

Zastosowanie markerów mikrosatelitarnych DNA w identyfikacji osobniczej oraz kontroli rodowodów psów

Anna Radko, Małgorzata Miszczak

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy,
Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa*

Na nici DNA nukleotydy ułożone są w specyficznej kolejności – sekwencji, która niesie ze sobą informację genetyczną i stwarza możliwość powstania praktycznie nieograniczonej zmienności w budowie DNA. Sekwencje nukleotydów, kodujące określone aminokwasy, nie są ciągłym odcinkiem biegnącym nieprzerwanie wzdłuż cząsteczki DNA, lecz są podzielone segmentami sekwencji niekodujących. Sekwencje kodujące białka stanowią jedynie 3% całego genomu, natomiast sekwencje niekodujące – nawet do 20–30% i to one charakteryzują się najwyższym polimorfizmem. Spośród polimorficznych sekwencji DNA szczególną zmiennością odznaczają się tandemowe powtórzenia DNA, gdzie powtarzające się motywy nukleoty-

dów są ułożone obok siebie i tworzą jedną całość; do grupy tej zaliczamy powtórzenia mikrosatelitarne.

Sekwencje mikrosatelitarne, zwane potocznie mikrosatelitami bądź krótkimi tandemowymi powtórzeniami – STR (anp. Short Tandem Repeat) składają się z powtarzających się motywów, zawierających od 1 do 6 nukleotydów. Liczba powtórzeń określonego motywu wynosi zwykle od 10 do 50, tak że łączna długość sekwencji mikrosatelitarnej waha się w granicach od 60 do 400 par zasad. Motywem powtarzającym się może być dwunukleotyd, np. (AC)_n, (GA)_n i in., trójnukleotyd (ATT)_n, (TCT)_n i in. lub czteronukleotyd (AGTG)_n, (GATC) i in. (rys. 1).



Rys. 1. Formy występowania sekwencji mikrosatelitarnych DNA
Fig. 1. Forms of microsatellite DNA sequences

Główną zaletą sekwencji mikrosatelitar-nych jest wysoki stopień polimorfizmu, czyli występowania w populacji kilku lub nawet kilkunastu różnych form – alleli danej sekwencji różniących się liczbą powtórzeń danego motywu, a zatem i długością (Cunningham i Meghan, 2001). Zmienność taką można wyjaśnić nagromadzeniem w czasie ewolucji licznych mutacji, najczęściej pojedynczych zmian sekwencji nukleotydów, występujących przeważnie w odcinkach niekodujących, a ponieważ są to obszary nie kodujące, mutacje te nie znajdują odbicia w fenotypie i nie podlegają selekcji.

Dzięki wysokiemu poziomowi zmienności, prostemu schematowi dziedziczenia oraz możliwości zastosowania zautomatyzowanej techniki ich analizy sekwencje mikrosatelitarne znalazły szerokie zastosowanie jako markery genetyczne, wykorzystywane w różnych dziedzinach nauki (Arranz i in. 1996). W hodowli zwierząt, szczególnie bydła, koni, a także psów badania markerów mikrosatelitarnych DNA są wykorzystywane do identyfikacji osobniczej i ustalenia pochodzenia osobnika po wskazanych rodzicach (Ichikawa i in., 2001; Řehout i in., 2006; Van Eenennaam i in., 2007; Radko, 2008; Carolino i in., 2009; Radko i in., 2010; Fornal i in., 2013; Tahir i in., 2015). Umożliwia to prowadzenie rzetelnej pracy hodowlanej poprzez wykluczenie błędów w zapisach rodowodu, wynikających z pomyłek lub oszustw, np. przy stosowaniu podwójnych kryć czy podkładania szczeniąt do innych miotów. Ponadto, identyfikacja osobnicza w oparciu o analizę DNA umożliwia identyfikację zwierząt na potrzeby prokuratury, sądów, policji i Towarzystwa Opieki nad Zwierzętami. Niejednokrotnie w sprawach karnych, najczęściej dotyczących kradzieży cennych zwierząt, analiza DNA pozwoliła na indywidualną identyfikację na podstawie zebranych

dowodów, stanowiących materiał biologiczny, występujący najczęściej w postaci włosów, tkanki, śladów krwi czy innych mikrośladów biologicznych (Dayton i in., 2009).

