

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 4

Issue 2

Különszám

Gödöllő
2008



EGYEDAZONOSÍTÁS ÉS SZÁRMAZÁSELLENŐRZÉS HIPERPOLIMORF MIKROSZATELLITA MARKERREL KUTYÁBAN

Zenke Petra, Leposa Tamás, Pádár Zsolt, Zöldág László

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Állattenyésztési, Takarmányozási és Laborállattudományi Intézet, Állattenyésztési és Genetikai Osztály
1078 Budapest, István u. 2.
Zenke.Petra@aotk.szie.hu

Összefoglalás

Világszerte egyre nagyobb igény mutatkozik a háziállatok, köztük a kutyák genetikai információ alapján történő egyedi azonosítására, illetve származásuk meghatározására. Egy gyors, pontos és költséghatékony módszerrel, a WILMS-TF (tumor faktor) génben lokalizálódó hiperpolimorf mikroszatellita marker használhatóságát vizsgáltuk, 52 különböző- illetve 48 labrador retriever fajtájú kutyából álló populációkban. A vér- ill. nyálminták DNS-tartalmának kinyerése után a WILMS lokuszt monoplex PCR reakcióval felszorzoztuk. A PCR fragmensek kapilláris elektroforézissel történő elválasztását és detektálását ABI Prism® 310 genetikai analizátorral a GeneScan® 3.1.2 szoftver (Applied Biosystems) segítségével végeztük. Genotipizáláshoz a szekvenálással hitelesített allélok előállított alléllétrát és a Genotyper® 2.5.2 szoftvert (Applied Biosystems) használtunk. Az allélok elnevezésénél a nemzetközi gyakorlathoz igazodva az ismétlődő egységek számát vettük alapul. Két esettanulmányban ill. populációstatisztikai analízissel igazoltuk a hiperpolimorf WILMS mikroszatellita marker alkalmazhatóságát fajtatiszta egyedek származás-ellenőrzésénél, azonban a megbízható egyedi azonosításhoz több genetikai marker vizsgálata is szükséges.

Kulcsszavak: kutya (*Canis familiaris*), egyedazonosítás, származásellenőrzés, mikroszatellita marker, Wilms lokusz

Individual identification and parentage control using a hyperpolymorphic microsatellite marker in dog

Abstract

Demand of the quick, correct and cost effective genetic based individual identification and parentage control is having increased importance in domestic animals, like dogs as well. In our study the applicability of a hyperpolymorphic microsatellite marker – which localized in the WILMS-TF (tumor factor) gene – in mixed (n=52) and purebred Labrador Retriever (n=48) canine populations was examined. Blood and buccal swabs were taken and the WILMS locus was amplified with monoplex PCR reaction following organic DNA extraction. The amplified fragments were separated and detected with capillary electrophoresis on ABI Prism® 310 Genetic Analyzer using GeneScan® 3.1.2 (Applied Biosystems) software. Allelic ladder – constructed from sequence verified fragments – and Genotyper® 2.5.2 software (Applied Biosystems) were applied for genotyping. The nomenclature for allele calling based on repetition structures is suitable for international comparisons. Our two casework studies and population-statistical analysis also justified the potential use and efficiency of hyperpolymorphic WILMS microsatellite marker in parentage control, however the requirement of extended set of loci in highly inbred canine population is still exist.

Keywords: dog (*Canis familiaris*), individual identification, parentage control, microsatellite marker, Wilms locus



Bevezetés

Az élőlények egyedi azonosításához azon tulajdonságaik vizsgálatára van szükség, melyek az egyed fiziológiás állapotától és életkorától függetlenek, nem változnak meg, ugyanakkor megfelelő mértékben polimorfak ahhoz, hogy az egyedek között különbséget lehessen tenni. Az egyedszintű azonosításhoz felhasznált genetikai markerek esetén rendkívül lényeges tényező a polimorfizmus foka (alléltípusok száma, előfordulásuk gyakorisága).

A származás ellenőrzésének igénye a szülő(k) pontos ismeretének hiányában merülhet fel. Több lehetséges apa esetén illetve mesterséges termékenyítésnél – pl. fajtagyőztes kutyák lefagyasztott spermájából – a kölykök egyedi származásának biztos meghatározása csak a genetikai profilok segítségével igazolható.

Anyag és módszer

A fajtapopulációs vizsgálatokhoz 48 db genetikailag közeli rokonságban nem lévő labrador retriever egyedtől biztosított szőr- ill. nyálminta szolgált, míg a vegyespopulációs vizsgálatokhoz 52 különböző fajta kiperparált DNS mintáját használtuk. A DNS feltárását proteolitikus sejtlyízis, szerves extrakció és ultraszűrés-koncentráció (Microcon-100, Amicon, Millipore) segítségével végeztük (Comey és mtsai, 1994).

