

**POLIMORFIZAM DUŽINE RESTRIKCIJSKOG FRAGMENTA
U GENU ZA OVALBUMIN ZAGORSKOG PURANA
(MELEAGRIS GALLOPAVO)**

Z. Janječić, S. Mužić, D. Bedeković, Gordana Duvnjak

Sažetak

Distribucija polimorfizma dužine restrikcijskog fragmenta (RFLP) preko gena za ovalbumin zagorskog purana i hibridnih pilića bila je mapirana u genomu DNA izoliranom iz krvi 30 životinja koje su predstavljale četiri soja. Rabeći iste početnice lančana reakcija polimeraze (PCR) upotrijebljena je za umnažanje ovalbumin gena genomske DNA purana i pilića. Uz veličinu umnoženog gena za ovalbumin, redoslijed restrikcijskih fragmenata određen je usporedbom mapa EcoRI, HaeIII, PvuII i Aval položaja kod zagorskog purana i pilića. Duljine PCR proizvoda dobivenih iz 40 genomskih DNA purana bile su 2,47 MB i bile su bez značajne razlike. Dva polimorfna restrikcijska mjesta PCR proizvoda kao što su Aval mjesto na poziciji 2150 bp i PvuII mjesto na 1718 bp omogućavaju genotipizaciju zagorskih purana i pilića. Naši rezultati ukazuju na to da je dio gena za ovalbumin identičan u sva četiri soja zagorskog purana na području Hrvatskog zagorja. Pri usporedbi dijela gena za ovalbumin između pilića i zagorskog purana uočena je velika polimorfna raznolikost.

Ključne riječi: DNA purana, gen za ovalbumin, lančana reakcija polimeraze, polimorfizam dužine restrikcijskog fragmenta.

Uvod

Uzgoj zagorskih purana na području Hrvatskog zagorja započeo je sredinom 16. stoljeća. Na području županija Krapinsko-zagorske i Varaždinske obitavaju četiri soja zagorskog purana: crni, brončani, sivi i svijetli. Zastupljenost pojedinog soja na određenom području vjerojatno je plod tradicije i navike lokalnog pučanstva.

Genom purana i njegova genetska varijabilnost manje su istraženi u usporedbi s pilećim genomom, ali kako je podudarnost između njih velika moguće ih je usporedno proučavati.

Rad je priopćen na IX. simpoziju »Peradarski dani 2011.« s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11-14. svibnja 2011.

Zlatko Janječić, Stjepan Mužić, Dalibor Bedeković, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

Gordana Duvnjak, Hrvatska poljoprivredna agencija, Zagreb, Hrvatska.

Prof. dr. sc. Zlatko Janječić, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za hranidbu domaćih životinja, Svetošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska; Tel.: ++385 (0) 1 239 3951, faks: ++385 (0) 1 239 3932; e-mail: zjanjecic@agr.hr.

Klasičan pristup u istraživanju genetske varijabilnosti je usporedba mikrosatelitnih biljega (Levin i sur., 1995.), međutim, u novije vrijeme se sve više pozornosti poklanja eksprimiranoj sekvenci i genima koji imaju i određenu ekonomsku važnost (Smith i sur., 2001.). Jedan od njih je i gen za ovalbumin.

Gotovo sva saznanja o strukturi i funkciji gena za ovalbumin prikupljena su proučavanjem pilećeg gena. Gen za ovalbumin je bio među prvim eukariotskim genima koji su detaljno opisani te kao model poslužili za nova saznanja o strukturi eukariotskih gena. Dugańczyk i sur. su još 1979. godine odredili strukturu cijelog gena za ovalbumin. Gen sadrži 8 eksona između kojih su 7 introna zajedno dugih 5828 bp od ukupnih 7564 bp.

