

PCR-TTGE módszer alkalmazása DNS mutációk kimutatására

Csikós Ádám – Simon Ádám – Tisza Ákos – Gulyás Gabriella – Jávor András – Czeglédi Levente

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,

Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Debrecen

csikos@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során PCR-időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis (TTGE) alkalmazásával, valamint a MeltINGENY bioinformai szoftver felhasználásával vizsgáltuk a szarvasmarha melanocortin-1 receptor (MC1R) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) génjében fellelhető mutációk kimutatói lehetőségeit. Az MC1R génben vizsgált mutációk a következők voltak: a 296. pozícióban T/C tranzíció, a 310. pozícióban G deléció, a 650. pozícióban 12 bp duplikáció, a 667. pozícióban C/T tranzíció. A PACAP génben vizsgált mutáció a 3909. pozícióban lévő G/A tranzíció volt. A szarvasmarha DNS mintákból simplex PCR reakcióban GC-clamp-et nem tartalmazó és tartalmazó primerek segítségével szaporítottuk fel a vizsgálni kívánt DNS régiókat. Az így előállított PCR termékeket denaturáló közegben (magas hőmérséklet, urea) poliakrilamid gélen elektroforézis segítségével választottuk el. A vizsgált minták az MC1R gén alléljaira nézve homozigóta állatoktól származtak.

Megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott MeltINGENY program megkönnyíti és költségkímélőbbé teszi a vizsgálatokat, ugyanis az adott szakasz olvadási profilja ismeretében eldönthető, hogy vizsgálható-e az adott gén meghatározott régiója az említett módszerrel vagy új metodikát kell választani. Az MC1R gén esetében érdemes ezt a módszert alkalmazni és optimalizálását elvégezni, míg a PACAP gén esetében ugyanez nem mondható el, a gén vizsgálatához érdemesebb lenne más kimutatói módszert alkalmazni.

Kulcsszavak: szarvasmarha, DNS mutáció, MC1R, PACAP

SUMMARY

In our study PCR-temporal temperature gelelectrophoresis (TTGE) and MeltINGENY bioinformatic program were used to analyse the mutations in the genes of melanocortin-1 receptor (MC1R) and pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in cattle. Amplification of target DNA by PCR was performed with GC-clamp primers and non-GC-clamp primers in simplex PCR reactions. The fragments were separated by denaturing polyacrylamide gelelectrophoresis (denaturing agents: high temperature, urea) after PCR reactions. MC1R homozygous individuals were used for the reaction.

We concluded that MeltINGENY program makes the decision and detection system easier, and more simple as the melting profile of target sequence is determined by the software. In case of MC1R gene, PCR-TTGE method is appropriate for SNP detection, however PACAP gene polymorphism can not be identified by the method, because PACAP mutations are not included in melting domains, therefore PCR-TTGE cannot detect them.

Keywords: cattle, DNA mutation, MC1R, PACAP

BEVEZETÉS

A DNS mutációk detektálása és az egyes mutációkat hordozó egyedek genotipizálása kiemelkedő fontossággal bír az egzakt populációgenetikai számítások során, ugyanakkor hasonló jelentősége van az érték-mérő tulajdonságok (tejtermelő-, hústermelő-képesség) génjeinek az elemzésében is.

Az utóbbi két évtizedben jelentős fejlődésen estek át a DNS-alapú, mutációk detektálását lehetővé tevő módszerek. A PCR reakció feltalálása (Mullis és Faloona, 1987) után számos új módszert fejlesztettek ki és ezek széles körben terjedtek el mind az alap-, mind az alkalmazott kutatások területén. Elterjedté vált a PCR-RFLP (Kocher et al., 1989) vagy a PCR-SSCP (Plath et al., 1997), mint DNS mutáció kimutatói alkalmas eszköz. Azonban más metodikák is fejlődésnek indultak, ilyen módszer a PCR-TGGE (hőmérséklet gradiens gélelektroforézis) vagy a PCR-TTGE (időben változó hőmérsékletű gélelektroforézis). A hőmérséklet gradiens gélelektroforézis (TGGE) olyan DNS alapú elválasztási technika, mely segítségével azonos bázispár hosszúságú, de különböző bázisszekvenciájú DNS molekulákat tudunk elválasztani poliakrilamid gélen.

