

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



52 ÚJ PULYKA MIKROSZATELLIT IZOLÁLÁSA ÉS TÉRKÉPEZÉSE

*Bakos Katalin^{1,2,4}, Veress Gyula^{1,4}, Korom Edit^{1,5,4}, Pinke Orsolya^{1,4}, Kovács Balázs⁴,
Varga László⁴*

Szent István Egyetem, ¹Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola, ²Állattenyésztés-tudományi Intézet,
Sertés- és Hobbiallat-tenyésztési Tanszék, ³Környezetipari Regionális Egyetemi Tudásközpont
2103 Gödöllő, Páter Károly u. 1.

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, ⁴Géntérképezés Állatokon Csoport, ⁵Paprika Genetikai és
Nemesítési Csoport
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

Bakos.Katalin@mkk.szie.hu

Összefoglaló

A mikroszatellitok a genom kódoló és nem kódoló régiójában megtalálható egyszerű, néhány bázispáros ismétlődésekből álló szekvenciák. Nagyfokú polimorfizmusuknak köszönhetően a legismertebb és leggyakrabban alkalmazott genetikai markerek közé tartoznak, a populációgenetika és az evolúciós genetika, valamint a géntérképezés legfontosabb eszközei, ezért kimutatásuk és izolálásuk egyre nagyobb jelentőségű. A mikroszatellitok izolálásához CA-ismétlődésekkel dúsított pulyka genomi könyvtárát hoztuk létre, mivel az élővilágban a mikroszatellit típusú ismétlődések közül a CA-ismétlődés a leggyakoribb. A könyvtár készítése során random gyűjtött, HaeIII és RsaI enzimekkel emésztett pulyka DNS-ekből indultunk ki. A 3' végén biotinilált CA-primerek segítségével kétszeres, mágneses izoláción alapuló dúsítással különítettük el az ismétlődést tartalmazó fragmenteket. Kompetens sejtekbe történő transzformálás után, a könyvtárát egy, az ismétlődő szekvenciára specifikus PCR-en alapuló módszerrel szűrtük. Minden klónt két PCR-reakcióval teszteltünk, amelynek során az egyik reakcióban egy, a transzformáló vektorra specifikus primerpárral szaporítottuk fel a klónozott fragmenteket, a másik reakcióban pedig, az említett primerpár mellett egy ismétlődésre specifikus primert is használtunk. A kiszűrt 167 klónból szekvencia meghatározás alapján 136 tartalmazott mikroszatellit ismétlődést, amelyek között 109 primertervezésre alkalmas, ezek között 59 egyedi, egymással nem azonos szekvenciát találtunk. Az eredményeket génbanki adatokkal összevetve megállapítottuk, hogy az 59-ből 7 mutat egyezést korábban már leírt pulyka mikroszatellit szekvenciákkal. Elvégeztük az újonnan izolált 52 mikroszatellit polimorfizmus vizsgálatát a Minnesotai Egyetemenről származó térképezési populációk DNS-ein, melynek során eddig 11 marker térképpozícióját határoztuk meg.

Kulcsszavak: pulyka (*Meleagris gallopavo*), mikroszatellit, mikroszatellit izolálás, genomi DNS könyvtár

52 new turkey (*Meleagris Gallopavo*) microsatellites: isolation and mapping

Abstract

Microsatellites are sequences present in the coding and non-coding regions of the genome, consisting of repeated units of a few base pairs. Due to their high polymorphism level, they are one of the most popular genetic markers used in the fields of population genetics, evolution genetics and genome mapping, thus their identification and isolation is of great importance. We constructed a turkey genomic library enriched for CA-repeats in order to isolate microsatellites, since CA-repeats are the most frequent repeat motifs. Randomly collected, RsaI and HaeIII digested turkey genomic DNA was used. The repeat containing fragments were isolated by a twofold enrichment procedure based on magnetic isolation, using 3'-biotinylated primers. After transforming the fragments into competent cells, the library was screened by a special PCR-technique, which consisted of two reactions: one using transforming vector-specific primers and another using an additional primer besides the former ones, specific for the repeat.



