

УДК 577.212:636.082.2

## РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР-ПДРФ НА ПРИМЕРЕ DGAT1-ГЕНА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

<sup>1</sup>Тюлькин С.В., <sup>1</sup>Вафин Р.Р., <sup>2</sup>Муратова А.В., <sup>3</sup>Хатыпов И.И., <sup>4</sup>Загидуллин Л.Р.,  
<sup>4</sup>Рачкова Е.Н., <sup>4</sup>Ахметов Т.М., <sup>4</sup>Равилов Р.Х.

<sup>1</sup>ФГБУ «Татарская межрегиональная ветеринарная лаборатория»,

Казань, e-mail: [tulsv@mail.ru](mailto:tulsv@mail.ru);

<sup>2</sup>ООО «АМС Медиа», Москва;

<sup>3</sup>ООО УК «Просто молоко», Казань;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины», Казань

Целью настоящей работы являлась разработка эффективного способа детекции единичных нуклеотидных замен (SNP) и идентификации аллельных вариантов генов на основе ПЦР-ПДРФ-анализа. Нами разработан и апробирован на примере генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *K* гена *DGAT1* способ проведения ПЦР-ПДРФ, отличающийся от аналога тем, что на этапе ПЦР в постановке «Single PCR» используются три праймера, два из которых являются аллельспецифичными, а третий праймер – общий для обоих аллелей анализируемого гена. Праймеры *DGAT1-1* + *DGAT1-2* + *DGAT1-3* инициируют амплификацию участка *DGAT1*-гена крупного рогатого скота длиной 100 бп, соответственно *DGAT1*-ПДРФ-*TaqI* профиль *AA* = 82/18 бп, *KK* = 100 бп и *AK* = 100/82/18 бп. Проведение ПДРФ-анализа позволило идентифицировать генотипы и аллели гена по соответствующим ПДРФ-*TaqI*-профилям; это говорит о том, что предложенный и апробированный нами новый способ ПЦР-ПДРФ эффективен и его можно применить для идентификации генотипов и аллелей других генов.

**Ключевые слова:** ДНК, ПЦР-ПДРФ, праймер, метод, ген *DGAT1*, аллель, крупный рогатый скот

## DEVELOPMENT OF A METHOD FOR PCR-RFLP ON THE EXAMPLE OF DGAT1 GENE IN CATTLE

<sup>1</sup>Tyulkin S.V., <sup>1</sup>Vafin R.R., <sup>2</sup>Muratova A.V., <sup>3</sup>Khatypov I.I., <sup>4</sup>Zagidullin L.R.,  
<sup>4</sup>Rachkova E.N., <sup>4</sup>Akhmetov T.M., <sup>4</sup>Ravilov R.K.

<sup>1</sup>Tatar trans-regional veterinarian laboratory, Kazan, e-mail: [tulsv@mail.ru](mailto:tulsv@mail.ru);

<sup>2</sup>AMC Media LLS, Moscow;

<sup>3</sup>Prosto moloko LLS, Kazan;

<sup>4</sup>Kazan state academy of veterinary medicine, Kazan

The aim of this work was to develop an efficient method for the detection of single nucleotide substitutions (SNP) and identification of allelic variants of genes based on PCR-RFLP analysis. We have developed and tested in the genotyping of cattle in the alleles *A* and *K* gene *DGAT1* method PCR-RFLP different from the counterpart of the fact that at the stage of PCR in the production of «Single PCR» is used three primers, two of which are allele-specific, and the third primer is common to both alleles of the analyzed gene. Primers *DGAT1-1* + *DGAT1-2* + *DGAT1-3* initiate amplification plot *DGAT1* gene of cattle with a length of 100 bp, respectively *DGAT1*-RFLP-*TaqI* profile *AA* = 82/18 bp, *KK* = 100 bp and *AK* = 100/82/18 bp. Conducting RFLP analysis allowed to identify the genotypes and alleles of gene in corresponding RFLP-*TaqI*-profiles; his suggests that the proposed and tested a new method of PCR-RFLP effective and it can be used of identification for genotypes and alleles of other genes.

