

IDENTYFIKACJA SEKWENCJI GENU KODUJĄCEGO DEHYDROGENAZĘ NADH 1 U SARNY

Małgorzata Natonek-Wiśniewska, Ewa Słota

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

*Wykrycie komponentów pochodzących od sarny (*Capra hircus*) przysparza wielu problemów. Niejednokrotnie istniejące metody są niewystarczające do identyfikacji DNA sarniego w każdym rodzaju tkanki. Niekompletnie zsekwencjonowany mtDNA tego gatunku dodatkowo komplikuje analizy utrudniając opracowanie nowych metod. Przedmiotem niniejszej pracy była identyfikacja sekwencji genu kodującego dehydrogenazę NADH 1 u *Capra hircus*. Otrzymany w reakcji sekwencjonowania produkt miał wielkość 650 pz. Sekwencje umieszczono w międzynarodowej bazie NCBI (GU199335).*

Analiza mitochondrialnego DNA (mtDNA) jest rutynową metodą stosowaną w badaniach nad przynależnością gatunkową zwierząt domowych i dzikich. Metoda ta jest przydatna w przypadku kłusownictwa, wypadków drogowych z udziałem zwierząt, nielegalnego handlu produktami pochodzącymi od zwierząt zagrożonych wyginięciem czy uzyskiwania nielegalnych produktów spożywczych. Badania można wykonać ze śladów o dużym stopniu degradacji spowodowanej obróbką termiczną, warunkami atmosferycznymi lub z natury zawierających małe ilości jądrowego DNA. Do badań tych wykorzystuje się sekwencje nukleotydowe poszczególnych gatunków umieszczone w międzynarodowej bazie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Istnieją jednak gatunki, których całkowite mtDNA nie zostało dotychczas zsekwencjonowane. Przykładem może być sarna, której tkanki często są przedmiotem ekspertyz. Z tego względu podjęto próbę zsekwencjonowania genu kodującego dehydrogenazę NADH 1. W prezentowanej pracy przedstawiono wynik tego sekwencjonowania.

Material i metody

Materiałem badawczym były próbki krwi sarny pochodzące od dwóch osobników (s2, s30) oraz próbka krwi kozy (k). Z próbek tych izolowano DNA zestawem Wizard (Promega). W badaniach wykorzystano sekwencję należącą do kozy (*Capra hircus* – NC_005044) analogiczną do poszukiwanej sarniej. Interesujący dla badań fragment

zawarty był między 2741 a 3697 parą zasad. Do fragmentu tego zaprojektowano przy zastosowaniu Primer3 (Rozen i Skaletsky, 1998) startery ograniczające region 180- >873 ND1 *Capra hircus*:

F:5'- CTTACGACCTGCACATCCT-3

R: 5'- AGTTGGTCGTAACGGAATCG-3

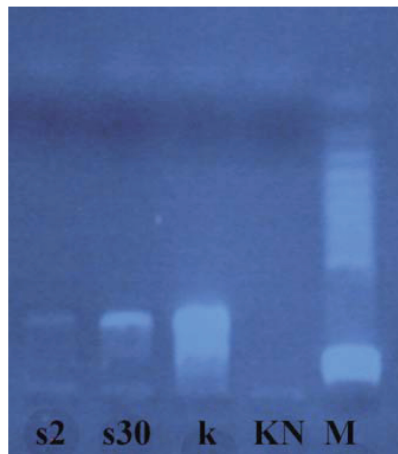
Starterów tych użyto do amplifikacji wcześniej wyizolowanego DNA sarniego (s2, s30), a kontrolą pozytywną reakcji PCR było kozie DNA (k).

Optymalny skład mieszaniny reakcyjnej był następujący: 1 × Bufor; dNTPmix – 1mM; polimeraza AmpliTaq Gold – 1,25 U; MgCl₂ – 1,8 mM, primer mix – 0,8 pmol/μl, DNA – 1,5/μl. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 μl. Amplifikację przeprowadzono przy zastosowaniu programu termicznego o profilu: 95°C – 3 minut, 30 × (94°C – 1 min., 54°C – 1 min., 72°C – 1 min.) 72°C – 15 minut.