The DNA-sequence of the found 167 positive clones was determined. 136 microsatellite repeat containing sequences were found, 59 of them were unique. Comparing these with the genomic databases, we found 7 previously annotated microsatellite sequences. The newly isolated 52 microsatellites were tested on the mapping population of the University of Minnesota, and until this time the map position of 11 microsatellites was determined.

Keywords: turkey (*Meleagris gallopavo*), microsatellite, microsatellite isolation, genomic DNA library

Irodalmi áttekintés

A mikroszatellitek egyszerű, néhány bázispáros (1-6 bp) motívumokból álló ismétlődések, melyeket egyedi, az adott mikroszatellitire jellemző határoló szekvenciák fognak közre. Megtalálhatóak a prokarióta és az eukarióta szervezetek genomjában, a kódoló és nem kódoló régiókban egyaránt. Sokallélos rendszerek, nagyfokú polimorfizmussal jellemezhetők, ami az ismétlődő motívumok változó hosszabból és bázisösszetételéből adódik (Tautz és Renz, 1984, Tautz és mtsai, 1986, Litt és Luty, 1989). A legismertebb és leggyakrabban alkalmazott molekuláris genetikai markerek közé tartoznak. Számos előnyös tulajdonsággal jellemezhetők, gyorsan, pontosan és könnyen kimutathatók és jól ismételtető eredményt adnak. Mivel napjainkra a populációgenetika, az evolúciós genetika valamint a genetikai térképezés legfontosabb eszközeivé váltak, kimutatásuk illetve izolálásuk mind nagyobb jelentőséggel bír.

E kutatási projektünk középpontjában a pulyka faj áll. Integrált térképét (Reed és mtsai, 2007) a következő három korábbi kapcsoltsági térkép egyesítésével alakították ki: 1) egy cDNS és RFLP alapú térkép (Harry és mtsai, 2003, 113 marker 22 kapcsoltsági csoportban) 2) a roslini mikroszatellit alapú kapcsoltsági térkép (Burt és mtsai, 2003, 74 marker 20 kapcsoltsági csoportban) 3) az UMN elnevezésű, minnesotai mikroszatellit alapú kapcsoltsági térkép (Reed és mtsai, 2005, 314 lókuszt 29 kapcsoltsági csoportban). Ennek az integrált térképnek és a tyúk géntérképének az összevetése alapján készítették el a két faj összehasonlító géntérképét (Reed és mtsai, 2007).

Anyag és módszer

CA-ismétlődésekre dúsitott genomi könyvtár létrehozása

A pulyka mikroszatellit könyvtár készítése során random gyűjtött pulyka DNS-ekből indultunk ki. A DNS minták Rsa I. (Fermentas) és Hae III. (Fermentas) enzimmel végzett restrikciós emésztése után a 200-1000bp méretű fragmentek mindkét végéhez SuperSNX linkereket ligáltunk.



A linker-ligált DNS 3'-végén biotinilált, CA-ismétlődésekből álló primerrel ((CA)₁₈-biotin) hibridizáltattuk, majd sztreptavidinnel borított mágnesezhető szemcse (Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles, Promega) segítségével mágneses izoláción alapuló dúsítást végeztünk (Glenn, T.C. és Schable, N.A, 2005). Az így nyert, feltételezhetően ismétlődést tartalmazó fragmenteket pGEM-T Easy (Promega) vektorba klónoztuk, majd XL1 Blue kompetens sejtekbe transzformáltuk. A sejteket ampicillint (150 µg/ml), IPTG-t (20 µg/ml) valamint X-Gal-t (40 µg/ml) tartalmazó Luria-Bertani (LB) agarlemezekeken tenyésztettük.

