

INTRODUCING OF SNAPSHOT METHOD FOR POLYMORPHISM DETECTION

ZAVEDENÍ SNAPSHOT METODIKY PRO DETEKCI POLYMORFISMŮ

Civáňová K., Knoll A.

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

E-mail: kristinciv@seznam.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are used in the study of complex genetic diseases, Mendelian traits, population and linkage studies. Our main challenge is to use the convenient and most reliable method to find out genetic differences among animal individuals, to assess their influence on the quantitative trait loci and the production traits or, eventually, use them for parentage or individual testing. The progressive recent technologies in nucleotide polymorphism detection take note of need to analyze the big amount of samples in one test tube as quickly as possible. This advantage offer mainly methods of multiplex PCR and DNA pooling. One of these methods, which we would like to introduce in our laboratory, is **SNaPshot** “minisequencing”. To verify the usage of this method for SNP analysis in porcine genome, we have chosen seven porcine genes, which are supposed to influence the meat production in pig (*IGF2*, *FOS*, *MC4R*, *DGAT1*, *MYF4*, *MYOD1*, *MC3R*).

Keywords: SNP, SNaPshot, meat production in pig

ABSTRAKT

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) se využívají zejména ve studiu geneticky podmíněných onemocnění nebo k populačním a vazbovým analýzám. Naším úkolem je využívat nejspolehlivější metodiky k detekci genetických rozdílů mezi jednotlivými zvířaty, stanovit jejich vliv na QTL a produkční vlastnosti, případně je využít pro individuální testování a ověřování rodičovství. Současné moderní technologie v detekci nukleotidových polymorfismů zohledňují potřebu analýzy velkého množství vzorků v co nejkratším čase. Tyto výhody poskytují zejména technologie multiplex PCR a DNA pooling. Jednou z těchto metod, kterou jsme zavedli v naší laboratoři, je SnaPshot (tzv. minisekvenování). K ověření využití zvolené metodiky pro SNP analýzu v genomu prasat jsme testovali sedm genů ovlivňujících masnou užitkovost (*IGF2*, *FOS*, *MC4R*, *DGAT1*, *MYF4*, *MYOD1*, *MC3R*).

Klíčová slova: jednonukleotidové polymorfismy (SNP), SnaPshot, masná užitkovost u prasete

ÚVOD

Vzhledem ke vzrůstajícímu významu SNPs jako molekulárních genetických markerů, se stále častěji objevují nové metodiky pro jejich detekci. V současnosti se v procesu mapování genů v naší laboratoři využívají metodiky přímého DNA sekvenování a PCR-RFLP (z angl. Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism). Obě metodiky mají svoje výhody i nevýhody. Hlavní výhodou PCR-RFLP je její nenáročnost. Avšak, v průběhu analýzy je nutné využít větší množství restričních enzymů (endonukleáz) a pravděpodobnost odhalení SNP polymorfismu ve studované sekvenci je velmi malá. Determinace přímé sekvence automatickým sekvenováním je dnes považována za nejspolehlivější metodu SNP detekce. Je velmi důležité, že tato metodika umožňuje stanovení heterozygotního genotypu z výsledků jedné sekvenační reakce. Jejimi výhodami jsou vysoká automatizovatelnost, spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků.

Výhody obou v sobě nese níže popisovaná metodika SnaPshot, založena na jednonukleotidové elongaci neznačeného specifického primeru (Sh primer), kombinující specifitu di-deoxy-nukleotidové inkorporace DNA polymerázou a senzitivitu fluorescence. Její zavedení do laboratoře šetří čas a finance, protože umožňuje analýzu až deseti SNP polymorfismů se známou lokalizací ve více DNA templátech (genech) současně a je aplikovatelná i v případech, kdy není možno použít metodu PCR-RFLP.