Smith i suradnici (2001.) ponovo su sekvencirali 3' kraj kromosomske deoksiribonukleinske kiseline (cDNA) purana da bi ju usporedili s istim fragmentom pileće cDNA. Fragment dužine 298 bp usporedili su s homolognim fragmentom pileće cDNA. Sekvenca je bila 85% identična. Vrlo je vjerojatno da postoji velika podudarnost u strukturi i sekvenci kompletnog puranskog i pilećeg gena te su zbog toga saznanja o pilećem genu za ovalbumin vrlo korisna.

Da bi se proučavala genetska varijabilnost zagorskih purana potrebno je analizirati barem dio njihove DNA sekvence. Sekvencioniranje je jedina metoda koja daje potpunu informaciju za određivanje genetske varijabilnosti, međutim, ta metoda nije lako dostupna većini znanstvenika, jer analiza dulje sekvence zahtijeva ulaganje većih sredstava. Zbog toga se puno češće rabe jednostavnije i jeftinije metode za određivanje genetske varijabilnosti (Cotton, 1993.). Jedna od njih je određivanje polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata PCR proizvoda (*polymerase chain reaction*, PCR i *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). To je relativno jednostavna metoda, a slijed koji se analizira je kratak, međutim, brojni su dokazi da se ova metoda može vrlo uspješno primijeniti u taksonomiji (Vilgalys i Hester, 1990.) kako bi se pokazale razlike između vrsta (Knight i sur., 1991.; Meyer i sur., 1995.) i podvrsta (Hope i McManus, 1994.). Metoda PCR-RFLP može biti osobito korisna u analizi genetske varijabilnosti kada PCR proizvod sadrži intronsku sekvencu gena. Intronska sekvencija često sadrži polimorfna mjesta i pogodna je za istraživanje genetske varijabilnosti (Friesen i sur., 1997.). Gen čija intronska sekvencija se promatra mora imati samo jednu kopiju u genomu te mora kodirati strukturno ili metabolički važan proizvod. Jedan od takvih gena je i gen za ovalbumin.

Cilj rada bio je polimorfizmom restrikcijskih fragmenata PCR proizvoda odrediti postoji li razlika u sekvenci i strukturi gena za ovalbumin između pojedinih sojeva zagorskog purana te usporediti strukturu pilećeg gena za ovalbumin s puranskim genom.

Materijal i metode

Krv zagorskih purana

Za potrebe izolacije DNA i niz drugih analiza odvojili smo 40 zagorskih purana tako da od svakog soja: crnog, brončanog, sivog i svijetlog, bude po 10 jedinka, 5 muških i 5 ženskih. Uzorke crnog soja označili smo brojevima 1-10, brončanog 11-20, sivog 21-30 i svijetlog soja 31-40. Iz jugularne vene uzeli smo po 10 mL krvi svakoj životinji i stavili je u označene epruvete s 10 mL EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*). Uzorke smo privremeno pohranili na ledu i kasnije čuvali na -20 °C.

Izolacija genomske DNA iz krvi

Krv zagorskih purana otopili smo u vodenoj kupelji. U 2 mL krvi dodali smo 5 mL amonijevog klorida. Centrifugiranjem 5 minuta pri 2500 rpm (Centric 322 A, Tehnica) dobili smo talog leukocita. Supernatant koji sadrži lizirane eritrocite i krvnu plazmu odlili smo, a talog s leukocitima resuspendirali s 5 mL amonijevog klorida, centrifugirali pod istim uvjetima i zatim još jednom ponovili postupak radi dobivanja što čistijeg taloga leukocita. Zatim smo uporabom komercijalnog kompleta QIAamp DNA Blood Midi Kit Protocol (Qiagen 2000) pristupili izolaciji genomske DNA zagorskih purana.