A könyvtár szűrése

A kék-fehér szelekció alapján pozitívnak talált telepeket párhuzamosan, két PCR reakcióval vizsgáltuk. Az egyikben a transzformáló vektorra specifikus primerpárral ellenőriztük a transzformálás sikerességét: 2mM MgCl₂; 320nM dNTP; 1U Taq polimeráz (Roche); 200nM M13F primer (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'), 200nM M13R primer (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'), a másikban az ismétlődő szekvencia kimutatására az előbbi primerpár mellett egy az ismétlődésre specifikus primert is használtunk: 2mM MgCl (Roche); 320nM dNTP (Roche); 1 U Taq polimeráz (Roche); 200nM M13F és M13R primer, 240nM CA primer (5' ACACACACACACACACDN 3'); 4% DMSO. A reakciók templátjaként mindkét esetben a transzformáns telep szolgált. A reakciókat Applied Biosystems 9700 típusú készülékben végeztük az alábbi kondíciók mellett: 3 ciklus 95 °C 2 min., 45 °C 1 min., 72 °C 1 min. 15 s., 41 ciklus 95 °C 30 s., 45 °C 30 s., 72 °C 1 min. 15 s., valamint 72 °C 5 min. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen választottuk el. Ha a második PCR reakcióban egy az inszertnél kisebb méretű fragmentet (is) detektáltunk, a klónozott fragment szekvenciáját meghatároztuk.

Szekvenálás és primertervezés

A szekvencia meghatározást ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit segítségével, ABI Prism 310 Genetic Analyser automata szekvenáló készülékkel végeztük. A kapott szekvenciákat először összevetettük egymással, majd az egyedi szekvenciákat az adatbázisokban leírt szekvenciákhoz hasonlítottuk (BLASTN). Az új, eddig mikroszatellitként nem ismert szekvenciákra OligoExplorer program segítségével terveztünk primert.

Polimorfizmus vizsgálat, térképbe illesztés

A PCR kondíciók optimalizálása után a markereket a Minnesotai Egyetem térképezési populációjának (University of Minnesota/Nicholas Turkey Breeding Farms, UMN/NTBF) F1 egyedek vizsgáltuk.



A populáció F1 nemzedékét egy mellhús termelő képesség tekintetében kiváló, és egy nagy szaporodóképességű vonal keresztezésével hozták létre. Ebből hozták létre a 207 utódból álló F2-t (Reed és mtsai, 2003). A PCR reakciókat Applied Biosystems 9700 típusú készülékben végeztük az alábbi kondíciók mellett: 1,5 mM MgCl₂ (Roche), 2 mM dNTP (Roche), 0,2 U Taq polimeráz (Roche), 720 nM forward és reverz primer, 2000 ng BSA, 2 ng DNS, 1 ciklus 94 °C 6 min., 10 ciklus 94 °C 30 s., 63-56 °C vagy 60-53 °C 30 s., 72 °C 45 s., 30 ciklus 94 °C 30 s., 56 °C vagy 53 °C 30 s., 72 °C 45 s., 72 °C 5 min. A mikroszatellit alléleket 6%-os, denaturáló poliakrilamid gélen (50×38 cm, 0,4 mm vastagságú, a denaturáló ágens urea) Sequi-Gen GT Sequencing Cell-BIORAD készülék segítségével választottuk szét, és ezüst-festéssel tettük láthatóvá (Varga és mtsai, 1997). A mikroszatellitek térképbe illesztését Kent Reed és munkatársai (Minnesotai Egyetem, University of Minnesota) végezték Locus map szoftver segítségével (Garbe és Da, 2003).

