

POLYMORPHISMS DETECTION IN GENE MYF6 USING AUTOMATIC DNA SEQUENCING

VYHLEDÁVÁNÍ POLYMORFIZMŮ V GENU MYF6 POMOCÍ AUTOMATICKÉHO SEKVENOVÁNÍ DNA

Lavická E., Knoll A., Vykoukalová Z.

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

E-mail: lavicka@email.cz

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the primary structure of the part of the porcine *MYF6* gene by automatic sequencing of the PCR product, the detection of the polymorphisms in the gained sequence of the *MYF6* gene and determination of the appropriate restriction enzymes for their verification. The total length of the sequenced fragment was 379 bp. Analyzed DNA was isolated from three individuals of breed Large White. At first the PCR reaction of all three samples of porcine DNA was carried out, obtained PCR products were subsequently used for the preparation of sequencing reaction mixes and sequenced using the automated genetic analyzer ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems), which use methods of cycle sequencing in combination with a fluorescent labelled ddNTP. Five single-nucleotide polymorphisms were detected in our sequences of the porcine *MYF6* gene.

Key words: sequencing DNA, automated sequencers, *MYF6*, polymorphisms detection

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo určení primární struktury části prasečího genu *MYF6* automatickým sekvenováním PCR produktu, detekce polymorfizmů v získané sekvenci genu *MYF6* a určení příslušných restričních enzymů pro jejich ověření. Délka sekvenovaného fragmentu byla 379 bp. Analyzovaná DNA pocházela od tří jedinců plemene Bílé ušlechtilé prase. Nejprve byla provedena PCR reakce všech tří vzorků prasečí DNA, vzniklé PCR produkty byly následně použity pro přípravu sekvenační reakční směsi a sekvenovány pomocí automatického genetického analyzátoru ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems), který využívá metody cyklického sekvenování v kombinaci se značenými koncovými nukleotidy. V získaných sekvencích prasečího genu *MYF6* bylo detekováno 5 jednonukleotidových polymorfizmů.

Klíčová slova: sekvenování DNA, automatické sekvenátory, *MYF6*, detekce polymorfizmů

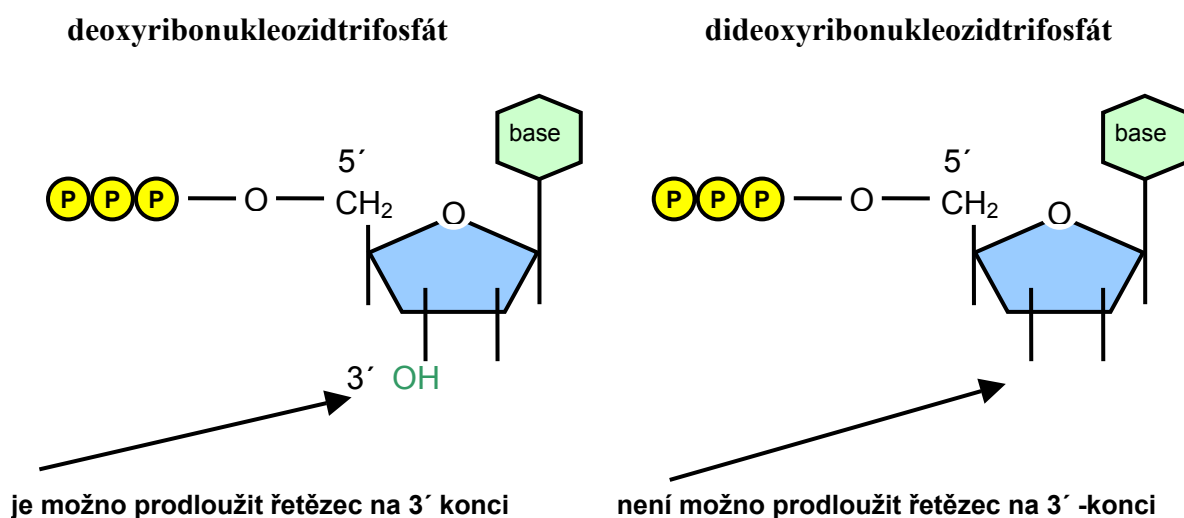
ÚVOD

Gen MYF6 (herkulin, myogenic regulatory factor 4) je zahrnut v procesu myogeneze, udržuje svalová vlákna v diferencovaném stavu a navíc se podílí na regeneraci svalů (Vykoukalová et al., 2005). Lze jej považovat za kandidátní gen pro kvalitu masa.