A módszer segítségével akár egyetlen bázisban eltérő DNS molekulákat is elkülöníthetünk egymástól (SNP-k). A módszert a denaturáló gradiens gélelektroforézisből fejlesztették ki (DGGE), ahol a gélben denaturáló közeg van, mely segítségével az elektroforézis közben a kétszálú DNS molekulák a közegben folyamatosan, a haladási iránnyal megegyezően növekvő koncentrációjú denaturánsok (urea és formamid) hatására egyszálú sodnak, és az SSCP módszerben leírtak alapján specifikus konformáció kialakulása miatt mozgásuk a gélben megreked (Peters és Robinson, 2010). A TTGE módszer hasonló a TGGE módszerhez, azonban ebben az esetben nincs hőmérséklet gradiens kialakítva a gélben, hanem az elektroforézis során, meghatározott időközönként növeljük a hőmérsékletet, ezzel biztosítva a mintában található kétszálú DNS molekulák denaturációját (Zoller et al., 2005; Jones és Knapp, 2009). A PCR-TGGE és TTGE módszerek során GC-clamp-et tartalmazó primerek segítségével szaporítják fel a vizsgálni kívánt DNS szakaszokat, ez a struktúra megakadályozza, hogy a denaturáció hatására teljesen elváljon egymástól a DNS molekula két szála.

Amikor a molekula eléri a gélben azt a hőmérsékleti tartományt, ami megfelel az olvadáspontjának (T_m),

a kétszálú formájából részlegesen denaturált formába kezd el átalakulni, ezáltal erőteljesen csökken a molekula mobilitása a gél mátrixában.

A vizsgálathoz az olvadási pont alapján tervező program segítségével lehet megfelelő primereket tervezni, valamint ez a program képes meghatározni a vizsgált DNS régió olvadási profilját, így a tényleges laboratóriumi munkát megelőzve képet kaphatunk arról, hogy a vizsgálni kívánt mutációknak a legalacsonyabb hőmérsékletű olvadási doménba esik-e, így lehetőség van ezen módszerekkel a kimutatására vagy sem, és ebben az esetben más jellegű módszert kell választani a mutáció detektálásához.

Laboratóriumunkban a TTGE módszert használtuk fel a szarvasmarha MC1R (melanokortin-1 receptor) gén mutánsainak a szeparálására. Az MC1R gén allél változatait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

Az MC1R génben található mutációk

Allél(1)	A mutáció pozíciója(2)	A mutáció típusa(3)
E ^p	296.	T/C tranzíció(4)
e	310.	G deléció(5)
E ¹	667.	C/T tranzíció(6)
E ²	650.	12 bp duplikáció(7)
E ³	-	nincs változás(8)

Table 1: Mutations in MC1R gene

Alleles(1), Position of mutation(2), Type of mutation(3), T/C transition(4), G deletion(5), C/T transition(6), 12 bp duplication(7), No mutation(8)

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintaelőkészítés, genomiális DNS izolálás

A vizsgálatokhoz szükséges DNS-t szőr- és vér-mintákból, a Zsolnai és Orbán (1999) által leírt módszer alapján nyertük ki. A DNS minták genotípusának meghatározása szekvenálással történt.

Polimeráz lánreakció (PCR) és agaróz gélelektroforézis

Kísérleteink során a fent említett szarvasmarha MC1R génváltozat mintáit (az 5 vizsgált MC1R mutáció: E1, E2, E3, ED, e) szaporítottuk fel PCR technikával, melyet a későbbiekben a TTGE módszerhez használtunk fel. Az MC1R gén szekvenciáját az NCBI honlapjáról töltöttük le (GeneBank azonosító: NM_174108), melyre specifikus primereket terveztünk bioinformatikai programok segítségével (Sequence Manipulation Suite), illetve primer tervező (Primer3, <http://frodo.wi.mit.edu/>) és analízáló programokat felhasználva (OligoAnalyzer). A létrehozott primereink: MC1R-sscp2 (forward) 5' GTGCTGGAGACGGCAGTCAT 3' (továbbiakban 2F) (Invitrogen) és MC1R-sscp2 (reverse) 5' GGGCGCTGCCTCTTCTGGA 3', (továbbiakban 2R) (Invitrogen). A primerek által felszaporított gén-szakasz mérete 416 bázispár (bp). A DGGE módszernél leírtak alapján GC-clampet hordozó primereket terveztünk a MeltNGENY program segítségével. A GC-clamp egy olyan guanin és citozin bázisokat tartalmazó, 30–40 bp-ból álló DNS szakasz,

melynek fontos szerepe van az olvadási hőmérséklet növelésében, így a TTGE módszerben a GC-clamp tartalmú primerek segítségével olyan DNS mintákat állíthatunk elő, melyek a hőmérséklet gradiens hatására a magas olvadási hőmérséklet (T_m) miatt nem fognak elválni egymástól, így tovább jutnak a gélben. GC-clampet hordozó primereink: GC_MC1R_F (forward) 5' CGCCGGGCGGGCGGGGCGGGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGAGCAACGTGCTGAGACGGC 3' [továbbiakban FGC (forward GC-clamp primer)] (Invitrogen) és GC_MC1R_R (reverse) 5' CGCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGCTGCCTTTCTGGAG 3' (továbbiakban RGC (reverse GC-clamp primer)) (Invitrogen). A primerekkel felszaporított génszakasz mérete 504 bp. Az alább leírt módon 3 master mixet készítettünk:

