	Pietrain	CC	GG
75	0101709	LWF	CC	GG
76	0115704	LWF	CT	AG
77	0116401	LWF	CC	AG
78	0100506	LWF	CC	AG
79	0114807	LWF	CC	AG
80	4175	LWF	CC	GG
81	0101203	LWF	CT	AG
82	0111403	LWF	CC	GG
83	0110402	LWF	CT	AG
84	0105102	LWF	CC	GG

3.4. Γενετική πληθυσμών - Υπολογισμός γονοτυπικών και αλληλομορφικών συχνοτήτων

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα υπολογίστηκαν οι γονοτυπικές και αλληλομορφικές συχνοτήτες όπως φαίνεται παρακάτω:

Για το γονίδιο RYR1

Γονοτυπικές συχνοτήτες

Ο γονότυπος CC (ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο) εμφανίζεται σε 77 ζώα, ενώ ο γονότυπος CT (ετερόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη) σε 6 ζώα-φορείς. Συνολικά ο αριθμός των ζώων είναι 83. Συνεπώς,

- Συχνότητα CC : $77/83=0,93$
- Συχνότητα CT : $6/83= 0,07$

Αλληλομορφικές συχνοτήτες

Το αλληλόμορφο C (φυσιολογικό) εμφανίζεται 166 φορές, ενώ το T (φέρει τη μετάλλαξη) 6 φορές. Ο συνολικός αριθμός των αλληλομόρφων είναι 166. Συνεπώς,

- Συχνότητα C : $160/166= 0,96$
- Συχνότητα T : $6/166= 0,04$

Για το γονίδιο FUT1

Γονοτυπικές συχνότητες

Ο γονότυπος AA (ομόζυγο για το φυσιολογικό αλληλόμορφο) εμφανίζεται σε 3 ζώα, ο γονότυπος GA (ετερόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη) σε 26 ζώα-φορείς και ο γονότυπος GG (ομόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη) σε 54 ζώα. Συνολικά ο αριθμός των ζώων είναι 83. Συνεπώς,

- Συχνότητα AA : $3/83 = 0,04$
- Συχνότητα GA : $26/83 = 0,31$
- Συχνότητα GG : $54/83 = 0,65$

Αλληλομορφικές συχνότητες

Το αλληλόμορφο A (φυσιολογικό) εμφανίζεται 32 φορές, ενώ το G (φέρει τη μετάλλαξη) 134 φορές. Ο συνολικός αριθμός των αλληλομόρφων είναι 166. Συνεπώς,

- Συχνότητα A : $32/166 = 0,19$
- Συχνότητα G : $134/166 = 0,81$

4. Συζήτηση

4.1. Για το γονίδιο RYR1

Το σύνδρομο άγχους των χοίρων, το οποίο είναι γνωστό ως Porcine Stress Syndrome (PSS), έχει συσχετιστεί με μια σημειακή μετάλλαξη C1843T (Arg615Cys) στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της ρυανοδίνης (RYR1) (Ilie et al, 2014), ο οποίος είναι κανάλι απελευθέρωσης Ca^{2+} του σαρκοπλασματικού δικτύου. Το γονίδιο RYR1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 των χοίρων (Ilie et al, 2014). Το σύνδρομο είναι κληρονομήσιμη ασθένεια που επηρεάζει τους χοίρους και μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο (Brenig et al, 1992).

