

Identyfikacja sekwencji mikrosatelitarnych w genomie szynszyli (*Chinchilla lanigera* Molina, 1782)

Brygida Ślaska, Grażyna Jeżewska

Akademia Rolnicza w Lublinie, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej,
ul. Akademicka 13, 20-049 Lublin

Celem badań była identyfikacja sekwencji mikrosatelitarnych w genomie szynszyli (*Chinchilla lanigera*). Przeprowadzone badania wskazują na to, że sześć z dwudziestu badanych sekwencji mikrosatelitarnych nie uległo amplifikacji. Dwa markery zostały odrzucone na podstawie kryteriów dotyczących jakości pików na otrzymanych elektroforegramach. Dla pozostałych badanych w pracy sekwencji mikrosatelitarnych ustalono warunki przebiegu reakcji PCR oraz skład mieszaniny reakcyjnej. Amplifikacja 12 analizowanych sekwencji mikrosatelitarnych świadczy o możliwości ich wykorzystania w badaniach genomu *Chinchilla lanigera*. Identyfikacja markerów genetycznych u szynszyli może być wykorzystana do określenia ich zmienności genetycznej i umożliwi przeprowadzenie oceny przydatności badanych sekwencji DNA do kontroli jakości cech użytkowych i funkcjonalnych tych zwierząt.

SŁOWA KLUCZOWE: szynszyla / *loci* mikrosatelitarne / PCR

Szynszyłe to niewielkie zwierzęta należące do rzędu gryzoni (*Rodentia*), rodziny szynszylowatych (*Chinchillidae*). Naturalnym obszarem występowania szynszyli jest Ameryka Południowa. Z trzech gatunków szynszyli tylko *Chinchilla lanigera* występuje w hodowli klatkowej w Polsce, głównie ze względu na wysoko cenione walory ich futra.

Jednym z najpopularniejszych narzędzi wykorzystywanych w badaniach genetycznych różnych gatunków zwierząt są sekwencje mikrosatelitarne, występujące w postaci krótkich tandemowych powtórzeń (STR – Short Tandem Repeat). Dzięki dużemu zróżnicowaniu ilości powtórzeń motywu podstawowego oraz równomiernemu rozmieszczeniu w genomach, poziom heterozygotyczności w *locus* mikrosatelitarnym przekracza często 80%. W praktyce sekwencje STR wykorzystywane są przede wszystkim do identyfikacji genów cech ilościowych QTL, a także do charakterystyki struktury genetycznej populacji, konstrukcji map sprzężeniowych oraz w badaniach filogenetycznych. Genom szynszyli jest stosunkowo mało poznany i brak jest doniesień dotyczących markerów STR u *Chinchilla lanigera*, które mogłyby być wykorzystane do konstrukcji mapy genetycznej tego gatunku.

Celem niniejszych badań była identyfikacja sekwencji mikrosatelitarnych w genomie *Chinchilla lanigera*.

Materiał i metody

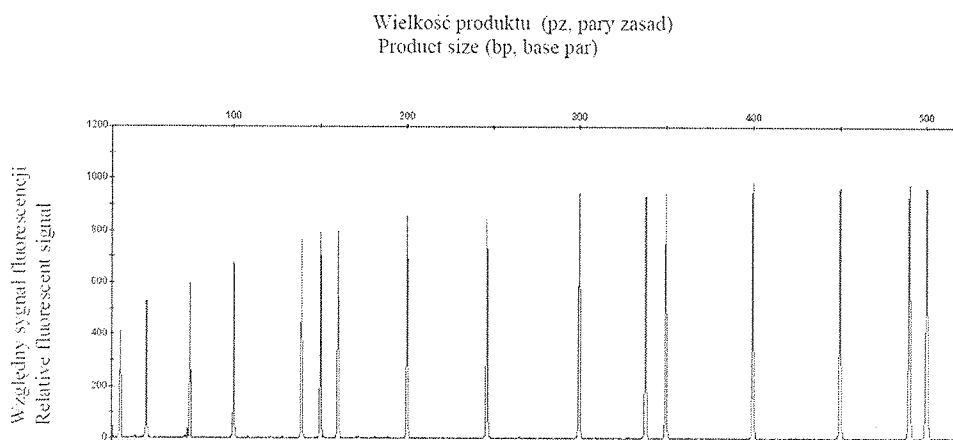
Materiał do badań stanowiła tkanka pobrana *post mortem* od ośmiu, nie spokrewnionych ze sobą, szynszyli odmiany standard, urodzonych na jednej z ferm we wschodniej Polsce. DNA został wyizolowany z tkanki ucha, z zastosowaniem zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit, firmy QIAGEN. Ocena ilościowa 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. W badaniach uwzględniono 20 sekwencji mikrosatelitarnych.

