

Identyfikacja polimorfizmu 11 loci mikrosatelitów u bydła rasy hereford

ANDRZEJ JANIK, TOMASZ ZĄBEK, ANNA RADKO

Zakład Immuno- i Cytogenetyki Instytutu Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

Janik A., Ząbek T., Radko A.

Identification of polymorphism at 11 microsatellite loci in Hereford cattle

Summary

Polymorphism of microsatellite DNA sequences in 35 individuals of Hereford cattle was analyzed. Automated DNA sizing technology was applied using a commercial primer kit for bovine parentage verification (Applied Biosystems). Alleles at the following 11 microsatellite loci were identified: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 and BM1824. Two DNA fragments (171 bp and 175 bp) at the TGLA122 locus and one (192 bp) at the BM1824 locus were found to be outside the size limits of 130-164 bp and 178-190 bp provided by the primer kit used. They probably represent new alleles at loci TGLA122 and BM1824. The analyzed microsatellite loci were found to be highly polymorphic with a total of 79 alleles detected. The highest polymorphism was observed for TGLA53 (11 alleles, PIC = 0.707), TGLA227 (10 alleles, PIC = 0.857), TGLA122 (11 alleles, PIC = 0.702), INRA23 (7 alleles, PIC = 0.758) and BM1824 (7 alleles, PIC = 0.730). The heterozygosity coefficient ranged from 0.608 (locus TGLA126) to 0.865 (locus TGLA227) for most of the loci. The probability of sire exclusion calculated for a set of 11 loci was 0.9996.

Keywords: cattle, microsatellite, parentage control

Sekwencje mikrosatelitarne są fragmentami DNA o długości od 60 do 300 par zasad (pz), występującymi głównie w regionach niekodujących genów i rozproszonymi równomiernie w genomie co 6 do 10 tysięcy par zasad (kpz). Składają się one z 10 do 50 powtórzeń 1 do 6 nukleotydowego motywu i charakteryzują się wysokim polimorfizmem (7, 15-17). W genomie bydła wykryto dotychczas około 2000 markerów mikrosatelitarnych (4, 7, 10, 15). Znaczący postęp w badaniach nad identyfikacją, charakterystyką i polimorfizmem sekwencji mikrosatelitarnych DNA przyniosło zastosowanie multipleksowych reakcji PCR oraz zautomatyzowanej techniki analizy wielkości fragmentów DNA (1, 9, 13, 19). Mikrosatelity są wykorzystywane u bydła między innymi w programach mapowania genomu (10), analizie zróżnicowania wewnątrz i międzyrasowego (9, 13, 14, 16, 17, 19) oraz w identyfikacji i mapowaniu loci cech ilościowych QTLs (12). Wykazano także przydatność tych markerów do identyfikacji osobniczej, kontroli pochodzenia (1, 5, 6, 9, 13, 22) oraz diagnozowania chimeryzmu komórkowego krwi i niepłodności jałówek pochodzących z różnopłciowych cięż bliźniaczych (20). W kraju przeprowadzono dotychczas wstępne badania nad polimorfizmem mikrosatelitarnym DNA u bydła czarno-białego (14), piemontese (13), czerwono-białego i polskiego czerwonego (14, 19) oraz simentalskiego (9). Koniecz-

ność prowadzenia dalszych badań nad tym zagadnieniem narzuca planowane w niedalekiej przyszłości wykorzystanie sekwencji mikrosatelitarnych DNA do kontroli pochodzenia bydła hodowanego w kraju i na świecie.

Celem przeprowadzonych badań była analiza polimorfizmu 11 loci mikrosatelitarnych DNA u bydła rasy hereford oraz ocena przydatności komercyjnego zestawu starterów Stock Marks for Cattle Parentage Verification Kit, Bovine II, version 2 firmy Applied Biosystems do kontroli pochodzenia w tej rasie.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły próbki krwi od 35 sztuk bydła rasy hereford. Krew do analiz przechowywano w próbkach z dodatkiem EDTA w temperaturze -20°C . U badanych osobników określono polimorfizm markerów mikrosatelitarnych DNA z 11 loci oznaczonych następującymi symbolami: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 i BM1824. DNA genomowe izolowano z 40 μl krwi według metody opisaną przez Kawasaki (11). Następnie poddawano go amplifikacji przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych sekwencji starterowych z komercyjnego zestawu Stock Marks for Cattle Parentage Verification Kit, Bovine II version 2 rekomendowanego do kontroli pochodzenia u bydła. Reakcje PCR przeprowadzono według protokołu PCR – Protocol for Bovine II v. 2 opracowanego przez