Izoliranoj genomskoj DNA spektrofotometrijski (Unicam UV-4) smo provjerili koncentraciju i čistoću, a kvalitetu izolirane genomske DNA provjerili smo u 1,0%-tnom gelu agaroze (Sigma) uronjenom u 50 mL TAE pufera (40 mM Tris-acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA) u Sub-cell GT (Bio-rad) sustav za elektroforezu. U jažice smo nanijeli 2 µg genomske DNA u TE puferu (10 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA) s 5 µL 0,25% bromfenol plavila loading pufera (Serva). Elektroforeza se odvijala 2 sata pri stalnom naponu od 50 V na sobnoj temperaturi. Gelove smo postavili na transiluminator (TF X-40 M) i fotografirali pomoću sustava za fotografiranje CP 700 (Mitsubishi).

Pileća genomska DNA

Genomska DNA izolirana je iz stanične linije MSB1 transformiranih pilećih T-limfoblasta na Institutu "Ruđer Bošković".

Lančana reakcija polimerazom (PCR)

PCR smo rabili za umnažanje fragmenta gena za puranski i pileći ovalbumin iz genomske DNA. Početnice koje smo pri tome rabili potpuno su komplementarne dijelu puranskog gena za ovalbumin (5'-AAG GAT GAA GAT ACG CAA GCA-3', 5'-TGC ATC TGC CAA AAA GAG A-3', Microsynth), a iste smo upotrijebili i za umnažanje pilećeg dijela gena. Koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi za umnažanje puranskog dijela gena bila je 1,6 μM , a za pileći dio gena 0,8 μM . U 25 μL reakcijske smjese bilo je još 0,2 μM dNTP, 5% DMSO, 1,5 U *Taq* polimeraze u 1x PCR puferu (1,5 μM MgCl_2) iz PCR Core Kita za 100 reakcija (Roche) te 0,2 μg genomske DNA.

Programirani termički blok Model 212 (Lab-line) smo programirali tako da početno denaturiramo kalup na 94 °C kroz 5 min, zatim kroz 34 ciklusa denaturiramo kalup 35 sekunda na 92 °C, spajamo početnice 45 sekunda na 54 °C i produljujemo 3 minute na 72 °C. Završno produljenje trajalo je 7 min na 72 °C, nakon čega smo hladili uzorke na 4 °C. Da bi umnožili fragment pilećeg gena za ovalbumin morali smo promijeniti neke od parametara PCR reakcije, jer je pri istim uvjetima i sastavu reakcijske smjese uz traženi proizvod nastajalo dosta nespecifičnih PCR proizvoda. Povećali smo temperaturu spajanja početnica na 56 °C i produžili vrijeme na 55 sekunda. Produžili smo i vrijeme produljivanja na 3 minute i 15 sekunda.

Umnožene PCR proizvode provjerili smo na sustavu Mini Sub DNA Cell za elektroforezu (Bio-rad) s 1,2% agarozom u TAE puferu. Konačna koncentracija etidijevog bromida u gelu bila je 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. U jažice smo nanijeli 5 μL uzorka i 2 μL pufera za nanošenje. U jednu jažicu nanijeli smo 1,5 μL DNA biljega XVI (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Roche). Elektroforeza se odvijala 90 minuta pri stalnom naponu od 60 V na sobnoj temperaturi.

Procjena broja i položaja restriktivnih mjesta pomoću računalnog programa Webcutter 2.0

Prije upotrebe restrikcijskih enzima za metodu PCR-RFLP rabio se računalni program Webcutter 2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>), te je provjeren broj i položaj restrikcijskih mjesta za naših 6 restrikcijskih enzima u pilećem genu za ovalbumin.