Amplifikację wybranych fragmentów DNA przeprowadzano w cienkościennych 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 startera Forward; 10 pM startera Reverse (znakowany fluorescencyjnie) – tabela; 25 mM MgCl₂; 1 U polimerazy Taq. Wyjściowa reakcja amplifikacji składała się z: denaturacji wstępnej (95°C, 10 min.); 35 cykli – denaturacji (95°C, 30 sek.), przyłączenia (58,5°C, 30 sek.) oraz wydłużania starterów (72°C, 1 min.); końcowego wydłużania starterów (72°C, 10 min.) oraz chłodzenia do temp. 46°C. Identyfikację alleli w obrębie *loci* mikrosatelitarnych przeprowadzono w oparciu na produktach reakcji PCR (startery Reverse poszczególnych *loci* wyznakowano barwnikami fluorescencyjnymi: 6-FAM lub VIC lub NED) oraz elektroforezę kapilarną (ABI PRISM™ 3100-Avant Genetic Analyzer), przy wykorzystaniu programów komputerowych: 3100-AVANT ABI PRISM DATA COLLECTION oraz GENE MAPPER SOFTWARE 3.5. Długości markerów mikrosatelitarnych określano wykorzystując GeneScan – 500 ROX, zawierający inserty o następujących długościach: 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490, 500 (rys. 1).

Parametry przebiegu elektroforezy kapilarnej, przeprowadzonej w ABI PRISM™ 3100-Avant Genetic Analyzer, przedstawiały się następująco: długość kapilary – 36 cm, czas iniekcji – 10 sek., napięcie prądu podczas iniekcji – 1 kV, napięcie prądu podczas elektroforezy właściwej – 15 kV, czas elektroforezy dla 4 prób – 1500 sek., temperatura elektroforezy – 60°C.

Wyniki i dyskusja

W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących sekwencji mikrosatelitarnych u szynszyli. Dlatego też przeprowadzona została ocena przydatności i optymalizacja warunków przebiegu reakcji PCR, z wykorzystaniem 20 par sekwencji starterowych (tab.) do amplifikacji STR u szynszyli.



Rys. 1. Elektroforegram długości insertów – GeneScan – 500 ROX
Fig. 1. Electrophoregram of the insert length – GeneScan – 500 ROX

Po przeprowadzeniu licznych prób ustalono, że sześć z dwudziestu sekwencji mikrosatelitarnych (FH3922, FH3300, REN144A06, FH2295, REN01N09 i BAC_382-K19) nie uległo amplifikacji. Markery: FH2263 i C01.246 zostały odrzucone na podstawie kryteriów dotyczących jakości pików na otrzymanych elektroforegramach. Dla pozostałych sekwencji mikrosatelitarnych ustalono temperatury przyłączania starterów,

