

Gulyás Gabriella



Debreceni Egyetem

2014

# ACTA AGRARIA DEBRECENIENSIS 57.

Agrártudományi Közlemények

Alapítva: 1966.



## 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 melanokortin-1 receptor (MC1R) és a hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) génjében fellelhető mutációk kimutatási 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 kimutatási 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 ezgakt populációgenetikai számítások során, ugyanakkor hasonló jelentősége van az érték-mérő tulajdonságok (tejtermelő-, hústermelő-képesség) géneinek 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 kimutatására 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.

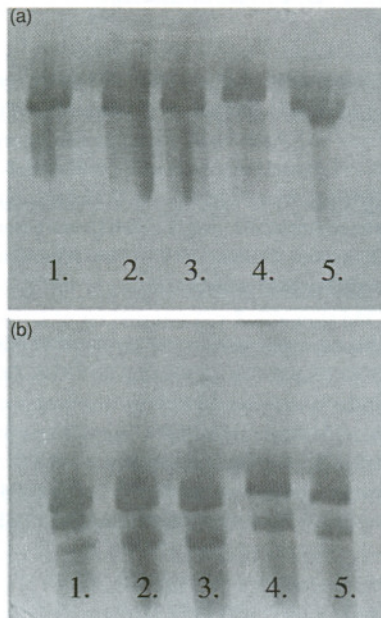
Amikor a molekula eléri a gélben azt a hőmérsékleti tartományt, ami megfelel az olvadáspontjának ( $T_m$ ),





csökkentett  $T_m$ ) a várható olvadási pont 64–67 °C közé esik, és itt csökken a DNS minta mobilitása a gélben a denaturáció miatt. Eredményeink alapján 5 óra futtatási idő után, melynél 66 °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 °C esetén viszont megjelent egy újabb sáv, melyből arra következtethetünk, hogy az olvadáspontját elérte 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 °C-kal csökkentett  $T_m$ ); futtatási körülmények: feszültség: 400 V, futtatási idő: 5 óra, hőmérsékleti lépték: 0,2 °C/10 perc, 57–63 °C. A géliképen látható, hogy a GC-clamp nélküli minták hamar elérték a  $T_m$ -et, így denaturlódtak 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.

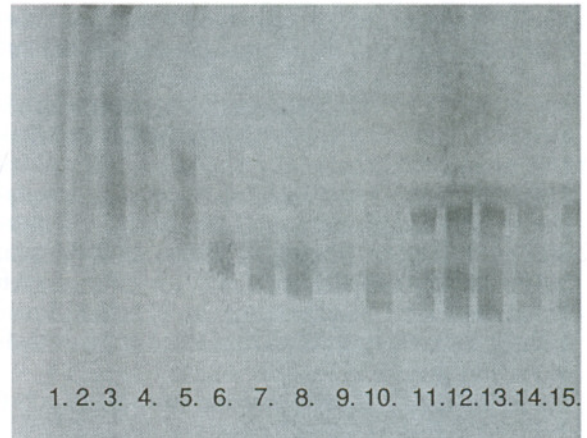
2. ábra: GC-clamp nélküli homozigóta MC1R DNS minták poliakrilamid gélmintázata



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 °C/8 perc, hőmérsékleti tartomány: 60–66,6 °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 °C/8 min, temperature range: 60 °C to 66.6 °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 °C/10 perc, hőmérsékleti tartomány: 57–63 °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 °C/10 min, temperature range: 57 °C to 63 °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 MeltINGENY megkönnyíti és költséghatékonyra 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 gében található mutációk olyan pozícióban fordulnak elő, melyek magas olvadási hőmérséklettel ( $T_m$ ) rendelkeznek, illetve a MeltINGENY 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.–Baudoïn, 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.