

# USING OF AUTOMATED DNA SEQUENCING FOR PORCINE CANDIDATE GENES POLYMORFISMS DETECTION

## VYUŽITÍ AUTOMATICKÉHO SEKVENOVÁNÍ DNA PRO DETEKCI POLYMORFISMŮ KANDIDÁTNÍCH GENŮ U PRASAT

**Vykoukalová Z., Knoll A., Boháč M., Kunstová J.**

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

E-mail: vykoukalova.zuzana@quick.cz

### ABSTRACT

In the 20 years since the current methods were first introduced, DNA sequencing has been at the heart of modern molecular biology. Chain termination (the Sanger or dideoxy method) is now by far the most widely used technique for sequencing DNA. Cycle sequencing in combination with a fluorescent label and automated sequencers, this is the method used to generate most new sequence information. In our lab, we gained a primer structure of *MYF6* and *FACL4* gene sequence by using an automated sequencer ABI Prism 310 Genetic analyzer (Applied Biosystems), we detected new polymorphisms in these sequences and found particular restriction enzymes to verify and testing some of these polymorphisms.

### ABSTRAKT

Využití metody sekvenování DNA je široké – přes určení přesného pořadí nukleotidů ve specifické molekule DNA po přímou detekci polymorfismů DNA. Usnadnění práce dnes přinášejí automatické sekvenátory, které využívají modifikované Sangerovy metody sekvenování a umožňují zpracovat větší množství sekvencí v relativně krátkém čase. S využitím automatického sekvenátoru ABI Prism 310 Genetic Analyzer se nám podařilo získat část sekvence genů *MYF6* a *FACL4*, v takto získaných sekvencích detekovat několik polymorfismů a pro řadu z nich určit příslušné restriční enzymy k jejich ověření.

**Klíčová slova:** sekvenování DNA, Sangerova metoda sekvenování, automatické sekvenátory, detekce polymorfismů, *MYF6*, *FACL4*

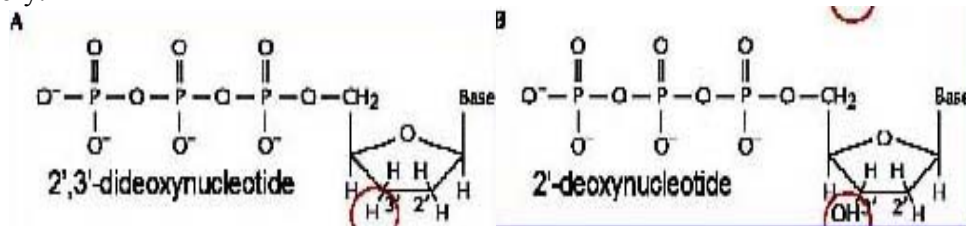
### ÚVOD

Sekvenování DNA znamená určení nukleotidové sekvence specifické molekuly DNA. Techniky sekvenování byly vyvinuty teprve poměrně nedávno, první publikace vyšly v roce 1977 (Maxam a Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977). Od té doby databáze takto získaných sekvencí

exponenciálně narůstají a samotné metody sekvenování jsou modifikovány tak, aby co nejvýše zvyšovaly efektivitu práce – tedy získat velký objem dat v krátkém čase.