Restrikcijska analiza PCR proizvoda

Nakon analize sekvence pilećeg gena za ovalbumin računalnim programom Webcutter 2.0 upotrijebili smo slijedeće enzime (Bethesda Research Laboratories, USA) u restrikcijskoj analizi PCR proizvoda: *PvuII* (10 U/ μ L), *EcoRI* (40 U/ μ L) i *HaeIII* (10 U/ μ L). Prema poznatoj sekvenci *AvaI* (16 U/ μ L), *BamHI* (20 U/ μ L) i *KpnI* (15 U/ μ L) restrikcijski enzimi ne bi trebali sjeći fragment pilećeg gena za ovalbumin, ali smo to ipak provjerili na manjem broju uzoraka. Iste enzime rabili smo za cijepanje fragmenta puranskog gena za ovalbumin. U steriliziranim Eppendorf tubicama od 0,5 mL pripremali smo reakcijske smjese od 10 μ L u kojima je bilo 5 U restrikcijskog enzima, 2 μ L PCR proizvoda i 1 μ L pufera za restrikcijski enzim. Reakcijsku smjesu smo inkubirali 90 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon inkubacije reakciju smo prekidali s 1 μ L EDTA. Fragmente PCR proizvoda nastale djelovanjem restrikcijskih enzima vizualizirali smo agaroznom gel elektroforezom na isti način kao i proizvode PCR. Veličinu fragmenta odredili smo pomoću računalnog programa PhotoCapt Version 97.02.

Rezultati

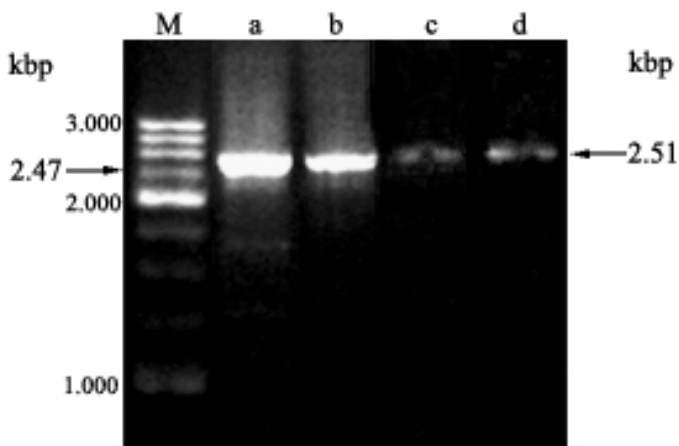
Koncentracija, čistoća i kvaliteta izolirane genomske DNA

Od 40 uzoraka krvi zagorskih purana uspješno smo izolirali genomsku DNA iz 37 uzoraka koji su bili visoke koncentracije i zadovoljavajuće čistoće te su pokazali kompaktan signal u agaroznom gelu prilikom elektroforeze.

Provjera kvalitete i kvantitete PCR proizvoda u agaroznom gelu

Od 37 uzoraka genomske DNA zagorskog purana iz njih 30 uspješno smo umnožili dio gena za ovalbumin metodom PCR, a iz jedne pileće genomske DNA pileći dio gena. U 5 μ L reakcijske smjese, koliko smo nanosili u gel, bilo je 0,1-0,2 μ g PCR proizvoda (slika 1.), dok nespecifičnih proizvoda većinom nije bilo. Srednja veličina fragmenta puranskog gena za ovalbumin bila je oko 2,47 kb, a pilećeg oko 2,51 kb.

Slika 1. – ELEKTROFOREZA PCR PROIZVODA UMNOŽENIH IZ GENOMSKE DNA POMOĆU POČETNICA SPECIFIČNIH ZA OVALBUMIN GEN. (M): DNA BILJEG XVI; (a) i (b): PREDSTAVNICI UMNOŽENOG DIJELA GENA ZA OVALBUMIN CRNOG SOJA ODNOSNO SIVOG SOJA PURANA; (c) i (d): UMNOŽENI DIJELOVI PILEĆEG GENA.



