

## Wstępne wyniki zastosowania starterów wybranych sekwencji DNA *Canis familiaris* do amplifikacji analogicznych loci w genomie *Nyctereutes procyonoides*\*

Brygida Ślaska, Grażyna Jeżewska, Grzegorz Zięba

Akademia Rolnicza w Lublinie, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Celem prowadzonych badań była ocena przydatności sekwencji starterowych, służących do amplifikacji fragmentów genów i loci mikrosatelitarnych *Canis familiaris* (psa domowego) do analizy analogicznych loci w genomie *Nyctereutes procyonoides* (jenota). Po wyizolowaniu DNA z krwi jenotów, jego ocenie ilościowej i jakościowej, przeprowadzono reakcję amplifikacji DNA metodą PCR (Polymerase Chain Reaction). Uwzględnione zostały fragmenty 4 genów oraz 20 sekwencji mikrosatelitarnych. Do amplifikacji wybranych sekwencji DNA u jenota wykorzystano startery opracowane dla genomu *Canis familiaris*. Przeprowadzono kontrolę jakościowo-ilościową reakcji PCR, analizę w świetle UV i archiwizację. Otrzymane produkty PCR 24 badanych sekwencji DNA świadczą o homologii fragmentów flankujących poszczególnych badanych fragmentów DNA u obu badanych gatunków psowatych (*Canis familiaris*, *Nyctereutes procyonoides*). Wynika z tego, że możliwe będzie określenie zmienności genetycznej jenotów na podstawie polimorfizmu genów i markerów genetycznych II klasy, tj. sekwencji mikrosatelitarnych DNA oraz przeprowadzenie oceny przydatności badanych sekwencji DNA do kontroli jakości cech użytkowych i funkcjonalnych jenota.

**SŁOWA KLUCZOWE:** *Nyctereutes procyonoides* / geny / sekwencje mikrosatelitarne

Historia rodziny psowatych (*Canidae*) rozpoczęła się w późnym eocenie, czyli ponad 44 miliony lat temu. Ponad trzydzieści gatunków, z obecnie żyjących, wykazuje silne spokrewnienie. Do rodziny *Canidae* należą m.in. pies domowy (*Canis familiaris*) i jenot (*Nyctereutes procyonoides*). Amplifikacja wybranych fragmentów genów jeno-

---

\*Praca naukowa finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Informatyzacji w latach 2004-2006, jako projekt badawczy nr 2 P06D 006 26

ta, z zastosowaniem starterów służących do amplifikacji analogicznych fragmentów DNA psa, może być jednym z elementów wskazujących na to, jak daleko można wykorzystywać informacje o genomie psa w badaniach genetycznych gatunku, należącego do tej samej rodziny. Ze względu na przynależność systematyczną psa i jenota do jednej rodziny, konstrukcja mapy genomu jenota budowana na bazie wiedzy o genomie psa może pozwolić na analizę konserwatywności genetycznej w rodzinie *Canidae*, jak również pozwoli wykorzystać znane już markery DNA psa w badaniach genetycznych prowadzonych w populacji jenota.

Celem prowadzonych badań była ocena przydatności starterów, służących do amplifikacji fragmentów genów i sekwencji mikrosatelitarnych *Canis familiaris*, do analizy analogicznych loci w genomie *Nyctereutes procyonoides* oraz ustalenie warunków reakcji PCR dla poszczególnych sekwencji DNA.

### **Materiał i metody**

Materiał do badań pochodził od 10 jenotów, urodzonych w 2003 roku na jednej z ferm reprodukcyjnych w południowo-wschodniej Polsce. Po uzyskaniu przez zwierzęta pełnej dojrzałości zimowej okrywy włosowej od każdego z nich pobrano (przyżyciowo) krew do probówek, zawierających antykoagulant EDTA. DNA został wyizolowany z pełnej krwi obwodowej, z zastosowaniem zestawu do izolacji QIAamp DNA Blond Mini Kit firmy QIAGEN. Ocena ilościowa i jakościowa prób DNA została przeprowadzona po rozdziale elektroforetycznym w 0,8% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono przez 50 minut, przy napięciu 80 V. Stężenie DNA określano spektrofotometrycznie, przez pomiar absorbancji prób DNA w spektrofotometrze Lightwave UV/Vis Diode-Array.