firmę Applied Biosystems. Produkty reakcji PCR poddawano elektroforezie w 4% denaturującym żelu poliakrylamidowym na sekwenatorze DNA ABI PRISM 377 firmy Applied Biosystems, w obecności wewnętrznego standardu wielkości 350 Rox i próbki referencyjnej. Długość ścieżki żelu wynosiła 36 cm, a czas rozdziału 2,5 godziny. Wielkość analizowanych fragmentów DNA (alleli) określano automatycznie w parach zasad za pomocą komputerowego programu GeneScan v. 2.1 firmy Applied Biosystems. Genotypy badanych osobników w poszczególnych loci mikrosatelitarnych ustalano przy użyciu programu Genotyper 2.0 tej samej firmy.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników obejmowała obliczenie częstości występowania alleli zidentyfikowanych w poszczególnych loci, stopnia heterozygotyczności – H (18), indeksu stopnia polimorfizmu – PIC (2), prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa – PE na podstawie pojedynczego locus, gdy znane są genotypy obojga rodziców (8) oraz prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa – PE_c na podstawie 11 loci (3).

Wyniki i omówienie

Sekwencje mikrosatelitarne DNA są nową grupą markerów genetycznych, która zgodnie z zaleceniem Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Zwierząt z 1996 r. powinna być wykorzystywana równolegle z grupami krwi do kontroli pochodzenia u bydła. W związku z tym od kilkunastu już lat w krajowych i zagranicznych ośrodkach naukowych trwają intensywne badania nad wytypowaniem zestawu markerów mikrosatelitarnych najbardziej przydatnych do kontroli pochodzenia (1, 5, 6, 9, 13, 19, 21, 22). Uzyskane dotychczas wyniki wskazują, że do kontroli pochodzenia powinny być wybrane sekwencje mikrosatelitarne DNA charakteryzujące się wysokim polimorfizmem, dobrze zrównoważoną częstością występowania alleli u poszczególnych loci, wartością wskaźników PIC, H i PE dla pojedynczych loci powyżej 0,5, dobrą rozdzielczością elektroforetyczną na żelu poliakrylamidowym i powtarzalnością wyników przy określaniu wielkości poszczególnych alleli.

W badanej rasie hereford w trakcie elektroforezy produktów PCR poszczególne fragmenty DNA wyraźnie się rozdzielały. W zależności od genotypu osobnika w danym locus obserwowano występowanie jednego fragmentu DNA (prążka) w przypadku homozygoty lub dwóch fragmentów u heterozygoty. Uzyskanie silnych sygnałów detekcji w postaci wysokich pików dla większości specyficznych produktów PCR pozwalało na dokładne automatyczne określenie wielkości poszczególnych alleli w parach zasad i odróżnienie genotypu homozygotycznego od heterozygotycznego.

Wyniki analizy polimorfizmu poszczególnych sekwencji mikrosatelitarnych DNA przedstawiono w tab. 1. W 11 loci mikrosatelitarnych wykryto ogółem 79 alleli, których liczba w zależności od locus wynosiła od 4 (locus ETH3) do 11 (locus TGLA53). W większości przypadków allele zidentyfikowane w poszczególnych loci występowały ze zróżnicowaną częstością.