Το γονίδιο RYR1 θεωρείται ο καλύτερος διαθέσιμος δείκτης που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο προδιάθεσης για ευαισθησία στο σύνδρομο PSS σε διάφορες φυλές χοίρων (Brenig et al, 1992), καθώς ανάμεσα στις φυλές των χοίρων το αλληλόμορφο που σχετίζεται με το σύνδρομο εμφανίζει διαφορετική συχνότητα. Οι μεταβολές στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου οδηγούν σε μια ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, όπως η συστολή των μυών, η έκφραση γονιδίων και η διαφοροποίηση του μεταβολισμού του οργανισμού, καθώς έχει χαρακτηριστεί ως υπερ-μεταβολικό σύνδρομο. Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης στον υποδοχέα της ρυανοδίνης RYR1 (C1843T) προκαλεί δυσλειτουργία στην ενδοκυτταρική ομοιόσταση του ασβεστίου, η οποία οδηγεί σε διαταραχή των σκελετικών μυών και μυϊκή ακαμψία (Rojas et al, 2008). Επιπλέον συμπτώματα του υπερ-μεταβολικού αυτού συνδρόμου είναι υπερθερμία, ταχυκαρδία (Rosenberg et al, 2015), ταχύπνοια, υπερβολική κατανάλωση οξυγόνου, κυάνωση, που ορίζεται ως ο μπλε χρωματισμός του δέρματος που προκύπτει από κακή κυκλοφορία ή ανεπαρκή οξυγόνωση του αίματος, καρδιακή δυσρυθμία, και ασταθής αρτηριακή πίεση (Ilie et al, 2014). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η μετάλλαξη που συμβαίνει στον υποδοχέα διευκολύνει το άνοιγμα του καναλιού και αναστέλλει το κλείσιμο του (Ilie et al, 2014).

Το σύνδρομο αυτό προκαλεί σοβαρά οικονομικά προβλήματα στην κτηνοτροφία δεδομένου ότι στα ζώα που πάσχουν από αυτό, αλλά ακόμα και

στους φορείς, σε συνθήκες στρες αλλοιώνεται η ποιότητα του κρέατος, μειώνοντας την εμπορική αξία του χοιρινού ακριβώς μετά από τη θανάτωση του ζώου. Ειδικά στην περίπτωση που το ζώο έχει εκτεθεί σε κατάσταση στρες, είτε ήπια είτε μέτρια, ή ακόμα και αν έχει καταναλώσει κάποιο φάρμακο που σχετίζεται με το σύνδρομο PSS, πριν από τη σφαγή, προκαλείται ο σχηματισμός του PSE κρέατος. Το κρέας αυτό συνδυάζει την υψηλή θερμοκρασία με την χαμηλή τιμή pH που οδηγούν στην μετουσίωση των πρωτεϊνών των μυών επηρεάζοντας την ικανότητα κατακράτησης νερού (Ilie et al, 2014). Ποιοτικά, το PSE κρέας εμφανίζεται λιγότερο κόκκινο, όπως είναι σε φυσιολογικές συνθήκες, και πιο κίτρινο (Adzitey et al, 2011).

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να χαρακτηριστούν οι γονότυποι 83 χοίρων για το γονίδιο RYR1 και να προσδιοριστούν οι συχνότητες εμφάνισης του αλληλομόρφου που φέρει την, επιβλαβή για την κτηνοτροφία, μετάλλαξη. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο (C) εμφανίζεται στον πληθυσμό με συχνότητα 96% ενώ το αλληλόμορφο (T) που φέρει τη μετάλλαξη σε συχνότητα 4%. Σε αντίστοιχες εργασίες, που έχουν προηγηθεί (Ilie et al, 2014), οι συχνότητες ανέρχονταν στο 93% και 7% αντίστοιχα. Η γονοτυπική συχνότητα για τα ετερόζυγα ζώα-φορείς (CT) έφτασε στο 7%, εμφανώς πιο χαμηλή στο σύνολο των χοίρων που ελέγχθηκαν στην εργασία συγκριτικά με προηγούμενη που κυμαινόταν στο 15%. Ο αριθμός των ζώων με γονότυπο ομόζυγο για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη είναι μηδενικός, καθώς τόσο στην παρούσα εργαστηριακή μελέτη, όσο και σε αντίστοιχες εργασίες που έχουν προηγηθεί (Ilie et al, 2014) δεν έχει καταγραφεί άτομο με γονότυπο TT το οποίο έχει επιβιώσει.

