

А.Н. РАШИДОВ<sup>2</sup>, В.Г. СПИРИДОНОВ<sup>2</sup>,  
О.М. КОНОВАЛ<sup>2</sup>, М.Д. МЕЛЬНИЧУК<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Національний університет біоресурсів та природокористування  
України, Київ

E-mail: arashydov@yahoo.com

<sup>2</sup> Українська лабораторія контролю та якості продукції АПК України, Київ

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЬНИХ ВАРИАНТІВ ГЕНІВ МОЛОЧНОЇ ПРОДУКТИВНОСТІ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ АНТИПРАЙМЕРА



*Представлено два незалежних підходи щодо проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі для SNP детекції генів каппа-казеїну та ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I у великої рогатої худоби. Проаналізовано зразки від 296 корів молочних порід української селекції. За геном каппа-казеїну отримано наступні частоти генотипів: AA – 0,58, AB – 0,34, BB – 0,08, а за геном ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I: AA – 0,7, АК – 0,26, КК – 0,04. Показана висока ефективність антипраймерної методики. Термін проведення антипраймерної ПЛР у реальному часі займає лише 2–2,5 год та дозволяє повністю ідентифікувати невідомий алельний варіант досліджуваних генів.*

© А.Н. РАШИДОВ, В.Г. СПИРИДОНОВ, О.М. КОНОВАЛ,  
М.Д. МЕЛЬНИЧУК, 2010

**Вступ.** Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) широко застосовується в молекулярній діагностиці, біотехнології, а також генетичному аналізі, зокрема, в галузі прикладної ветеринарії. Вперше ця технологія була застосована у 2006 р. для клінічної діагностики раку у людей [2]. Описано модифікацію кількісного ПЛР у реальному часі, що базується на технології 3'-зв'язування, відомій як «антипраймер» [1].

Дослідження генів каппа-казеїну (*csn*) та ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I (*dgat*) у великої рогатої худоби (ВРХ) має велике значення як з наукової, так і з практичної точки зору, оскільки ці гени кодують білки, що впливають на сиродільчі показники молока та сиру. Казеїни – це група складних фосфопротеїдів (залишок фосфорної кислоти утворює складний ефір з гідроксильною групою серину), які забезпечують високу поживну цінність молока ссавців і складають до 80 % усіх молочних білків [3]. Казеїни містять повний набір незамінних амінокислот, багаті валіном (7 %), лейцином (12 %), лізином (7 %) [4]. Каппа-казеїн є головною детермінантою якості молока та молочних продуктів [5]. Продукт гена каппа-казеїну є також основним ферментом, який відповідає за регуляцію рівня синтезу тригліцеридів в адипоцитах [6].

Нуклеотидна заміна GC → AA в позиціях 10433/10434 призводить до амінокислотної заміни A → K (аланін/лізин) у положенні 232 білка гена *dgat* [7]. Мутація K232A пов'язана з вмістом жиру і білків у молоці: алельний варіант K – з великою кількістю жиру у молоці, алель A – з виходом молока і сумарною концентрацією білків. Ці якісні ознаки залежать від точкових мутацій у вказаних генах, так званих мутацій SNP (single nucleotide polymorphism – однонуклеотидний поліморфізм) [4].

Даний тип мутацій аналізують, використовуючи метод ПЛР – поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Проте у цього методу є ряд недоліків, з яких основний – тривалий час проведення аналізу (від 24 год). Проведення аналізу в 5–6 стадій також збільшує вірогідність помилки оператора та контамінації зразків.

Метод ПЛР в реальному часі з використанням технології «антипраймер» є модифікацією ПЛР у реальному часі, де використовується антипраймер [8]. У звичайній ПЛР в реальному часі використовують зонди – послідовнос-