**Keywords:** DNA, PCR-RFLP, primer, method, *DGAT1* gene, allele, cattle

Наиболее удобным методом диагностики аллельного полиморфизма ряда генов отвечающих за хозяйственно полезные признаки сельскохозяйственных животных, является ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция с последующим анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов). Благодаря своей простоте и точности он получил широкое распространение в диагностических научно-исследовательских учреждениях [1]. Суть данного метода в том, что происходит амплификация участка определённого (исследуемого) гена, несущего сайт узнавания для

эндонуклеазы, с последующим разрезанием его соответствующим ферментом. По длине образовавшихся фрагментов (ПДРФ) делают заключение о наличии / отсутствии искомого аллеля у индивидуума [4, 7].

Одним из важных генов липидного обмена у крупного рогатого скота является ген диацилглицерол О-ацилтрансферазы (*DGAT1*). Исследования, проведённые на коровах-первотёлках холмогорской породы татарстанского типа, продемонстрировали, что наилучшие показатели молочной продуктивности имели аналоги, несущие в своём геноме *K*-аллель гена *DGAT1* [2]. В связи

с этим исследованием, касающиеся разработки методов изучения аллельного полиморфизма гена *DGAT1*, актуальны и представляют научный интерес.

**Цель настоящей работы** – разработка эффективного способа детекции единичных нуклеотидных замен (SNP) и идентификации аллельных вариантов генов на основе ПЦР-ПДРФ-анализа.

#### Материалы и методы исследования

Экстракция нуклеиновой кислоты из образцов цельной крови крупного рогатого скота, консервированной 10 мМ ЭДТА-Na<sup>2</sup>, осуществлялась сорбционным способом («ДНК-сорб В», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия).

Разработанный способ проведения ПЦР-ПДРФ апробирован на примере генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *K* гена *DGAT1*.

Анализ локуса гена *DGAT1* при проведении ПЦР-ПДРФ. ПЦР проводили на программируемом термоджеле «Терцик» (Россия) в объеме 20 мкл, содержащей буфер (60 мМ трис-HCl (pH 8,5), 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол; 0,1 мМ тритон X-100), 5% DMSO, 0,25 мМ dNTP, 1 ед. Taq ДНК полимеразы, по 0,25 мкМ праймеров DGAT1-1: 5'-CCGCTTGCTCGTAGCTTTTGGCAGGTAACAA-3' DGAT1-2: 5'-CCGCTTGCT CGTAGCTTTTGGCAGGTAACAA-3', по 0,5 мкМ праймера DGAT1-3: 5'-AGGATCCTCACCGCGGTAGGTCAGG-3' [3] для амплификации фрагмента гена *DGAT1* длиной 100 пар нуклеотидов, 1 мкл пробы ДНК в следующем режиме:

×1: 94°C – 4 мин; ×40: 94°C – 10 с, 72°C – 10 с;  
×1: 72°C – 5 мин.; хранение: 4°C.

Для определения аллельного полиморфизма гена *DGAT1* по вариантам *A* и *K* 20 мкл ПЦР пробы обрабатывали 20 ед. эндонуклеазы рестрикции *TaqI* в 1×буфере «Y» фирмы СибЭнзим (Россия) при 65°C в течение ночи.

Детекцию результатов ПЦР-ПДРФ осуществляли методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в буфере TBE (pH 8,0), содержащем этидий бромид в концентрации 0,5 мкг/мл, с последующей визуализацией амплифицированных продуктов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе ( $\lambda = 310$  нм).

Размеры фрагментов ДНК оценивали по подвижности в сравнении со стандартными ДНК маркерами.

В работе были использованы продукты для молекулярно-биологических исследований производства ООО «СибЭнзим», Россия.

Исследования по определению полиморфных вариантов гена *DGAT1* у 70 чистопородных и помесных по голштинской породе быков-производителей проводились в ГУП ГПП «Элита» Высокогорского района Республики Татарстан.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Одним из подходов к детекции единичных нуклеотидных замен (SNP) и идентификации аллельных вариантов генов является способ ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP), включая её модификацию – PCR-PIRA (PCR-primer introduced restriction analysis), являющуюся ближайшим аналогом предлагаемого способа [5, 6].

Нами разработан и апробирован на примере генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *K* гена *DGAT1*, схожий с прототипом [6], способ проведения ПЦР-ПДРФ, включающий подготовку пробы нуклеиновой кислоты, внесение указанной пробы в реакционную смесь для ПЦР, состоящую из деионизированной воды, дНТФ, буферной системы, Taq ДНК полимеразы, праймеров, проведение ПЦР, последующее эндонуклеазное расщепление ПЦР-продукта рестриктазой и детекцию полученных ПЦР-ПДРФ-фрагментов методом гель-электрофореза, **отличающийся** тем, что на этапе ПЦР в постановке «Single PCR» используются три олигонуклеотидных праймера, два из которых являются аллельспецифичными, но с заданным идентификационным сайтом рестрикции для одного из них, а третий праймер – общий для обеих аллелей анализируемого гена.