- GC-clamp nélküli forward és reverse primert tartalmazó PCR mix az 5 féle MC1R genotípusra;
- GC-clampellátott forward primert és GC-clamp nélküli reverse primert tartalmazó PCR mix az 5 féle MC1R genotípusra;
- Forward primert és GC-clampellátott reverse primert tartalmazó PCR mix az 5 féle MC1R genotípusra.

A PCR mix összetétele 20 µl reakcióközegben: 1x GoTaq-puffer (Promega), 150 µM dNTP (Fermentas), 3 mM MgCl₂ (Promega), 0,1 µM 2F primer (Invitrogen), 0,1 µM 2R primer (Invitrogen), 0,1 µM GC-clampes forward primer (Invitrogen), 0,1 µM GC-clampes reverse primer (Invitrogen), 0,5 U GoTaq-polimeráz (Promega), desztillált víz. PCR program beállításai: kezdeti denaturáció 95 °C, 2 perc; denaturáció 95 °C, 0,5 perc; primer tapadás 69 °C, 0,5 perc; szintézis 72 °C, 0,5 perc; végső szintézis 72 °C, 5 perc. A ciklusok száma 35 volt. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük 2%-os agaróz gélen (1x TAE (Tris-ecetsav-EDTA) (SERVA) puffer, 4V/cm), melyet GelRed (Biotium, USA) DNS festékkel festettünk.

Poliakrilamid gélelektroforézis – TTGE

A gél összetétele 40 ml végtérfogatban: 1x TAE (SERVA), 7–10 M urea (Sigma), 10–11% 37,5:1 akrilamid:biszakrilamid (Sigma), 400 µl 10%-os ammónium-perszulfát oldat (Sigma) és 30 µl tetrametil-etiléndiamin (TEMED) (BioRad). Az akrilamid, illetve urea koncentrációt változtattuk. Az elektroforézist BioRad Protean II xi Cell típusú futtató rendszerben végeztük. Az elektroforézis után a mintában található DNS sávokat ezüstfestéssel tettük láthatóvá Benbouza et al. (2006) módszere alapján.

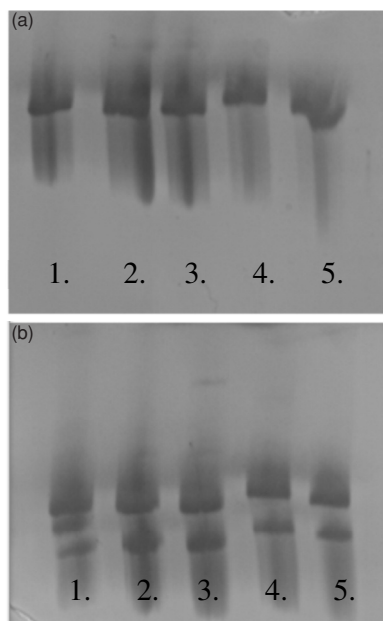
EREDMÉNYEK

A szarvasmarha MC1R és PACAP génváltozatok olvadáspont analízise

A PCR segítségével felszaporított termékek a TTGE folyamán az olvadáspontjuknak megfelelő hőmérséklet (T_m) elérésekor duplahelikális állapotból fokozatosan denaturált (egyszálú) állapotba kerülnek. A két állapot közötti átmenet során a PCR termékek elektroforetikus mobilitása lecsökken. A különböző génváltozatok olvadáspontja erősen függ azok bázis-