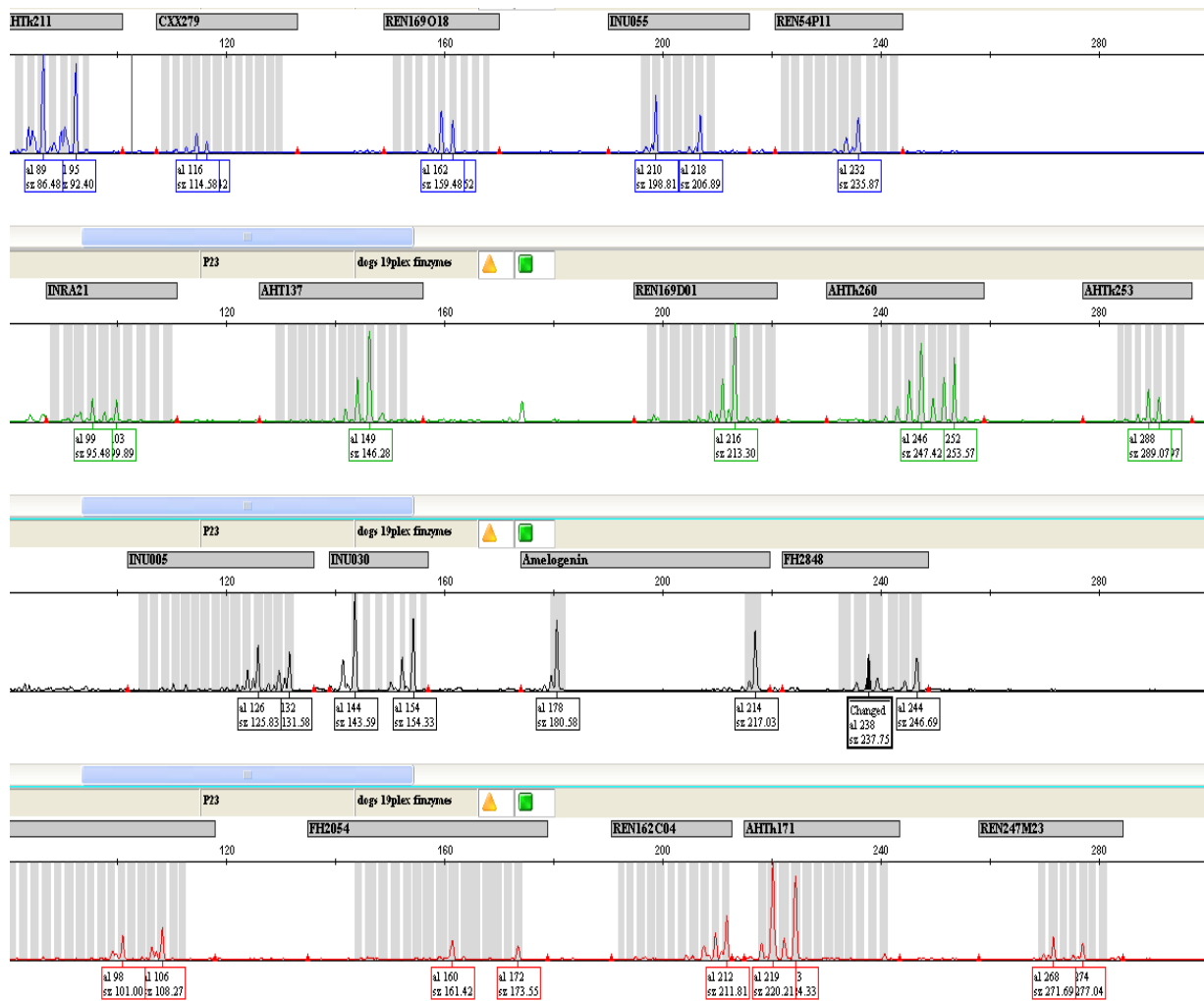
Analiza markerów mikrosatelitarnych u psów polega na pozyskaniu DNA z materiału biologicznego, dostarczanego w postaci wymazu śluzówki policzka, cebulek włosowych lub krwi. Następnie wykonuje się namnożenie DNA za pomocą metody PCR (łańcuchowej reakcji polimerazy) oraz identyfikację otrzymanych fragmentów DNA o długości charakterystycznej i indywidualnej dla każdego osobnika. Do badań stosuje się reakcję PCR typu multipleks, w której analizie poddaje się kilkanaście markerów jednocześnie (Zaje, 1994). Liczba zastosowanych markerów decyduje o dokładności ustalonego profilu DNA danego osobnika i skuteczności w potwierdzaniu danych rodowodowych. Analizę długości, powielonych podczas reakcji PCR 21-plex, fragmentów DNA przeprowadza się automatycznie w sekwenatorze podczas rozdziału elektroforetycznego.