Amplifikacja DNA metodą PCR (Polymerase Chain Reaction) została przeprowadzona przy użyciu termocyklera PTC-225 DNA Engine Tetrad. Uwzględnione zostały fragmenty genów: ESR1 (Estrogen Receptor 1), GHR (Growth Hormone Receptor), GH1 (Growth Hormone 1), IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) oraz sekwencji mikrosatelitarnych: FH3922; FH3300; C01.246; REN112I02; REN288J16; PEZ17; REN144A06; FH2097; REN126G20; AHT103; C03304; ACE; FH2263; FH3596; REN198P23; UOR0442; FH2295; REN230G12; REN01N09; BAC\_382-K19.

Do reakcji amplifikacji wybranych sekwencji mikrosatelitarnych i fragmentów genów w genomie jenota zostały użyte startery (tab. 1), opisane w literaturze dla genomu psa domowego – *Canis familiaris* [1, 2, 3, 4, 6, 7].

Amplifikacja wybranych fragmentów DNA przeprowadzana była w cienkościennej probówkach (0,2 ml). Wyjściowa mieszanina reakcyjna (objętość próby – 25 µl) składała się z: 200-400 ng DNA; 2,5 µl buforu do PCR, 200 µM każdego z nukleotydów, 25 pM każdego startera, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U polimerazy Taq. Wyjściowa reakcja amplifikacji składała się z: denaturacji wstępnej (95°C, 10 min); 35 cykli: denaturacji (95°C, 30 sek.), przyłączania (58°C, 30 sek.) oraz wydłużania starterów (72°C, 1 min); końcowego wydłużania starterów (72°C, 10 min) oraz chłodzenia do temperatury 4°C.

**Tabela 1 – Table 1**  
Sekwencje starterowe analizowanych loci  
Primer sequences of analyzed loci

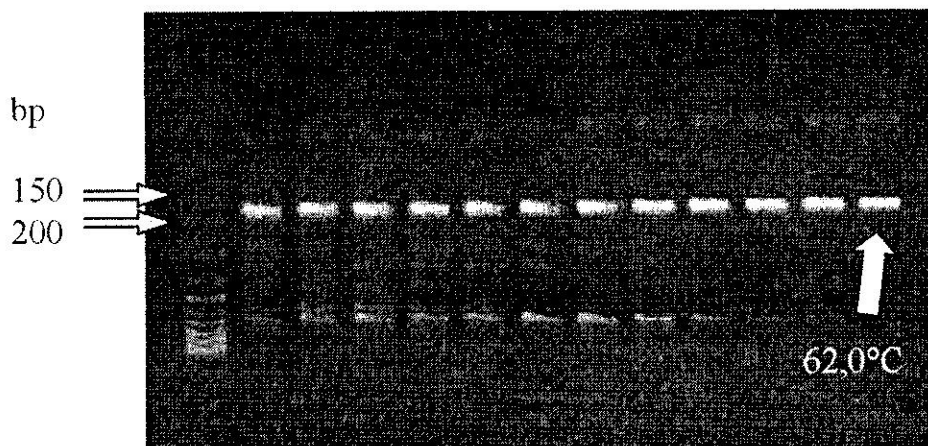
Locus	Forward Primer	Reverse Primer
FH3922	TTTTGTCAAGCAGCCCTATATC	TGGCCTTAATTTATCATGGAG
FH3300	TGAAATGGTACTTCAGCATCG	ATCAGGCCCAGATAGTATGC
C01.246	GACTTCATTCATCCATTCATGA	GGATCGAGTCCAACGTGG
REN112102	ATAGCCCATGAAATCCA	CCCCAAATACATCCCTACAT
REN288J16	GGGTTTCGTTAAGGGAGGAA	AGAGTTTGGAGGGCACAGAC
PEZ17	CTAAGGGACTGAACTTCTCC	GTGGAACCTGCTTAAGATTG
REN144A06	CCATTGCAAAGGCAAGATT	GAAATTTGGCCACAGTTCAT
FH2097	CAATGTCGAATTCATGGTG	ATGGAGCAAGATGTGTTGTG
REN126G20	TAGGGTATGCACTTGTTTTG	CCAGGGGGTATCCATCT
AHT103	GGAAACTCAGTTATTTTACA	GCCCTAGAACTTCACACACA
C03304	ATTGGCATCATCCACTGGTCA	TGGAGGCAGCTTAAATCTCAACA
ACE	AGGTCACTGTCTGTACACGTAGTG	ACCCCTGTGCACCTCATCTTA
FH2263	CATGTAGAGTGATTAGTTGGTCTTT	CTGAATATCTCTGCCCCTTC
FH3596	ACATCAGGTGAAGAGCTTGC	GAAGTTGGCTGGGGAAGG
REN198P23	TTGTACATTATCTGTTCTACCTCGG	TCCTCAGCAGGCCCTTTTCTC
UOR0442	TCAGCTGGTTAATGATAGGTGG	ATATTCCTTTGCTCTGAGACGC
FH2295	TCTCGGGGATAGTGTATAACTCC	GTCAGGAAAAGGACATTTGACC
REN230G12	AGTGGCTTTCCCTCCTCATF	CATTGCAGTGCATACTTGCC
REN01N09	CTTCCAACCTACCACCAC	GCCATCATTAACCTCATTT
BAC_382-K19	TTACTGTTAGCCCTGTCTTGTG	TAAAGATCCACATAAACGTGCC
ESR1	GGGTGGGCGGGTCTCTGGAGATG	GGCTGAACCAGCTCCCTGTGAGCA
GHR	AGATCTCCTCAAGGAAGGAAAATTA	AAGGATGTTAAGTGATTTCTCATGG
GHI	GCAGTTTCTCAGCAGGGTCT	GATGCCCAGCAACTAGAAGG
IGF1	AGCCACAGGGTACGGCTC	CTTCTGAGCCTTGGGCATGTC

