

MULTIPLEX PCR-RFLP OF THE GENES *CSN3*, *PIT-1* AND *DGATI* ASSOCIATED WITH SPECIFIC CATTLE MILK PERFORMANCE TRAITS

MULTIPLEX PCR-RFLP GÉNOV *CSN3*, *PIT-1* A *DGATI* ASOCIOVANÝCH SO ŠPECIFICKÝMI VLASTNOSTAMI MLIEČNEJ ÚŽITKOVOSTI SKOTU

Manga I., Dvořák J.

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

E-mail: xmangal@mendelu.cz, dvorakj@mendelu.cz

ABSTRACT

Multiplex PCR-RFLP represents an effective and technically modest method of the gene polymorphism detection. In contrast to individual gene testing, amplification of several products in one PCR reaction followed with specific restriction endonucleases cleaving in optimal buffer medium, highly reduces the time of genes analyse. The aim of our work was to create and optimise multiplex PCR-RFLP method for detection known SNPs of the genes *CSN3*, *DGATI* a *Pit-1* in cattle. Associations of these genes to specific milk performance traits were described by many authors. Genotype BB *CSN3* is mostly associated with high protein content and other useful traits (cheese production). Variability of the *DGATI* is linked to yield and content of milk fat. Polymorphism of the *Pit-1* is in relation to milk yield. In the future, our method will be used to evaluate the genetic potential of specific milk performance traits among larger Slovak Pinzgau cattles group.

Key words: multiplex PCR-RFLP, cattle, milk performance traits, SNP polymorphism

ABSTRAKT

Multiplex PCR-RFLP predstavuje efektívnu a technicky nenáročnú metodiku detekcie polymorfizmov génov. Amplifikácia niekoľkých produktov v jednej PCR reakcii a následné špecifické štiepenie restriktónymi endonukleázami v prostredí optimálneho pufru výrazne redukuje čas potrebný na analýzu génov v porovnaní s individuálnym testovaním génov. Cieľom našej práce bolo vytvoriť a optimalizovať multiplex PCR-RFLP metodiku na detekciu známych SNP génov *CSN3*, *DGATI* a *Pit-1* u skotu. Asociácie spomínaných génov ku špecifickým parametrom mliečnej úžitkovosti boli popísané už mnohými autormi. Genotyp BB *CSN3* je spájaný s vysokým obsahom mliečnych proteínov a ďalšími vlastnosťami (produkcia syra). Variabilita *DGATI* sa viaže k obsahu a produkcii mliečného tuku. Polymorfizmus *Pit-1* je vo vzťahu k celkovej produkcii mlieka. Metodika bude v budúcnosti použitá na odhad genetického potenciálu pre špecifické parametre mliečnej produkcie u väčšieho počtu dojníc plemena slovenské pinzgauské.

Kľúčové slová: multiplex PCR-RFLP, parametre mliečnej úžitkovosti, SNP polymorfizmus

ÚVOD

Genotypizácia špecifických genetických markerov a následná selekcia jedincov je dnes už integrovanou súčasťou chovu a šľachtenia skotu ako aj ďalších hospodárskych zvierat. Výber génov testovaných našou metodikou bol cielený na produkciu mlieka s vysokým obsahom proteínov a nízkym obsahom tuku pri dostatočne vysokej celkovej mliečnej úžitkovosti. Set testovaných génov môže byť interpretovaný aj ako voľný výber najvýznamnejších kandidátnych génov pre kvalitu mlieka či parametre mliečnej úžitkovosti skotu, slúžiaci k demonštrácii možnosti aplikácie metódy multiplex PCR-RFLP.

