

DETECTION OF SNP IN MSTN GENE OF GASCONNE CATTLE BREED

DETEKCE SNP V GENU MSTN U PLEMENE GASCONNE

Stehlík L., Dvořák J.

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

E-mail: stehliklibor@atlas.cz, dvorakj@mendelu.cz

ABSTRACT

In the present study we deal with detecting SNP in myostatin (MSTN) gene using molecular genomic methods. MSTN is a negativ regulator of muscle growth. Nine different mutations were found in that gene. Theese are responsible for double muscling in cattle and the others spesies. Mutation called G938A was detected in gasconne cattle breed and it is causing embarrassment during birth. The aim of breeders is to supress appearence of phenotype trait of double muscling in gasconne sires, mainly.

By mentioned reasons, two different methods were designed. First was based on allele specific PCR. The results were negative because of unusual sequence near SNP, low occurence of GC. The second one was sequencing of DNA fragment in which G938A mutation was found. The primers were designed using on line software Primer 3 (v 0.4.0). The samples were analysed in ABI PRISM 310 machine with using DNA Sequencing Analysis Software (ver. 5.1).

Key words: double muscling, myostatin, gasconne, AS – PCR, sequencing DNA

ÚVOD

Současná podoba plemene gasconne byla vytvořena z původní populace skotu chovaného ve francouzských Pyrenejích. Šlechtitelský program je zaměřen na jednostrannou masnou užitkovost v extenzivních podmínkách při zachování vrozené tvrdosti a odolnosti, s velmi dobře utvářenými končetinami a tvrdými paznehty, výbornou konverzí živin z objemných krmiv a snadnou ovladatelností. Černé sliznice umožňují vysokou toleranci zvířat na sluneční záření a zabraňují přenosu keratokonjunktivity. Tyto vlastnosti umožňují spásání chudé vegetace na strmých svazích hor ve vysoké nadmořské výšce i při extrémních změnách počasí. Tím je umožněna ekonomicky efektivní produkce kvalitního masa i ve velice extenzivních podmínkách.

Myostatin (označovaný jako MSTN, GDF-8 – growth differentiation factor 8) je významným genetickým markerem, který přímo ovlivňuje množství svaloviny, redukuje podíl intramuskulárního tuku, snižuje mramorování, zvyšuje křehkost masa, zvyšuje váhu zvířete při narození a zvyšuje procento těžkých porodů (Karim et al., 2000).

Gen myostatinu, který se nachází na 2. chromozomu u skotu, vystupuje jako negativní regulátor svalového růstu. V důsledku mutace dochází ke ztrátě funkce a tím ke zväšení počtu svalových buněk (hyperplasie). Mutace tohoto genu je odpovědná za dvojité osvalení - double-muscling (Kambadur *et al.* 1997). Bylo identifikováno celkem 9 mutací u různých plemen skotu (Grobet et al., 1998).

U plemene gasconne a piemnotese byla nalezena mutace, která způsobuje záměnu guaninu (G) za adenin (A) v pozici 938 bp (G938A) ve třetím exonu a má za následek substituci aminokyseliny cytosinu za thyrosin (C313Y). Nahrazený cystein je velice významný, protože je v pořadí pátý konzervativní cystein z 9 typických pro zástupce TGF-beta skupiny. Substitute má za následek změnu konformace a stability výsledného protein (ztrátu funkce) (Grobet et al. 1998, Marchitelli et al. 2003). Jedná se o jednonukleotidovou (jednobodovou) mutaci označovanou jako SNP (single nucleotide polymorphism).

Způsoby detekce SNP pomocí OLA (oligonucleotide ligation assay) – metoda je založena na alelově specifické PCR. Využívají se značené sondy a fragmentační analýza (Karim et al., 2000). Další způsob detekce je fluorescenční PCR (Fahrenkrug et al., 1999). Dále je možno využít alelově specifickou PCR (AS – PCR) (Grobet et al., 1999). Jednobodovou mutaci G938A lze také detekovat pomocí sekvenace daného úseku DNA. Metoda PCR-RFLP nemůže být pro danou mutaci použita, protože neexistuje restriční enzym s odpovídajícím štěpným místem.