Kontrola jakościowo-ilościowa reakcji PCR została przeprowadzona (z wykorzystaniem buforu obciążającego zawierającego błękit bromofenolowy) po elektroforetycznym rozdziale w 2% żelu agarozowym. Żele zostały poddane analizie w świetle UV (Transiluminator) i archiwizowane. Jako marker wielkości fragmentów DNA wykorzystano GeneRuler 50bp DNA Ladder firmy Fermentas.

## Wyniki i dyskusja

Przeprowadzona została ocena przydatności 24 sekwencji starterowych, służących do amplifikacji fragmentów genów i sekwencji mikrosatelitarnych psa domowego (*Canis familiaris*) do analizy analogicznych loci w genomie jenota. Zoptymalizowano warunki reakcji PCR dla poszczególnych par starterów. Reakcje PCR wykonane zostały w gradiencie temperatury (rys. 1).

Ustalono temperatury przyłączania starterów dla poszczególnych fragmentów badanych sekwencji DNA u jenota. Wynosiły one 50,3°C i 58,5°C dla sekwencji mikrosatelitarnych (tab. 2). Dla badanych markerów mikrosatelitarnych jenota temperatury przyłączania starterów nieznacznie tylko odbiegały od opracowanych dla genomu psa



Rys. 1. Elektroforegram fragmentu genu IGF1 w genomie jenota (gradient temperatury)  
 Fig. 1. Electrophoregram of IGF1 gene in raccoon dog genome (temperature gradient)

domowego [1, 2, 3, 4, 6, 7]. Różnice te dla poszczególnych par starterów wahały się od 0,2°C dla REN126G20 do 3,5°C dla AHT103.

Najniższa temperatura przyłączania starterów w przypadku badanych fragmentów genów dotyczyła GHR, najwyższą zaś odnotowano w przypadku ESR1 (tab. 2). Podobnie jak w przypadku sekwencji mikrosatelitarnych, odbiegały one od danych literaturowych dla genomu psa domowego [1, 2], a różnice dochodziły do 3°C (GHR).

W przypadku niektórych par starterów, aby otrzymać specyficzny produkt, niezbędna była zmiana warunków PCR w stosunku do danych literaturowych, dotyczyło to,

**Tabela 2 – Table 2**

Temperatura przyłączania starterów  
 The temperature of attaching primers

Loci	Temperatura przyłączania starterów (°C) Temperatures of attaching primers (°C)
REN112I02, REN126G20, REN01NO9	50,3
FH3922, FH3300, C01.246, REN288J16, PEZ17, REN144A06, FH2097, AHT103, C03304, ACE, FH2263, FH3596, REN1198P23, UOR0442, FH2295, REN230G12, BAC_382-K19	58,5
GHR	57,2
GH1	60,2
IGF1	62,0
ESR1	64,0

poza optymalizacją temperatury przyłączania starterów, również czasu ich końcowego wydłużania nawet do 30 minut w przypadku GHR (tab. 3).