Rezultati analize Webcutter 2.0

Rezultati analize pomoću računalnog programa Webcutter 2.0 za analizu sekvenca pilećeg gena za ovalbumin prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. – REZULTATI ANALIZE POMOĆU WEBCUTTER 2.0 ZA ANALIZU SEKVENCA PILEĆEG GENA ZA OVALBUMIN

Ime enzima	Broj cijepanja	Pozicije mjesta	Prepoznate sekvence
<u>EcoRI</u>	1	1111	<u>g/aattc</u>
<u>HaeIII</u>	3	539, 555, 1391	<u>gg/cc</u>
<u>PvuII</u>	2	808, 1718	<u>cag/ctg</u>

Slijedeći enzimi su izabrani, ali nisu cijepali ove sekvence: *AvaI*, *BamHI*, *KpnI*.

Restrikcijsko cijepanje dijela gena za ovalbumin zagorskog purana

Utvrđeno je da su veličine restrikcijskih fragmenata iste za pojedini restrikcijski enzim kod svih ispitanih PCR proizvoda (tablica 2.). *KpnI* i *BamHI* ne cijepaju analizirani dio gena za ovalbumin (provjereno na 7 uzoraka).

Tablica 2. – REZULTATI RESTRIKCIJSKE ANALIZE UMNOŽENIH DIJELOVA PURANSKOG GENA ZA OVALBUMIN

Ime enzima	Broj analiziranih PCR proizvoda	Broj cijepanja	Restrikcijski fragmenti/kbp
<i>EcoRI</i>	12	1	1,09; 1,38
<i>HaeIII</i>	16	2	0,53; 0,84; 1,18
<i>PvuII</i>	18	1	0,76; 1,72
<i>AvaI</i>	10	1	2,15; 0,34

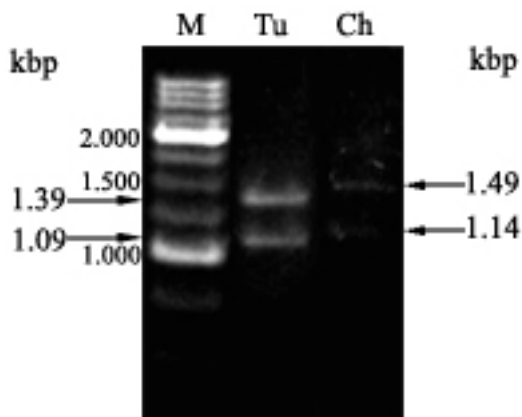
Slijedeći enzimi nisu cijepali ove sekvence: BamHI and KpnI

Uspoređujući rezultate primjenom programa Webcutter 2.0 i one postignute kod restrikcije dijela puranskog gena za ovalbumin zapazili smo male razlike između puranskih i pilećih fragmenata.

Usporedba dužine restrikcijskih fragmenata pilećeg i puranskog gena za ovalbumin

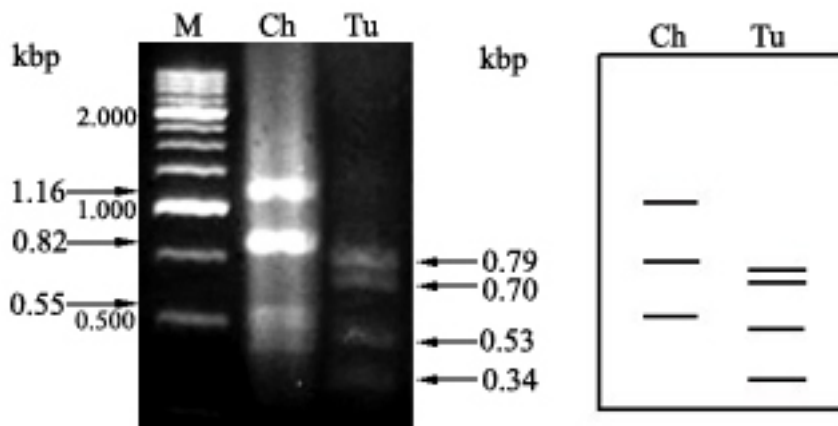
Usporedbom restrikcijskih fragmenata pilećeg i puranskog gena za ovalbumin nastalih nakon restrikcije enzimom *EcoRI* uočene su manje razlike (slika 2.).