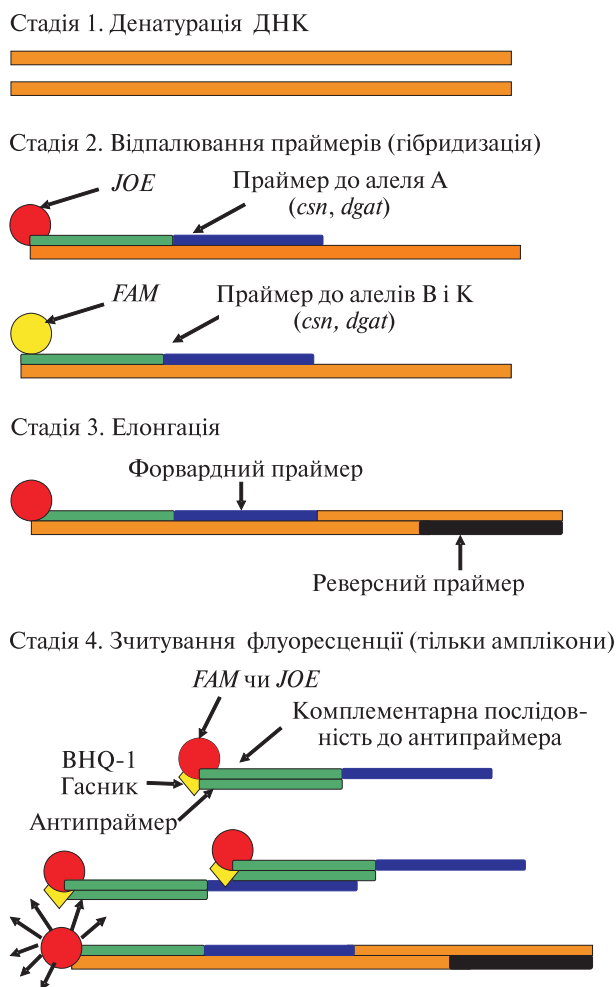


Рис. 1. Схема ПЛР

Таблиця 1

Параметри ампліфікації

Етапи ампліфікації	Температура, °C		Час	Кількість циклів	
	<i>csn</i>	<i>dgat</i>		<i>csn</i>	<i>dgat</i>
Початкова денатурація ДНК	94	94	5 хв	1	1
Денатурація	94	94	15 с	45	40
Відпалювання праймерів	62	64	15 с	45	40
Синтез	72	72	15 с	45	40
Зчитування сигналу	50	50	45 с	45	40

Примітка. Аналіз проведено за допомогою приладу «7000 Sequence Detection System» з активним регулюванням температури при об'ємі рідини в пробірці 25 мкл.

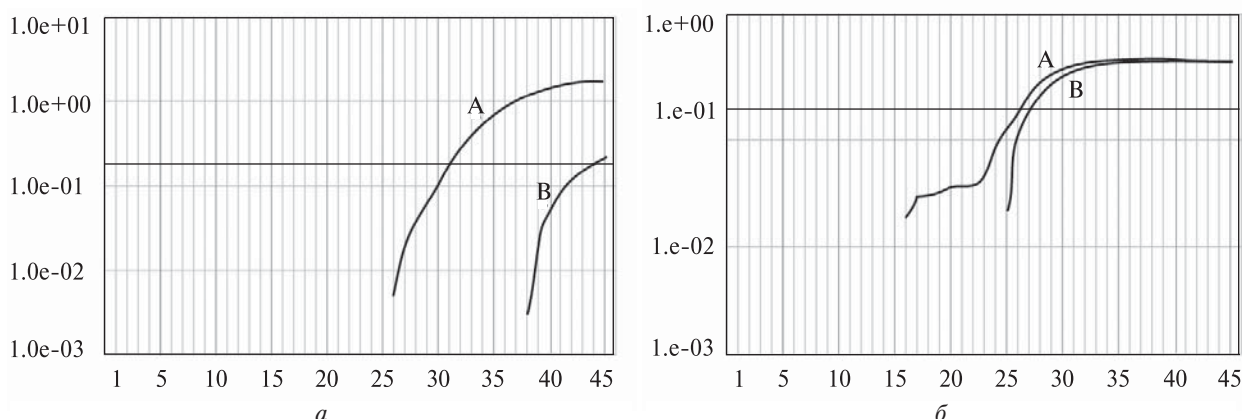
ті, мічені флуоресцентними барвниками, які забезпечують безперервний моніторинг флуоресцентного сигналу. Величина цього сигналу є прямо пропорційною кількості ПЛР-продукту. Модифікація з антипраймером відрізняється у наступному. Кожний праймер складається з послідовності розміром до 40 нуклеотидів, міченої флуоресцентною міткою з 5'-кінця *FAM* та *JOE*. У всіх праймерів є консервативна послідовність, яка починається з 5'-кінця праймера і має розмір 20 нуклеотидів. Антипраймер має на 3'-кінці зв'язаний гасник та послідовність TTCCCTCGGATAGCACT-BHQ-1 [2], повністю комплементарну до 5'-кінця праймерів [9]. Аналіз з використанням методу ПЛР з антипраймером включає чотири послідовні стадії (рис. 1) [1].

