

APPLICATION OF DNA POOLING METHOD FOR CSN3, CSN2 AND DGAT1 GENOTYPIZATION

VYUŽITÍ METODY DNA POOLING PRO GENOTYPIZACI *CSN3*, *CSN2* A *DGAT1*

Bořilová G., Přivětivá L., Putnová L.

Ústav genetiky, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

E-mail: gabriela.boril@seznam.cz

ABSTRACT

Our study is aimed at DNA pooling methodology for identification and prediction of bovine kappa-casein gene (*CSN3*) allelic variants in milk mix samples. Single nucleotide polymorphism is detected by using tetra-primer ARMS-PCR followed by capillary electrophoresis based on laser scanning of fluorescence-marked DNA fragments. Results are quantified against a regression function constructed with pools prepared with DNA from milk with known ratios of genetic variance. Genotyping pools should be constituted with care to ensure equal amounts of DNA individuals. Pooling allows allele frequencies in groups of individuals to be measured using far fewer PCR reactions. In our research DNA pooling methodology was optimized also for detection of beta-casein gene (*CSN2*) and acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) in milk mix samples. The frequency of allele *A* was 0.77, allele *B* 0.23 in *CSN3* gene, the frequency of allele *A1* of *CSN2* gene was 0.05, allele *A2* 0.95, the frequency of allele *Q* in *DGAT1* gene was 0.19 and allele *q* 0.81.

Keywords: bovine, milk, *CSN2*, *CSN3*, *DGAT1*, DNA pooling, tetra-primer ARMS-PCR

ABSTRAKT

Cílem optimalizace metody DNA pooling pro detekci genotypů zvolených kandidátních genů kravského mléka (*CSN3*, *CSN2*, *DGAT1*) je určení, zda a s jakou statistickou přesností lze stanovit jednotlivé genotypy, za využití genomové DNA izolované ze směsného vzorku mléka. Genomová DNA byla izolována z individuálních vzorků mléka 83 zvířat jednoho chovu. Vzorky byly předem rozděleny dle počtu somatických buněk. Polymorfismy byly testovány prostřednictvím ARMS-PCR. Frekvence alely *A* byla 0,77 a alely *B* 0,23 v genu *CSN3*. V genu *CSN2* byla zjištěna frekvence alely *A1* 0.05 a alely *A2* 0,95. Frekvence alely *Q*

DGAT1 genu byla 0,19 a alely *q* 0,81. Jako podkladový materiál pro konečné statistické zpracování byly prostřednictvím fragmentační analýzy testovány také směsné vzorky.

Klíčová slova: skot, mléko, *CSN2*, *CSN3*, *DGAT1*, DNA pooling, ARMS-PCR

ÚVOD

Analýza polymorfizmu mléka a mléčných proteinů poskytuje užitečné informace šlechtitelům i zpracovatelům mléka. Cílem a snahou dnešních chovatelů mléčného skotu je efektivní produkce kvalitního a zdravého mléka určeného nejen pro přímou konzumaci, ale zejména pro výrobu vysoce kvalitních mléčných výrobků.

Gen pro *CSN3* (*kappa-casein*) kóduje informaci pro jeden z nejdůležitějších proteinů mléka. Je uložen na 6. bovinním chromozomu (*Threadgill, Womack, 1990*). Polymorfismus tohoto genu je znám od roku 1964 (*Neelin*) a dosud bylo popsáno 6 genetických variant: *A*, *B* (*Neelin, 1964*), *C* (*Siebert a kol., 1987*), *E* (*Erhardt, 1989*) a *Ikonen a kol. (1996)* popsali u *CSN3* nové alely *F* a *G*. Z publikovaných prací je zřejmá převažující tendence alely *CSN3 A* a jednotlivá plemena se liší pouze frekvencí výskytu. Z hlediska zpracovatelů mléka je ovšem mnohem zajímavější alela *B*, neboť je asociována nejen s vyšší produkcí tuku (%) a bílkovin (%), ale zejména s lepším průběhem syření a vyšší jakostí syřeniny.

Dalšími geny, které jsou zajímavé z hlediska produkce mléka, jsou *CSN2* (*beta-casein*) a *DGAT1* (*acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase*).

U genu *CSN2* jsou detekovány alely *A1*(=*B*) a *A2*(=*A*), *Panicke et. al (1996)* uvádí, že alela *A2 CSN2* genu aditivně zvyšuje poměr proteinů k tuku. Nejnovější výzkumy prokazují, že alela *A1* je též rizikovým faktorem pro diabetes 1. typu (*Landesen, Elliot, 2003*) a je v asociaci s výskytem koronárních srdečních onemocnění.