Slika 2. – RESTRIKCIJA *ECORI* ENZIMOM DIJELA OVALBUMIN GENA UMNOŽENOG METODOM PCR IZ GENOMSKE DNA PURANA (Tu) I PILIĆA (Ch); (M) BILJEG.



Razlika između pilećih i purećih PCR proizvoda bila je očita nakon restrikcije restriktivnim enzimima *Ava*I i *Hae*III u istoj reakcijskoj smjesi (slika 3.).

Slika 3. – RESTRIKCIJA ENZIMIMA HAEIII I AVAI DIJELA GENA ZA OVALBUMIN UMNOŽENOG METODOM PCR IZ GENOMSKE DNA PURANA (Tu) I PILIĆA (Ch). (M): BILJEG. PIKTOGRAM PRIKAŽUJE RESTRIKTIVNA MJESTA KOD PURANA I PILIĆA.



Genom purana je manje istražen u usporedbi s pilećim genomom, ali kako je podudarnost između njih velika moguće je usporedno proučavati genomsku i cDNA sekvencu među tim vrstama peradi kako bi se istražila genetska varijabilnost. Tako su Levin i sur. (1995.) i Liu i sur. (1996.) među prvima neizravno izveli usporednu genomsku analizu purana i pilića. Dio genoma koji su istraživali sastojao se većinom od mikrosatelitnih biljega smještenih u nekodirajućem dijelu genoma.

Kodirajući dio genoma se ipak sve češće istražuje pa su tako novija saznanja temeljena na oligonukleotidima specifičnim za sekvence koje se eksprimiraju. Smith i sur. (2001.) su tako sekvencirali 4597 bp cDNA iz 10 purana i utvrdili učestalost polimorfizma u jednoj bazi od 1/289. Između ostalog sekvencirali su i 3' kraj cDNA dijela gena za ovalbumin purana da bi ju usporedili s istim fragmentom pileće cDNA. Fragment dužine 298 bp usporedili su s homolognim fragmentom pileće cDNA i sekvenca je bila 85% jednaka.

Metodom PCR-RFLP pokušali smo odrediti postoji li genetska varijabilnost između četiri soja zagorskog purana u dijelu gena za ovalbumin umnoženom pomoću PCR. Umnožili smo i dio pilećeg gena za ovalbumin koji se u kodirajućem dijelu razlikuje 15% od puranskog kodirajućeg dijela gena

(Smith i sur., 2001.) kako bismo potvrdili da se metoda PCR-RFLP može upotrijebiti za dokazivanje razlike između vrsta, što je na više primjera i ranije pokazano (Knight i sur., 1991.; Meyer i sur., 1995.). Metodom PCR-RFLP smo pokazali očitu razliku između dviju vrsta. U sedam restrikcijskih mjesta utvrđenih restrikcijskim cijepanjem restrikcijskim enzimima *EcoRI*, *HaeIII*, *PvuII* i *AvaI* te računalnim programom Webcutter 2.0 dokazali smo razliku u čak dva restrikcijska mjesta između pilećeg i puranskog slijeda. Restrikcijski enzim *AvaI* nije cijepao pileći dio gena za ovalbumin, restrikcijski fragment dug 0,34 kb nedostaje u restrikcijskoj smjesi, a prisutan je kada se cijepa dio puranskog gena za ovalbumin. Razlika postoji i u dužini restrikcijskih fragmenata 0,82 kb kod pilećeg i 0,79 kb kod puranskog restrikcijskog fragmenta. Ti fragmenti predstavljaju isti dio gena u dvjema vrstama, ali su očito različite dužine.

Između sojeva zagorskog purana nije bilo razlike u restrikcijskom cijepanju, iako smo pretpostavili da bi razlike moglo biti u intronskoj sekvenci 6. i 7. introna koje smo umnožili, jer introni često sadrže polimorfna mjesta i pogodni su za istraživanje genetske varijabilnosti (Friesen i sur., 1997.).