Gén *DGATI* (acylCoA:diacylglycerol acyltransferáza) predstavuje kandidátny gén pre obsah a produkciu mliečného tuku. Mutácia označovaná ako *K232A* spôsobuje jeho alelový dimorfizmus (Q, q), pričom alela Q zvyšuje percentuálny obsah tuku v mlieku. Substitúcia lyzínu za alanín (*K232A*) v *DGATI* géne s predpokladaným vzťahom ku QTL lókusú ovplyvňujúcemu obsah tuku v mlieku a produkciu mlieka bola recentne identifikovaná i pozičným klonovaním v oblasti centroméry chromozómu 14 (Grisart B. et al, 2004). Autorovi sa podarilo získať údaje, ktoré potvrdili funkčnú i genetickú kauzalitu *K232A* mutácie génu *DGATI*. Pri práci vychádzal z konštrukcie mapy o veľkosti 3,8 cM s veľkým počtom SNP, mapa obsahovala spomínaný QTL lókus. Tu sa potvrdilo, že asociácia s percentuálnym obsahom tuku v mlieku bola dominantná v oblasti *DGATI* génu. Pomocou vírusových expresných systémov bola ďalej zabezpečená expresia oboch alel *DGATI* v Sf9 bunkách, pričom sa ukázalo že alela Q (prítomnosť lyzínu), spôsobujúca zvýšenie percentuálneho obsahu tuku v mlieku je charakterizovaná vyššou produkciou triglyceridov ako alela q (prítomnosť alanínu). Cases et al., (2001), popísal existenciu najmenej dvoch enzýmov katalyzujúcich reakciu diacylglycerolu kovalentne viazaného k dlhým reťazcom acyl-CoA, pri ktorej dochádza k tvorbe triglyceridov – základných stavebných jednotiek tukov. Jedným z nich je práve enzým vznikajúci expresiou *DGATI*. Mutácia *K232A* (prítomnosť alanínu) génu *DGATI* nie je konzervatívna a môže mať negatívny efekt na schopnosť proteínu *DGATI* viazať acyl-CoA, čo vysvetľuje nižší obsah tukov v mlieku (Winter et al., 2002). V štúdií spomínaného autora bola analýzou génu *DGATI* pochádzajúceho od plemien, produkujúcich mlieko s rozdielnym obsahom tuku zároveň potvrdená signifikantná variabilita frekvencie polymorfných alel génu.

CSN3 gén (κ -casein) predstavuje azda najznámejší a najpoužívanější genetický marker, slúžiaci k zvýšeniu kvality mliečného produktu skotu. Toto postavenie získal najmä vďaka veľkému množstvu štúdií, ktoré jednoznačne preukázali vzťah jeho polymorfných alel k takým špecifickým vlastnostiam ako sú kvalita a výťažnosť syroviny, rýchlosť jej zrážania a pod. Komerčná testácia sa obmedzuje väčšinou na selekciu alel typu *A* a *B*. Cenná je alela typu *B* pre jej pozitívnu asociáciu so spomínanými technologickými vlastnosťami mlieka, zároveň je vo vzťahu s vyšším obsahom bielkovín v mlieku, ktorý podľa niektorých autorov koreluje i s vyšším obsahom kazeínov v mlieku. Efekt *CSN3* kazeínu na kvalitatívne parametre mlieka a na celkovú mliečnú úžitkovosť bol aktuálne testovaný na plemeni Holstein v Grécku (Tsiaras et al, 2005). Výsledky potvrdili, že genotypy *CSN3* signifikantne

ovplyvňujú percentuálny obsah proteínov v mlieku, ako aj celkový zisk mliečnych proteínov (genotyp *AB* > genotyp *AA*).

Gén *Pit-1* (Growth hormone factor-1/ pituitary-specific transcription factor), člen tzv. POU rodiny transkripčných faktorov predstavuje špecifický transkripčný faktor, ktorý reguluje expresiu rastového hormónu u cicavcov, aktivuje i expresiu tyreotropínu a prolaktínu. Súčasne zohráva významnú úlohu pri diferenciácii a proliferácii buniek hypofýzy. Spolu s rastovým hormónom predstavujú esenciálne gény pre vývin mliečnej žľazy a tvorbu mlieka (*Bauman, 1985, Peel, 1987*). Najčastejšie testovaným polymorfizmom génu u skotu je substitúcia adenínu (alela *A*) za guanín (alela *B*) v pozícii 1178 génu (*Dierkes et al., 1998*). Vo vzťahu k parametrom mliečnej úžitkovosti je tento polymorfizmus spájaný zväčša s ovplyvnením celkovej produkcie mlieka. Napr. v patentovanej aplikácii (WO-A-98/03677) sa uvádza, že alela *A* bola v signifikantne pozitívnej korelácii s celkovou mliečnou úžitkovosťou. V ďalšej štúdiu na plemene holštajn (*Renaville et al., 2005*) autori vyhodnotili vplyv *AA* genotypu na mliečnu produkciu efektom +46,3kg / norm.lakt. Pri kombinovanom efekte selektovaním na genotypy *AA* génu *Pit-1* a *BB CSN3* (κ -casein) génu zaznamenali výrazný efekt (+237kg mlieka / norm. lakt.) na mliečnu úžitkovosť v porovnaní so skupinou dojníc s genotypmi *BB* u *Pit-1* a *AA* u *CSN3*. Podľa autorov patentu umožňuje uvedený postup selekcie získať dostatočné množstvo mlieka s optimálnym zložením a vlastnosťami.