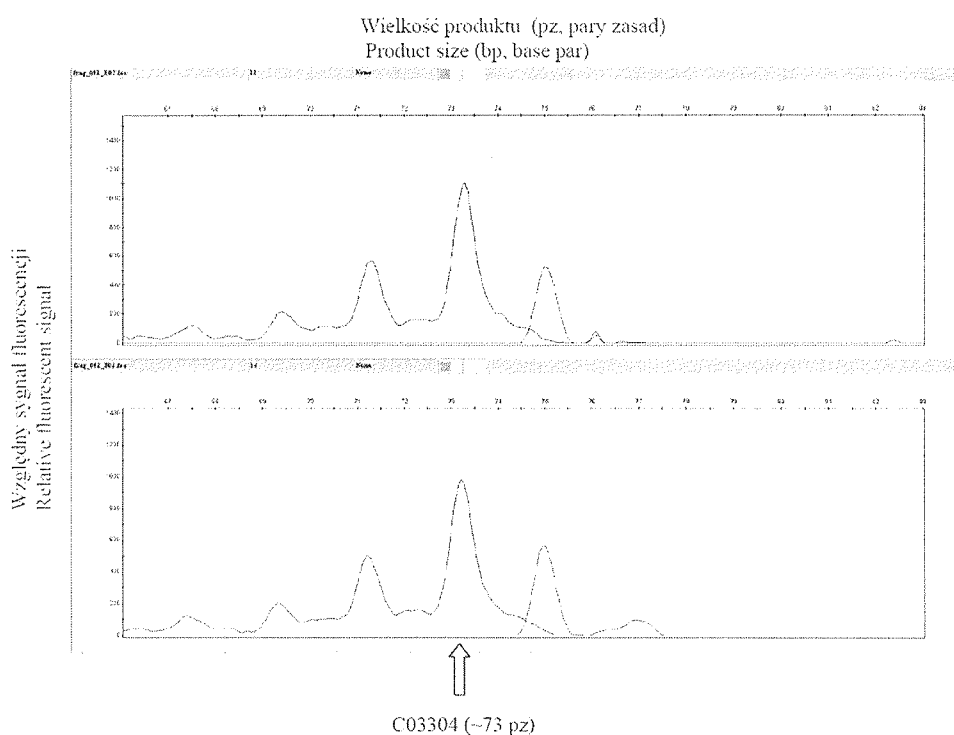
Tabela – Table

Sekwencje starterowe analizowanych *loci*
Primer sequences of analyzed *loci*

Lokus	NCBI, UniSTS	Forward Primer	Reverse Primer
FH3922	263953	TTTTGTCAAGCAGCCCTATATC	TGGCCTTTAATTTATCATGGAG
FH3300	263805	TGAAATGGTACTTCAGCATCG	ATCAGGCCAGATAGTATGC
C01.246	262755	GACTTCATTCATCCATTCATGA	GGATCGGAGTCCAACGTGG
REN112102	264247	ATAGCCCATGAAATCCA	CCCCAAAATACATCCCTACAT
REN288J16	264631	GGGTTTCGTTAAGGGAGGAA	AGAGTTTGGAGGGCACAGAC
PEZ17	264142	CTAAGGGACTGAACTTCTCC	GTGGAACCTGCTTAAGATT
REN144A06	264314	CCATTGCAAATGGCAAGATT	GAAATTTGGCCACAGTTCCAT
FH2097	263501	CAATGTGCAATCCATGGTG	ATGGAGCAAGATGTGTTTGTG
REN126G20	264277	TAGGGTATGCACTTGTTTTG	CCAGGGGGTATCCATCT
AHT103	262006	GGAAACTCAGTTATTTTACA	GCCCTAGAACTTCACACACA
C03304	262776	ATTGGCATCATTCCACTGGTCA	TGGAGGCAGCTTAAATCTCAACA
ACE	261991	AGGTCACTGTCTGTACACGTAGTG	ACCCCTGTGCACCTCATCACTTA
FH2263	263543	CATGTAGAGTGATTAGTTGGTCTTT	CTGAATATCCTCTGCCCTTC
FH3596	263877	ACATCAGGTGAAGAGCTTGC	GAAGTTGGCTGGGGAAGG
REN198P23	264454	TTGTACATTATCTGTTCTACCTCGG	TCTTCAGCAGGCCTTTTCTC
UOR0442	264967	TCAGCTGGTTAATGATAGGTGG	ATATTCCTTTTGCTCTGAGACGC
FH2295	263551	TCTCGGGGATAGTGTATAACTCC	GTCAGGAAAAGGACATTGACC
REN230G12	264505	AGTGGCTTTCCCTCCTCATT	CATTGCAGTGCATACTTGCC
REN01N09	264179	CTTCCAACCTACCACCAC	GCCATCATTAACCTCATT
BAC_382-K19	262663	TTACTGTTAGCCCTGTCTTGTG	TAAAGATCCACATAAACGTGCC