U genu *DGAT1* (*acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase*) byl prokázán výrazně zlepšující vliv alely *Q* (*T*) na obsah tuku v mléce. Alela *q* (*M*) je asociována s vyšší celkovou produkcí mléka (kg).

K testování polymorfizmu mléka a mléčných proteinů slouží alelově specifická polymerázová řetězová reakce ARMS-PCR (*Rincón, Medrano, 2003*).

Pro snížení nákladů molekulárně biologických analýz prováděných na větších souborech zvířat byla využita metoda DNA pooling. „*Poolingování*“ znamená záměrné vytváření směsných vzorků – poolů (pools), které musí vykazovat maximální možnou rovnost množství DNA pocházející od jednotlivých testovaných jedinců. Použití těchto poolů umožňuje zjišťování zastoupení jednotlivých alel, metoda tak umožňuje provést mnohem méně molekulárně-biologických analýz, než kdyby byly genotypovány individuální vzorky.

Náhodné možné experimentální chyby, jež by se mohly objevit v cílovém vyjádření alelových frekvencí, jsou minimalizovány vhodným statistickým vyhodnocením výsledků analýz.

METODIKA

Vzorky syrového mléka byly odebrány od 83 zvířat dvou plemen (Holštýn a České strakaté) z jednoho chovu. Vzorky byly ve spolupráci s Laboratoří pro rozbor mléka Chrlice (Českomoravská společnost chovatelů a. s.) vyhodnoceny a rozděleny podle počtu somatických buněk.

Genomová DNA byla izolována z mléka standardní metodou pomocí kitu *Invisorb® Spin Blood Minikit for DNA Extractions*. Kvalita izolované genomové DNA ověřena elektroforezou na agarozovém gelu. K vizualizaci byl použit ethidium bromid.

Pro zajištění identického množství DNA ve všech vzorcích byla DNA kvantifikována na gelu pomocí standardů o známé koncentraci.

Polymorfismy jednotlivých genů byly detekovány užitím modifikované metody tetra-primer ARMS-PCR (*tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction*). Jde o alelově specifickou reakci s využitím dvou přímých a dvou zpětných primerů, kdy přímé primery jsou značené fluorescenční barvou. Následovala fragmentační analýza amplifikovaných fragmentů v sekvenátoru ABI 310 (Applied Biosystems). Testování bylo založené na laserovém skenování fluorescenčně značených DNA fragmentů na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Separace PCR fragmentů kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu probíhala spolu s interním DNA markerem. Určení genotypů v konkrétních MS proběhlo vyhodnocením velikostí DNA fragmentů softwarovými programy GeneScan® a Genotyper® (Applied Biosystems). Došlo ke stanovení frekvencí alel pro jednotlivé zvolené kandidátní geny.

Primery na ARMS PCR pro *CSN3* a *CSN2* byly vybrány dle literatury (*Rincón a Medrano, 2003*). Sekvence značeného primeru *CSN3I A* byla modifikována. Primery na ARMS PCR pro *DGATI* byly vybrány dle literatury (*Winter a kol., 2002*).

CSN3:

Použité primery: Acc.number X14908, Exon 4, A → C (5345.Nt). Alela *A* [A]: 245 bp (*CSN3I A* + *CSN3O B*), Alela *B* [C]: 163 bp (*CSN3O A* + *CSN3I B*), Meziprodukt: 350 bp (*CSN3O A* + *CSN3O B*)

Cyklování: proběhlo na přístroji GeneAmpTM PCR System 9700 cyclor (Applied Biosystems): Podmínky cyklování: predenaturace 95°C 15 min, 35x(denaturace 95°C 30s , annealing 55°C 30s, elongace 72°C 30s), závěrečná elongace 72°C 7 min

Reakční mix (konečný objem 25 ml) obsahoval: 1×PCR pufr, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μM primerů CSN3I B, CSN3O A a 0.6 μM primerů CSN3I A a CSN3O B, 200 μM každého dNTP, 1.5 U Taq Gold DNA polymerázy (Ampli^{Taq} GoldTM, Applied Biosystems), 50 ng DNA.

CSN2:

Použité primery: Acc.number X14711, Exon 7, C → G (kodon 122, 8267.Nt). Alela A=A2 [C]: 217 bp (CSN2I A + CSN2O B), Alela B=AI [G]: 175 bp (CSN2O A + CSN2I B), Meziprodukt: 338 bp (CSN2O A + CSN2O B)

Cyklování: proběhlo na přístroji GeneAmpTM PCR System 9700 cyclor (Applied Biosystems): Podmínky cyklování: predenaturace 95°C 15 min, 35x (denaturace 95°C 30s , annealing 65°C 30s, elongace 72°C 30s), závěrečná elongace 72°C 7 min.