		<u>TaqI</u>			
		CCGCTTGCTC	GTAGCTTTTCG	AAGGTAACGC	= <u>A-аллель-специфичный праймер</u>
<u>DGAT1-ГЕН</u>		CCGCTTGCTC	GTAGCTTTGG	CAGGTAACAA	= <u>K-аллель-специфичный праймер</u>
Allele A 001		CCGCTTGCTC	GTAGCTTTGG	CAGGTAAGGC	GGCCAACGGG GGAGCTGCC
Allele K 001	.....	.....	.....	AA	.....
				<u>Общий праймер ПЦР</u>	
				CCTGA	<u>продукт</u>
Allele A 051		AGCGCACCGT	GAGCTACCCC	GACAACCTGA	CCTACCGCGG TGAGGATCCT 100 bp
Allele K 051	.....	.....	.....	.....	100 bp
		<u>TaqI-рестрикционное картирование</u>		<u>TaqI-ПЦР-ПДРФ-профиль</u>	
Allele A		1-18/19-100		82/18 bp	
Allele K		100		100 bp	

Рис. 1. Результаты выравнивания и *TaqI*-рестрикционного картирования амплифицируемых с помощью трёх праймеров *DGAT1-1* + *DGAT1-2* + *DGAT1-3* нуклеотидных последовательностей ДНК локуса *DGAT1*-гена *Bos Taurus* (аллели *A* и *K*)

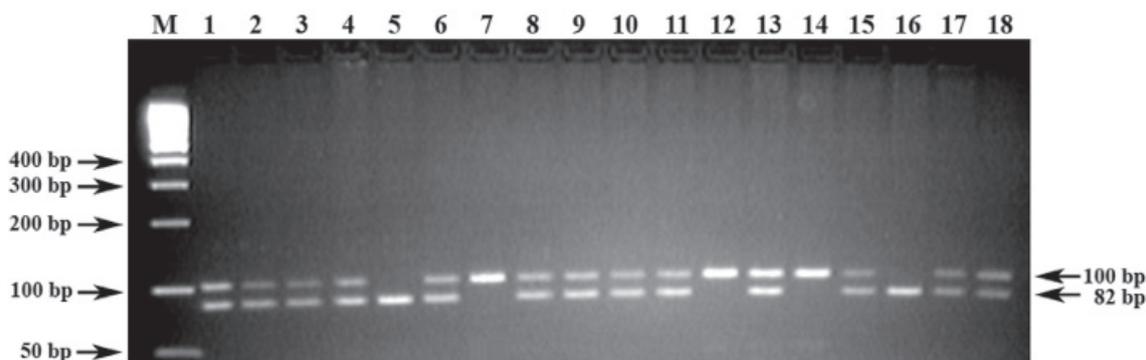


Рис. 2. Электрофореграмма результата *TaqI*-ПЦР-ПДРФ-идентификации аллелей *A* и *K* гена диацилглицерол *O*-ацилтрансферазы крупного рогатого скота с использованием трёх праймеров *DGAT1-1* + *DGAT1-2* + *DGAT1-3* и рестриктазы *TaqI*.

Обозначения: *M*) ДНК-маркеры 100 bp + 50 bp (*СибЭнзим*); 1–4, 6, 8–11, 13, 15, 17–18) *TaqI*-ПЦР-ПДРФ-профиль генотипа *AK* (100/82/18); 5, 16) *TaqI*-ПЦР-ПДРФ-профиль генотипа *AA* (82/18 bp); 7, 12, 14) *TaqI*-ПЦР-ПДРФ-профиль генотипа *KK* (100 bp)

Процесс валидации способа проведения ПЦР для идентификации аллельных вариантов *DGAT1*-гена крупного рогатого скота осуществляли с учётом анализа выравнивания фланкируемых тремя праймерами *DGAT1-1* + *DGAT1-2* + *DGAT1-3* (рис. 1) и путём тестирования протокола ПЦР-ПДРФ (рис. 2).