Wykazano, że z wyjątkiem 2 fragmentów DNA (171 pz i 175 pz) wykrytych w locus TGLA122 i jednego (192 pz) w locus BM1824 wszystkie pozostałe allele mieściły się w zakresie wielkości podanym przez producenta komercyjnego zestawu starterów użytych do badań. Dwie wartości komputerowe 171,02 pz i 175,44 pz odpowiadające fragmentom DNA 171 pz i 175 pz z locus TGLA122 nie leżały w podanym zakresie wielkości 130-164 pz, a w przypadku locus BM1824 tylko jedna wartość 191,94 pz odpowiadająca fragmentowi o wielkości 192 pz nie mieściła się w zakresie 178-190 pz. W ramach powtórnego testowania tych samych próbek uzyskano dla nich identyczne wyniki. Nie wydaje się więc aby wymienione wartości były wynikiem błędu laboratoryjnego. Ogólnie przyjmuje się, że polimeraza Taq może replikować nieprawidłowo około 0,25% sekwencji DNA. Jednak prawdopodobieństwo, że enzym mógł powtórzyć ten sam błąd 2 razy w przypadku locus TGLA122 i jeden raz w przypadku locus BM1824 jest raczej małe. Prawdopodobieństwo zanieczyszczenia próbek obcym DNA jest także niewielkie ponieważ molekularny test był przeprowadzany w sterylnych warunkach. Wartości te reprezentują najprawdopodobniej nowe allele o wielkościach 171 pz i 175 pz w locus TGLA122 oraz allel 192 pz w locus BM1824. Po potwierdzeniu uzyskanych wyników na większym materiale zakresy wielkości alleli w tych loci u bydła rasy hereford będą mogły być rozszerzone do 175 pz (locus TGLA122) i 192 pz (locus BM1824). Podobny przypadek identyfikacji dodatkowego allelu w wielkości 172 pz w locus TGLA122 został opisany także u bydła piemontese (13). Większość analizowanych loci mikrosatelitarnych charakteryzowała się wysokim polimorfizmem, na co wskazuje zarówno liczba wykrytych w poszczególnych loci alleli, jak i indeks stopnia polimorfizmu PIC powyżej 0,5. Spośród 11 loci najbardziej polimorficzne były loci TGLA53 (11 alleli, PIC = 0,708), TGLA227 (10 alleli, PIC = 0,857), TGLA122 (11 alleli, PIC = 0,702), BM2113 (8 alleli, PIC = 0,757) oraz INRA23 (7 alleli, PIC = 0,758) i BM1824 (7 alleli, PIC = 0,730). Najmniejszą liczbę alleli (4 allele) oraz najniższy indeks stopnia polimorfizmu (PIC = 0,420) obserwowano jedynie w locus ETH3. Wysoki polimorfizm loci TGLA53, TGLA227 oraz TGLA122 wykazali także inni autorzy u bydła piemontese (13), simentalskiego (9) oraz czerwono-białego i holsztyno-fryzyjskiego (19).

Analizowane loci z wyjątkiem ETH3 charakteryzowały się wysokim współczynnikiem heterozygotyczności, którego wartości mieściły się w przedziale od 0,608 (locus TGLA126) do 0,865 (locus TGLA227). W locus ETH3 stopień heterozygotyczności kształtował się na poziomie 0,473. Wartość stopnia heterozygotyczności powyżej 0,5 dla loci TGLA53 (0,727), TGLA227 (0,770), TGLA126 (0,603) i TGLA122 (0,655) obserwowali także Bates i wsp. (1) analizując polimorfizm 22 markerów mikrosatelitarnych u 49 osobników rasy hereford. Prawdopodobieństwo wy-

Tab. 1. Polimorfizm 11 markerów mikrosatelitarnych DNA u bydła rasy hereford (n = 35)

Locus	Liczba alleli	Allele	Częstość występowania alleli	PIC	H	PE	Locus	Liczba alleli	Allele	Częstość występowania alleli	PIC	H	PE
TGLA227	10	81	0,014	0,851	0,865	0,729	TGLA126	6	115	0,114	0,573	0,608	0,390
		83	0,100						117	0,586			
		85	0,100						119	0,157			
		87	0,043						121	0,029			
		89	0,086						123	0,100			
		91	0,186						125	0,014			
		93	0,171						139	0,014			
		95	0,186						141	0,043			
		97	0,043						143	0,444			
		101	0,071						147	0,014			
BM2113	8	125	0,171	0,757	0,788	0,590	TGLA122	11	151	0,086	0,702	0,733	0,532
		127	0,086						153	0,229			
		133	0,271						155	0,014			
		135	0,100						161	0,071			
		137	0,029						163	0,057			
		139	0,300						171	0,014			
		141	0,029						175	0,014			
		143	0,014						202	0,029			
		154	0,044						206	0,221			
		158	0,029						208	0,162			
TGLA53	11	160	0,383	0,708	0,743	0,536	INRA23	7	210	0,073	0,758	0,787	0,593
		162	0,309						212	0,059			
		164	0,029						214	0,118			
		166	0,088						216	0,338			
		168	0,029						115	0,029			
		170	0,044						117	0,685			
		172	0,015						119	0,229			
		174	0,015						121	0,057			
		182	0,015						140	0,129			
		213	0,015						144	0,029			
ETH10	5	217	0,059	0,621	0,676	0,419	ETH225	5	146	0,343	0,652	0,703	0,455
		219	0,206						148	0,385			
		221	0,455						150	0,114			
		223	0,265						178	0,044			
		248	0,403						180	0,324			
SPS115	6	252	0,145	0,655	0,704	0,461	BM1824	7	182	0,250	0,730	0,766	0,551
		254	0,032						184	0,235			
		256	0,081						188	0,059			
		258	0,016						190	0,073			
		260	0,323						192	0,015			