Reakční mix (konečný objem 25 ml) obsahoval: 1×PCR pufr, 1.5 mM MgCl₂, 0.6 μM každého primeru, 200 μM každého dNTP, 3% DMSO, 1.25 U Taq Gold DNA polymerázy (Ampli^{Taq} GoldTM, Applied Biosystems), 50 ng DNA.

DGAT1:

Použité primery: Acc.number AJ318490, Exon 8, AA → GC (K232A, 10433.Nt a 10434.Nt), Alela Q [AA]: 174 bp (DGAT1I A + DGAT1O B), Alela q [GC]: 238 bp (DGAT1O A + DGAT1I B), Meziprodukt: 372 bp (DGAT1O A + DGAT1O B)

Cyklování: proběhlo na přístroji GeneAmpTM PCR System 9700 cyclor (Applied Biosystems): Podmínky cyklování: predenaturace 95°C 15 min, 35x(denaturace 95°C 30s, annealing 56°C 30s, elongace 72°C 30s), závěrečná elongace 72°C 7 min.

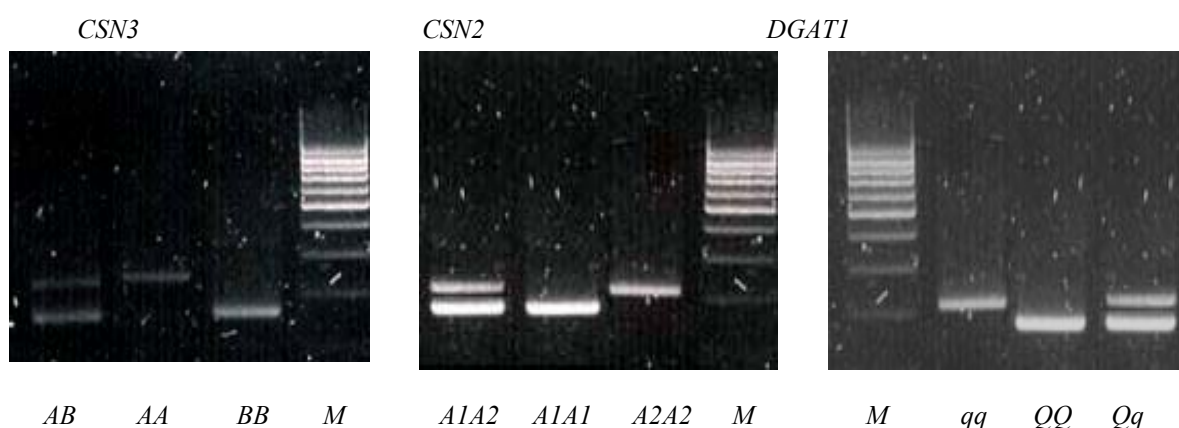
Reakční mix (konečný objem 25 ml) obsahoval: 1×PCR pufr, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μM primerů DGAT1I B, DGAT1O A a 0.6 μM primerů DGAT1I A a DGAT1O B, 200 μM každého dNTP, 1U Taq Gold DNA polymerázy (Ampli^{Taq} GoldTM, Applied Biosystems), 50 ng DNA.

Reakční mix fragmentační analýzy (konečný objem 13μl) obsahoval: 0.5 μl PCR produktu, 12 μl Formamidu, 0.5 μl ROX500 (DNA marker, Applied Biosystems), následovala denaturace 95°C 5 minut, pak byly vzorky vloženy na led.

VÝSLEDKY A ZÁVĚR

Metoda ARMS PCR byla optimalizována u studovaných genů *CSN3*, *CSN2*, *DGAT1* pro laboratorní podmínky řešitelského pracoviště (viz obr. 1).

Obr. 1: Elektroforetická separace ARMS PCR produktů na 2% agarózovém gelu, barveno ethidium bromidem