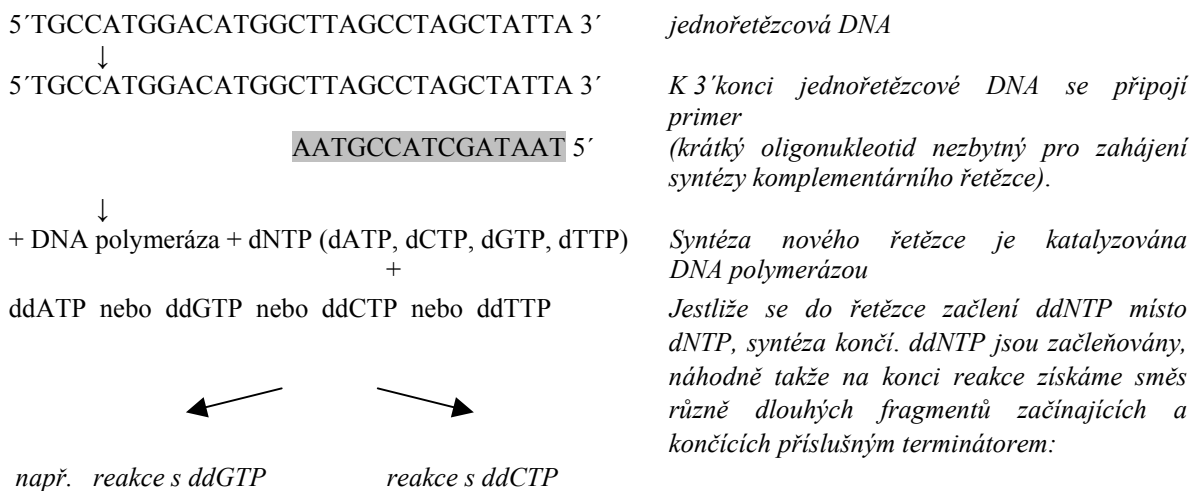
K určení primární struktury vybrané DNA můžeme použít dvě různé metody sekvenování: metodu "chemické degradace", známou také jako Maxam-Gilbertova metoda (Maxam a Gilbert, 1977), která je založena na báze-specifickém chemickém štěpení molekuly DNA, nebo metodu "terminátorů" - "Sangerova nebo dideoxy metoda" (Sanger et al., 1977), založenou na syntéze DNA pomocí enzymu DNA polymerázy, kdy kromě klasických nukleotidů (dNTP) se do nově syntetizovaných řetězců začleňují ještě specifické nukleotidy, tzv. dideoxynukleotidy (ddNTP- ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), neboli terminátory (obr.1).

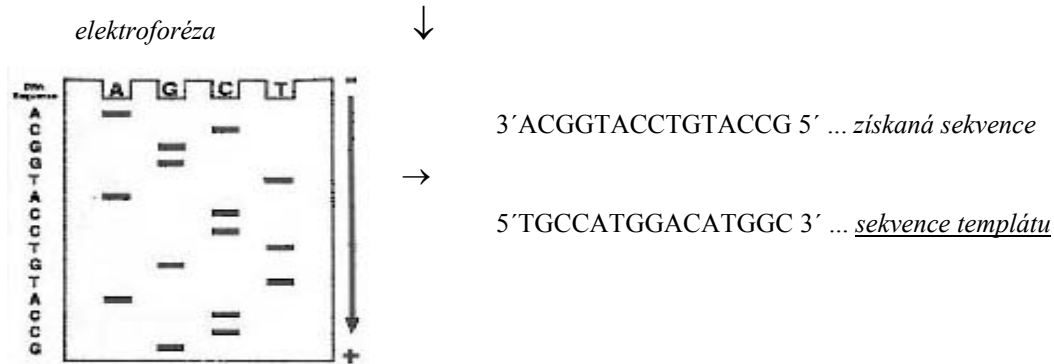
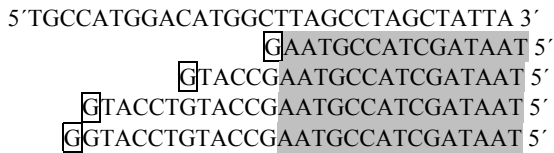
Obr. 1: Srovnání (A) deoxynukleotidu (dNTP) a (B) dideoxynukleotidu (ddNTP). ddNTP postrádají 3'OH skupinu nezbytnou pro vytvoření fosfodiesterové vazby k dalšímu nukleotidu, takže po jejich začlenění se řetězec dále neprodlužuje a v jejich místě syntéza končí. Fungují tedy jako terminátory.



Princip Sangerovy metody je stručně shrnut na obrázku 2.

