

D.A. Mukhamedyarov, Z.A. Kulametov, M.S. Kalimkulova, I.A. Akhmetollaev

Synthesis of the modified primers for identification of microsatellite loci of a horned cattle

Today microsatellite DNA technologies, which based of fluorescent-modified oligonucleotides, are be most informing and effective applying in population and evolutionary biology, genomic mapping and relationship between types and populations. We modified 4 primers for BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60 loci. Primers, which connected with azids of fluorescent rhodamines, were cleared from free primers and not bound fluorescent reagent on C18 column in HPLC system. Fractions of primers, which received by means of a HPLC, were analyzed on length of a wave of emission of fluorescent rhodamine.

Keywords: oligonucleotides, fluorescent labels, synthesis, microsatellites.

Д.А. Мухамедьяров, Ж.А. Куламетов, М.С. Калимкулова, И.А. Ахметоллаев

Ірі мүйізді малдың микросателлиті локустар бірдейлестіру үшін модификацияланған олигонуклеотидтердің синтезі

Қазіргі таңда, түрлерді және популяцияларды геномды картілеу және туыстығын анықтау барысында популяциялық және эволюциялық биологияда флуоресцентті-модификацияланған олигонуклеотидтер негізінде микросателлитті ДНК технологиялары өте информативті және тиімді. Жұмыс жүргізу барысында біз BM1818, BM 1824, BM2113 және CSRM60 праймерлерін 5' соңынан модифицирленді. Азидті флуоресцентті родаминдермен қосылған праймерлер бос олигонуклеотидтерден және қосылмаған флуоресцентті реагентпен C18 колонкасында ЖТСХ жүйесінде тазаланды. Хроматография фракциясы арқылы алынған праймерлер фракциясы флуоресцентті родамин эмиссиясының толқын ұзындығы арқылы анализденді.

Түйінк сөздер: олигонуклеотидтер, флуоресценттік белгі, синтез, микросателлиттер

Микросателлиты представляют собой tandemно-повторяющиеся элементы генома, состоящие из одного и до 6 пар оснований, способные образовывать достаточно протяженные кластеры, до 60 и более повторов. Микросателлитные последовательности ДНК в последнее время играют доминирующую роль в качестве неисчерпаемого источника генетических маркеров. В настоящее время выделено и описано более 2000 микросателлитов в геноме крупного рогатого скота (база данных INRA, Франция) и их количество увеличивается с каждым днем. Микросателлиты имеют ряд преимуществ перед другими маркирующими системами: они множественны, высокополиморфны, широко распространены по всем хромосомам, легко выявляются и идентифицируются. В 1996 году Международным обществом генетиков (ISAG) было рекомендовано использование микросателлитных локусов ДНК для определения достоверности происхождения крупного рогатого скота. С открытием микросателлитов появилась возможность осуществить маркировку некоторых генетических локусов, связанных с продуктивностью [1-11].

Одним из основных способов анализа микросателлитных маркеров является мультилокусное разделение ампликонов в капиллярном анализаторе, с использованием дифференциальной детекции флуоресцентных красителей связанных с праймерами. В настоящее время наиболее распространенной реакцией, используемой в модификации олигонуклеотидов, является реакция связывания аминов с активированными сукцинимидными и сульфосукцинимидными эфирами. При всей простоте, этот подход имеет недостатки, связанные с неустойчивостью активированных эфиров в водной среде и зависимости хода реакции от pH, а также растворимости активированного эфира. Альтернативой этому может служить подход, основанный на диполярном присоединении азидов к терминальным ацетиленам в присутствии ионов меди, получивший название "click chemistry" [12].

В нашей работе мы проводим синтез и модификацию праймеров к микросателлитным локусам BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60 с помощью технологии "click chemistry".

Материалы и методы

Олигонуклеотидные последовательности синтезировали на приборе ASM 800 фирмы Биоссет (Россия) фосфоаммидным методом согласно Инструкции фирмы-производителя. Аммонолиз праймеров проводили в 25% растворе аммиака при комнатной температуре.

Полученные олигонуклеотиды анализировали в денатурирующем 20%-ном ПААГе как описано в статье [13].

Модификацию полученных праймеров осуществляли с помощью набора реагентов от фирмы Lumiprobe Corporation (Lumiprobe LTD) по 5' концу праймера. Для модификации олигонуклеотидов использовались азиды родамина 110 (535нм), родамина 6G (555 нм), тетраметилродамина (585нм) и 5-карбоксихродамина (610нм) [12].