Перша стадія починається з денатурації матричної ДНК за умов 94 °C протягом 5 хв. На другій стадії проводять відпалювання праймерів на вже денатурованій матриці при 62–64 °C в залежності від типу аналізу (повна комплементарність ДНК-матриці та комплементарності до антипраймера стає можливою тільки з другого циклу ампліфікації). На третій стадії – елонгації – відбувається подвоєння кількості існуючих ампліконів при 72 °C. На четвертій стадії температуру проведення реакції знижують до 50 °C (табл. 1). На цій стадії відбувається повна гібридизація усіх незв'язаних праймерів та проходить зчитування сигналу апаратурою [1, 10]. Цей метод є високочутливим, оскільки можна виявити цільову послідовність за умови її зустрічання один раз на 10<sup>5</sup> клітин.

Метою роботи є визначення порівняльної ефективності ПЛР в реальному часі з використанням антипраймера для аналізу алейних варіантів генів молочної продуктивності корів каппа-казеїну та ацил-КоА-діацилгліцерол ацилтрансферази I.

**Матеріали і методи.** У наших дослідженнях ми використовували стандартну Taq-Pol виробництва «Fermentas» (Литва). Праймери були синтезовані компанією «СИНТОЛ» (РФ).

Дослідження проводили на 296 дійних коровах української чорно-рябої та червоно-рябої молочних порід ДП ДГ «Прогрес» Чернігівського інституту АПВ УААН. Зразки крові відбирали за допомогою системи «Вакуете», де

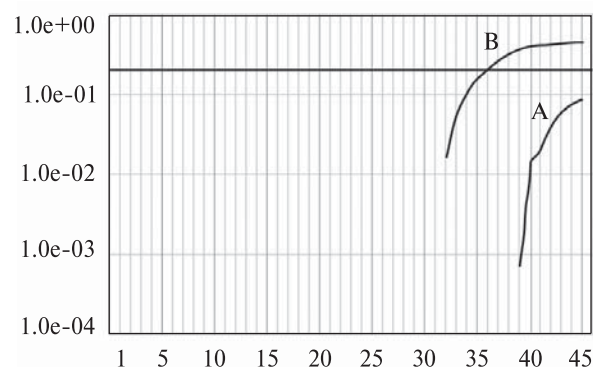


**Рис. 2.** Графіки ампліфікації генотипів AA (а) та АВ (б) гена каппа-казеїну у ВРХ: по вертикалі –  $\Delta R_n$ ; по горизонталі – номер ампліфікаційного циклу реакції

як антикоагулянт використовують ЕДТА. ДНК виділяли з цільної крові за методом [11].

Для аналізу поліморфізму генів з використанням ПЛР у реальному часі використовували діагностичні системи, розроблені відділом молекулярної діагностики Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК. Ампліфікацію проводили в термоциклері Applied Biosystems 7000. Умови ампліфікації оптимізували для кожного локусу емпірично. Обрахунок та аналіз результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення, рекомендованого виробником (постачається в комплекті з даним приладом). Усі отримані дані перевіряли, додатково використовуючи ПЛР – ПДРФ діагностичні системи. Ампліфікацію проводили в термоциклері Applied Biosystems 2720. Рестрикційний аналіз здійснювали з використанням рестриктаз виробництва «Fermentas» (Литва) за методикою, рекомендованою виробником. Продукти рестрикції аналізували в 4%-ному агарозному гелі. Розмір продуктів рестрикції визначали за маркером молекулярної маси GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus («Fermentas», Литва). Розміри продуктів ампліфікації, рестриктази та розміри фрагментів рестрикції наведені в табл. 2. Дані, одержані двома методами, є статистично достовірними.

**Результати досліджень та їх обговорення.** В роботі представлені результати аналізу, проведеного з використанням двох незалежних ПЛР систем у реальному часі для SNP детекції генів *csn* та *dgat* у великої рогатої худоби.