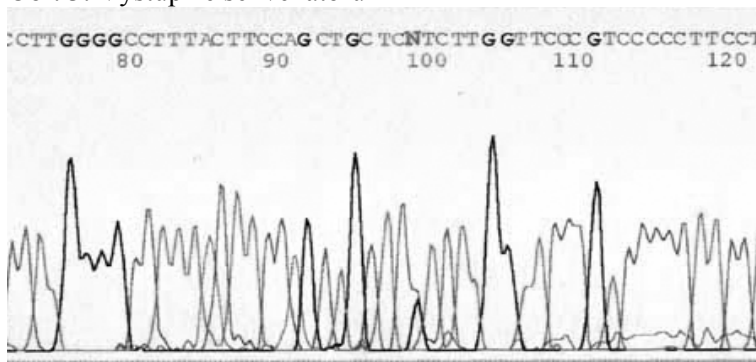
Obr. 2: Princip Sangerovy dideoxy metody sekvenování.





V současné době existuje řada modifikací této metody, ale princip zůstává stejný. Velké uplatnění nacházejí automatické sekvenátory. V naší laboratoři používáme ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), který provádí cyklické sekvenování - během několika cyklů denaturace, annealingu a elongace v termálním cykleru dojde k amplifikaci templátu. Do reakce se dává pouze jeden primer, amplifikace je tedy lineární. Výsledkem je směs různě dlouhých fragmentů zakončených specifickým terminátorem. Pro odlišení jednotlivých typů terminátorů se používají čtyři různé fluorescenční barvy, které po excitaci argonovým laserem emitují světlo o čtyřech různých vlnových délkách. Během kapilární elektroforézy v sekvenátoru se fragmenty separují podle velikosti. Při průchodu kapilárou jsou fluorescenční barvy terminátorů excitovány laserem a emitované světlo o určité vlnové délce je zachycováno tzv. CCD kamerou. V pravidelných intervalech jsou získaná data odesílána do počítače, kde jsou vyhodnocována pomocí speciálního softwaru. Výsledkem je sekvence daného templátu (obr.3).

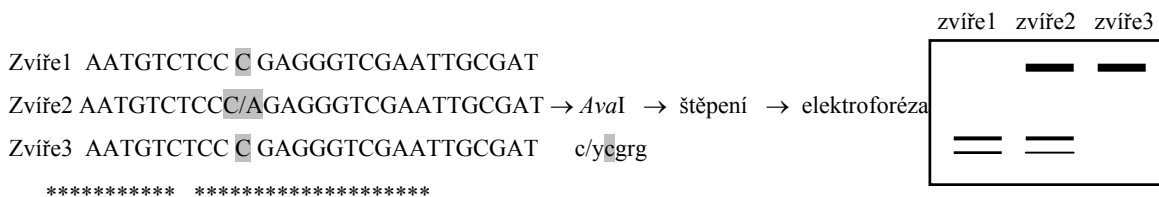
Obr. 3: Výstup ze sekvenátoru



Známe-li primární strukturu DNA, můžeme ji využít například pro lokalizaci regulačních a genových sekvencí, srovnávání homologních genů mezi druhy nebo k detekci polymorfismů DNA genů (obr.4).

Obr.4: Využití sekvenování pro detekci nových polymorfismů: Určíme-li pomocí sekvenování sekvenci genu nebo jeho části u dvou nebo tří různých zvířat, jejich srovnáním můžeme snadno identifikovat jednonukleotidové rozdíly v sekvenci. Pro toto místo pak zjistíme příslušný restriční enzym a štěpením ověříme, zda se jedná o polymorfismus.

c/y<sub>c</sub>grg – restriční místo enzymu *Ava*I, kde r = a, g a y=c, t. DNA zvířete1 bude tento enzym štěpit, DNA zvířete2 bude štěpit částečně a DNA zvířete 3 štěpit nebude. Jednotlivé vzorky DNA pak budou rozlišitelné po elektroforéze na gelu podle rozdílného počtu proužků.



Detekovaný a ověřený polymorfismus pak testujeme u většího souboru zvířat a provádíme analýzu, zda a jaký má detekovaný polymorfismus vztah k nějaké užitkové vlastnosti.