Objaśnienia: PIC – indeks stopnia polimorfizmu, H – stopień heterozygotyczności, PE – prawdopodobieństwo wykluczenia

Tab. 2. Kształtowanie się prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa PE_C w zależności od liczby analizowanych loci mikrosatelitarnych

Nazwa loci	Liczba loci	Wartość PEC
TGLA227; BM2113; TGLA53; ETH10; SPS115; TGLA126; TGLA122; INRA23; ETH3; ETH225; BM1824	11	0,9996
TGLA227; BM2113; TGLA53; ETH10; SPS115; TGLA126; TGLA122; INRA23; ETH225; BM1824	10	0,9995
TGLA227; BM2113; TGLA53; TGLA122; INRA23; BM1824	6	0,9956

kluczenia ojcostwa PE w badanej rasie hereford obliczone dla poszczególnych loci mieściło się w zakresie od 0,247 (locus ETH3) do 0,729 (locus TGLA227). Wysokie wartości PE wykazano tylko dla 6 loci: TGLA227 (0,729), BM2113 (0,590), TGLA53 (0,536), TGLA122 (0,532), INRA23 (0,593) i BM1824 (0,551). Chociaż wartości PE dla 5 loci (ETH10, SPS115, TGLA126, ETH3, ETH225) były niskie (< 0,5) to jednak łączne prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa PE na podstawie 11 loci było wysokie i wynosiło 0,9996 (tab. 2). Wyłączenie z analizowanego zestawu loci sekwencji mikrosatelitarnej ETH3, dla której wartość wskaźnika PE była najniższa (0,247) spowodowałoby tylko nieznaczne obniżenie prawdopodobieństwa wykluczenia ojcostwa do wartości 0,9995. Natomiast przy wyeliminowaniu 5 loci, dla których wskaźniki PE wynosiły poniżej 0,5, łączne prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa PE obliczone dla 6 loci zmniejszyłoby się do wartości 0,9956. Wysokie prawdopodobieństwo wykluczenia ojcostwa oraz rodzicielstwa w rasie hereford sięgające powyżej 99% wykazali także inni autorzy (1, 21, 22) analizując polimorfizm innych sekwencji mikrosatelitarnych DNA.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły wysoki polimorfizm większości markerów mikrosatelitarnych DNA z komercyjnego zestawu Stock Marks for Cattle Parentage Verification Kit, Bovine II version 2 u bydła hereford oraz ich przydatność do kontroli pochodzenia. Rezultaty dotychczasowych badań własnych (9) oraz innych autorów (1, 5, 6, 13, 19) wskazują na konieczność prowadzenia dalszych prac nad wytypowaniem zestawu markerów mikrosatelitarnych DNA najbardziej przydatnych do kontroli pochodzenia w różnych rasach bydła oraz opracowaniem standardowego testu molekularnego do ich identyfikacji.

Piśmiennictwo

- Bates S., Peterson-Knabe C., Holm T., Van Heringen H., Lange K., Ziegler J., Heyen D., Da Y., Lewin H.: Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for automated parentage verification. Perkin Elmer Applied Biosystems, nie datowany reprint, s.1-8.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Genet.* 1980, 32, 314-331.
- Fredholm M., Wintero A. K.: Efficient resolution of parentage in dogs by amplification of microsatellite. *Anim. Genet.* 1996, 27, 19-23.
- Fries R., Eggan A., Stranzinger G.: The bovine genome contains polymorphic microsatellites. *Genomics* 1990, 8, 403-406.