METODIKA

Vzorky pro testování: T2, T3, T4 – plemeno bílé ušlechtilé (BU), T9 – plemeno landrase (L) (Š.V.CH. Frahelž, rok odběru 1999)

Multiplex PCR: Pro multiplex PCR bylo vybráno sedm genů, které hrají roli v regulaci příjmu potravy, mají vliv na ukládání tuku a masnou užitkovost u prasat (*IGF2*, *FOS*, *MC4R*, *DGAT1*, *MYF4*, *MYOD1*, *MC3R*). Dle specifických podmínek pro jednotlivé PCR produkty a anelační teploty použitých primerů byly navrženy a optimalizovány podmínky termálního cyklování multiplex PCR.

Pro gen *IGF2* nebyly v literatuře PCR podmínky uvedeny. Začlenění tohoto fragmentu do multiplex směsi způsobovalo značné potíže (fragment se neamplifikoval), proto PCR reakce pro tento gen měla osobitní složení reakční směsi. Amplifikace však probíhala při stejných podmínkách cyklování.

Složení reakční směsi (25 µl): IGF2: 50 ng genomové DNA, HotStar 1 x PCR pufr, 200 µM každého dNTP, 2,2 mM MgCl₂, 1 x Q solution, 1 U HotStarTaq DNA polymerázy a 0,4 µM každého primeru (přímý, zpětný).

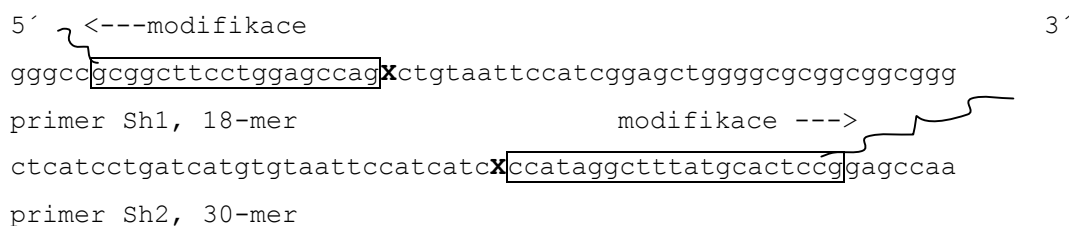
Ostatní geny: 50 ng genomové DNA, HotStar 1 x PCR pufr, 200 µM každého dNTP, 2,2 mM MgCl₂, 1 U HotStarTaq DNA polymerázy a směs primerů (koncentrace pro každý z primerů u jednotlivých genů 0,1-0,4 µM).

Kvalita PCR produktů a jejich koncentrace byly ověřeny na 2% agarózovém gelu s EtBr.

Přečištění PCR reakce: Odstranění PCR primerů a neinkorporovaných dNTPs pomocí High Purity PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals) dle protokolu.

Design Sh primerů: Sh primery jsou navrženy tak, aby specificky nasedali směrem 3' nebo 5' těsně k polymorfnímu místu analyzovaného fragmentu. K jejich navržení jsme využili teoretickou sekvenci, která se skládala z části sekvencí jednotlivých PCR fragmentů, které obsahovali polymorfní místo. Primery použité v jedné reakci k multilokusovému vyšetření se musí signifikantně odlišovat délkou (schématicky znázorněno na **obr. 1**), aby se předešlo překrývání SNPshot produktů. Proto je délka primeru modifikována na 5'konci přidáním nehomologických polynukleotidů (např. poly dT, poly dA. Poly dC, případně (dGACT)).

Obr. 1: Schématické znázornění designu a modifikace Sh primerů (specifické sekvence primeru jsou orámovány)



Příprava sekvenční reakce: Na přípravu samotné SNaPshot reakce využitím ABI PRISM SNaPshotTM Multiplex Kitu (Applied Biosystems) postačuje 0,01-0,40 pmol PCR templátu (koncentrace jednotlivých vzorků ověřena kvantifikací). Všechny primery využitě v SNaPshot reakci musí být smíchány do finální koncentrace 0,05 µM-1,00 µM pro každý primer. Kvůli citlivosti chemikálií se reakce připravuje na ledu. Celkový objem reakční směsi je 10 µl.