Sekvenováním DNA se rozumí určení pořadí nukleotidů ve specifické molekule DNA. Na rozdíl od sekvenování proteinů je sekvenování nukleových kyselin poměrně novou metodou – do poloviny 70. let byly analyzovány sekvence pouze velmi krátkých fragmentů DNA o délce 15-20 bp. Mezníkem se stal rok 1977, kdy Frederic Sanger a Walter Gilbert společně s Allanem Maxamem nezávisle na sobě publikovali rozdílné metody sekvenace DNA (Sanger et al., 1977; Maxam a Gilbert, 1977), které umožnily analýzu mnohem delších úseků DNA.

Primární strukturu vybrané molekuly DNA lze tedy určit dvěma různými metodami sekvenování. Pomocí chemické Maxamovy-Gilbertovy metody, jež je založena na bázově specifické chemické modifikaci a následném štěpení molekuly DNA v místech, kde došlo k modifikaci bází, nebo pomocí Sangerovy metody „ukončení řetězce“ čili dideoxy-metody založené na terminaci replikace nového řetězce podle matrice zkoumané sekvence dideoxyribonukleozidtrifosfátem (ddNTP), neboli terminátorem (obrázek 1).

Obrázek 1. Srovnání deoxyribonukleozidtrifosfátu (dNTP) a dideoxyribonukleozidtrifosfátu (ddNTP). ddNTP postrádají na 3'-uhlíku deoxyribózy OH-skupinu a proto k nim DNA polymeráza nemůže navázat další nukleotid, takže pokud během syntézy nukleotidového řetězce dojde k začlenění ddNTP, syntéza řetězce se v tomto místě zastaví, řetězec se dále neprodlužuje.



Využití Sangerovy metody zcela zastínilo chemickou Maxamovu-Gilbertovu metodu sekvenování. Také většina automatických sekvenátorů pracuje na principu modifikované

Sangerovy metody. Materiálem pro automatické sekvenování jsou fragmenty DNA vznikající při asymetrické PCR. První část tohoto uspořádání PCR probíhá standardně se dvěma primery v jedné reakci. V druhé části probíhá vlastní asymetrická PCR, kdy je v jedné reakci použit vždy jen jeden primer (přímý nebo zpětný). Dochází tak k amplifikaci jen jednoho ze dvou řetězců k tzv. lineární amplifikaci. V reakční směsi jsou spolu s klasickými deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTP) použity i jejich fluorescenčně značené analogy dideoxyribonukleozidtrifosfáty (ddNTP), které fungují jako koncové inhibitory elongace. Výsledkem je dle matrice vytvořená směs různě dlouhých fragmentů DNA zakončených specifickým terminátorem (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), které jsou následně elektroforeticky za denaturačních podmínek dle velikosti rozděleny v kapiláře automatického sekvenátoru. Při průchodu kapilárou jsou fluorescenční barvy terminátorů excitovány laserem a emitované světlo o určité vlnové délce (podle typu použitého fluorochrómu) je zachycováno tzv. CCD kamerou. Pořadí nukleotidů je automaticky odečítáno detektorem a zaznamenáváno v počítači. Sekvence je následně analyzována pomocí speciálního softwaru. Výsledkem je sekvence daného templátu.

MATERIÁL A METODIKA

Materiálem pro sekvenování byla prasečí DNA izolovaná ze 3 jedinců plemene Bílé ušlechtilé prase. Sekvenovány byly PCR produkty fragmentu genu MYF6 vzniklé asymetrickou PCR, která následovala po PCR reakci probíhající standardním způsobem se dvěma primery v jedné reakci. Složení reakční směsi a podmínky cyklování jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení a podmínky standardní PCR reakce pro gen MYF6

	MYF6
Primery	Přímý: MF6 2A – 5' TGC TGC ACC GGC TGG ATC AG 3' Zpětný: MF6 2B – 5' GCA GGA AAT CCG CAC CCT CAA 3'
Reakční směs o celkovém objemu 25μl	2μl DNA, 8μl H ₂ O, 15μl Master mixu složeného z 10,8μl H ₂ O, 2,5μl standardního pufru P _{complete} , 0,5μl dNTP, 0,5μl přímého a zpětného primeru, 0,2μl LA Taq polymerázy
Podmínky cyklování	Úvodní denaturace 95°C/2min.; 30 cyklů: 95°C/20s, 62°C/30s, 68°C/50s; závěrečná extenze: 68°C/7min.
Velikost fragmentu	379 bp