**Рис. 3.** Результати ампліфікації генотипу ВВ гена каппа-казеїну у ВРХ: по горизонталі – номер ампліфікаційного циклу реакції; по вертикалі –  $\Delta R_n$

Таблиця 2  
**Розміри продуктів ампліфікації, рестриктази та розміри продуктів рестрикції досліджених генів**

Ген	Розмір амплікону, п.н.	Рестриктаза	Алель (розміри фрагментів рестрикції, п.н.)
<i>csn</i>	273	<i>Hinf I</i>	A (133, 91, 49) B (224, 49)
<i>dgat</i>	411	<i>Crf I</i>	A (203, 208) K (411)

Примітка. Праймери для ПЛР – ПДРФ аналізу: ctcgtagcttggcaggaaga DGAT-K; ctcgtagcttggcaggaaggc DGAT-A; tcaggtgtcgggtagctcac DGAT-R; ggctctcaataactctggagaat CSN-A; ggctctcaataactctggagaag CSN-B; ccattgctagtggtagcctaca CSN-R.

Обидві системи аналізу мають на меті визначення SNP мутацій у ВРХ, але досягнути повної 100%-ної дискримінації (розділення) алелів обох генів практично неможливо. Тео-

Таблиця 3  
Частоти генотипів генів *csn* та *dgat* у червоно-рябої та чорно-рябої порід ВРХ

Порода	Частоти генотипів	
	<i>dgat</i>	<i>csn</i>
Червоно-ряба	AA – 0,7538	–
	AK – 0,2385	
	KK – 0,0077	
Чорно-ряба	AA – 0,6507	AB – 0,3452
	AK – 0,2951	AA – 0,5714
	KK – 0,0542	BB – 0,0834

ретично це обумовлюється тим, що конструкції праймерів відрізняються один-двома нуклеотидами на 3'-кінці, а основна послідовність праймера на 98–99 % комплементарна для обох алелів, тобто при стадії відпалювання праймерів до матриці статистична вірогідність помилкового приєднання послідовності праймера до іншого алеля є досить високою. Тому вводиться поняття порогове значення  $\Delta C_t$  – це цикл ПЛР в реальному часі, на якому проходить статистично достовірне збільшення флуоресценції по відношенню до базового рівня флуоресценції.

Необхідно також враховувати різниці циклів ( $\Delta C_t$ ) під час інтерпретації одержаних даних для кожного з алелів досліджуваного гена. Наприклад, для гетерозигот ця різниця буде мінімальною в межах 0,5–3,5 циклів, в той час для гомозигот ця різниця буде перевищувати різницю в 3,5 циклів.

Для оцінки придатності розробленої методики ми перевіряли усі зразки методом ПЛР в реальному часі у триразовій повторності. На рис. 2 та 3 представлені результати генотипування алелів А і В гена каппа-казеїну для гомозигот AA, гетерозигот АВ та гомозигот BB відповідно.

Генотипування тварин за генотипом AA дозволяє чітко ідентифікувати алель А. Сигнал детектується на 31-му циклі. В той же час спостерігається незначна детекція алеля В, рівень сигналу не досягає порогового значення. На рис. 2, б представлений результат ідентифікації генотипу АВ (гетерозиготи), ампліфікація обох алелів А і В детектується на рівні 26–27-го циклу.

На рис. 3, де представлений результат ідентифікації тварин із генотипом BB, показана чітка детекція алеля В на рівні 37-го циклу, в той час як детекція алеля А не досягає порогового циклу. Аналогічна картина спостерігається і для генотипування алелів А і К гена *dgat*.

Результати дослідження зведені в табл. 3. У чорно-рябої породи частота генотипів за геном *csn* становила: AA – 0,58, AB – 0,34 та BB – 0,08. За геном *dgat* для чорно-рябої породи частота виявлення генотипів складала: AA – 0,65, AK – 0,30 та KK – 0,06, у червоно-рябої AA – 0,75, AK – 0,24 та KK – 0,01.

Слід зазначити, що в середньому близько 0,5–1 % зразків потребують повторної постановки реакції. Це, можливо, пов'язано з деякими причинами, серед яких неякісна пробопідготовка зразків, невідповідність умовам їх зберігання і температурного режиму в робочих приміщеннях, неякісні компоненти реакційної суміші, помилки оператора тощо.

Таким чином, на прикладі ідентифікації алельних варіантів генів *csn* і *dgat*, що визначають господарсько-корисні ознаки продуктивності ВРХ, показана ефективність генотипування SNP методом ПЛР у реальному часі з модифікацією «антипраймер». При порівнянні результатів аналізу, одержаних методом антипраймерної ПЛР, з результатами, одержаними методом ПЛР–ПДРФ, розбіжність становила від 0,5 до 1 %, в той час як для методу антипраймерної ПЛР час проведення аналізу не перевищував 2,5 год. Дана методика може бути застосована селекційними підприємствами з метою створення племінного ядра із чітко визначеними характеристиками для направленої селекції та отримання високопродуктивних стад.