A WILMS mikroszatellitát PCR eljárással monoplex formában sokszorosítottuk fel, majd a kapott fragmenseket kapilláris elektroforézissel *ABI Prism*[®] 310 genetikai analizátoron elválasztottuk, a NED elnevezésű fluorofórral jelölt primer lézergérsztett detektálását *GeneScan*[®] 3.1.2 szoftver (Applied Biosystems) használatával végeztük.

A potenciális allélként felsokszorozott termékeket méretük alapján csoportosítottuk, majd ezekből a csoportokból egy ill. több allél bázissorrend meghatározására került sor. A szekvencia vizsgálatokkal igazolt, ismert méretű allélok összekeverésével alléllétrát állítottunk elő. Az ismétlődő egységek számán alapuló allélnevezéktant a nemzetközi összehasonlításra is alkalmas módon alakítottuk ki (Eichmann és mtsai, 2004). Az allélok típusának félautomata meghatározása – genotipizálás – *Genotyper*[®] 2.5.2 szoftverrel (Applied Biosystems) történt.

A lokuszon megfigyelhető allélgyakoriságok ismeretében kiszámítottuk a várt- és megfigyelt heterozigotitást ($H_{(exp)}$ és $H_{(obs)}$), a kizárási- és megkülönböztető erőt (PD és PE), a polimorfizmus információ tartalom értékét (PIC), valamint becsültük a beltenyésztettséget (F).



Labrador retriever, valamint cane corso fajtatenyésztők megkeresésére a fenti módszert alkalmazva megállapítottuk a lehetséges nemző kanokat - mindkét esetben az anya, a két lehetséges kan valamint két kölyök szájnyalkahártya-törletéből tisztított DNS mintából.

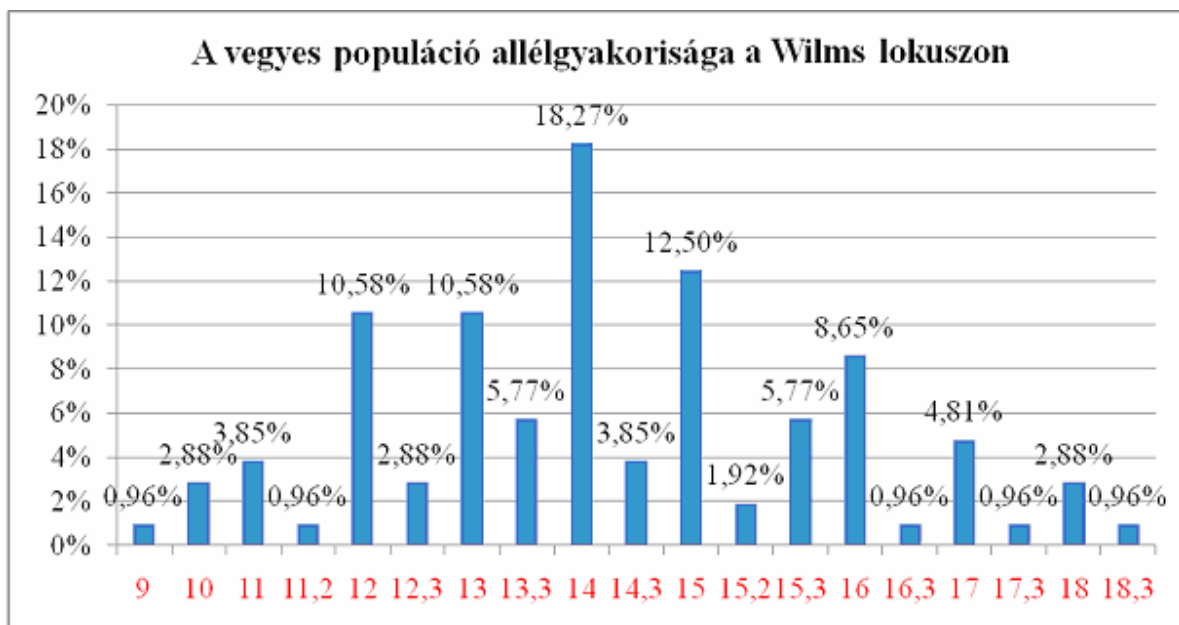
Eredmények és értékelés

A Wilms lokusz polimorfizmus vizsgálata

Az allélhosszúságok alapján történő csoportosítással potenciális alléltartományokat kaptunk, melyekből kiválasztottuk az alléllétrát alkotó fragmenseket és ezek méretét szekvencia analízissel igazoltuk. A populációs minták genotípusának pontos megállapítását az alléllétra segítségével végeztük, melynek során a Wilms lokuszon a vegyes populációban 19, a labrador retriever fajtapopulációban 10 alléltípust figyeltünk meg.