S využitím automatického sekvenování jsme v naší laboratoři určili např. primární strukturu části genů *MYF6* a *FACL4* u prasat a v získaných sekvencích detekovali několik nových polymorfismů. *MYF6* (*MRF4*, herkulín) je členem *bHLH* rodiny svalově specifických transkripčních faktorů (tzv. *MyoD* rodiny), které hrají důležitou roli při vývoji svalů. Gen *FACL4* kóduje jednu z forem *LACS* (*long chain acyl-CoA synthetase* nebo *long chain fatty acid-CoA ligase*, *FACL*), proteinu, který přeměňuje volné dlouhé řetězce mastných kyselin na *acyl-CoA* estery těchto kyselin, klíčové meziproducty v syntéze složených lipidů.

## MATERIÁL A METODIKA

Sekvenovány byly PCR produkty genů *MYF6* a *FACL4*, u obou genů byla tedy nejprve provedena PCR reakce. Složení reakční směsi a podmínky cyklování jsou uvedeny v tab1.

Tab. 1: Podmínky a složení PCR reakce pro geny MYF6 a FACL4

	MYF6	FACL4
<b>primery</b>	F - 5' TGC TGC ACC GGC TGG ATC AG 3' R - 5' GCA GGA AAT CCG CAC CCT CAA 3'	F - 5' AAT GAA ATG CAG CCA AAT GGA A3' R - 5' ATT CAC TCT GCG ATT CAC TTC 3'
<b>reakční směs</b>	25 µl: standardní PCR pufr, 2,2 mM Mg <sup>2+</sup> , 200 µM každý dNTP, 0,2 µM každý primer, 1U LA <i>Taq</i> polymerázy, asi 100 ng DNA	25 µl: standardní PCR pufr, 2,2 mM Mg <sup>2+</sup> , 200 µM každý dNTP, 0,2 µM každý primer (10 pmol/µl), 1U LA <i>Taq</i> polymerázy, asi 100 ng DNA
<b>podmínky cyklování</b>	počáteční denaturace 95°C/2 min.; 30 cyklů: 95°C/20s, 62°C/30s, 68°C/50s; závěrečná extenze: 68°C/7 min.	počáteční denaturace 95°C/1,5 min.; 3 cykly: 95°C/45s, 54°C/30s, 68°C/45s; 3 cykly: 95°C/45s, 53°C/30s, 68°C/45s; 31 cyklů: 95°C/45s, 52°C/30s, 68°C/45s; závěrečná extenze: 68°C/7 min.
<b>velikost fragmentu</b>	379 bp	~ 750 bp

Kvalita PCR produktu byla ověřována elektroforeticky na agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem. Získaný PCR produkt - fragment byl následně použit pro sekvenování. Po změření koncentrace PCR produktu jsme připravili 10 µl reakční směsi o složení: 4 ng DNA (gen *MYF6*) nebo 8 ng DNA (gen *FACL4*), 4 µl Reagent Quantity Terminator Ready Reaction Kitu (Applied Biosystems), 0,16 µl primeru (přímého nebo zpětného), do 10 µl voda. V termálním cyklu "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystems) byla následně během 25 cyklů při teplotách 96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min; 4°C/60min provedena lineární amplifikace templátu. Po přečištění sekvenační směsi etanolem a denaturaci při 95°C/2min byl amplifikovaný PCR fragment osekvenován v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Data ze sekvenátoru byla vyhodnocována pomocí Sequencing Analysis Softwaru.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

U genu *MYF6* jsme osekvenovali fragment o délce 379 bp (sekvence je na obr.5). Pro sekvenaci byly použity stejné primery jako pro PCR reakci. V získané sekvenci jsme identifikovali tři polymorfismy. Jejich pozice a příslušné restriční enzymy jsou uvedeny v tab. 2.