A.N. Rashydov, V.G. Spyridonov,  
O.N. Konoval, M.D. Melnychuk

#### IDENTIFICATION OF ALLELE VARIANTS OF CATTLE MILK PRODUCTIVITY GENES USING PCR ANTI-PRIMER METHOD

In this work we have demonstrated two independent real-time PCR methods for detection single nucleotide polymorphism (SNP) of genes *csn* and acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (*dgat*) in cattle. We have analyzed 296 samples of milk production cattle of Ukrainian breeding. The genotype frequencies were AA – 0,58, AB – 0,34, BB – 0,08 for *csn* gene and for *dgat* gene – AA – 0,7, AK – 0,26, KK – 0,04. High efficiency of so called «anti-primer»

method was shown. Duration of anti-primer PCR reaction was about 2–2,5 hours only and provided full investigation of unknown gene allele.

*А.Н. Рашидов, В.Г. Спиридонов,  
О.Н. Коновал, М.Д. Мельничук*

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ  
ВАРИАНТОВ ГЕНОВ МОЛОЧНОЙ  
ПРОДУКТИВНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО  
СКОТА ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ  
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
МЕТОДА АНТИПРАЙМЕРА**

Представлены два независимых подхода для проведения ПЦР в реальном времени для определения одиночного нуклеотидного полиморфизма при детекции генев каппа-казеина и ацил-Ко-А-диаглицерол ацилтрансферазы I у крупного рогатого скота. Проанализированы образцы от 296 коров молочных пород украинских коров. По гену каппа-казеина получены следующие частоты генотипов: AA – 0,58, AB – 0,34, BB – 0,08, по гену ацил-Ко-А-диаглицерол ацилтрансферазы I: AA – 0,7, AK – 0,26, KK – 0,04. Показана высокая эффективность антипраймерной методики. Время проведения реакции антипраймерной ПЦР составляет всего 2–2,5 ч и позволяет полностью идентифицировать неизвестный аллельный вариант исследуемых генев.

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Jin Li G., Makrigiorgos M.* Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping // Department of Radiation Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA, 2007. Published online 22 February 2007 [www.nature.com/natureprotocols](http://www.nature.com/natureprotocols)
2. *Li J.* Antiprimer quenching-based real-time PCR and its application to the analysis of clinical cancer samples // *Clin. Chem.* – 2006. – **52**. – P. 624–633.

3. *Patel R.K., Chauhan J.B., Singh K.M., Soni K.J.* Genotype and allele frequencies of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin in Indian river buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) // *Buffalo Bull.* – 2007. – **26**, № 3. – P. 63–66.
4. *McLean D.M., Graham E.R., Ponzoni R.W., Mckenzie H.A.* Effects of milk protein genetic variants on milk yield and composition // *J. Dairy Res.* – 1985. – **51**. – P. 531–546.
5. *Van der Berg G., Escher J.T.M., De Konning P.J., Bovenhuis H.* Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin in relation to milk composition and processing // *Netherl. Milk Dairy J.* – 1992. – **46**. – P. 145–168.
6. *Cases S., Smith S.J., Zheng Y., Myers H.M., Lear S.R., Sande E.* Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triglycerol synthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1986. – **95**. – P. 13018–13023.
7. *Pareek C.S., Czarnik U., Zabolewicz T., Pareek R.S., Walawski K.* DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide polymorphism in Polish Black-and- White cattle // *J. Appl. Genet.* – 2005. – **46**, № 1. – P. 85–87.
8. *Heid C., Stevens J., Livak K., Williams P.* Real time quantitative PCR // *Genome Methods : Genome Research.* – New York : Cold Spring Harbor, 1996.
9. *Zhang Y., Zhang D., Li W., Chen J., Peng Y., Cao W.A.* Novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe // *Nucl. Acids Res.* – 2003. – **31**. – P. 123.
10. *Whitcombe D., Theaker J., Guy S.P., Brown T., Little S.* Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – **17**. – P. 804–807.
11. *Kanai N., Fujii T., Saiki K., Tokoyama T.* Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood // *J. Clin. Pathol.* – 1994. – **47**. – P. 1043–1044.

Надійшла 29.12.09