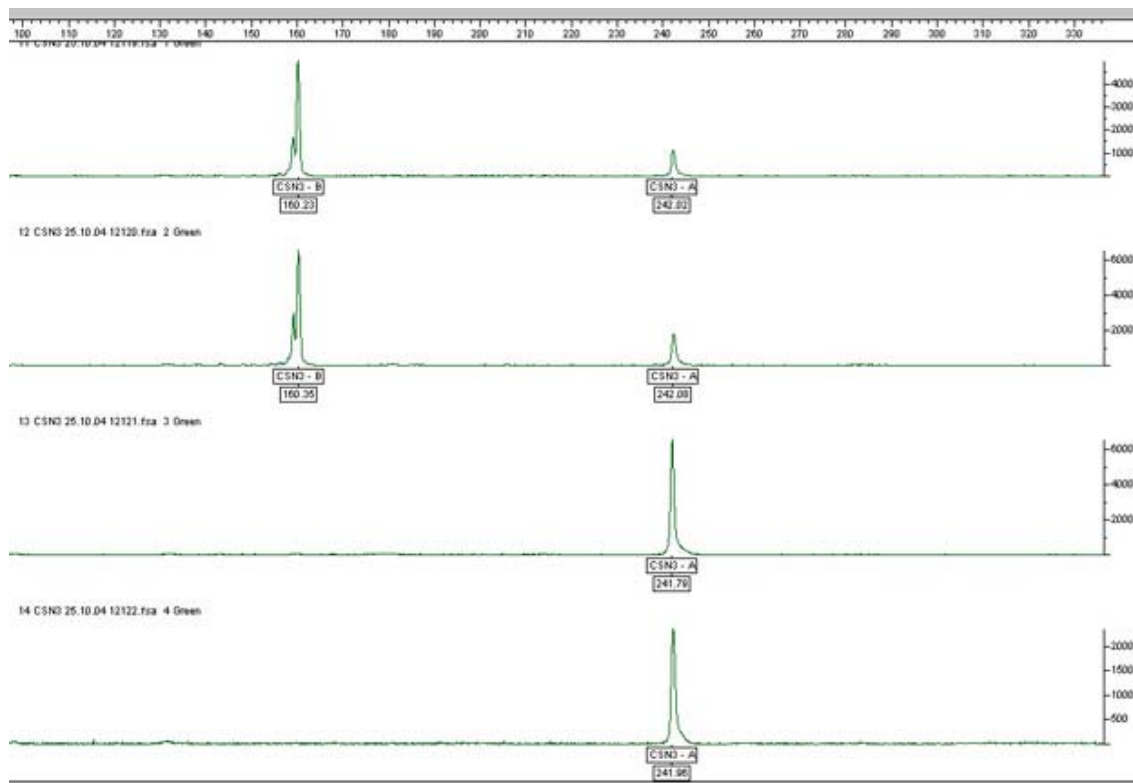


Stanoven byl výskyt genotypů a frekvence alel sledovaných genů v testovaném chovu skotu. Z tabulky č. 1. je zřejmá převažující frekvence alely *CSN3 A* a nižší frekvence alely *CSN3 B*, což je v souladu s údaji uváděnými v literatuře (Erhardt, 1989; Nebola a kol., 1996).

Tab. 1: Výskyt genotypů a frekvence alel sledovaných genů v testovaném chovu

Gen	N	Frekvence alel		Výskyt genotypů v chovu (ks)		
<i>CSN3</i>	83	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
		0,77	0,23	44	39	0
<i>CSN2</i>	83	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A1A1</i>	<i>A1A2</i>	<i>A2A2</i>
		0,05	0,95	0	8	75
<i>DGAT1</i>	83	<i>Q</i>	<i>q</i>	<i>QQ</i>	<i>Qq</i>	<i>qq</i>
		0,19	0,81	0	32	51

Obr. 2: Výstup fragmentační analýzy genu CSN3



Výsledky získané ARMS PCR a FA budou použity jako výchozí podklady pro statistické zpracování - zavedení metody DNA Pooling a následnou práci s umělými pooly.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Checa M. L., Dunner S., Canón J., 2002: Prediction of X and Y chromosome content in bovine sperm by using DNA pools through capillary electrophoresis. *Theriogenology*, 58: 1579-1586.

Fisher P. J., Spelman R. J., 2004: Verification of selective DNA pooling methodology through identification and estimation of the *DGAT1* effect. *Animal Genetics*, 35: 201-205.

Grisart B. et al., 2002: Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGAT1* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.*, 12: 222-231.

Rincón G., Medrano J. F., 2003: Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein genes using the tetra-primer ARMS-PCR. *J. Anim. Bree. Genet.*, 120: 331-337.

Winter A. et al., 2002: Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 9300-9305.

Threadgill D. W., Womack J. E., 1990: Genomic analysis of the major bovine milk genes. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6935-6942.

Neelin J. M., 1964: Variants of γ -casein revealed by improved starch gel electrophoresis. *J. Dairy Sci.*, 47: 506.

Siebert B., et al. 1987: Detection of a new γ -casein variant cow's milk. *Anim. Genet.*, 18: 269-272.

Erhardt G., 1989: γ -caseins in bovine milk. Evidence of a further allele (γ -CN E) in different breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 106: 225-231.

Ikonen T. et al., 1996: Allele Frequencies of the major milk proteins in Finnish Ayrshire and detection of a new γ -casein variant. *Anim. Genet.*, 27: 179-181.

Nebola M. et al., 1996: Kappa-casein gene polymorphism in cattle breeds in the Czech Republic and Poland. *Živ. Vým.*, 41: 429-431.

Příspěvek vznikl za podpory *FRVŠ MŠMT ČR č.169/2004*.