U plemene gasconne je snahou šlechtitelů potlačit výskyt dvojitého osvalení z důvodu původního zaměření plemene, které se vyznačuje svojí tvrdostí a rustikálností. Při manifestaci dvojitého osvalení jak u telat tak i matek dochází ke značným komplikacím během porodů, popřípadě k ekonomické ztrátě v podobě mrtvě narozených nebo uhynulých telat.

MATERIÁL A METODIKA

Genomová DNA byla izolována z krve gaskoňských býků v odchovných pomocí kitu JETQUICK Blood & Cell Culture DNA Spin Kit.

Pro detekci mutace byly zvoleny dvě metody. Primery (Generi Biotech s.r.o.) pro alelově specifickou PCR (AS – PCR) byly navrženy pomocí programu Primer3 (v 0.4.0). Celkem bylo zapotřebí objednat 2 páry primerů (Tab. 1). Sada primerů 1A2A sloužila k odhalení mutované alely, resp. 1B2B k detekci původní alely.

Primer	Směr	Sekvence	T _M [°C]	G/C
1A	Přímý	AGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATA	68.4	37.5
1B	Přímý	AGATATAAGGCCAATTACTGCTCTGGAGAATG	68.8	40.6
2A	Zpětný	TGGGTATGAGGATACTTTTGCAAAAATACAAATTCAA	70.0	29.7
2B	Zpětný	TGGGTATGAGGATACTTTTGCAAAAATACAAATTCAG	70.4	32.4

Tab. 1 Navržené primery pro AS – PCR

Reakce probíhala v termocykleru PTC – 200, MJ Research Inc. K celkovému objemu 15 ml master mixu byl přidán roztok DNA s H₂O (3ml / 7 ml) (Tab. 2).

Komponenta	Objem [μl]	Koncentrace
H ₂ O	9,3	
10x PCR Buffer without MgCl ₂	2,5	50mM
dNTP mix	0,5	30 μM
Přímý primer	0,5	0,1 mM
Zpětný primer	0,5	0,1 mM
MgCl ₂	1,5	2,5 mM
Taq polymerasa	0,2	1U
Celkový objem	15,0	

Tab. 2 Složení master mixu

Pro nastavení optimální teploty annealingu byla použita gradientová PCR (66°C - 52°C). PCR produkty byly vizualizovaný na 4% agarosovém gelu s přidavkem 5 ml EtBr po prosvícení UV lampou.

Pro sekvenování fragmentu, který obsahuje danou mutaci, byly použity sekvenační primery (Generi Biotech s.r.o.). Primery byly navrženy pomocí programu Primer3 (v 0.4.0).

Primer	Směr	Sekvence	T _m [°C]	G/C
AS1	Přímý	TCTCGATGCTGTCGTTACCCTCT	57.1	52.2
GAS2	Přímý	GGCTGAACCTCTGGGGTTTGCT	59.1	59.1

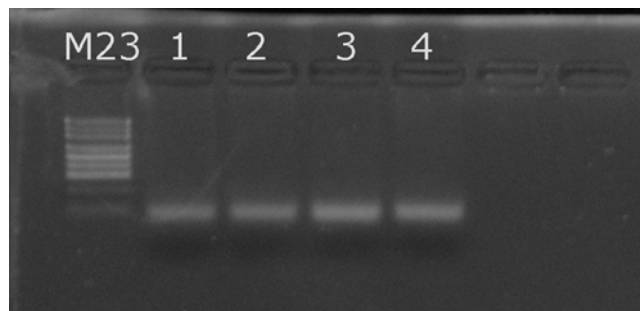
Tab. 3 Sekvenační primery

Reakce probíhala v termocykleru PTC – 200, MJ Research Inc. K celkovému objemu 15 ml master mixu byl přidán roztok DNA s H₂O (3ml / 7 ml) (Tab. 2). PCR produkty byly vizualizovány na 4% agarosovém gelu s přidavkem 5 ml EtBr po prosvícení UV lampou.

PCR produkty byly analyzovány pomocí automatického fluorescenčního sekvenování pomocí přístroje ABI PRISM 310. Data byla vyhodnocena softwarem DNA Sequencing Analysis Software (ver. 5.1).