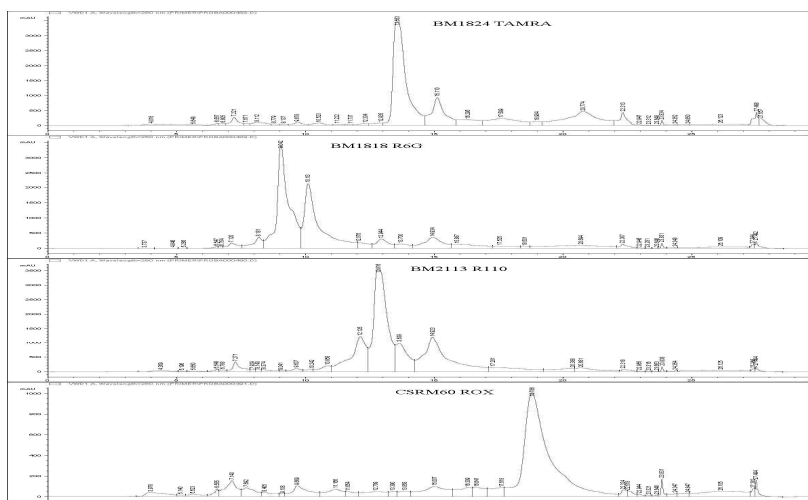


Рисунок 1 - Результаты разделения олигонуклеотидов BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60 после модификации азидами родамина 110, родамина 6G, тетраметилродамина и 5-карбоксихродамина, соответственно

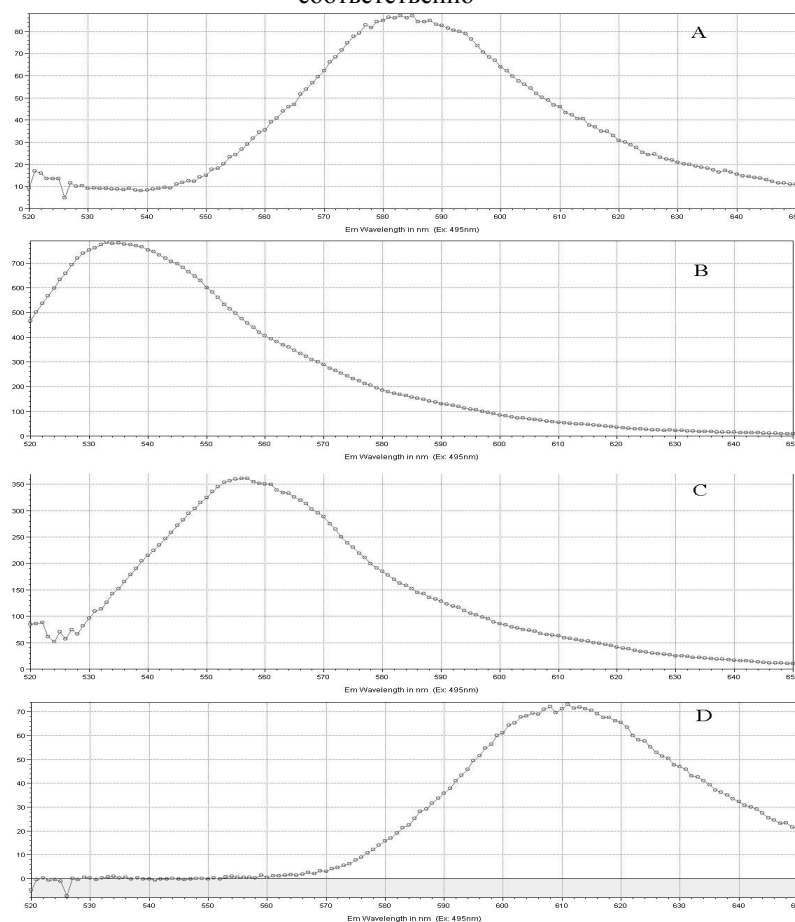


Рисунок 2 – Результаты анализа спектров эмиссии фракций полученных после ВЭЖХ: А – BM1824 – TAMRA, длина волны эмиссии 583 нм; В – BM2113 - R110, длина волны эмиссии 555 нм; С – BM1818 - R6G, длина волны эмиссии 555 нм; D – CSRM60-ROX длина волны эмиссии 610 нм

Очистку модифицированных олигонуклеотидов проводили в системе ВЭЖХ Agilent 1200 на колонках C18 в градиенте 0.1М ТЕАА и ацетонитриле. Степень связывания флуоресцинов с праймерами оценивали на мультканальном спектрофотометре SpectraMax M5 (Molecular Devices).