Na osnovi naših rezultata može se zaključiti da unutar 30 dijelova gena za ovalbumin u četiri istraživana soja zagorskih purana nije nađena genetska varijabilnost, dok je ista dobivena između jednog pilećeg i svih ispitanih puranskih dijelova gena za ovalbumin.

LITERATURA

1. Cotton, R.G.H. (1993): Current methods of mutation detection. *Mutation Res.* 285, 125-144.
2. Dugaiczyk, A., Woo, S.L., Colbert, D.A., Lai, E.C., Mace, M.L., O'Malley, B.W. (1979): The ovalbumin gene: cloning and molecular organization of the entire natural gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 2253-2257.
3. Friesen, V.L., Congdon, B.C., Kidd, M.G., Birt, T.P. (1997): Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. *Mol. Ecol.* 8, 2147-2149.
4. Hope, M., McManus, D.P. (1994): Genetic variations in geographically isolated populations and subspecies of *Oncomelania hupensis* determined by a PCR-based RFLP method. *Acta Trop.* 57, 75-82.
5. Knight, M., Brindley, P.J., Richards, C.S., Lewis, F.A. (1991): *Schistosoma mansoni*: use of a cloned ribosomal RNA gene probe to detect restriction fragment

- length polymorphism in the intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* 73, 285-294.
6. Levin, I., Cheng, H.H., Baxter-Jones, C., Hillel, J. (1995): Turkey microsatellite DNA loci amplified by chicken-specific primers. *Anim. Genet.* 26, 107-110.
 7. Liu, Z., Crooijmans R.P., Van der Poel, J., Groenen, M.A.M. (1996): Use of chicken microsatellite markers in turkey: a pessimistic view. *Anim. Genet.* 27, 191-193.
 8. Meyer, R., Hofelein, C., Lüthy, J., Candrian, U. (1995): Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 78, 1542-1551.
 9. Qiagen (2000): QIAamp DNA Blood Midi Kit Protocol. Handbook 5, 15-18.
 10. Smith, E.J., Shi, L., Prevost, L., Drummond, P., Ramlal, S., Smith, G., Pierce, K., Foster, J. (2001): Expressed sequence tags for the chicken genome from a normalized ten-day-old white leghorn whole embryo cDNA library: 2. Comparative DNA sequence analysis of guinea fowl, quail, and turkey genomes. *Poult. Sci.* 80, 1263-1272.
 11. Vilgalys, R., Hester, M. (1990): Rapid generic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172, 4238-4246.

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM OF ZAGORJE TURKEY (*MELEAGRIS GALLOPAVO*) OVALBUMIN GENE

Summary

The distribution of restriction fragment length polymorphism (RFLP) across the Zagorje turkey and hybrid chicken ovalbumin locus has been mapped in DNA genome isolated from blood of 30 animals, representing four phenotype varieties. Using the same primers, polymerase chain reaction (PCR) was used for amplification of the ovalbumin gene of Zagorje turkey and chicken genomic DNA. In addition to the size of amplified ovalbumin gene, the order of restriction fragments was determined by comparing a map of the EcoRI, HaeIII, PvuII and Aval sites in Zagorje turkey and chicken. The lengths of PCR products derived from 40 turkey DNA genomes were 2.47 kb without significant differences. Two polymorphic restriction sites in PCR products such as Aval site at position 2150 bp and PvuII at 1718 bp allows genotyping of Zagorje turkey and chicken. Our results suggest that the part of the ovalbumin gene is identical in all four Zagorje turkey phenotypes at the location of Hrvatsko Zagorje. The comparison between chicken and Zagorje turkey ovalbumin genes showed high polymorphic diversity

Keywords: turkey DNA, ovalbumin gene, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism.

Primljeno: 20.5. 2011.