VÝSLEDKY A DISKUZE

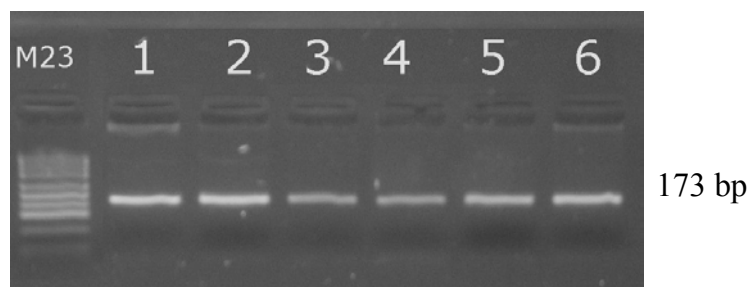
Při použití metody AS – PCR a dvou párů primerů nebyly nikdy získány PCR produkty. Nedošlo k nasednutí primerů a k namnožení ohraničeného vymezeného fragmentu DNA (Obr. 1). Viditelné fragmenty odpovídaly tzv. primerům dimerům, které se formují během PCR. Jedná se o spárované primery, jejichž je přibližně 50 bp.



Obr. 1 Vizualizace PCR produktů (AS – PCR)

Negativní amplifikace může být zapříčiněna nesprávně zvolenou konfigurací primerů, kde poměr G/C neodpovídá optimálnímu 50%, ale je mnohem menší (Tab. 1). Dalším negativem je poměrně vysoká teplota tání (T_M) primerů, při které dochází k annelaingu, který je klíčovým krokem k úspěšné PCR. V případě použití DMSO, která napomáhá k nasedání primerů k templátové DNA, by mohlo dojít k výtěžku specifického fragmentu DNA. Doposud nebylo vyzkoušeno.

Při použití primerů, které byly sestaveny pro sekvenování, bylo docíleno úspěšné amplifikace DNA. PCR produkty byly dlouhé 173 bp.



Obr. 2 Vizualizace PCR produktů po použití primerů pro sekvenaci

Úspěšnost amplifikace DNA po použití druhé sady primerů GAS1 a GAS2 vychází z důkladného návržení a výběru vhodné oblasti pro nasednutí ve zmiňovaném fragmentu DNA. V průběhu designu primerů jsme mohli hledat vhodné místo pro primery 100 – 150 bp down/up stream od SNP. V porovnání s AS – PCR byla lokalizace primerů pevně daná místem SNP.

ZÁVĚR

Pomocí metody AS – PCR nebyla nalezena bodová mutace G938A z důvodu negativního annealingu navržených primerů. V oblasti lokalizace SNP, kde bylo nutno navrhnout primery, se nachází velmi málo GC (~30%). Optimální zastoupení GC v primerech je 50% z důvodu vhodné T_M a T_A , která by se měla pohybovat v rozmezí 52 – 60°C. Primery musely obsahovat až 40 bp, aby došlo k zvýšení T_M . Takovéto primery velice špatně nasedají na templátovou DNA v průběhu PCR. Výhodou AS – PCR je její nízká finanční náročnost ve srovnání se sekvenováním.

Dalším možným krokem pro optimalizaci metody je přidavek DMSO (10% z celkového objemu), který snižuje citlivost primerů k templátové DNA a tím usnadňuje jejich annealing. Nebylo dosud vyzkoušeno.

Navržené primery pro sekvenování velice dobře nasedaly k templátové DNA. Velikost PCR produktů odpovídala vymezené oblasti. SNP byla detekovaná v průběhu sekvenování. Zvolená metoda vyhovuje podmínkám laboratoří ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, proto může být ihned implementována do praxe za účelem dalšího výzkumu apod.

Oproti AS – PCR je detekce pomocí sekvenování poměrně drahá, proto bude snahou metodu optimalizovat.

LITERATURA

GROBET, L., *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetic*. 1997, no. 17, s. 71-74.

KAMBADUR, Ravi, *et al.* Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*. 1997, vol. 7, no. 9, s. 910-915.

KARIM, L., *et al.* Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Animal Genetics*. 2000, vol. 31, is. 6, s. 396-399.

MARCHITELLI, C., *et al.* Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene.. *Mammalian Genome*. 2003, vol. 14, GROBET, L., *et al.* A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetic*. 1997, no. 17, s. 71-74. no. 6, s. 392-395.