

THE SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS OF CANINE DNA AND THEIR UTILIZATION IN BREEDING

JEDNONUKLEOTIDOVÉ POLYMORFISMY DNA U PSŮ A JEJICH VYUŽITÍ V CHOVATELSKÉ PRAXI

Horák P.

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

E-mail: horakpav@email.cz

ABSTRACT

Molecular genetics is exploited in different spheres of breeding and genetic improvement. The aim of this work was the installation and verification of laboratory methods for single nucleotide polymorphisms (SNPs) detection in dogs. Molecular genetic variability was studied in three SNPs: G → T substitution in the beta A3/A1 crystallin gene (*CRYB*), *MspI* polymorphic site in the von Willebrand factor gene (*VWF*) and *TaqI* polymorphism in the *KITLG* gene. There were included Caniche, Dachshund, English Cocker Spaniel and Deutscher Schäferhundaim breeds in the sample population. There were ascertained both potential alleles in all investigated loci with the exception of the *KITLG* gene in Deutscher Schäferhundaim breed.

Key words: dog, SNPs, the *CRYB* gene, the *VWF* gene, the *KITLG* gene

ABSTRAKT

Metody molekulární genetiky jsou stále častěji využívány v různých oblastech chovu a šlechtění zvířat. Cílem práce bylo zavést a optimalizovat metodiku detekce vybraných jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) DNA u psů. Za tímto účelem byly vybrány SNPs ve třech genech: genu beta A3/A1 crystallinu (*CRYB*), genu von Willebrandova faktoru (*VWF*) a genu KIT ligand (*KITLG*). Detekce variability těchto lokusů byla prováděna v referenčním souboru zvířat plemen anglický kokršpaněl, pudl, německý ovčák a jezevčík. U všech plemen byly ve sledovaných polymorfních místech zachyceny obě alternující alely s výjimkou genu *KITLG*, který byl u německých ovčáků monomorfní pro alelu *A*.

Klíčová slova: pes, SNPs, gen *CRYB*, gen *VWF*, gen *KITLG*

ÚVOD

Bouřlivý rozvoj metod molekulární genetiky se sebou přinesl možnost aplikovat nové přístupy, které byly dříve doménou pouze výzkumné a vědecké oblasti, i v chovatelské a šlechtitelské práci.

V současnosti je polymorfismus DNA v chovatelské praxi využíván při stanovení tzv. genetického typu na základě variability mikrosatelitních sekvencí. Mikrosatelity (MS) jsou

repetitivní sekvence náhodně rozmístěné v genomu, tvořené 2-4 nukleotidy opakovanými mnohokrát za sebou. Pro svou vysokou variabilitu jsou vhodné ke studiu diverzity populací, ověřování rodičovství apod..

Do budoucna je předpovídáno rozsáhlé využívání jednonukleotidových mutací DNA tzv. SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Jedná se o polymorfni místa vzniklá záměnou či absencí jednotlivých nukleotidů v řetězci. Vyskytují se jak v kódujících tak nekódujících oblastech DNA. Mnoho SNPs je identifikováno jako kausální pro vznik dědičných onemocnění (např. progresivní retinální atrofie, narkolepsie), což vytváří přímou možnost jejich aplikace ve šlechtění. Předpokládá se také, že jednonukleotidové mutace postupně nahradí mikrosatelity při jedinečné identifikaci jedinců a ověřování rodičovství zvířat.

Cílem práce bylo zavést a optimalizovat metodiku detekce vybraných jednonukleotidových mutací DNA u psů a ověřit její spolehlivost na referenční populaci zvířat. Za tímto účelem byl zvolen:

- 1) gen beta A3/A1 crystallinu (*CRYB*) – na 9. chromosomu, mutace jejíž podstatou je G → T substituce 218. nukleotidu v sekvenci intronu není detekovatelná známými endonukleázami, a proto byl designován primer se záměrnou záměnou nukleotidu, který vytváří v PCR-produktu restrikční místo pro restrikční enzym *NcoI*.
- 2) gen von Willebrandova faktoru (*VWF*) – mapován na chromosom CFA16, mutace detekovatelná restrikčním enzymem *MspI*
- 3) gen KIT ligand (*KITLG*) – na 15. chromosomu, stanovení přítomnosti polymorfních variant probíhá na základě štěpení endonukleázou *TaqI*

METODIKA

Do zkoumaného souboru byli zařazeni jedinci plemen anglický kokršpaněl, pudl, německý ovčák a jezevčík. Genomická DNA byla izolována ze vzorků odebrané krve pomocí QIAamp® DNA Mini Kit (fy QIAGEN GmbH, Německo).