MATERIÁL A METODIKA

Templátová DNA slúžiaca k vývinu a testácii metodiky bola izolovaná z krvi kitom JETQUICK (Genomed, GmbH) a následne uchovaná pri -20°C. Experimentálnemu testovaniu metodiky predchádzala teoretická konštrukcia vhodného panelu multiplex PCR-RFLP. Všetky použité primery boli designované programom Oligo 4.0 na jednotnú približne 54°C T_m s max. rozdielom 2 °C (Tab.1). Podmienky amplifikácie boli nasledovné: 94°C/10min; 95°C/30sec; 53,5°C/45sec; 72°C/2min; 72°C/10min. PCR produkty sme štiepili spoločne restriktónymi endonukleázami *HinfI* a *CfrI* (Fermentas) v prostredí pufru 1X Tango (Fermentas) pri 37°C počas noci. PCR-RFLP produkty boli následne separované na 3% agarózovom gély s EtBr elektroforézou pri 90V. Výsledok bol vizualizovaný UV svetlom a fotograficky dokumentovaný (Canon Ultra Cam.)

Tab. 1 Použité primery

primer	sekvencia	T _m (°C)
<i>mp DGAT1 F</i>	5' TCCTCAAGCTGTTCTCTCTACCG 3'	55.1
<i>mp DGAT1 R</i>	5' CCCC GCATCCGAAAGC 3'	54.3
<i>mp Pit-1 F</i>	5' GTTTT CAGCGTCTTTAGGTTTCC 3'	53.3
<i>mp Pit-1 R</i>	5' TTGATGAATTATTCTCAGAAGGCAC 3'	53.6
<i>mp CSN3 F</i>	5' CATTCACCAAAGAAAAATCAGG 3'	54.4
<i>mp CSN3 R</i>	5' AGAGAAGGCGAAATGGGCTAAT 3'	55.2

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po návrhu primerov a následnom testovaní individuálnych PCR reakcií bola zavedená a optimalizovaná multiplex PCR-RFLP metodika skúmaných génov. PCR produkt génu *CSN3* mal očakávanú veľkosť 342 bp, génu *DGAT1* 395 bp, gén *Pit-1* nám poskytol produkt 525 bp. Štiepením s restriktčnými endonukleázami *HinfI* a *CfrI* sme získali PCR-RFLP produkty s predpokladanou veľkosťou: u génu *CSN3* alela *A* 131, 122 a 89 bp, alela *B* 253, 89 bp, u génu *DGAT1* alela *Q* 395 bp, alela *q* 204, 191 bp a u génu *Pit-1* alela *A* 525 bp, alela *B* 293, 234 bp (Tab.2).

Tab. 2 Porovnanie T_m (teploty denaturácie) a vznikajúcich produktov multiplex PCR-RFLP génov *CSN3*, *DGAT1* a *Pit-1* skotu s použitím štandardných primerov a primerov navrhovaných na multiplex PCR-RFLP (označené tmavo).

gén	primery	T_m (°C)	T_m (°C) optimalizácia	alela	enzým	RFLP multiplex (bp)	RFLP multiplex (bp) optimalizácia
<i>CSN3</i>	forward (Medrano et al., 1990)	60,9	54,4	<i>A</i>	<i>HinfI</i>	131, 125, 91, 31	131, 122, 89
	reverse	59,5	55,2	<i>B</i>		256, 91, 31	253, 89
<i>DGAT1</i>	forward (Winter et al., 2002)	47,9	55,1	<i>Q</i>	<i>CfrI</i>	411	395
	reverse	51,3	54,3	<i>q</i>		203, 208	204, 191
<i>Pit-1</i>	forward (Renaville, et al., 2005)	46,8	53,3	<i>A</i>	<i>HinfI</i>	451	525
	reverse	48,7	53,6	<i>B</i>		244, 207	293, 234

Konštrukcii panelu multiplex PCR-RFLP predchádzalo niekoľko krokov. Sekvencie vybraných génov obsahujúce skúmané polymorfizmy sme najskôr podrobili testácii na prítomnosť restriktčných miest pre *HinfI* a *CfrI* (Webcutter 2.0). V blízkosti testovaného *A/B* polymorfizmu génu *CSN3* bolo detekované nežiadúce restriktčné *CfrI* miesto, ktoré by analýzu výsledkov metodiky zbytočne komplikovalo. Štandardne používané *CSN3* primery (Medrano et al., 1990) sa taktiež vyznačujú pomerne vysokou hodnotou T_m , ktorú by sme pri návrhu primerov ďalších testovaných génov nemuseli dosiahnuť. Aby sme zabezpečili čo najúčinnejšiu amplifikáciu produktov multiplex PCR, rozhodli sme sa pre návrh nových optimálnych primerov u všetkých testovaných génov. Zároveň sme brali zreteľ na čo najjednoduchšiu interpretáciu výsledkov. Primery s optimálnou T_m a s jej tolerovaným rozdielom do 2°C v porovnaní s T_m ostatných primerov boli navrhnuté tak, aby k nesprávnej interpretácii výsledkov metodiky nedochádzalo ani v prípade zlyhania analýzy RFLP.