Populációstatisztikai elemzések

A Wilms lokuszon megfigyelt fragmens-típusokból az elvégzett szekvencia analízisek során 19 allélvariáns volt kimutatható. A megfigyelt allélgyakorisági értékek tartománya a vegyes populációban 0,96% és 18,27% (1. ábra), a labrador retriever populációban 1,04% és 30,21%, között változott. Mindkét csoportban leggyakrabban a 14-es allél előfordulását figyeltük meg.



1. ábra: A vegyes populációban megfigyelt allélgyakoriság

Figure 1. Observed allele frequency in mixed population



A vegyes- ill. a labrador retriever populációra vonatkozó heterozigotizási, kizárási- és megkülönböztető erő értékeket, valamint a beltenyésztettségi koefficiens értékét a fajtapopulációban az 1. táblázatban tüntettük fel.

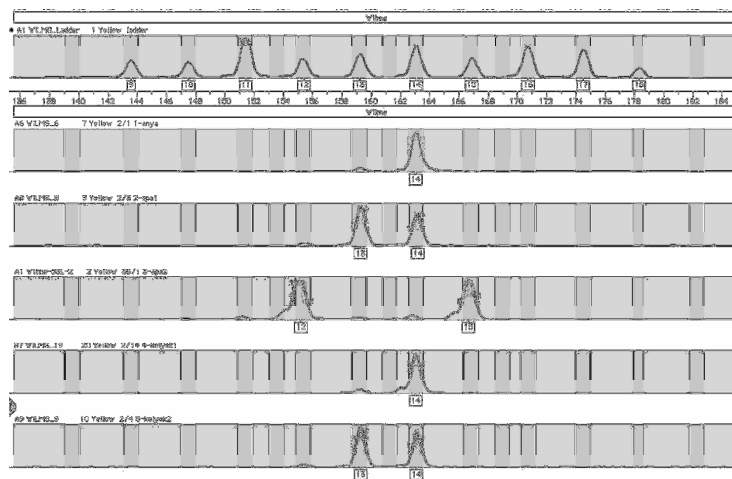
1. táblázat: A vegyes és fajtapopuláció főbb populáció genetikai adatai

Vegyes populáció(1)	Labrador r. populáció(2)
$H_{(exp)} = 0,915$	$H_{(exp)} = 0,802$
$H_{(obs)} = 0,769$	$H_{(obs)} = 0,646$
PE = 0,812	PE = 0,604
PD = 0,968	PD = 0,914
PIC = 0,899	PIC = 0,766
	F = 0,195

Table 1. Main population statistic data of mixed and Labrador retriever population
Mixed population(1), Labrador r. population(2)

Esettanulmányok

A két – cane corso és labrador retriever (2. ábra) – származásvizsgálat során 5-5 egyed Wilms lokuszon lokalizálódó alléljait határoztuk meg. A vizsgálatok eredménye alapján mindkét esetben egyértelműen kizárható volt az egyik kan biológiai apasága.



2. ábra: Alomellenőrző vizsgálat labrador retriever állományban

Föntről lefelé: Wilms alléllétra, anya, két lehetséges nemző kan, két kölyök

Figure 2. Parentage control in Labrador retriever stock

From above: Wilms allelic ladder, mother, two possible males, two puppies



Következtetés és javaslatok

A Wilms marker jellemzése

Az általunk alkalmazott polimorf STR marker jól definiáltnak, egyértelműen meghatározhatónak bizonyult, valamint megfelelően magas fokú polimorfizmussal rendelkezik. Technikai szempontból megfelelően érzékeny – szőrszálak gyökérhüvelyi sejtjeinek sikeres genotipizálása –, és az esettanulmányok kapcsán is bizonyította gyakorlati alkalmazhatóságát.

Populációstatisztikai elemzések

A vegyes populációban megfigyelt 19 allél, ill. a labrador retriever populációban megfigyelt 10 allél jól összemérhető a külföldi eredményekkel (*Eichmann és mtsai*, 2005), ahol 131 véletlenszerűen kiválasztott kutyában, 24 alléltípust közöltek. Nekünk ezek közül összesen 18-at sikerült kimutatnunk, valamint a 9-es allélt, amely a hivatkozott munkában nem szerepel.