Amplifikace vybraných fragmentů DNA byla provedena polymerázovou řetězovou reakcí PCR pomocí následujících primerů:

- 1) gen *CRYB* (*Shibuya et al., 1995*):
F 5'GTTTCCCCCTCTTAAATATTTCTCCATG- 3'
R 5'- TGAGATGGAGCTCCGCACTCAGTGGG- 3'
- 2) *MspI* polymorfismus genu *VWF* (*Venta et al., 1999*)
F 5'- TCTTGTCCCCCGCACTGGA- 3'
R 5'- TTGTGGTGCAGCCACAGTC- 3'
- 3) gen *KITLG* (*Schmutz et al., 2003*)
F 5'-GCCTCAAATTCCATTGAAGATTCC-3'
R 5'-TTATTTTCATTATCCTCTTCATTAATCTG-3'

PCR probíhala na teplotním cykleru PTC-100TM (fy MJ Research. Inc.). V případě genů *CRYB* a *VWF* celkový reakční objem 25 µl tvořilo 5 – 10 µl lyzátu DNA (dle koncentrace), 6,9 µl dest. H₂O, 2,5 µl 10 x PCR Buffer (bez MgCl₂), 2 µl dNTP (10 mM), po 0,5 µl všech primerů (10 pmol/µl), 0,13 µl *Taq* DNA Polymerase recombinant (5 U/µl) a 1,5 µl MgCl₂ (25 mM). Amplifikace fragmentu genu *KITLG* byla prováděna v celkovém reakčním objemu 15 µl: 1-5 µl lyzátu DNA (dle koncentrace), 4,9 µl dest. H₂O, 1,5 µl 10 x PCR Buffer (bez MgCl₂), 0,3 µl dNTP (10 mM), po 1 µl obou primerů (10 pmol/µl), 0,1 µl *Taq* DNA Polymerase recombinant (5 U/µl) a 1,2 µl MgCl₂ (25 mM). Pokud bylo do reakce přidáno méně než 10 resp. 5 µl lyzátu DNA, byl doplněn stanovený objem příslušným množstvím destilované vody.

Kvalita a koncentrace PCR – produktů byla kontrolována na 1,5 % agarosovém gelu po obarvení ethidiumbromidem a vizualizací UV-světlem.

Teplotní profil jednotlivých PCR reakcí je následující:

gen *CRYB* (*Shibuya et al., 1995*): počáteční denaturace 94 °C / 3 min., 34 cyklů - denaturace 94 °C / 1 min., annealing 47 °C / 90 s, elongace 70 °C / 1 min., závěrečná elongace 70 °C / 7 min.

MspI polymorfismus genu *VWF* (*Venta et al., 1999*): počáteční denaturace 94 °C / 3 min., 50 cyklů -denaturace 94 °C / 30 s, , annealing 62 °C / 1 min., elongace 72 °C / 1 min. , závěrečná elongace 72 °C / 7 min.

gen *KITLG* (*Venta et al., 1999*): počáteční denaturace 94 °C / 4 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 50 s, , annealing 53 °C / 50 s, elongace 72 °C / 50 s, závěrečná elongace 72 °C / 4 min.

Štěpení amplifikovaných úseků genů *CRYB* a *VWF* je prováděno přidáním 5 µl master-mixu k 20 µl příslušného PCR-produktu. Master-mix pro disekci *CRYB* a *VWF* obsahuje 2,6 µl dest. vody, 2 µl pufru (dle restričního enzymu) a 0,4 µl endonukleázy –*MspI* (gen *VWF*) či *NcoI* (gen *CRYB*). Vzorky jsou inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 3 hod..

Pro restrikci genu *KITLG* je k 10 µl PCR-produktu přidáván master-mix následujícího složení – 3,1 µl dest. vody, 1,5 µl pufru a 0,4 µl endonukleázy – *TaqI*. Inkubace probíhá 3 hod. při teplotě 65 °C.

Odečítání genotypů v jednotlivých polymorfních místech je prováděno po separaci štěpených PCR-produktů na agarosovém gelu dle následujícího klíče:

- 1) gen *CRYB* – 4,5 % agarosový gel, 165 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 141 bp a 24 bp (alela *G*) či zůstává neštěpen (alela *T*)
- 2) gen *VWF* – 4,5 % agarosový gel, 147 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 124 bp a 23 bp (alela *B*) či zůstává neštěpen (alela *A*)
- 3) gen *KITLG* – 3,5 % agarosový gel, 788 bp dlouhý PCR – produkt je stabilně štěpen na dva fragmenty o délce 247 bp a 541 bp, delší z fragmentů obsahuje polymorfní

restrikční místo tzn. je případě přítomnosti mutace štěpen na fragmenty 473 bp a 68 bp (alela *A*), neštěpená alela je označována jako *G*

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve sledovaném souboru zvířat byly zachyceny obě alely genu beta A3/A1 crystallinu, ale výskyt všech genotypů byl zjištěn pouze u plemene anglický kokršpaněl (viz. Tab. 1). U plemen angl. kokršpaněl a jezevčík byla vyšší frekvence alely *G*, u pudlů byla četnost opačná.