Obr.5: Sekvence genu MYF6 získaná automatickým sekvenováním PCR produktu – fragment o délce 379 bp;

přímý primer  
**TGCTGCACCGGCTGGATCAG**CAGGACAAAATGCAGGAGCTAGGCGTGACCCCTTCAGCTACAGACCCAAGCAAGAGAA  
*Hin*II  
 TGTAAGCCCAGACGCCGCCGGGGCAGGGGAATGCAAAAGCTGATTAG**ACGCC**TTCTTGGGGCCTTACTTCCAGCTG  
*Bse*RI  
**CTCCTC**TTGGTTCCCGTCCCCCTTCTCGACCCACCCCTCTCCACTCCGCTCCCCCTCTAATGAACCCCACTGACCCGTG  
*Ava*I  
 AACACGGGGTGCCTGCAACAGGCAGGAAATCTGTACTTGG**CCCGAG**GAACCAGGGGAGACACCCCCAGCCCCGGAAC  
 GTTGCTTTTGCCTAATCTGCTGCCTCTCTTCTCCAGC**TTGAGGGTGCGGATTCCTGC**  
 zpětný primer

Tab. 2: Detekované polymorfismy v získané sekvenci genu MYF6. Uvedeny jsou polymorfismy, jejich pozice, příslušný restriční enzym se sekvencí restričního místa a velikost fragmentů jednotlivých alel po štěpení PCR produktu těmito enzymy; r= a nebo g, y= c nebo t.

polymorfismus	pozice	restriční enzym	sekvence restričního místa	alely
C/A	128	<i>Hin</i> II	gr/cgyc	A - nemá polymorfni RES, fragmenty 91 a 288 bp
				C - má polymorfni RES, fragmenty 91,36 a 252 bp
C/G	161	<i>Bse</i> RI	ctcctc	C - nemá polymorfni RES, fragment 379 bp
				G - má polymorfni RES, fragmenty 163 a 216 bp
C/T	282	<i>Ava</i> I	c/ycgrg	T - nemá polymorfni RES, fragment 379 bp
				C - má polymorfni RES, fragmenty 99 a 280 bp

U genu *FACL4* byly pro sekvenování použity tři primery (primery použité při PCR a jeden vnitřní primer – 5' AATGAAATGCAGCCAAATGGAA 3'), podařilo se nám zatím získat sekvenci jen mezi vnitřním přímým primerem a zpětným primerem – sekvence o délce 618 bp (obr.6). V tomto úseku bylo identifikováno 10 polymorfismů. V současné době hledáme restriční enzymy vhodné pro jejich ověření.

Obr.6: Sekvence genu *FACL4* získaná automatickým sekvenováním PCR produktu – fragment o délce 618 bp

vnitřní přímý primer

```
AATGAAATGCAGCCAAATGGA AAGGTGTTAAGAAGGTAAAGCATTTCATTCTATTCTTTGTAAGGGGGAAGGT  
ACACTTAACTTTTAAAAAATCAAGTGCATTTAAACACACTGGTGGAAGTTCCTTGTGGCGCGGGGTTAAGACTCCAG  
CGTTGCCGCAGCTGTGGCAGAGGCTGTAATGGCAGCGCGGTTTGATCCCTGGCCCAGGAACTCCACATGCCGCAGGCA  
CGGCCAAGCAAACAAACACTGGCATTTCGATCACAGTGTGTAGCTAAACTCTCAGACGTTCTGGCTTCTCCGGATTCA  
CTTAAGAGCATTTTTATTTATTTATTTTTCACAATACAAATATACTTTATTTTATTACTCAATAAATTTATCACAT  
CTGTAGTTGTATGATGATCATCAATCCAATCTCACAGATTTCATCCACAGCCCAACTAAGAGCATTTTAAAGGTC  
TGCATGTTGAATCACGTTGTAATTGCTTGCAGTACCTATGCTAATATTACAGTATGTCTCACTGTAAACAGTTAATTCT  
TGGGAATTATAAATGGATGAACTATCTC GAAGTGAATCGCAGAGTGAAT
```

zpětný primer

## ZÁVĚR

Metoda automatického sekvenování umožňuje díky poměrně rychlému určení primární struktury DNA jednoduše detekovat polymorfismy DNA nejen kandidátních genů u zvířat. Touto metodou se nám podařilo určit část sekvence genů *MYF6* a *FACL4*, které mohou mít vliv na masnou užitkovost prasat, v těchto sekvencích detekovat nové polymorfismy a pro některé z nich určit restriční enzymy vhodné pro jejich ověření a testování.

## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla řešena v rámci projektu FRVŠ MŠMT ČR č. 1195/03.

## POUŽITÁ LITERATURA

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 560-564.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467.