A labrador csoporton belül megfigyelt 0,646-os heterozigotizációs érték összehasonlítva más magyarországi kutyapopulációkban kapott egyéb polimorf lokuszok értékeivel – $H_{(obs)}=0,177-0,878$ (*Pádár*, 2006) – megfelelően magasnak bizonyult. A vegyes- és a fajtacsoport heterozigotizációs értékeinek eltérései (*I. táblázat*) összefüggésben lehetnek a vizsgálatba vont fajta- és egyedszámok különbözőségével, valamint a beltenyésztettség mértékével. A várt és megfigyelt heterozigotizáció között észlelt szignifikáns különbség a genetikai egyensúly hiányára utal mindkét populációban.

A két kutyapopulációban kapott PE-, PD-értékek az azonos elvű humán igazságügyi értékeléshez viszonyítva kellőképpen magasak. A genetikai diverzitás jellemzésére szolgáló polimorfizmus információ tartalom értéke alapján a Wilms lokusz hazai ($PIC=0,548-0,875$) és külföldi ($PIC=0,889$) eredményekkel (*Eichmann és mtsai*, 2004, *Pádár*, 2006) való összehasonlításában is igen polimorfnak ($PIC=0,899$) mondható a vegyes populációban. Ez feltehetően szerkezetbeli összetettségének és nagyszámú – 19-ből 9 – intermedier alléljának valamint azok viszonylagosan egyenletes eloszlásának is köszönhető.

Az irányított és korlátozott szaporítás a megnövekedett homozigóta aránnyal rendelkező beltenyésztettség kialakulását segíti elő. A vizsgált labrador populációban is igen magas beltenyésztettségi koefficiens számítottunk ($F=0,195$) más hazai kutyapopulációk értékeihez képest (*Zenke és mtsai*, 2006). Ennek okaként az állomány valós beltenyésztettsége mellett az is valószínűsíthető, hogy a rokonsági kapcsolatokat csak a szülő-utód, illetve testvérek szintjén zártuk ki, de a pontos törzskönyvi adatok hiányában az esetleges távolabbi kapcsolatok nem kerülhettek kiszűrésre.



Esettanulmányok

Amint azt esettanulmányaink is mutatják, a Wilms mikroszatellita gyakorlati alkalmazásával gyors, egyszerű és pontos módon volt eldönthető a kérdéses apaság, még az erősen beltenyésztett labrador állományban is.

Összességében a vizsgálat bizonyította, hogy a Wilms mikroszatellita marker származásellenőrzés céljából történő felhasználásra jó alternatíva lehet, egyedi azonosítás esetén, a megbízhatóbb eredmények érdekében, kiegészíthető más polimorf rendszerekkel (pl. PEZ6, PEZ8, ZUBECA).

A vizsgálatokat a tenyésztőkkel történő összehangolt munkával lehetne az egyes fajtakörökre kibővíteni, ily módon akár egy fajtaklub számára hasznos információkat nyújthatnánk a populáció genetikai, beltenyésztettségi állapotáról. Megfelelő adatbázis létrehozásával pontos nyilvántartást lehetne létrehozni, amellyel a rokonsági kapcsolatokat az egyes almok esetében teljes mértékben bizonyítani lehetne.

Megfelelő számú, Wilms-tumorról diagnosztizált minta összegyűjtése a marker és a betegség közti kapcsoltsági vizsgálatokat tenne lehetővé (MAS – Marker Assisted Selection), mellyel egy szűrési rendszer bevezetésére is sor kerülhetne. A vizsgálat spektrumát szélesítve más, a betegségben érintett háziállatfajt bevonására is sor kerülhetne.

Irodalomjegyzék

- Comey, C.T., Koons, B.W., Presley, K.W., Smerick, J.B., Sobieralski, C.A., Stanley, D.M., Baechtel, F.S.* (1994) DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.*, 39. 1254-69.
- Eichmann, C., Berger, B., Parson, W.* (2004): A proposed nomenclature for 15 canine-specific polymorphic STR loci for forensic purposes. *Int. J. Legal. Med.*, 118. 5. 249-266.
- Eichmann, C., Berger, B., Steinlechner, M., Parson, W.* (2005): Estimating the probability of identity in a random dog population using 15 highly polymorphic canine STR markers. *Forensic Sci. Int.*, 151. 37-44.
- Pádár, Zs.* (2006): Kutya eredetű anyagmaradványok igazságügyi genetikai vizsgálata. PhD értekezés.
- Zenke P., Pádár Zs., Zöldág L.* (2006): Molekuláris genetikai és kutyatenyésztés. 2006. *Magy. Állatorv. Lapja*, 9. 128. 544-550.