Zastoupení všech genotypů genu *VWF* bylo odhaleno opět u plemene anglický kokršpaněl, ale též u pudlů (viz. Tab. 2). U německých ovčáků byla detekována velmi vysoká četnost alely *P*, u zbývajících plemen byly frekvence obou alel poměrně vyrovnané.

Nejvyšší meziplemenná variabilita v rozložení četností genotypů a alel byla zjištěna v genu *KITLG*. Ani u jednoho ze sledovaných plemen nebyli zachyceni jedinci všech tří možných genotypů, přičemž jedinci plemene německý ovčák byli dokonce monomorfní pro alelu. *A* (viz. Tab. 3). U ostatních plemen byla naopak detekována mnohem vyšší četnost alely *G*.

Tab. 1: Frekvence genotypů a alel genu beta A3/A1 crystallinu (*CRYB*) u sledovaných plemen psů

Plemena	n	Frekvence genotypů			Frekvence alel	
		<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	<i>T</i>	<i>G</i>
Angl. kokršpaněl	4	0,25	0,25	0,5	0,375 ± 0,171	0,625 ± 0,171
Pudl	5	0,4	0,6	0	0,7 ± 0,145	0,3 ± 0,145
Německý ovčák	7	0,143	0,857	0	0,571 ± 0,132	0,429 ± 0,132
Jezevčík	6	0	0,5	0,5	0,25 ± 0,125	0,75 ± 0,125
Σ	22	0,182	0,591	0,227	0,477 ± 0,075	0,523 ± 0,075

Tab. 2: Frekvence genotypů a alel genu von Willebrandova faktoru (*VWF*) u sledovaných plemen psů

Plemena	n	Frekvence genotypů			Frekvence alel	
		<i>AA</i>	<i>AP</i>	<i>PP</i>	<i>A</i>	<i>P</i>
Angl. kokršpaněl	4	0,25	0,5	0,25	0,5 ± 0,177	0,5 ± 0,177
Pudl	5	0,4	0,4	0,2	0,6 ± 0,155	0,4 ± 0,155
Německý ovčák	7	0	0,143	0,857	0,072 ± 0,069	0,928 ± 0,069
Jezevčík	6	0	0,833	0,167	0,417 ± 0,142	0,583 ± 0,142
Σ	22	0,136	0,455	0,409	0,364 ± 0,073	0,636 ± 0,073

Tab. 3: Frekvence genotypů a alel genu KIT ligand (*KITLG*) u sledovaných plemen psů

Plemena	n	Frekvence genotypů			Frekvence alel	
		<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>
Angl. kokršpaněl	4	0	0,5	0,5	0,25 ± 0,153	0,75 ± 0,153
Pudl	5	0	0,4	0,6	0,2 ± 0,126	0,8 ± 0,126
Německý ovčák	7	1	0	0	1	0
Jezevčík	6	0	0,5	0,5	0,25 ± 0,125	0,75 ± 0,125
Σ	22	0,318	0,318	0,364	0,477 ± 0,175	0,523 ± 0,075

ZÁVĚR

Zavedená a optimalizovaná metodika umožňuje další řešení disertační práce s cílem vybrat jednonukleotidivé mutace DNA u psů a ověřit možnost jejich využití v chovatelské a šlechtitelské práci.

Práce je podporována Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt č. FRVŠ 1208/2003.

POUŽITÁ LITERATURA

Schmutz, S. M. , Berryere, T. G. , Sharp, C. A.: *KITLG* maps to canine chromosome 15 and is excluded as a candidate gene for merle in dogs. *Anim. Gen.* 34, 2003: 75-76.

Shibuya, H., Mrad, D. R., Collins, B. K., Stoy, S. J., Nonneman, D., Johnson, G. S.: Two polymorphisms in the canine beta-A3/A1 crystallin gene, detectable by PCR-RFLP. *Anim. Gen.* 26, 1995: 284-285.

Venta, P. J. , Vidal, M.: *MspI* RSP in exon 42 of the canine von Willebrand (*VWF*) gene. *Anim. Gen.* 30, 1999: 229.