Multiplex PCR-RFLP predstavuje technicky jednoduchú, výhodnú detekčnú metódu SNP génov. Vo väčšine prípadov je však nutný design nových primerov s vhodnou T_m a so zanedbateľnou tvorbou dimérov a slučiek. Pre jej úspešnosť je rozhodujúca najmä voľba

správneho teplotného a časového PCR profilu. Podmienkou je samozrejme i maximálne precízna práca v laboratóriu. Počet testovaných SNP ako aj jednotlivých komponentov multiplex PCR je však limitovaný (Rachlin J., et al., 2004). V prípade amplifikácie slabého multiplex PCR produktu môžeme znížiť teplotu annealingu primerov na najnižšiu prípustnú hodnotu. Pozitívny efekt môže zabezpečiť aj zvýšenie množstva primerov, templátovej DNA či *Taq* DNA polymerázy. Ďalšou alternatívou je zmena koncentrácie KCl pufru či použitie špecifických aditív (0,1 – 0,8µg/µl BSA, 5% DMSO, glycerol), (Henegariu, O., et al., 1997). Konečným riešením je voľba nových primerov, obyčajne s dlhšou sekvenciou.

ZÁVER

Optimalizáciou multiplex PCR-RFLP metodiky pre analýzu SNP polymorfizmov génov *CSN3* (alely *A*, *B*), *DGAT1* (alely *Q*, *q*) a *Pit-1* (alely *A*, *B*) u skotu sme vytvorili efektívnejšiu metodiku testácie spomínaných génov. Paralelnou amplifikáciou požadovaných PCR produktov a ich špecifickým štiepením v jednej RFLP reakcii sa výrazne redukuje čas, potrebný k analýze genotypov testovaných jedincov, zároveň sa eliminuje spotreba jednotlivých PCR komponentov. Skúmané gény predstavujú dnes už rutinne testované markery mliečnej úžitkovosti skotu a kvality mlieka, možnosti praktického využitia metodiky sú preto značné. V spolupráci s Výskumným ústavom živočíšnej výroby v Nitre v súčasnosti pripravujeme testáciu asi dvesto dcér plemenných býkov slovenského pinzgauského plemena. V centre pozornosti budú najmä dojnice s kombinovaným genotypom *AA* génu *PIT-1* a *BB* génu *CSN3*, prípadne genotypy homozygotné v preferovaných alelách všetkých troch testovaných génov.

Táto práca bola podporená projektami GAČR 523/03/H076 a MZeČR 1G58073.

LITERATÚRA

Bauman, D. E., et al., (1985): Response of high producing dairy cows to long term treatment with pituitary- and recombinant-growth hormone. *J.Dairy Sci.* 68:1352.

Cases, S., Stone, S.J., Zhou, P., Yen E., Tow, B., Lardizabal, K.D., Voelker, T., Farese, R.V., Jr., (2001). *I. Biol. Chem.* 276, 38870-38876.

Dierkes, B., et al., (1998), *Animal Genetics*, 29:405

Grisart, B., et al, (2004): Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGAT1* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *PNAS*, february 24, 2004, 101/8, 2398-2403

Henegariu, O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H., (1997): Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol *BioTechniques*, September 23:504-511

Peel, C. J., and D. E. Bauman. (1987): Somatotropin and lactation. *J. Dairy Sci.* 70:474.

Rachlin J., Ding Ch., Cantor Ch., Kasif, S., (2004): The Limits of Multiplex PCR, Boston University

Renaville R., et al., (1997): Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J Dairy Sci.* Dec;80(12):3431-8.

Tsiaras AM, Bargouli GG, Banos G, Boscovos CM. (2005): Effect of kappa-casein and beta-lactoglobulin loci on milk performance traits and reproductive performance of Holstein cows, *J Dairy Sci.* Jan;88(1):327-34.

Winter, A., et al., (2002): Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *PNAS*, July 9, 2002, 99/14, 9300-9305