Na podstawie uzyskanych wyników elektroforezy (rys. 2, tab. 1) w postaci pików określonych liczbą par zasad (pz) ustalany jest profil DNA, np. 128/130 (dla heterozygoty) lub 128/ (dla homozygoty).

Profile DNA, na podstawie analizy porównawczej, służą do ustalenia pochodzenia, co pozwala na stwierdzenie, czy potencjalni rodzice psa są jego rodzicami biologicznymi. Jest to ważny aspekt prowadzenia hodowli. Profil DNA, pochodzący od jednego osobnika, wykazuje co najwyżej dwa allele (fragmenty DNA) dla każdego markera. Potomstwo dziedziczy materiał genetyczny w połowie po ojcu i w połowie po matce. W przypadku, gdy znany jest profil matki, wszystkie allele, które nie pochodzą od matki, muszą być odziedziczone po ojcu (rys. 3).

Tabela 1. Przykładowy zapis profilu DNA
Table 1. Example DNA profile

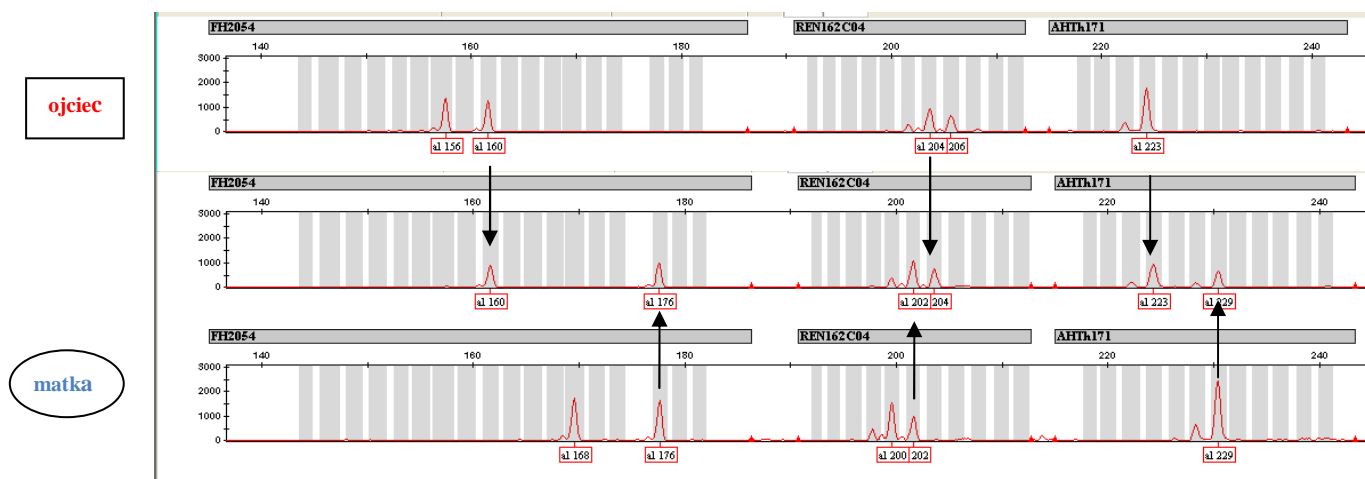
AHTk211	CXX279	REN169O18	INU055	REN54P11	INRA21	AHT137	REN169D01	AHTTh260
89/95	116/118	162/164	210/218	232/	99/103	149/	216/	246/252
AHTk253	INU005	INU030	FH2848	AHT121	FH2054	REN162C04	AHTTh171	REN247M23
288/290	126/132	144/154	238/244	98/106	160/172	212/	219/223	268/274



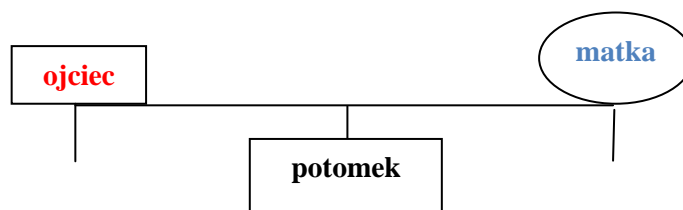
Rys. 2. Rozdział elektroforetyczny w sekwencerze
 Fig. 2. Electrophoretic separation in a sequencer