Τα ετερόζυγα ζώα-φορείς του συνδρόμου, με γονότυπο CT, θα πρέπει να λαμβάνουν ειδική μεταχείριση, για να μην βιώνουν καταστάσεις στρες, ειδικά σε περιπτώσεις που προωθούνται για θανάτωση, που θα οδηγούσε σε σχηματισμό του PSE κρέατος. Ειδικοί χειρισμοί θα πρέπει να εφορμίζονται επίσης και στη διαδικασία διασταύρωσης μεταξύ των ζώων του ίδιου πληθυσμού, από τα οποία θα προέκυπταν απόγονοι με υψηλές πιθανότητες εκδήλωσης της ευαισθησίας στο σύνδρομο της υπερθερμίας (MH).

4.2. Για το γονίδιο FUT1

Ο θάνατος των χοιριδίων μπορεί να αποδοθεί σε διάφορες αιτίες, συμπεριλαμβανομένης της ευαισθησίας του ξενιστή σε φυσικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και πρακτικές διαχείρισης τους. Οι πιο συνηθισμένες αναφερθείσες αιτίες θανάτου στους ζώντες χοίρους είναι η πείνα, η διάρροια απογαλακτισμού και ο τραυματισμός από τη μητέρα τις πρώτες μέρες μετά από τη γέννα.

Η δράση των E.coli F18 βακτηρίων, τα οποία έχουν συσχετιστεί με τη νόσο του οιδήματος (ED) και με την διάρροια απογαλακτισμού (PWD) είναι ο αποικισμός στο λεπτό έντερο αφού προηγηθεί η σύνδεση με τους κατάλληλους υποδοχείς (E.coli F18R) (Wang et al, 2011). Ο υποδοχέας E.coli F18 (E.coli F18R) που υπάρχει στις μεμβράνες των βλεφαρίδων του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου παίζει ρόλο στη δέσμευση των βακτηρίων E.coli F18. Η παθογένεια του στελέχους E.coli F18 ωστόσο, εξαρτάται από την παρουσία των υποδοχέων E.coli F18R στις μεμβράνες του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου των χοίρων.

Το γονίδιο της αλφα- (1,2) -φουκοζυλτρανσφεράσης (FUT1) το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 (Meijerink et al, 1997), και συγκεκριμένα στη θέση 6q11, έχει αναγνωριστεί ως υποψήφιο γονίδιο για τη ρύθμιση της έκφρασης ECF18R (Meijerink et al, 1997). Γενικότερα, το γονίδιο FUT1 λειτουργεί ως γονίδιο-μάρτυρας για την επιλογή στους χοίρους. Το γονίδιο FUT1 του χοίρου είναι 82,3% ταυτόσημο με την ανθρώπινη ακολουθία FUT1 (Wang et al, 2011) και εμπλέκεται επίσης στο σχηματισμό των αντιγόνων των ομάδων αίματος του συστήματος αίματος των χοίρων AO (αντίστοιχο του ανθρώπινου συστήματος ABO). Η μετάλλαξη του γονιδίου FUT1 επηρεάζει την ανθεκτικότητα και την ευαισθησία στα βακτήρια για τους χοίρους που φέρουν το αλληλόμορφο με την μετάλλαξη, καθώς επηρεάζει τον αριθμό των υποδοχέων του στελέχους E.coli F18.

Με τον χαρακτηρισμό των γονοτύπων για το γονίδιο FUT1 σε 83 χοίρους αξιολογήθηκε η σύνδεση του πολυμορφισμού FUT1 με την επιβίωση των οργανισμών μετά τον απογαλακτισμό. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η μετάλλαξη που γίνεται στο γονίδιο FUT1 αυξάνει την ευαισθησία στα εντεροτοξικά βακτήρια E.coli F18 και συνεπώς το φυσιολογικό αλληλόμορφο

είναι το επιθυμητό για τον πληθυσμό των χοίρων καθώς αυξάνει την επιβίωση μετά τον απογαλακτισμό. Ωστόσο, ο μηχανισμός που υποκρύπτει το όφελος επιβίωσης του φυσιολογικού αλληλόμορφου παραμένει άγνωστος, αλλά σύμφωνα με τις πρόσφατες μελέτες το γονίδιο FUT1 επιδρά στην αντοχή των χοίρων στις μολυσματικές ασθένειες (Kim et al, 2013).