Eredmények és értékelés

A mikroszatelliteket általában genomi könyvtárból izolálják, amelyet érdemes e célra alkalmas, valamilyen rövid ismétlődő szekvenciára feldúsítani. Mivel az élővilágban a leggyakoribb mikroszatellit ismétlődés a CA motívum, ezért CA-ismétlődésre dúsított pulyka genomi könyvtárat hoztunk létre. A pulyka mikroszatellit könyvtár készítése során több forrásból származó, HaeIII és RsaI enzimekkel emésztett pulyka DNS-ekből indultunk ki. A 3' végén biotinilált CA-primerek segítségével kétszeres, mágneses izoláción alapuló dúsítással különítettük el, az ismétlődést tartalmazó fragmenteket. Kompetens sejtekbe történő transzformálás után a könyvtárat specifikus, PCR-en alapuló módszerrel szűrtük. Minden klónt két PCR-reakcióval teszteltünk, amelynek során az egyik reakcióban egy, a transzformáló vektorra specifikus primerpárral szaporítottuk fel a klónozott fragmenteket, a másik reakcióban pedig, az említett primerpár mellett egy ismétlődésre specifikus primert is használtunk. Az így kiszűrt 167 klón szekvenciáját meghatároztuk, amelyek közül 167 tartalmazott CA-ismétlődést, ezek közül 136 tartalmazott mikroszatellit ismétlődést és 109 volt primertervezésre alkalmas. A mikroszatellit ismétlődést tartalmazó szekvenciákat egymással összevetve 59 egyedi, egymással nem azonos szekvenciát találtunk. Az eredményeket génbanki adatokkal összehasonlítva megállapítottuk, hogy a 59-ből 7 mutat egyezést korábban már leírt pulyka mikroszatellit szekvenciákkal.



Az újonnan izolált 52 mikroszatellit markert az UMN/NTBF térképezési populáció F1 egyedein vizsgáltuk, és az eredmények alapján 11 mikroszatellit térképpozícióját határoztuk meg. Az informatív mikroszatelliteket és hét, a térképezési populációban csak egy allélváltozattal rendelkező mikroszatellitét génbanki adatbázisban is leírtunk (1. táblázat).

1. táblázat: Az UMN térképbe illesztett, valamint a génbankban leírt mikroszatellitek eredményeinek összességé

Marker neve(1)	GenBank accession No.	Primerpárok szekvenciája (5' – 3')(2)	Allélok száma az UMN/NTBF térképezési populációban(3)	Legközelebbi kapcsolt lokusz(4)	LOD érték(5)	Pulyka kapcsoltsági csoport (UMN)(6)	Tyúk homológ(7)
MGP006	DQ 480738	GCACTCCCCTGCCTCC	1	-	-	-	-
		AACCAGGTGTTTCCTTCGC					
MGP009	DQ 526387	GGGAGACCTCCAACCACGT	1	-	-	-	-
		CCTTTTCAGCCGCTACACC					
MGP010	DQ 526388	AGTAAAAATAGGTTTGCCCGTA	2	MNT LEI070	11.74	M3	2q
		TTACGAGGCACCAGGACC					
MGP012	DQ 497633	AGGTAGCACAGCCTTATTCA	2	MNT 149	3.54	M11	4p
		ACCAAGCCTCATTACAACA					
MGP015	DQ 526395	TCTGATTTTATGGTTTCCTGAT	1	-	-	-	-
		ATCTTGCTACTCAGTGAATCTACA					
MGP018	DQ 497634	GAGCAGGCTTTGAGCAGTC	3	RHT 031	27.60	M2	3
		CAGAGATGTCCAGGTGTGTTG					
MGP019	DQ 526389	CAGTGAAAATACCAGCCGATAC	1	-	-	-	-
		ACTGGCTTTACCTCCCGTG					
MGP020	DQ 526390	CAGTTCTGCTACTCTGCGTTAC	1	-	-	-	-
		AGCTTGTGGATTGCTCCTT					
MGP022	DQ 526381	GGAGGTCAGTGAACACAGGAA	4	RHT 078	40.08	M8	6
		ACACGGGTGAGAAGGCAGT					
MGP023	DQ 526394	ATCTTATTTGAATGGTGGTGTGG	1	-	-	-	-
		ATTCTGCTGGTAGCCTTCCC					
MGP031	DQ 526391	TCAGAGCGAGCAGGCAC	2	LEI 043	4.21	M2	3
		GAGCTGGAGGGGAGGATC					