Produkty amplifikacji oczyszczono enzymem Exo Sap (37°C – 15 min, 80°C – 5 min, 4°C – ∞, a następnie sekwencjonowano przy użyciu chemii BigDye Terminator 1.1 (Applied Biosystems) oraz starterów użytych do reakcji PCR. Produkty sekwencjonowania rozdzielono w 4% żelu poliakrylamidowym, a odczytu sekwencji dokonano na automatycznym sekwenatorze (Applied Biosystems).

Wyniki

Zastosowane startery umożliwiające powielenie fragmentu genu kodującego dehydrogenazę NADH 1 u kozy *Capra hircus* pozwoliły na otrzymanie produktu reakcji PCR dla sarniego DNA (Fot.1). Otrzymany produkt amplifikacji sekwencjonowano, a odczytaną sekwencję porównano do sekwencji *Capra hircus* przy zastosowaniu BLASTu (Altschul i in., 1997).



Fot.1. Wynik reakcji PCR. W kolejnych studzienkach znajduje się produkt reakcji PCR, w której matrycą było DNA wyizolowane z próbek krwi sarny (s2), sarny (s30) i kozy (k).

KN oznacza kontrolę negatywną reakcji PCR. M – marker wielkości (25pz)

Fig. 1. Result of PCR. Lanes contain a PCR product, in which the matrix was DNA isolated from blood samples of roe deer (s2), roe deer (s30) and goat (k). KN designates negative control of the PCR reaction. M – size marker (25bp)

Dopasowanie otrzymanej sekwencji z sekwencją źródłową z GenBanku przedstawia poniższy diagram, gdzie „ch” oznacza sekwencje 2741-> 3696 *Capra hircus* (NC_005044), a „cc” otrzymaną sekwencję.

```

ch 195 ATCTCAATCTCAATATTTATTCTAGCCCCATTTTAGCTCTGACCCCTAGCCCTTAACCAT
      |||
cc 1   ATCTCAATCTCAATATTTATTCTAGCCCCATTTTAGCCCTAAGCTTAGCCCTAACCAT

ch 255 ATGAATTCCTACCCATACCCTACCCCTCATTAACATAAAATTTAGGAGTCCTCTTCAT
      |||
cc 61  ATGAATTCCTACCCATACCATATCCTCTTATTAATAAAATTTAGGGGTCCTATTTAT

ch 315 ATTAGCTATATCAAGCTTAGCCGTATACTCAATTCTCTGATCAGGCTGAGCTTCCAACCTC
      |||
cc 121 ACTAGCAATATCAAGCCTAGCTGTATATTCATCCTCTGATCAGGCTGGGCTTCTAACTC

ch 375 AAAATATGC-TCTCATTGGAGC-CTTACGAGCAGTAGCACAAACAATTTTCATATGAAGTA
      |||
cc 181 TAAATACGCAT-TAATTGGAGCTCT-ACGAGCAGTAGCTCAAACAATTTTCATACGAAGTA

ch 433 ACACTAGCAATTATCTACTGTCAAT-CTTACTAATAAACGGATCCTTTCGC-CTCTCTA
      |||
cc 239 ACCCTAGCAATTATTTTACTATCCGTTCTC-CTAATAAATGGATCCTT-CACACTCTCTA

ch 491 CACTAATTATTACACAGGAACAAGTATGACTAATCTTCCAGCATGACCTCTAGCAATAA
      |||
cc 297 CCCTAATTATTACGCAAGAACAAGTATGATTAATCTTCCAGCATGACCTTTAGCTATAA

ch 551 TGTGATTTCATCTCAACACTAGCAGAAACAAACCGAGCACCATTTGACCTGACCGAAGGAG
      |||
cc 357 TATGATTTCATTTCAACATTAGCAGAAACAAATCGAGCCCTTTGACCTTACCGAAGGCG

ch 611 AATCCGAAGTAGTATCAGGCTTCAACGTAGAATATGCCGGC-GGACCATTTGCCCTATTT
      |||
cc 417 AATCAGAAGTAGTCTCAGGCTTCAACGTAGAGTATGCAG-CAGGACCATTGCCCTATTT

ch 670 TTCATAGCAGAATATGCTTATATTATAATAAATATCTTCACAACAACTCTC-TTCCT
      |||
cc 476 TTCATAGCAGAATATGCAACATTATTATAATAAATATTTTACAACAA-TCTTATTCCT

ch 729 AGGAGCATTTCACAGCCCCTATATA-CCAGAACTCTACACAATTAACCTTATTATCAAAAT
      |||
cc 535 AGGAGCATTTCACAACCCA-ATTTTGCCAGAACTCTATAACAATTAACCTCACTATTAAT

ch 788 CACTCTACTTACAATCACTTTCCTATGAATCCGAGCATCCTACCCCGATTCCGT
      |||
cc 594 CACTCTACTAACAATTTCTTTCCTATGGATCCGAGCATCATACCCTCGATTCCGT