Kvalita PCR produktů tzn., zda se během standardní PCR reakce amplifikovalo dostatečné množství DNA, byla ověřena elektroforeticky na 3% agarózovém gelu vizualizovaném ethidium-bromidem (EtBr). Získané PCR produkty byly následně přečištěny

pomocí MinElute Purification Kitu (20µl každého PCR produktu bylo postupně přečištěno PB, PE a EB pufry) a opět provedena elektroforetická kontrola přečištěné DNA na agarózovém gelu vizualizovaném EtBr. Podrobnější informace uvádí Vykoukalová *et al.*(2005). Srovnáním velikosti a intenzity PCR fragmentů s koncentrační řadou DNA hmotnostního markeru MBI Gene Ruler 50 bp DNA Ladder byla určena koncentrace DNA v přečištěných PCR směsích a připraveno šest sekvenačních reakčních směsí o celkovém objemu 20µl každá a složení: 4µl Reagent Quantity Terminator Ready Reaction Mixu, 2µl Sequencing Buffer, 0,32µl sekvenační primer (přímý nebo zpětný), 5,5ng DNA (produkt ze standardní PCR), do 20µl voda. V termálním cykleru GeneAmp PCR System 9700 byla následně během 25 cyklů při teplotách 96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min, 4°C/∞ provedena lineární amplifikace templátu (asymetrická PCR). Poté byly sekvenační směsi přečištěny nejprve kolonou (DyeEx 2.0 Spin Kitem) a následně etanolem a amplifikované PCR fragmenty osekvenovány v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Data ze sekvenátoru byla vyhodnocována pomocí softwaru DNA Sequencing Analysis Software verze 5.1., který je součástí softwarového vybavení sekvenátoru. Pro detekci polymorfizmů byly získané sekvence porovnány pomocí programu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) a pomocí programu Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html>) byly vyhledány restriční endonukleázy (RE) vhodné pro ověřování a testování detekovaných polymorfizmů (tabulka 2).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Podářilo se nám osekvenovat fragment genu MYF6 o délce 379 bp (sekvence na obrázku 2) a v získané sekvenci identifikovat pět jednonukleotidových polymorfizmů (SNP). Jejich pozice a příslušné restriční enzymy jsou uvedeny v tabulce 2. Detekcí polymorfizmů ve stejném fragmentu genu MYF6 se rovněž zabývala Vykoukalová *et al.* (2005), která sekvenovala PCR produkty z DNA tří zvířat dvou odlišných plemen (dva jedinci plemene bílé ušlechtilé a jeden jedinec plemene duroc) a detekovala čtyři SNP: A/C v pozici 128, C/G v pozici 161, A/G v pozici 192 a C/T v pozici 282 získané sekvence.

Obrázek 2: Sekvence genu MYF6 o velikosti 379 bp získaná automatickým sekvenováním PCR produktu.

přímý primer
TGCTGCACCGGCTGGATTCAGCAGGACAAAATGCAGGAGCTAGGCGTGGACCCCT
 TCAGCTACAGACCCAAGCAAGAGAATGTAAGCCCAGACGCCGCGGGGCAGGGG
 AATGCAAAAGCTGATTAGAA**A/C**GCCTTCCTTGGGGCCTTTACTTCCAGCTGCTC**C/G**
 TCTTGGTTCCCGTCCCCCTTCCTCGACCCC**A/G**CCCTCTCCCAC**T/C**CCGCTCCCCCT
 CTAATGAACCCCACTGACCCGTGAACACGGGGTGCCTGCAACAGGCAGGAAAT
 CTGTA**T/C**CTGGCC**T/C**GAGGAACCAGGGGAGACACCCCCAGCCCCGGAACGTTG
 CTTTTGCCTAATCTGCTGCCTCTCTCTTCCTCCAGC**TTGAGGGTGC**GGATTTCCTGC
 zpětný primer

Tabulka 2: Detekované polymorfizmy v získané sekvenci genu MYF6. Jsou zde uvedeny jejich pozice v získané sekvenci, příslušný restriční enzym se sekvencí restričního místa a velikost jednotlivých alel po štěpení PCR produktu těmito enzymy, r = a nebo g, y = c, t.