csökkentett T_m) a várható olvadási pont $64\text{--}67\text{ }^\circ\text{C}$ közé esik, és itt csökken a DNS minta mobilitása a gélben a denaturáció miatt. Eredményeink alapján 5 óra futtatási idő után, melynél $66\text{ }^\circ\text{C}$ volt a rendszer hőmérséklete, még nem érte el a T_m -et a minta DNS, ezért nem indult meg a denaturáció és a DNS nem állt meg a gélben, 5 óra 30 perc futtatási időnél, $66,6\text{ }^\circ\text{C}$ esetén viszont megjelent egy újabb sáv, melyből arra következtethetünk, hogy az olvadáspontját elért DNS szálak szétváltak egymástól és a részben egyszálú DNS megállt a gélben, nem haladt tovább (2. ábra). A homozigóta mutánsok 2 különböző olvadási doménba estek, melyek egyike az MC1R gén elülső szakaszára, másik pedig a gén végére esett (2. ábra a, b). Ezért volt szükség a gén mindkét végére tervezett GC-clampre, mivel így mindkét domén esetében külön vizsgálni tudtuk a gén mobilitását poliakrilamid gélen. A GC-clampet tartalmazó minták esetében a beállítások az alábbiak voltak: 10% akrilamid gél, 10 M urea ($20\text{ }^\circ\text{C}$ -kal csökkentett T_m); futtatási körülmények: feszültség: 400 V, futtatási idő: 5 óra, hőmérsékleti lépték: $0,2\text{ }^\circ\text{C}/10$ perc, $57\text{--}63\text{ }^\circ\text{C}$. A gélképen látható, hogy a GC-clamp nélküli minták hamar elérték a T_m -et, így denaturalódtak a gélben, ezért nem haladtak tovább. Ezt követte a forward és reverse GC-clampel ellátott mintasorozat, melyek a GC-clamp jelenléte miatt az emelkedett T_m -nek köszönhetően tovább vándoroltak a gélben (3. ábra). Elmondható, hogy a GC-clamp használatával az elválasztás hatékonysága növekszik poliakrilamid gélen, viszont az egyes homozigóta mutáns csoportok közötti különbségek kimutatásához további optimalizálás szükséges.

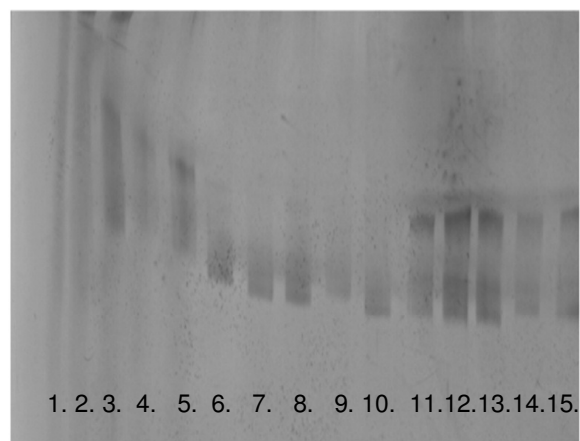
2. ábra: GC-clamp nélküli homozigóta MC1R DNS minták poliakrilamid gélmintázata



Megjegyzés: minta sorrend: 1. E1/E1, 2. E2/E2, 3. E3/E3, 4. ED/ED, 5. e/e genotípusú MC1R DNS minták. Futtatási beállítások: feszültség: 400 V, futtatási idő: 5 h (a) és 5 h 30 min (b), hőmérsékleti lépték: $0,2\text{ }^\circ\text{C}/8$ perc, hőmérsékleti tartomány: $60\text{--}66,6\text{ }^\circ\text{C}$.

Figure 2: Sample sequence (the genotypes of the examined MC1R). Note: samples 1. E1/E1, 2. E2/E2, 3. E3/E3, 4. ED/ED, 5. e/e. Running conditions: power: 400 V, running time: 5 h (a) and 5 h 30 min (b), temperature scale: $0,2\text{ }^\circ\text{C}/8$ min, temperature range: $60\text{ }^\circ\text{C}$ to $66,6\text{ }^\circ\text{C}$.

3. ábra: GC-clampet nem tartalmazó és GC-clampet tartalmazó homozigóta MC1R DNS minták poliakrilamid gélmintázata



Megjegyzés: mintasorrend: 1. GC-clamp nélküli E1/E1, 2. GC-clamp nélküli E2/E2, 3. GC-clamp nélküli E3/E3, 4. GC-clamp nélküli ED/ED, 5. GC-clamp nélküli e/e, 6. Forward GC-clamp E1/E1, 7. Forward GC-clamp E2/E2, 8. Forward GC-clamp E3/E3, 9. Forward GC-clamp ED/ED, 10. Forward GC-clamp e/e, 11. Reverse GC-clamp E1/E1, 12. Reverse GC-clamp E2/E2, 13. Reverse GC-clamp E3/E3, 14. Reverse GC-clamp ED/ED, 15. Reverse GC-clamp e/e. Futtatási beállítások: feszültség: 400 V, futtatási idő: 5 h, hőmérsékleti lépték: $0,2\text{ }^\circ\text{C}/10$ perc, hőmérsékleti tartomány: $57\text{--}63\text{ }^\circ\text{C}$.