Στην παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν οι γονότυποι 83 χοίρων για το γονίδιο FUT1 και προσδιορίστηκαν οι συχνότητες εμφάνισης τόσο των γονοτύπων, όσο και των αλληλομόρφων στον πληθυσμό των χοίρων που μελετήθηκε. Το φυσιολογικό αλληλόμορφο (A) εμφανίζεται στον πληθυσμό με συχνότητα 19% ενώ το αλληλόμορφο (G) που φέρει τη μετάλλαξη σε συχνότητα 81%. Σε αντίστοιχες εργασίες, που έχουν προηγηθεί (Kim et al, 2013), οι συχνότητες ανέρχονταν στο 29% και 71% αντίστοιχα. Η γονοτυπική συχνότητα για τα ετερόζυγα ζώα-φορείς (GA) έφτασε στο 31%, ενώ η συχνότητα για τα ομόζυγα για το αλληλόμορφο με την μετάλλαξη (GG) υπολογίστηκε 65%. Σε προηγούμενη μελέτη οι συχνότητες αυτές ήταν 37% και 53% αντίστοιχα (Kim et al, 2013). Τέλος, η συχνότητα για τα ομόζυγα άτομα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο είναι μόλις 4%.

Όπως απορρέει από τα παραπάνω, και σύμφωνα με τα εργαστηριακά δεδομένα, το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στον πληθυσμό των χοίρων, συγκριτικά με το φυσιολογικό. Είναι μια επιβλαβής μετάλλαξη για τον πληθυσμό των χοίρων, η οποία με κατάλληλους χειρισμούς, όπως είναι οι στοχευμένες διασταυρώσεις που αποδίδουν απογόνους με μεγάλες πιθανότητες να φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο, ή ακόμα και η αντικατάσταση των ζώων από το κοπάδι με άλλα που φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο, θα οδηγήσει στην αύξηση της συχνότητας εμφάνισης αυτού του αλληλομόρφου στον πληθυσμό.

Στο κοπάδι που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία μικρό ποσοστό των χοίρων είναι ετερόζυγα για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη στο γονίδιο RYR1, ενώ αντίστοιχα το ποσοστό για τους ετερόζυγους για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη στο γονίδιο FUT1 είναι αρκετά υψηλό. Το μεγαλύτερο ποσοστό παρατηρείται στους ομόζυγους για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο χοίρους για το γονίδιο FUT1.

Από τον πληθυσμό των 83 χοίρων, μόνο 4 από αυτούς είναι ετερόζυγοι και για τους 2 γενετικούς τόπους (CT - AG), και το ποσοστό για αυτούς ανέρχεται στο 5%. Ωστόσο, υπάρχουν 2 χοίροι από τους 83 (ποσοστό 2%) οι οποίοι είναι ετερόζυγοι για τον γενετικό τόπο του γονιδίου RYR1 (CT) και ομόζυγοι για το φυσιολογικό αλληλόμορφο για τον γενετικό τόπο του γονιδίου FUT1 (AA), και ένας χοίρος από τους 83 (ποσοστό 1%) ο οποίος είναι ομόζυγος για το φυσιολογικό αλληλόμορφο τόσο για τον γενετικό τόπο του γονιδίου RYR1 (CC) όσο και για τον γενετικό τόπο του γονιδίου FUT1 (AA). Τα υπόλοιπα 76 ζώα του κοπαδιού (ποσοστό 92%) είναι ομόζυγα για το φυσιολογικό αλληλόμορφο του γενετικού τόπου του γονιδίου RYR1, αλλά για τον γενετικό τόπο του γονιδίου FUT1 είναι είτε ετερόζυγα είτε ομόζυγα για το αλληλόμορφο που φέρει τη μετάλλαξη, καθιστώντας όλα αυτά τα ζώα ευαίσθητα στη νόσο των οιδημάτων, καθώς και στη διάρροια απογαλακτισμού, δεδομένης της ευαισθησίας που παρουσιάζουν στα εντεροτοξικά βακτήρια E.coli F18.