- Glowatzki-Mullis M. L., Gaillard C., Wigger G., Fries R.: Microsatellite-based parentage control in cattle. *Anim. Genet.* 1995, 26, 7-12.
- Heyen D. W., Beever J. E., Da Y., Evert R. E., Green C., Bates S. R. E., Ziegler J. S., Lewin H. A.: Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.* 1997, 28, 21-27.
- Hirano T., Nakane S., Mizoshita K., Yamakuchi H., Inone-Murayma M., Watanabe T., Barendse W., Sugimoto Y.: Characterization of 42 highly polymorphic bovine microsatellite markers. *Anim. Genet.* 1996, 27, 365-368.
- Jamieson A.: The genetics of transferrin in cattle. *Heredity* 1965, 20, 419-441.
- Janik A., Ząbek T., Radko A., Natonek M.: Evaluation of polymorphism at 11 microsatellite loci in Simmental cattle raised in Poland. *Ann. Anim. Sci.* 2001, 1, 19-29.
- Kappes S. M., Koele J. W., Stone R. T., McGraw R. A., Sonstegard T. S., Smith T. P. L., Lopez-Corralles N. L., Beattie C. W.: A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 1997, 7, 235-240.
- Kawasaki E. S.: Sample preparation from blood, cells and other fluids. W: *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (Wyd. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.) Acad. Press 1990, New York, s.146-152.
- Lipkin E., Mosig M. O., Darvasi A., Ezra E., Shalom A., Friedmann A., Soller M.: Quantitative trait locus mapping in dairy cattle by means of selective milk DNA pooling using dinucleotide microsatellite markers: analysis of milk protein percentage. *Genetics* 1998, 149, 1557-1567.
- Lubieniecka J., Grzybowski G., Grzybowski T., Miścicka-Słiwka D., Lubieniecki K., Czarny J.: Polymorphism at microsatellite loci in Piedmontese cattle by automated DNA sizing technology. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 1999, 17, 25-34.
- Lubieniecka J., Grzybowski G., Lubieniecki K.: Zróżnicowanie genetyczne w europejskiej populacji bydła. XIV Zjazd Pol. Tow. Genet. (Streszczenia). *Genetyka w służbie człowieka*. Poznań, 11-13.06.2001, s. 251-252.
- Ma R. Z., Russ I., Park C., Heyen D. W., Beever J. E., Green C. A., Lewin H. A.: Isolation and characterization of 45 polymorphic microsatellites from bovine genome. *Anim. Genet.* 1996, 27, 43-47.
- Mac Hugh D. E., Loftus R. T., Cunningham P., Bradley D. G.: Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Anim. Genet.* 1998, 29, 333-340.
- Moazami-Goudarzi K., Laloe D., Furet J. P., Grosclaude F.: Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Genet.* 1997, 28, 338-345.
- Ott J.: Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 1992, 51, 283-290.
- Radko A.: Polimorfizm sekwencji mikrosatelitarnych DNA u bydła rasy czarno-białej i czerwono-białej w Polsce. Praca dokt., Instytut Zootechniki, Balice, 2001.
- Rejduch B., Słota E., Janik A., Ząbek T.: Identification of blood cell chimerism in bovine heterosexual twins using blood groups, karyotype and DNA microsatellite polymorphism analyses. *Ann. Anim. Sci.* 2001, 1, 13-18.
- Usha A. P., Simpson S. P., Williams J. L.: Probability of random sire exclusion using microsatellite markers for parentage verification. *Anim. Genet.* 1995, 26, 155-161.
- Vankan D. M., Moore S. S., Bell K., Hetzel D. J. S.: Evaluation of DNA microsatellites for parentage and paternity testing of cattle. XXIV Intern. Conf. Animal Genetics, 23-29.07.1994, Prague, Czech Republic, s.100-101.

Adres autora: dr inż. Andrzej Janik, ul. Serbska 3/49, 30-638 Kraków

CATELLI E., DE MARCO M. A., DELOGU M., TERREGINO C., GUBERTI V.: Serologiczny dowód zakażenia pneumowirusem ptaków bażantów hodowlanych i żyjących na wolności. (Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants). *Vet. Rec.* 149, 56-58, 2001 (2)

Badania w kierunku obecności przeciwciał dla pneumowirusa ptaków (APV) wykonano testem enzymatycznego blokowania (AbEIA) z 704 surowicami bażantów z 16 stad i z 263 surowicami bażantów wolno żyjących. W surowicach bażantów z 2 stad hodowlanych występowały przeciwciała dla wirusa APV. W stadzie usytuowanym na terenie Rawenny 14 z 44 badanych surowic reagowało pozytywnie, zaś na terenie Forli-Casena 28 surowic reagowało pozytywnie. Nie występowała korelacja pomiędzy wynikami pozytywnymi i przebywaniem w promieniu 5 km od fermy bażantów innych gatunków ptaków. Dodatnie wyniki w kierunku obecności przeciwciał dla APV uzyskano dla bażantów żyjących na wolności w 1992 r. i 1994 r. Odsetek wyników dodatnich wynosił u nich 1,1%, podczas gdy u bażantów hodowlanych 27,3%.