```

Produkt sekwencjonowania jest w 86% homologiczny z sekwencją *Capra hircus* (NC_005044).

Otrzymaną sekwencję umieszczono w międzynarodowej bazie NCBI (GU199335).

Omówienie wyników

Analiza mtDNA jest użytecznym narzędziem identyfikacji gatunkowej zwierząt hodowlanych i dzikich. Większość opracowanych metod identyfikacji gatunkowej dotyczy zwierząt hodowlanych (Bottero et al., 2003; Lahiff et al., 2001), natomiast wykrywanie materiału pochodzącego od zwierząt dzikich rzadziej jest przedmiotem badań. Wyróżniający się wkład do badań nad metodami wykrywania komponentów pochodzących od zwierząt wolnożyjących należy do Fajardo, który proponuje identyfikację fragmentu 12SrRNA o wielkości około 712 pz dla jeleni, danieli, saren, bydła owiec i kóz (Fajardo i in., 2007). Otrzymany produkt PCR następnie różnicuje gatunkowo przy zastosowaniu trzech enzymów restrykcyjnych. Metoda ta jednak niesie ze sobą pewne ograniczenia spowodowane trudniejszą i nie zawsze możliwą identyfikacją materiału pochodzącego od sarny. Ponadto mtDNA tego gatunku nie zostało również całkowicie zsekwencjonowane co dodatkowo utrudnia identyfikacje komponentów pochodzących od niego.

Opisywana w niniejszej pracy sekwencja o długości 650 pz i numerze akcesyjnym GU199335 w międzynarodowej bazie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) znajduje się w locus genu kodującego dehydrogenazę 1 (ang. NADH dehydrogenase subunit 1), której produktem jest białko o numerze identyfikacyjnym ACZ82358.1

W zidentyfikowanej sekwencji nukleotydowej występuje jedynie kodon start (zaczynający się w pozycji 2 nukleotydu w sekwencji GU199335), natomiast nie występuje kodon stop.

Wykryta sekwencja ma znaczenie zarówno poznawcze jak również może się przyczynić do opracowania lepszych metod identyfikacji mtDNA sarny.

Piśmiennictwo

- Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389–3402.
- Bottero M.T., Dalmasso I.A., Nucera D., Turi R.M., Rosati S., Squadrone S., Gorla M., Civera T. (2003). Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food Prot.*, 66 (12): 2307–2312.
- Fajardo V., González I., López-Calleja I., Martín I., Rojas M., Pavón Miguel A., Hernández P., García T., Martín R. (2007). Analysis of mitochondrial DNA for authentication of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), Pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*), and mouflon (*Ovis ammon*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *J.AOAC Int.*, 90: 179–186.

- Lahiff S., Glennon M., O'Brien L., Lyng J., Smith T., Maher M., Shilton N. (2001). Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). *Mol. Cell. Probes*, 15: 27–35.
- Rozen S., Skaletsky H. (1998). Primer 3. http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

Zatwierdzono do druku 27 X 2010

MAŁGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, EWA SŁOTA

Sequencing the gene coding for NADH 1 dehydrogenase in roe deer

SUMMARY

Identification of components from roe deer (*Capra hircus*) causes many problems. The existing methods are often inadequate to identify roe deer DNA in all tissue types. The fact that mtDNA of this species is not completely sequenced makes the analyses even more complicated by hindering the development of new methods. The aim of this study was to sequence the gene encoding NADH 1 dehydrogenase in *Capra hircus*. The product obtained from sequencing reaction was 650 bp in length. The sequences were submitted to NCBI database (GU199335).

Key words: *Capreolus capreolus*, *Capra hircus*, PCR, NADH 1 sequencing