Результаты и обсуждение

Для проведения модификаций олигонуклеотидов были синтезированы праймеры, фланкирующие микросателлитные локусы BM1818, BM1824, BM2113 и CSRM60 с повторяющимися единицами (TG)_n, (GT)_n, (CA)_n и (AC) соответственно. В реакцию модификации было использовано по 20нМ прямого праймера для каждого локуса. Перед нанесением на ВЭЖХ олигонуклеотиды осаждали ацетоном с 2М перхлоратом лития. Полученные осадки растворяли в 0.1 М буфере ТЕАА. Фракционирование олигонуклеотидов на колонке С18 проводили при 60°С, с постоянным потоком фазы 0,5 мл/мин. Идентификацию пиков проводили при длине волны 260нм, по абсорбции молекул ДНК. Результаты фракционирования меченных праймеров представлены на рисунке 1. Результаты хроматографии показали, что все модифицированные праймеры имели свою степень связывания с колонкой в зависимости от градиента 0.1М ТЕАА и ацетонитрила.

Для всех изучаемых олигонуклеотидов были собраны все значимые по величине абсорбции пики. Каждую фракцию после концентрирования анализировали на мультифотонном спектрофотометре по длинам волн эмиссии, характерным для красителя.

На рисунке 2 представлены результаты спектрометрического анализа пиков, показывающих наличие флуоресцентной метки в элюированных праймерах. Для олигонуклеотида BM1824, модифицированного родамином TAMRA, фракция, содержащая флуоресцин, элюировалась на 13 минуте градиента. Олигонуклеотид BM1818, содержащий родамин R6G, сходил с колонки на 9 минуте градиента ацетонитрила. Праймер для локуса BM2113, меченный родамином R110, выходил с колонки на 12 минуте градиента. На 18 минуте фракционирования с колонки С18 сходила фракция, характерная для праймера CSRM60, меченного родамином ROX.

В результате проведенной работы было показана возможность использования метода присоединения флуоресцентных азидов к терминальным ацетиленам по 5' концу олигонуклеотида. Степень связывания флуоресцентной метки с олигонуклеотидом составляла от 70 до 90 процентов от общего количества праймера.

Литература

1. Georges M., Dietz A.B., Mishra A. et al. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus // PNAS. - 1993. -V. 90. - P.1058 - 1062.
2. Band M, Ron M. Isolation of polymorphic AGC repeats located 3' to bovine SINEs // Animal Genetics. - 1994. -V. 25. - P.281-283
3. Charlier C., Coppeters W., Farnir F. et al. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine Chromosome 2 // Mamm. Genome. - 1995.- V.6. - P. 788-792
4. Georges M.D., Nielsen M., Mackinnon M. et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing // Genetics. - 1995. - V.139. - P. 907-920.
5. Ohba Y., Kitagawa H., Kunieda T., et al. Mapping of a locus responsible for a new hereditary disease for renal tubular dysplasia in Japanese Black cattle // Anim. Genet. - 1998. - V. 29. - P. 65
6. Velmala R.J., Vilkki J.H., Elo K.T. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. // Animal Genetics. - 1999. - V.30. -P.136-143.
7. Ashwell M.S., Van Tassell C.D. Detection on putative loci affecting milk, health and type traits is a US Holstein population using 70 microsatellite markers in a genome scan. // J. Dairy Sc. - 1999. - V.82. - №.11. -P.2497-2502
8. Ma R, I Russ Z., Park C., Heyen D.W., Beever J.E., Green C.A., Lewin H.A. Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellites from the bovine genome. // Animal Genetics. - 1996. - V.27. - P.43-47.
9. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. // Science. - 1998. - V.282. -P.2095-2098.
10. Peelman L., Mortiaux F., Van Zeveren A., Dansercoer A. Evaluation to the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. // Animal Genetics. - 1998. - V.29. - V.3. - P. 161167.
11. Vemala R., Vilkki J., Elo K. Gasein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. // Animal Genetics. - 1995. - V.26. - P.419-426.
12. Astakhova, K.; Wengel, J. Interfacing Click Chemistry with Automated Oligonucleotide Synthesis for the Preparation of Fluorescent DNA Probes Containing Internal Xanthene and Cyanine Dyes // Chem. Eur. J. – 2013.- V.19(3). –P.1112–1122.
13. Ellington A, Pollard JD Jr. Purification of oligonucleotides using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis // Curr Protoc Mol Biol. – 2001. – V.1.