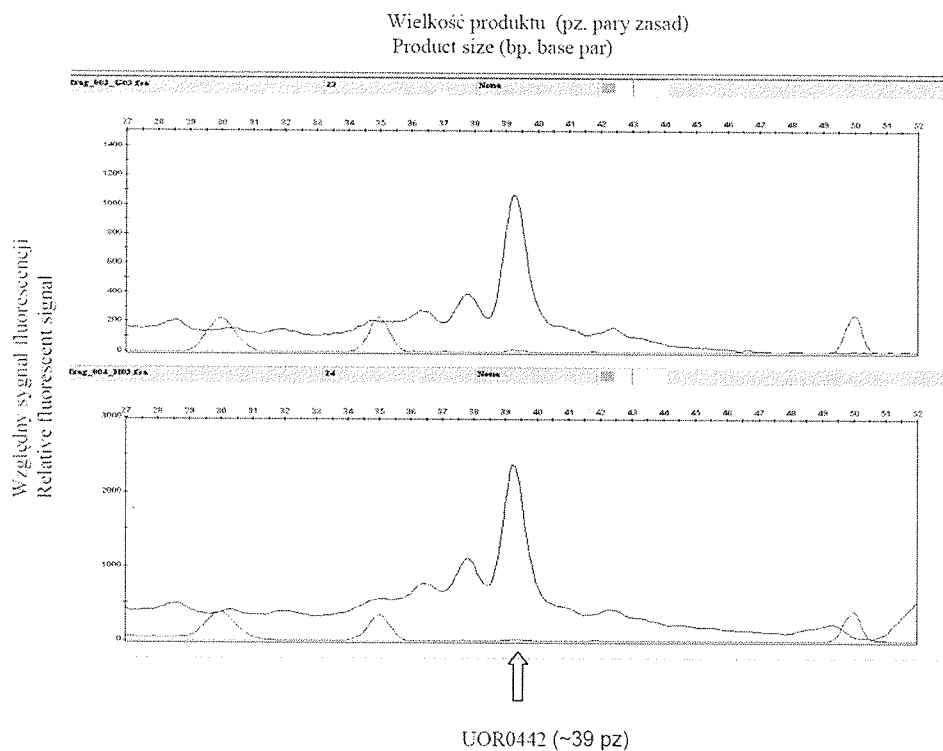
które dla dwóch z analizowanych *loci* (REN112I02, REN126G20) wynosiły 50,0°C, natomiast dla pozostałych markerów (REN288J16, PEZ17, FH2097, AHT103, C03304, ACE, FH3596, REN198P23, UOR0442, REN230G12) – 58,5°C. Nieznaczne zmiany wprowadzono także w składzie mieszaniny reakcyjnej. W przypadku markerów FH3596 i FH2097 zwiększono ilość nukleotydów wchodzących w skład mieszaniny reakcyjnej. Dodatkowo dodano 25 µM każdego z nukleotydów do 1 próby (25 µl) wyjściowej mieszaniny reakcyjnej.

Namnożony materiał genetyczny widoczny był w postaci różnobarwnych pików (w zależności od barwnika użytego do znakowania startera) – rysunek 2 i 3.



Rys. 2. Elektroforegramy sekwencji mikrosatelitarnej C03304 u szynszyli
Fig. 2. Electrophoregrams of chinchilla microsatellite sequence – C03304

Zwrócić należy uwagę na długości sekwencji mikrosatelitarnych, które w przeważającej większości były wielokrotnie krótsze w porównaniu z danymi literaturowymi, dotyczącymi innych gatunków zwierząt. Jedynie marker REN288J16 ma zbliżoną długość do prezentowanej w piśmiennictwie [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]. Pozostałe analizowane *loci* są krótsze u szynszyli, podkreślenia przy tym wymaga, że niektóre z nich są pięć (REN198P23, UOR0442) do ośmiu (REN112I02 i PEZ17) razy krótsze, w porównaniu z innymi gatunkami zwierząt. Ponadto należy też zwrócić uwagę na bezwzględne dłu-



Rys. 3. Elektroforegramy sekwencji mikrosatelitarnej UOR0442 u szynszyli
Fig. 3. Electrophoregrams of chinchilla microsatellite sequence – UOR0442

gości sekwencji mikrosatelitarnych w genomie szynszyli. Osiem z dwunastu markerów nie przekroczyło długości 75 par zasad, przy czym długość pięciu z nich (REN198P23, REN112I02, PEZ17, AHT103 i UOR0442 (rys. 3) wahała się od 30 do 40 par zasad.