MGP035	DQ 526382	CAGGGGAGATTTCTGGAGTT	2	MNT 388	14.82	M2	3
		GTGCCAATCACTAGGACTGTCT					
MGP040	DQ 526383	GGCTGCTCCTCACCATCTG	2	RHT 138	33.71	M1	1
		GACCGCCTCACTTGGATTC					
MGP042	DQ 526384	GGCTGCCTTGATGTCCTG	1	-	-	-	-
		GATTTATGTCTGCGTGGTGC					
MGP043	DQ 526392	AGCAGGTGGAATAAAGTAGCA	2	RHT 044	22.21	M19	13
		GCTGTGGAGGGGAAAGG					
MGP046	DQ 526385	AGGCTTCAAGTGCTACCTGG	2	MNT 174	12.34	M1	1
		GCAAACAGAACATTAGTTTGTAACA					
MGP047	DQ 526393	GATGAACAGGATCTTTGGAGG	2	ADL 184	13.87	UN	18
		CACAGGCTTTGGGAAGGA					
MGP049	DQ 526386	TGGGCATCACTCATTACACAA	2	MNT 217	20.70	M2	3
		GAGAAAAGGGAAAATAATGATGAC					

Table 1. Information summary of the microsatellites incorporated to the UMN map and annotated to the GenBank Name of marker(1), sequence of primer pairs (5' – 3')(2), number of alleles in the UMN/NTBF mapping population(3), the closest locus linked (4), LOD value(5), turkey linking group (UMN)(6), hen homolog(7)

Következtetések és javaslatok

Az újonnan izolált mikroszatellitek hozzájárulnak a pulykával kapcsolatos genetikai ismeretek bővítéséhez, a pulyka kapcsoltsági térképének fejlesztéséhez, amely segítséget nyújt majd az állattenyésztés szempontjából fontos tulajdonságok (betegségekkel szembeni ellenállóképesség, termelőképesség, stb.) genetikai hátterét képező QTL-ek (Quantitative Trait Loci) térképezésében, valamint a pulyka genom szekvenálásban.

Irodalomjegyzék

Burt, D.W., Morrice, D.R., Sewalem, A., Smith, J., Paton, I.R., Smith, E.J., Bentley, J., Hocking, P.M. (2003): Preliminary linkage map of the Turkey (*Meleagris gallopavo*) based on microsatellite markers. *Anim. Genet.*, 34. 399-409.



- Garbe, K.J., Da, Y. (2003): Locusmap user manual Version 1.1. Department of Animal Science, University of Minnesota, St. Paul.
- Glenn, T.C., Schable, N.A. (2005) Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology.*, 395. 202-222.
- Harry, D.E., Marini, P.J., Zaitlin, D., Reed, K.M. (2003): A first generation map of the turkey genome. *Genome*, 46. 914-924.
- Litt, M., Luty, J.A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44. 397-401.
- Reed, K.M., Chaves, L.D., Garbe, J.R., Da, Y., Harry, D.E. (2003): Allelic variation and genetic linkage of avian microsatellites in a new turkey population for genetic mapping. *Cytogenet Genome Res.*, 102. 1-4. 331-339.
- Reed, K.M., Chaves, L.D., Hall, M.K., Knutson, T.P., Harry, D.E. (2005): A comparative genetic map of the turkey genome. *Cytogenet Genome Res.*, 111. 118-127.
- Reed, K.M., Chaves, L.D., Mendoza, K.M. (2007): An integrated and comparative genetic map of the turkey genome. *Cytogenet Genome Res.*, 119. 13-126.
- Tautz, D., Renz, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res.*, 12. 10. 4127-4138.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G. A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322. 652-656.
- Varga, L., Szabó, Gy., Darvasi, A., Müller, G., Sass, M., Soller, M. (1997) Inheritance and mapping of Compact (Cmpt), a new mutation causing hypermuscularity in mice. *Genetics*, 147. 755-764.