W sytuacji, jeśli nie zgadza się choćby jeden allel w profilu DNA, wówczas można przypuszczać, że mamy do czynienia z niezgodnością między potomkiem a domniemanym rodzicem. Jednak, ze względu na możliwość wystąpienia spontanicznych mutacji genetycznych, powodujących zaburzenia w zapisie DNA przyjmuje się, że wykluczenie stwierdza się na podstawie co najmniej niezgodności w dwóch markerach. Należy zaznaczyć, że markery STR pozwalają ze 100% pewnością wykluczyć pochodzenie badanego osobnika po podanych rodzicach. W sytuacji natomiast, gdy nie stwierdzamy wykluczenia po podanych rodzicach, istnieje jedynie prawdopodobieństwo, że mamy do

czynienia z danym osobnikiem. Przy zastosowaniu możliwie dużej liczby wysoko polimorficznych STR takie prawdopodobieństwo może ograniczyć z pewnością, jednak nigdy nie osiągnąć 100%. Prawdopodobieństwo, z jakim można potwierdzić pochodzenie danego osobnika po danej parze rodzicielskiej, jest oszacowane za pomocą prawdopodobieństwa wykluczenia – PE (ang. probability of exclusion), które w głównej mierze zależy od ilości zastosowanych markerów (Jamieson i Taylor, 1997). Szacuje się, że prawdopodobieństwo wykluczenia względem jednego z rodziców oscyluje na poziomie 99,5%, natomiast dwóch na poziomie 99,9% (Ichikawa i in., 2001; Fornal i in., 2013).



Rys. 3. Przykładowa analiza profili DNA na podstawie 3 markerów STR
 Fig. 3. Example DNA profile analysis based on 3 STR markers



sekwencja 1	156/160	160/176	168/176
sekwencja 2	204/206	202/204	200/202
sekwencja 3	223/	223/229	229/

Dziedziczenie sekwencji mikrosatelitarnych DNA. Potomkowie zgodnie z prawem Mendla otrzymują jeden allel od ojca i jeden od matki

Inheritance of microsatellite DNA sequences. In accordance with Mendel's laws of inheritance, offspring receive one allele from each parent

Pierwszy dostępny na rynku komercyjny zestaw 10 markerów mikrosatelitarnych (PEZ1, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ11, PE12, PEZ18, UCB2054, UCB2079), przygotowany przez firmę *Applied Biosystems*, nie zawsze był wystarczający do ustalenia rodowodu z powodu ograniczenia zmienności genetycznej oraz wzrostu inbrodu u wielu ras psów. Ograniczona zmienność genetyczna wyraża się ograniczoną liczbą alleli w niektórych mikrosatelitarnych *loci*, co stwarza trudność w wyborze panelu markerów, który mógłby być informatywny i powszechnie stosowany w kontroli rodowodów psów. Na podstawie analiz populacyjnych markerów mikrosatelitarnych, cechujących się wysoką polimorficznością, określa się przydatność poszczególnych loci w kontroli pochodzenia da-

nych ras. Miarą użyteczności stosowanego zestawu markerów STR jest współczynnik PIC (ang. polymorphism information content) – indeks stopnia polimorfizmu, określający informatywność danego locus. Czym wyższy współczynnik, tym wyższa jego przydatność do analiz (Botstein i in., 1980).

Obecnie stosowany jest zestaw 21 markerów STR: AHTk211, CXX279, REN169O18, INU055, REN54P11, INRA21, AHT137, REN169D01, AHTh260, AHTk253, INU005, INU030, FH2848, AHT121, FH2054, REN162C04, AHTh171, REN247M23, REN105L03, AHTh130, REN64E19 i gen AMEL. Sekwencje te są rekomendowane przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt – ISAG (ang. International Society for Animal Genetics) do kontroli rodowo-

dów psów. Szacowane PE na podstawie tego zestawu markerów daje 99,9998% prawdopodobieństwa właściwie ustalonego pochodzenia. Dodatkowo, markery te są testowane i standaryzowane co dwa lata w międzynarodowych testach porównawczych DNA, organizowanych przez ISAG. Umożliwia to ustalanie profili DNA i wystawianie certyfikatów DNA uznawanych międzynarodowo, co jest niezbędne przy międzynarodowym obrocie materiału hodowlanego czy też sprowadzaniu zza granicy wyłącznie nasienia do inseminacji.