**Tabela 3 – Table 3**

Modyfikacje czasu końcowego wydłużania starterów  
Modifications of final annealing time of primers

Loci	Czas końcowego wydłużania starterów Final annealing time of primers (min)
FH3300, REN126G20, AHT103	20
GHR	30

**Tabela 4 – Table 4**

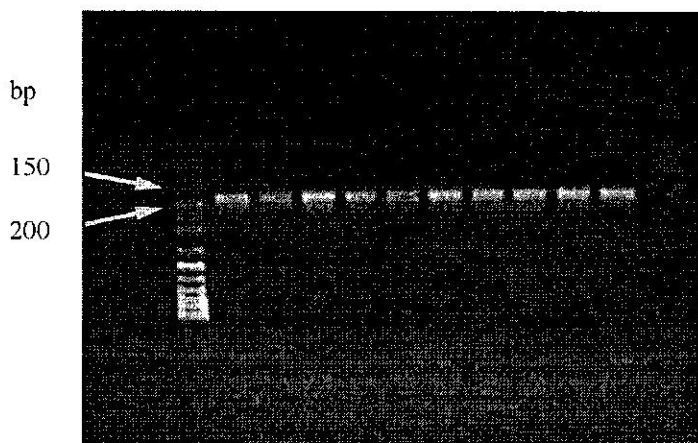
Modyfikacje składu wyjściowej mieszaniny reakcyjnej  
Modification of composition of initial mixture

Loci	Dodane dodatkowo do 1 próby (25 µl) wyjściowej mieszaniny reakcyjnej Added additionally to 1 sample (25 µl) of initial mixture
FH3922, FH3300, FH2097, FH3596, FH2295, REN230G12, ESR1, GH1, IGF1, GHR	25 µM każdego z nukleotydów 25 µM of each from nucleotides
ESR1, GH1, IFG1	2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 U polimerazy Taq 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 U polymerase Taq
GHR	2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1,5 U polimerazy Taq 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1,5 U polymerase Taq

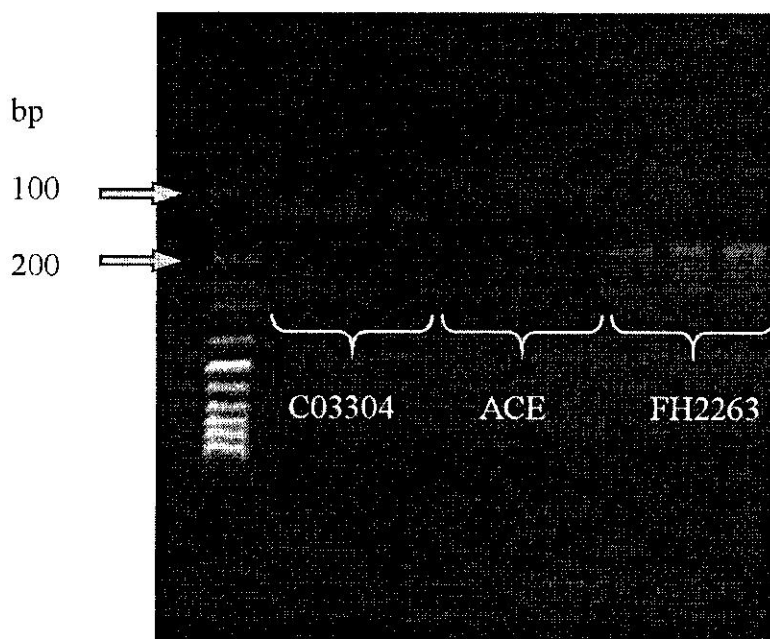
Przeprowadzono również optymalizację składu mieszaniny reakcyjnej – zwiększono ilość polimerazy oraz MgCl<sub>2</sub>, szczególnie w przypadku ESR1, GHR, GH1, IGF1 (tab. 4).

Otrzymano produkty amplifikacji fragmentów 4 badanych genów oraz 20 markerów mikrosatelitarnych DNA zwierząt z gatunku *Nyctereutes procyonoides*. Namnożony materiał genetyczny był widoczny w postaci fluoryzujących w świetle UV prążków (rys. 2 i 3). W przypadku niektórych loci (GH1, ESR, REN112I02, FH2097, FH2295, FH2263) otrzymano wyższą wydajność reakcji PCR w porównaniu z pozostałymi badanymi fragmentami DNA, o czym świadczył wyższy poziom ich fluorescencji w świetle UV.