Υπάρχει η ανάγκη να γίνουν αντίστοιχες μελέτες για να ελεγχθούν περισσότεροι πολυμορφισμοί στους πληθυσμούς των χοίρων καθώς και γονοτύπηση των απογόνων κάθε πληθυσμού, έτσι ώστε να υπάρχει μια συστηματική εκτίμηση της κατάστασης του κοπαδιού και για να γίνονται διασταυρώσεις μεταξύ των ζώων που να έχουν υψηλές αποδόσεις. Σε περίπτωση που δεν είναι εφικτή η γενετική βελτίωση των ατόμων σε έναν πληθυσμό, θα μπορούσαν να εισαχθούν νέα ζώα στον πληθυσμό στα οποία είναι γνωστός ο γονότυπος και μπορούν να εξυπηρετήσουν τους σκοπούς που προαναφέρθηκαν σε ένα κοπάδι.

5. Βιβλιογραφία

- Adzitey, F., & Nurul, H. (2011). Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: Causes and measures to reduce these incidences - a mini review. *International Food Research Journal*, 18(1), 11–20.
- Bao, W. Bin, Ye, L., Pan, Z. Y., Zhu, J., Zhu, G. Q., Huang, X. G., & Wu, S. L. (2011). Beneficial genotype of swine FUT1 gene governing resistance to E. coli F18 is associated with important economic traits. *Journal of Genetics*, 90(2), 315–318. <https://doi.org/10.1007/s12041-011-0059-9>
- Brenig, B., & Brem, G. (1992). Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1). *FEBS Letters*, 298(2–3), 277–279. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80076-S](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80076-S)
- Farber, C. R., Raney, N. E., Kuhlers, D. L., Nadarajah, K., & Ernst, C. W. (2003). Mapping of porcine genetic markers generated by representational difference analysis. *Anim Biotechnol*, 14(1), 87–102. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120022139>
- Francis, D. H. (2002). Enterotoxigenic Escherichia coli infection in pigs and its diagnosis. *Journal of Swine Health and Production*, 10(4), 171–175.
- Gabriel, S., Ziaugra, L., & Tabbaa, D. (2009). SNP genotyping using the sequenom massARRAY iPLEX Platform. *Current Protocols in Human Genetics*, (SUPPL. 60), 1–18. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0212s60>
- Hospital, H., & Road, D. (1985). OF MAN AND PIGS : IS MALIGNANT HYPERTHERMIA A STRESS-RELATED DISORDER ?, 53(October 1983), 47–53.
- In, M., & Wild, E. (2005). et al ., 1983, 55(2), 251–255.
- Kim, K., Nguyen, D. T., Choi, M., Kim, J.-H., Seo, H. G., Dadi, H., ... Park, C. (2013). Alpha (1,2)-Fucosyltransferase M307A Polymorphism Improves

Piglet Survival. *Animal Biotechnology*, 24(3), 243–250.