Праймеры *DGAT1-1* + *DGAT1-2* + *DGAT1-3* инициируют амплификацию участка *DGAT1*-гена крупного рогатого скота длиной 100 bp, соответственно *DGAT1*-ПДРФ-*TaqI* профиль *AA* = 82/18 bp, *KK* = 100 bp и *AK* = 100/82/18 bp.

После проведения ДНК-анализа 70 быков-производителей распределение животных по генотипам локуса гена *DGAT1* было следующим: 38 (54,3%) быков имели гомозиготный генотип *AA*; 28 (40,0%) – гетерозиготный генотип *AK* и 4 (5,7%) быка с гомозиготным генотипом *KK*. При этом частота аллеля *A* составила 0,74, а аллеля *K* – 0,26.

#### Вывод

По результатам практических исследований, направленных на апробацию разработанного нами способа проведения ПЦР-ПДРФ, нами получен обеспечиваемый заявленным способом технический результат, выраженный в эффективной идентификации генотипов (на примере генотипирования крупного рогатого скота по аллелям *A* и *K* гена *DGAT1*) ввиду корректной интерпретации генерируемых генотип-специфичных фрагментов.

#### Список литературы

1. Зарипов О.Г. Генотипирование крупного рогатого скота по генам бета-лактоглобулина и каппа-казеина методами ДНК-технологии: дис. ... канд. биол. наук. –Казань, 2010. – С. 30.
2. Зиннатова Ф.Ф., Зинатов Ф.Ф. Роль генов липидного обмена (*DGAT1*, *TG5*) в улучшении хозяйственно-полезных признаков крупного рогатого скота // Учёные записки Казанской ГАВМ. – 2014. – Т. 219. – С. 164–168.
3. Патент РФ № 2528743 С1, 20.09.2014.

4. Chikuni K. Identification of bovine kappa-casein genotypes using polymerase chain reaction method // J. Zootechn. Sci. – 1991. – № 7. – P. 654–659.

5. Jacobson D. R., Moskovits T. Rapid, nonradioactive screening for activating ras oncogene mutations using PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) // PCR Methods Appl. – 1991. – Vol. 1. – № 2. – P. 146–148.

6. Komisarek J., Michalak A. A relationship between *DGAT1* K232A polymorphism and selected reproductive traits in Polish Holstein-Friesian cattle // Anim. Sci. Pap. and Rep. – 2008. – Vol. 26. – № 2. – P. 89–95.

7. Velmala R., Mantysaari E.A., Maki-Tanila A. Molecular genetic polymorphism at the k-casein and B-lactoglobulin loci in Finish dairy bulls // Ari. Sci. Finl. – 1993. – Vol. 2. – P. 431–435.

#### References

1. Zarirov O.G. Genotipirovanie krupnogo rogatogo skota po genam beta-laktoglobulina I kappa-kazeina metodami DNK-tekhnologii: diss. kand. biol. nauk. Kazan, 2010, pp. 30.

2. Zinnatova F.F., Zinnatov F.F. Rol genov lipidnogo obmena (*DGAT1*, *TG5*) v uluchshenii khozyastvenno-poleznykh priznakov krupnogo rogatogo skota // Uchenye zapiski Kazanskoi GAVM, 2014. T. 219. pp. 164–168.

3. Patent RF no. 2528743 S1, 20.09.2014.

4. Chikuni K. Identification of bovine kappa-casein genotypes using polymerase chain reaction method // J. Zootechn. Sci. 1991. no. 7. pp. 654–659.

5. Jacobson D. R., Moskovits T. Rapid, nonradioactive screening for activating ras oncogene mutations using PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA) // PCR Methods Appl. 1991. Vol. 1. no. 2. pp. 146–148.

6. Komisarek J., Michalak A. A relationship between *DGAT1* K232A polymorphism and selected reproductive traits in Polish Holstein-Friesian cattle // Anim. Sci. Pap. and Rep. 2008. Vol. 26. no. 2. pp. 89–95.

7. Velmala R., Mantysaari E.A., Maki-Tanila A. Molecular genetic polymorphism at the k-casein and B-lactoglobulin loci in Finish dairy bulls // Ari. Sci. Finl. 1993. Vol. 2. pp. 431–435.

#### Рецензенты:

Алимов А.М., д.вет.н., профессор кафедры биологической и неорганической химии, Казанская государственная академия ветеринарной медицины, г. Казань;

Софронов В.Г., д.вет.н., профессор кафедры зоогигиены, Казанская государственная академия ветеринарной медицины, г. Казань.