W ostatnim teście porównawczym 2013–2014 Dog DNA ISAG CT uczestniczyły 53 laboratoria z całego świata. Z Polski udział wzięło jedynie Laboratorium Genetyki Moleku-

larnej Instytutu Zootechniki PIB (ISAG Code 84451), które zakwalifikowało się do 1 rangi, obok blisko 68% laboratoriów uczestniczących w teście. Wyniki testu 2013–2014 Dog DNA ISAG CT przedstawiono w tabeli 2.

Metody, oparte na analizie sekwencji mikrosatelitarnych, ze względu na ich polimorficzność, kodominujące dziedziczenie, powtarzalność oraz prostą i szybką analizę stały się nieodzownym elementem badań, związanych z hodowlą zwierząt, w tym psów.

Analiza markerów STR może być wykorzystywana do identyfikacji osobniczej, kontroli rodowodów, w sprawach spornego ojcostwa czy też wydawania opinii dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości.

Tab. 2. Wyniki testu Dog DNA ISAG CT
Tab. 2. Results of Dog DNA ISAG CT test

Rank	Zgodność profili DNA Match between DNA profiles	labs	% labs
Rank 1	100–98%	36	67,92%
Rank 2	97,9–95%	6	11,32%
Rank 3	97,9–90%	1	1,89%
Rank 4	89,9–80%	4	7,55%
Rank 5	poniżej – below 80%	6	11,32%
Razem – Total		53	

Literatura

- Arranz J.J., Bayón Y., San Primitivo F. (1996). Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Anim. Genet.*, 27: 415–419.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314–331.
- Carolino I., Sousa C.O., Ferreira S., Carolino N., Silva F.S., Gama L.T. (2009). Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.*, 32: 306–311.
- Cunningham E.P., Meghen C.M. (2001). Biological identification system: genetic markers. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 20 (2): 491–499.
- Dayton M., Koskinen M.T., Tom B.K. (2009). Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological materials. *Croat. Med. J.*, 50: 268–285.
- Fornal A., Radko A., Piestrzyńska-Kajtoch A. (2013). Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochim. Pol.*, 60 (4): 761–765.
- Ichikawa Y., Takagi K., Tsumagari S., Ishihama K., Morita M., Kanemaki M., Takeishi M., Takahashi H. (2001). Canine parentage testing based on microsatellite polymorphisms. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 1209–1213.
- Jamieson A., Taylor S.C.S. (1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Anim. Genet.*, 28: 397–400.
- Radko A. (2008). Microsatellite DNA polymorphism and its usefulness for pedigree verification of cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.*, 8, 4: 205–216.

- Radko A., Słota E., Marczyńska J. (2010). Usefulness of a supplementary set of microsatellite DNA markers for parentage testing in cattle. *Pol. J. Vet. Sci.*, 13: 113–117.
- Řehout V., Hradecká E., Čítek J. (2006). Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. *Czech. J. Anim. Sci.*, 12: 503–509.
- Tahir M.S., Hussain T., Babar M.E., Nadeem A., Naseer M., Ullah Z., Intizar M., Hussain S.M. (2015). A panel of microsatellite markers for genetic diversity and parentage analysis of dog breeds in Pakistan. *J. Anim. Plant Sci.*, 25 (2): 351–356.
- Van Eenennaam A.L., Weaber R.L., Drake D.J., Penedo M.C.T., Quaas R.L., Garrick D.J., Pollak E.J. (2007). DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. *J. Anim. Sci.*, 85: 3159–3169.
- Zaje I. 1994. A new method of paternity testing for dogs, based on microsatellite sequences. *Vet. Rec.*, 135: 545–547.

APPLICATION OF CANINE MICROSATELLITE DNA MARKERS FOR INDIVIDUAL IDENTIFICATION AND PARENTAGE CONTROL

Summary

The highly polymorphic repetitive sequences in the genome are utilized in population genetics because of their relatively straightforward analysis, especially due to the widespread use of multiplex PCR amplification and capillary electrophoresis. Accurate determination of relatedness and efficient control of pedigree registration is of great importance in dog breeding. Microsatellite DNA can be used as a marker for individual identification and parentage control including deciding controversial cases of putative parents and forensic casework. The development of biological identification techniques allows for more accurate analysis of DNA markers. The activities of the laboratory are standardized through the work of the International Society for Animal Genetics (ISAG), which conducts inter-laboratory comparisons. At present, ISAG recommends 22 microsatellite loci as a minimal STR panel for parentage testing in dogs and for evaluating the usefulness of the investigated panel of markers for parentage verification in different breeds.



Fot. D. Dobrowolska