Polymorfismus	Pozice polymorfizmu	Restriční enzym	Sekvence restričního místa	Velikost alel
A/C	128	Hin1I , BsaHI, BbiII, AclI, Hsp92I, Msp17I,	gr/cgyc	Alela C – má polymorfni RES, vzniknou fragmenty 91, 36 a 252 bp Alela A – nemá polymorfni RES, vzniknou fragmenty 91 a 288 bp
		HgaI	gacgc	C – má polymorfni RES, fragmenty 94, 36 a 249 bp A – nemá polymorfni RES, fragmenty 94 a 285 bp
		CviJI	rg/cy	C - nemá polymorfni RES, fragmenty 11, 27, 20, 27, 33, 23, 13, 125, 29, 49 a 22 bp A – má polymorfni RES, fragmenty 11, 27, 20, 27, 33, 11, 12, 13, 125, 29, 49, 22 bp
C/G	161	BseRI	gaggag	G – nemá polymorfni RES, fragment 379 bp C - má polymorfni RES, fragmenty 163 a 216 bp
		MnII	cctc	G - nemá polymorfni RES, fragmenty 185, 12, 19, 70, 58, 10, 10, 15 bp C – má polymorfni RES, fragmenty 163, 22, 12, 19, 70, 58, 10, 10, 15 bp
A/G	192	AcII	ccgc	G – má polymorfni RES, fragmenty 97, 96, 15, 162, 9 bp A – nemá polymorfni RES, fragmenty 97, 111, 162 a 9 bp
		FauI	cccgc	G – má RES, fragmenty 193 a 186 bp A – nemá RES, neštěpený fragment 379 bp
T/C	204	FauI	cccgc	T – nemá polymorfni RES, fragmenty 193 a 186 bp C – má polymorfni RES, fragmenty 193, 15 a 171 bp

T/C	282	AspS9I, AsuI, Cfr13I, Sau96I	g/gncc	C – má polymorfní RES, fragmenty 51, 92, 139 a 97 bp T – nemá polymorfní RES, fragmenty 51, 92 a 236 bp
		BsaJI, BseDI	c/cnngg	C – má polymorfní RES, fragmenty 97, 37, 147, 8, 21, 69 bp T – nemá polymorfní RES, fragmenty 97, 37, 155, 21 a 69 bp
		AoCI, Bse2II , CvnI, Bsu36I, Eco81I	cc/tnagg	T – má polymorfní RES, fragmenty 281 a 98 bp A – nemá polymorfní RES, neštěpený fragment 379 bp
		BstDEI, DdeI	c/tnag	T – má polymorfní RES, fragmenty 281 a 98 bp A – nemá polymorfní RES, fragment 379 bp

ZÁVĚR

Pomocí metody automatického sekvenování se nám podařilo určit část sekvence prasečího genu MYF6 o velikosti 379 bp. Sekvenovány byly PCR produkty z DNA tří zvířat stejného plemene (bílé ušlechtilé), sekvenovány byly oboustranně pomocí primerů MF6 2A a MF6 2B. Srovnáním získaných sekvencí v programu ClustalW se nám podařilo detekovat pět jednonukleotidových polymorfizmů: A/C v pozici 128, C/G v pozici 161, A/G v pozici 192, T/C v pozici 204 a T/C v pozici 282 získané sekvence. Pomocí programu Webcutter 2.0 byly následně vyhledány příslušné RE, které by se daly použít pro ověření těchto polymorfizmů (tabulka 2). Z tabulky je patrné, že pro testování polymorfizmu A/C v pozici 128 získané sekvence by z vyhledaných restričních endonukleáz byla nejvhodnější *HinII* (*AcyI*), pro polymorfizmus C/G v pozici 161 RE *BseRI* a pro polymorfizmus T/C v pozici 282 RE *Bse2II*. Pro zbývající dva polymorfizmy se sice podařilo nalézt restriční endonukleázy, ale tyto pro ověření nejsou vhodné, neboť po štěpení PCR produktu by vznikly fragmenty s malými rozdíly ve velikostech. Ověřování polymorfizmů již nebylo prováděno.

LITERATURA

MAXAM, A.M. a GILBERT, W. *A new method for sequencing DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, 1977: pp. 560-564.

SANGER, F., NICKLEN, S. a COULSON, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 74, 1977: pp. 5463-5467.

VYKOUKALOVÁ, Z. Variabilita genů MYF6, IGF2 a ACSL4 u prasat, *Disertační práce*.
Brno, 2005, s.17, 53, 68.

<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/index.html> - Webcutter 2.0

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> - ClustalW