Termální cyklování a odstranění neinkorporovaných ddNTPs po cyklování: SNaPshot minisekvenování (GeneAmp9600 termální cykler, Perkin Elmer) probíhalo za

uvedených podmínek : 25 cyklů (96/10, 50/5, 60/30, 4/∞). Po sekvenační reakci se pro odstranění volných nukleotidů do směsi přidala 1 U enzymu CIP (Calf Intestine Phosphatase, New England BioLabs) a směs se inkubovala 1 hodinu při 37 °C. Po přečištění se provedla inaktivace enzymu 15 minutovou inkubací při 75°C.

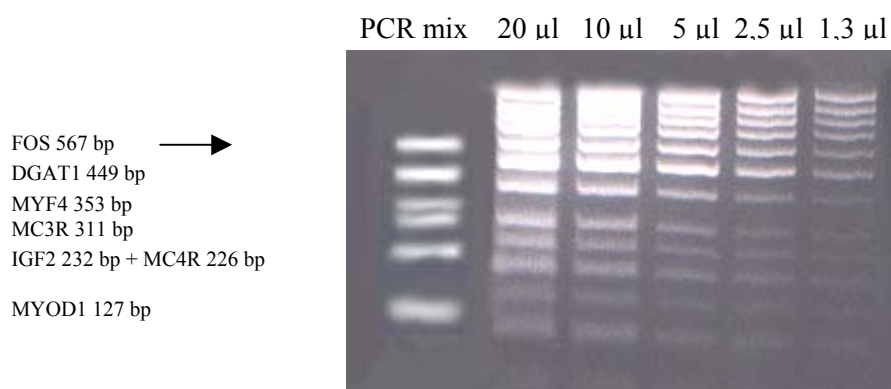
Elektroforéza: Pro elektroforetickou analýzu vzorků byla připravena směs: 9 µl Hi-Di formamidu (Applied Biosystems), 0,5 µl standardu velikostí fragmentů GeneScan-120 LIZ size standard (Applied Biosystems) a 0,5 µl SNaPshot produktu. Po následní denaturaci (5 min/95°C) byly vzorky uchovávány na ledu až do doby analýzy. Kapilární gelová elektroforéza proběhla na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) využitím matricového standardu E5 – Matrix Standard Set DS-02(dR110, dRGG, dTAMRA, dROX, LIZ).

Analýza dat: K analýze a vyhodnocení dat byl využit software GeneMapper v 3.0.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při analýze pro zavedení a využití popsané metodiky jsme modifikovali postup uvedený v protokole pro ABI PRISM SNaPshotTM Multiplex Kit tím, že jsme místo smíchání jednotlivých PCR produktů analyzovaných genů provedli multiplex PCR (výjimku tvořil gen *IGF2*, viz. kapitola Metodika). Do finálního PCR mixu byl produkt genu *IGF2* přidán v poměru 1:1. Koncentrace jednotlivých DNA fragmentů v PCR mixu byla ověřena kvantifikací na 2% agarózovém gelu s EtBr (obr. 2).

Obr. 2: Kvantifikace PCR produktu (50 bp hmotnostní marker (20-1,3 µl))

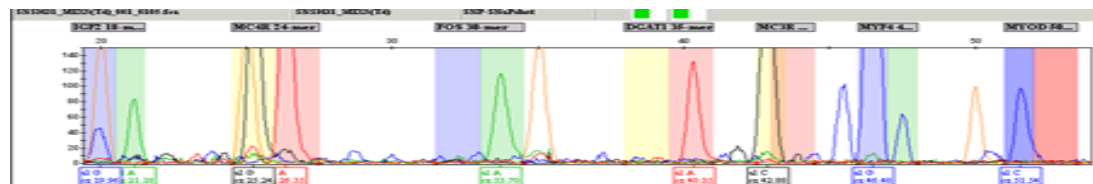


Pro vybrané geny se nám podařilo optimalizovat podmínky PCR, které byly úspěšně použity při amplifikaci všech testovaných vzorků.