Amplifikacja 12, z 20 analizowanych, sekwencji mikrosatelitarnych świadczy o możliwości ich wykorzystania w badaniach genomu *Chinchilla*. Identyfikacja markerów genetycznych u szynszyli może być wykorzystana do określenia ich zmienności genetycznej, co umożliwi w przyszłości poszukiwanie genów cech ilościowych QTL.

Przeprowadzone badania wskazują na możliwość wykorzystania w badaniu genomu szynszyli 12 sekwencji mikrosatelitarnych, dla których ustalono warunki przebiegu reakcji PCR oraz skład mieszaniny reakcyjnej. W świetle powyższych rozważań nie budzi wątpliwości fakt, że możliwe będzie określenie zmienności genetycznej szynszyli na podstawie polimorfizmu markerów genetycznych II klasy, tj. sekwencji mikrosatelitarnych DNA oraz poszukiwanie związku polimorfizmu sekwencji DNA z cechami użytkowymi, jak również przeprowadzenie oceny przydatności badanych sekwencji DNA do kontroli jakości cech użytkowych i funkcjonalnych szynszyli.

PIŚMIENNICTWO

1. BREEN M., JOUQUAND S., RENIER C., MELLERSH C.S., HITTE C., HOLMES N.G., CHERON A., SUTER N., VIGNAUX F., BRISTOW A.E., PRIAT C., MCCANN E., ANDRE 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., 2004 – Chromosome-specific single-locus FISH probes allow anchorage of an 1800-marker integrated radiation-hybrid/linkage amp of the domestic dog genome to all chromosome. *Genome Research* 11, 1784-1795.
2. CLARK L.A., TSAI K.L., STEINER J.M., WILLIAMS D.A., GUERRA T., GALIBERT F., OSTRANDER E.A., MURPHY K.E., 2004 – Chromosome-specific Microsatellite Multiplex Sets for Linkage Studies in the Domestic Dog. *Genomics* 84, 550-554.
3. 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., ANDRE C., GALIBERT F., OSTRANDER E.A., 2003 – A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 9, 5296-5301.
4. 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.
5. 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.
6. NEFF M. W., BROMAN K. W., MELLERSH C.S., RAY K., ACLAND G.M., AGUIRRE G. D., ZIEGLEJ S., OSTRANDER E.A., RINE J., 1999 – A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151, 803-820.
7. ŚLASKA B., JEŻEWSKA G., ZIĘBA G., PIERZCHAŁA M., 2007 – Genetic variability of selected microsatellite markers in Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*) bred in Poland and linkage studies. *Archiv fur Tierzucht* (oddane do druku).
8. YUZBASIYAN-GURKAN V., BLANTON S.H., CAO Y., FERGUSON P., LI J., VENTA P.J., BREWER G.J., 1997 – Linkage of a microsatellite marker to the canine copper toxicosis locus in Bedlington terriers. *American Journal of Veterinary Research* 58, 1, 23-7.

Brygida Ślaska, Grażyna Jeżewska

Identification of microsatellite sequence in the chinchilla's genome (*Chinchilla lanigera* Molina, 1782)

S u m m a r y

The purpose of the study was the identification of microsatellite loci in *Chinchilla lanigera* genome. The results obtained from the research indicate that six from the twenty examined microsatellite loci did not undergo amplification in chinchilla. Two markers were not considered on the basis of the criteria of peak qualities on the electrophoregrams obtained. The conditions of Polymerase Chain Reaction as well as composition of reactionary mixture of other microsatellite loci were established. The amplification of 12 microsatellite sequences proved the possibility of their utilization in the investigations of *Chinchilla lanigera* genome. Identification of genetic markers in chinchilla can be useful for estimation of the genetic variability and allow the evaluation of usefulness of the studied DNA sequences for the quality control of chinchilla utility and functional traits.