Figure 3: Polyacrylamide electrophoresis of MC1R homozygous individuals, PCR with GC-clamp and without GC-clamp

Note: samples: 1. Without GC-clamp E1/E1, 2. Without GC-clamp E2/E2, 3. Without GC-clamp E3/E3, 4. Without GC-clamp ED/ED, 5. Without GC-clamp e/e, 6. Forward GC-clamp E1/E1, 7. Forward GC-clamp E2/E2, 8. Forward GC-clamp E3/E3, 9. Forward GC-clamp ED/ED, 10. Forward GC-clamp e/e, 11. Reverse GC-clamp E1/E1, 12. Reverse GC-clamp E2/E2, 13. Reverse GC-clamp E3/E3, 14. Reverse GC-clamp ED/ED, 15. Reverse GC-clamp e/e. Running conditions: power: 400 V, running time: 5 h, temperature scale: $0,2\text{ }^\circ\text{C}/10$ min, temperature range: $57\text{ }^\circ\text{C}$ to $63\text{ }^\circ\text{C}$.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az alkalmazott PCR-TTGE módszer előnye, hogy költséghatékony és időtakarékos módszer. Egyetlen hátránya, hogy különböző gének/mutációk eltérő beállításokat igényelnek, így optimalizálás szükséges.

A kísérleteink során alkalmazott bioinformatikai program, a MeltNGENY megkönnyíti és költségkímélővé teszi a vizsgálatokat, mivel lecsökkenti a metodikai lépések számát, melyek esetlegesen költségessé tennék a módszer kivitelezését (nem megfelelő primerek használata, rossz futtatási hőmérséklet, ezáltal kiértékelhetetlen eredmények stb). Az előzetes eredmények alapján MC1R gén esetében indokolt a módszer további optimalizálása, ilyen módon jobb gélmintázatot nyerhetünk, mely könnyebbé teszi a homozigóta mutánsok megkülönböztetését.

PACAP gén esetében nem javasolt ezen módszerek további használata, mivel a génben található mutációk olyan pozícióban fordulnak elő, melyek magas olvadási hőmérséklettel (T_m) rendelkeznek, illetve a MeltNGENY programmal lefutott olvadási doméneket tartalmazó grafikonon is jól látható, hogy nem lehet elkülöníteni a mutációt.

Összefoglalva a fent említett mutáció detektáló módszert, elmondható, hogy ezen módszer alkalmazásával költséghatékonyan és időtakarékosan tudunk elkülöníteni egymástól akár egy bázispárban különböző DNS mintákat is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Czeglédi Levente publikációt megalapozó kutatása a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergenciaprogram című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

IRODALOM

- Benbouza, H.–Jacquemin, J. M.–Baudoin, J. P.–Mergeai, G. (2006): Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 10: 77–81.
- Jones, B. M.–Knapp, L. A. (2009): Temporal Temperature Gradient Electrophoresis for Detection of Single Nucleotide Polymorphisms [In: Komar, A. A. *Single Nucleotide Polymorphisms Methods and Protocols*. Second Edition.] Humana Press. 153–164.
- Kocher, T. D.–Thomas, W. K.–Mayer, A.–Edwards, S. V.–Paabo, S.–Villablanca, F. X. –Wilson, A. C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 86: 6196–6200.
- Mullis, K. B.–Faloona, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 155: 335–350.
- Peters, H.–Robinson, P. N. (2010): Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. [In: Patrinos, G. P.–Ansoerge, W. *Molecular Diagnostics*. Second Edition.] Elsevier. 75–86.
- Plath, A.–Krause, I.–Einspanier, R. (1997): Species identification in dairy products by three different DNA-based techniques. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*. 205: 437–441.
- Wu, Y.–Hayes, V. M.–Osinga, J.–Mulder, I. M.–Looman, M. W.–Buys, C.–Hofstra, R. M. (1998): Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 26: 5432–5440.
- Zoller, P.–Redila-Flores, T.–Chu, D.–Patel, A. (2005): Temporal Temperature Gradient Electrophoresis: A Powerful Technique to Screen Mutations. <http://www.biocompare.com/Application-Notes/42665-Temporal-Temperature-Gradient-Electrophoresis-A-Powerful-Technique-To-Screen-Mutations/#top>
- Zsolnai, A.–Orbán, L. (1999): Accelerated separation of random complex DNA patterns in gels: comparing the performance of discontinuous and continuous buffers. *Electrophoresis*. 7: 1462–1468.