<https://doi.org/10.1080/10495398.2013.776964>

- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11), 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- Letters, R. B. (2014). Screening of RYR1 genotypes in swine population by a rapid and sensitive method, 19(2), 9170–9178.
- Liu, Y., Rw, X., Xm, Y., Yj, H., Gq, Z., Sl, W., & Wb, B. (2015). Expression Level of FUT1 Gene in Different Pig Populations and its Relationship with ETEC F18 Resistance, 1–5.
- Luo, Y., Qiu, X., Li, H., & Zhang, Q. (2010). Association between the polymorphism in FUT1 gene and the resistance to PWD and ED in three pig breeds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(10), 1268–1275. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90638>
- Ma, J., Li, M., Wang, H., & Li, X. (2012). Genotyping of the porcine ryanodine receptor 1 (RYR1) and estrogen receptor 1 (ESR1) genes by high resolution melting (HRM) approach. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(5), 1076–1079. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0139-6>
- Meijerink, E., Fries, R., V??geli, P., Masabanda, J., Wigger, G., Stricker, C., ... Stranzinger, G. (1997). Two ??(1,2) fucosyltransferase genes on porcine chromosome 6q11 are closely linked to the blood group inhibitor (S) and Escherichia coli F18 receptor (ECF18R) loci. *Mammalian Genome*, 8(10), 736–741. <https://doi.org/10.1007/s003359900556>
- Ouragh, L., Mériaux, J. -C., & Braun, J. -P. (1994). Genetic blood markers in Arabian, Barb and Arab-Barb horses in Morocco. *Animal Genetics*, 25(1), 45–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1994.tb00055.x>

- Rojas, J. E., Wilches, M. a., Cepeda, L. a., Garcés, M. F., Suarez, M. a., Baldrich, R. M., ... Caminos §, J. E. (2008). Molecular Diagnostics of Porcine Stress Syndrome Susceptibility Associated with the Arg615Cys Mutation Using Real-Time PCR with Fluorescent Hybridization Probes. *Revista Colombiana de Anestesiología*, 36(1), 11–18.
[https://doi.org/10.1016/S0120-3347\(08\)61003-5](https://doi.org/10.1016/S0120-3347(08)61003-5)
- Rosenberg, H., Pollock, N., Schiemann, A., Bulger, T., & Stowell, K. (2015). Malignant hyperthermia: a review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0310-1>
- Salas, R. C. D., & Mingala, C. N. (2017). Genetic Factors Affecting Pork Quality: Halothane and Rendement Napole Genes. *Animal Biotechnology*, 28(2), 148–155. <https://doi.org/10.1080/10495398.2016.1243550>
- Schwartz, R., & Teramo, K. A. (2000). A DNA polymorphism influencing $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to Escherichia coli F18 adhesion. *Immunogenetics*, 52(1–2), 129–136.
<https://doi.org/10.1007/s002510000263>
- Wang, S. J., Liu, W. J., Yang, L. G., Sargent, C. A., Liu, H. B., Wang, C., ... Zhang, S. J. (2012). Effects of FUT1 gene mutation on resistance to infectious disease. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 2805–2811.
<https://doi.org/10.1007/s11033-011-1039-0>
- List of pig breeds, From Wikipedia,
https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_pig_breeds
- Overview of Malignant Hyperthermia (Porcine stress syndrome), By HuiChu Lin, DVM, MS, DACVAA, JT Vaughan Large Animal Teaching Hospital, Auburn University,
<http://www.msdrvmanual.com/metabolic-disorders/malignant-hyperthermia/overview-of-malignant-hyperthermia>

- Ryanodine Receptors: Structure and Function* by Filip Van Petegem, <http://www.jbc.org/content/287/38/31624.full>
- E. coli Tops Weaned Pig Diarrhea Causes by Paul Armbrrecht, DVM | Dec 22, 2010 , <http://www.nationalhogfarmer.com/health-diseases/e-coli-tops-weaned-pig-diarrhea-causes-1215>
- Παναγιώτης Σμιτζής, Στεργίου, Λέκτορας, Εργαστήριο Γενικής & Ειδικής Ζωοτεχνίας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Άννα Στεργίου , <http://www.yraithros.gr/ekdoseis/choirotrofia-prooptikes-provlhmata-lyseis/>
- Jensen, P., 1986. Observations on the maternal behaviour of free-ranging domestic pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 16, 131–142.