Po sekvenační analýze jsme vyhodnotili elektroforetogramy jednotlivých vzorků, pomocí uvedeného softwaru (obr. 3). V závislosti od intenzity jednotlivých píků jsme

optimalizovali koncentraci jednotlivých Sh primerů ve směsi. Pro všechny geny se nám podařilo metodiku aplikovat a ani jeden z vybraných genů nebyl z analýzy vyřazen. U všech vzorků byly stanoveny genotypy v jednotlivých genech analyzovaného SNaPshot panelu (tab. 1 a tab. 2). Jednotivé genotypy byly ověřovány u každého ze vzorků pomocí PCR-RFLP, která potvrdila spolehlivost testované SNaPshot metodiky.

Obr. 3: Elektroforetogram SNaPshot analýzy vzorku T4 (BU)



Tab. 1: Stanovení genotypů po SNaPshot analýze u testovaného vzorku (pol-polymorfismus, f/r-přímý/zpětný primer, B-blue, G-green, Y-yellow, R-red)

vzorek	gen	pol.		velikost primeru	fragment	fluorescenční barva	ddNTPs	odvozená alela
T4	IGF2	G/A	f	Sh1 18	19, 21	BG	GA	GA
mix5	MC4R	G/A	r	Sh2 24	25, 26	YR	CT	GA
	FOS	G/A	f	Sh3 30	33	G	A	A
	DGAT1	G/A	r	Sh4 35	40	R	T	A
	MC3R	T/C	f	Sh5X 40	43	Y	C	C
	MYF4	G/A	f	Sh6X 45	46	B	G	G
	MYOD1	C/A	r	Sh7 50	52	B	G	C

Tab. 2: Stanovení genotypů po SNaPshot analýze u testovaných vzorků (pol-polymorfismus)

gen	IGF2	MC4R	FOS	DGAT1	MC3R	MYF4	MYOD1
vzorek/ pol	G/A	G/A	G/A	G/A	T/C	G/A	C/A
T4	GA	GA	A	A	C	G	C
T9	G	GA	A	A	T	G	A
T2	G	A	A	A	T	A	C
T3	G	A	A	GA	T	G	C

ZÁVĚR

Metodika SNaPshot, kterou jsme se rozhodli zavést v naší laboratoři, je spolehlivá, rychlá, s dobře reprodukovatelnými výsledky. Její jedinou nevýhodou je složitá optimalizace reakčních podmínek. Avšak analýzou testovaných vzorků jsme potvrdili její experimentální zvládnutí a možnost zavedení pro rutinní testování SNP polymorfismů v genomu prasat. Využití vytvořeného SNaPshot panelu pro testování genů ovlivňujících masnou užitkovost u prasat se v současnosti ověřuje analýzou souboru 100 zvířat plemene přeštické

černostrakaté, kde se po stanovení genotypů bude sledovat asociace k několika znakům (přírůstek, výška hřbetního tuku, procento libového masa).

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Civáňová, K. et al., 2004: Linkage mapping of the porcine MC3R gene to chromosome 17. Anim. Genetics 35 (6), in press

Knoll A. et al., 1997: Detection of a *DdeI* PCR RFLP within intron 1 of the porcine *MYOD1* (*MYF3*) locus. International Society for Animal Genetics, Animal Genetics, 28: 321

Knoll A., Vykoukalová Z., 2002: Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfismů DNA genů). MZLU v Brně, s. 168, ISBN: 80-7157-616-6

Další literatura je k dispozici u autorů.

Příspěvek vznikl za podpory grantového projektu FRVŠ MŠMT ČR č. 170/2004