W podobnych badaniach, prowadzonych w Polsce [5], zaobserwowano, że sekwencje starterowe opracowane dla genomu psa umożliwiają amplifikację analogicznych



Rys. 2. Elektroforegram mikrosatelity REN126G20 w genomie wybranych jenotów  
 Fig. 2. Electrophoregram of microsatellite REN126G20 in genome of chosen raccoon dog



Rys. 3. Elektroforegram wybranych sekwencji mikrosatelitarnych jenota  
 Fig. 3. Electrophoregram of chosen microsatellite sequence in raccoon dog genome

fragmentów DNA zawierających mikrosatelity w genomie lisa pospolitego i lisa polarnego. Należą one, podobnie jak jenot, do rodziny *Canidae*. Otrzymane produkty PCR, dotyczące 20 badanych sekwencji mikrosatelitarnych i 4 genów, świadczą o homologii

fragmentów flankujących poszczególnych badanych fragmentów DNA u obu badanych gatunków psowatych (*Canis familiaris*, *Nyctereutes procyonoides*). Wynika z tego, że możliwe będzie określenie zmienności genetycznej jenotów na podstawie polimorfizmu genów i markerów genetycznych II klasy, tj. sekwencji mikrosatelitarnych DNA oraz poszukiwanie związku sekwencji DNA z cechami użytkowymi jenota, jak również przeprowadzenie oceny przydatności badanych sekwencji DNA do kontroli jakości cech użytkowych i funkcjonalnych jenota.

## PIŚMIENNICTWO

1. BREEN M., JOUQUAND S., RENIER C., MELLERSH C.S., HITTE C., HOLMES N.G., CHÉRON A., SUTER N., VIGNAUX F., BRISTOW A.E., PRIAT C., MCCANN E., ANDRÉ C., BOUNDY S., GITSHAM P., THOMAS R., BRIDGE W.L., SPRIGGS H.F., RYDER E.J., CURSON A., SAMPSON J., OSTRANDER E.A., BINNS M.M., GALIBERT F., 2001 – Chromosome-Specific Single-Locus FISH Probes Allow Anchorage of an 1800-Marker Integrated Radiation-Hybrid/Linkage Map of the Domestic Dog Genome to All Chromosomes. *Genome Research* 11, 1784-1795.
2. GUYON R., LORENTZEN T.D., HITTE C., KIM L., CADIEU E., PARKER H.G., QUIGNON P., LOWE J.K., RENIER C., GELFENBEYN B., VIGNAUX F., DEFRANCE H.B., GLOUX S., MAHAIRAS G.G., ANDRÉ C., GALIBERT F., OSTRANDER E.A., 2003 – A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (9), 5296-5301; published online before print as 10.1073/pnas.0831002100.
3. HOLMES N.G., DICKENS H.F., PARKER H.L., BINNS M.M., MELLERSH C.S., SAMPSON J., 1995 – Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics* 26, 132-133.
4. JOUQUAND S., PRIAT C., HITTE C., LACHAUME P., ANDRÉ C., GALIBERT F., 2000 – Identification and characterization of a set of 100 tri- and dinucleotide microsatellites in the canine genome. *Animal Genetics* 31, 4, 266-272.
5. KLUKOWSKA J., STRABEL T., MAĆKOWSKI M., ŚWITOŃSKI M., 2003 – Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120, 88-94.
6. NEFF M.W., BROMAN K.W., MELLERSH C.S., RAY K., ACLAND G.M., AGUIRRE G.D., ZIEGLE J.S., OSTRANDER E.A., RINE J., 1999 – A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. *Genetics* Vol. 151, 803-820.
7. YUZBASIYAN-GURKAN et al. (<http://www.msu.edu/~k9genome/overview.htm>)

Brygida Ślaska, Grażyna Jeżewska, Grzegorz Zięba

### Preliminary results of application of chosen DNA sequence primers of *Canis familiaris* in amplification of *Nyctereutes procyonoides* genom parallel loci

The purpose of the study was to evaluate usefulness of primer sequences designed for amplification of genes' fragments and microsatellite loci of *Canis familiaris* to analyze analogous loci in genom of *Nyctereutes procyonoides*. After isolation of DNA from raccoon dogs blood, its quantitative and qualitative evaluation, the amplification of DNA by the PCR method was conducted.

Fragments of 4 genes as well as 20 microsatellite sequences were taken into consideration. Primers of *Canis familiaris* DNA sequences were used for amplification of analogous loci of raccoon dog genom. Qualitative and quantitative control of PCR reaction as well as analysis in UV was performed. PCR products of 24 examined DNA sequences were obtained. They showed homology of flank sequences of DNA individual fragments of both studied species of *Canidae* family (*Canis familiaris*, *Nyctereutes procyonoides*). Results obtained from the research proved the possibility of estimating the raccoon dog genetic variability on the basis of polymorphism of genes as well as the second class genetic markers i.e. DNA microsatellite sequences and allowed to conduct the evaluation of usefulness of studied DNA sequences to control the quality of raccoon dog functional and performance traits.