

# Walidacja zestawu StockMarks® do identyfikacji osobniczej zwierząt z rodziny psowatych

ANDRZEJ JAKUBCZAK, GRAŻYNA JEŻEWSKA

Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UP,  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Jakubczak A., Jeżewska G.

## Validation of StockMarks® Set for identifying origin of species from the canine family

### Summary

The goal of this study was to measure the utility of 10 pairs of starter sequences described scientifically to amplify microsatellites in the genome of canines and measure the usefulness of the commercial set StockMarks® for Dogs Canine Genotyping Kit from Applied Biosystems company in individual identification. An additional goal is to check the feasibility of using the set to control the origin of species from Canidae family. The tests were conducted on animals from three species: Red Fox (*Vulpes vulpes*), Arctic Fox (*Alopex lagopus*), and Raccoon Dog (*Nyctereutes procyonoides*), from which blood was drawn into sterile vacuum test-tubes with the anticoagulant EDTA from the saphena vein. DNA was isolated from the blood using QIAamp DNA Blood Mini Kit, a set for isolating genetic material. The obtained products PCR were exposed to electrophoretic separation in the genetic analyzer ABI Prism 3100 Avant, then analyzed using the computer program Gene Mapper™ v. 3.5. The frequency of alleles was measured for all microsatellite loci. All calculations were performed using the statistical packet SAS – module SAS/Genetics™ 9.1.3.

The analysis of the microsatellite sequences (FHC 2010, FHC 2054, FHC 2079, PEZ1, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8) in the population of the Arctic Fox, Red fox, and Raccoon Dog, indicates a high degree of polymorphism and high usefulness in the majority of tested microsatellite loci to control the origin of species and identification of specimen in fox and raccoon dog farms. Moreover, it has been confirmed that in many cases clear differences between the length of specific alleles indicates a potential use in identifying species.

**Keywords:** microsatellite sequences, control of origin of species, Canidae

Markery genetyczne stały się w ostatnich latach cennym materiałem zarówno do badań z zakresu genetyki populacji, jak i dla hodowców. W nowoczesnej hodowli zwierząt znajdują zastosowanie szczególnie badania polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych określonych genów oraz minisatelity i mikrosatelity. Zidentyfikowane u zwierząt gospodarskich zarejestrowane są w międzynarodowym banku genów GenBank lub EMBL.

Sekwencje mikrosatelitarne jako markery genetyczne wykorzystywane są w hodowli zwierząt, między innymi, w badaniach zmienności genetycznej populacji (9, 10). Najczęściej stosowanymi parametrami określającymi zmienność genetyczną są: heterozygotyczność, różnorodność alleliczna i procent *loci* polimorficznych. Miarą różnorodności allelicznej jest liczba alleli sekwencji STR, jaka znajduje się w danym *locus*. Procent *loci* polimorficznych jest to udział takich *loci* w ogólnej liczbie analizowanych *loci*. Zmienność genetyczną szacowaną na podstawie sekwencji mikrosatelitarnych wykorzystuje się również do charakte-

rystyki struktury genetycznej populacji, analizy kierunków i intensywności migracji między populacjami, szacowania stopnia zimbredowania populacji, w analizie pokrewieństwa i pochodzenia osobników oraz w analizie stopnia hybrydyzacji pomiędzy sąsiadującymi populacjami spokrewnionych gatunków. Sekwencje STR wykorzystywane są także w molekularnych metodach identyfikacji płci, jak i do oceny przynależności gatunkowej osobników.

Sekwencje mikrosatelitarne stały się w ostatnich latach jedną z najliczniejszych grup markerów. Ich rozproszenie w genomie, wysoki stopień polimorfizmu oraz proste metody identyfikowania pozwalają na wykorzystanie ich w mapowaniu genomu, analizie różnic wewnątrz- i międzyodmianowych, jak i mapowaniu *loci* cech ilościowych (7, 8, 11). Markery te umożliwiają również identyfikację genów odpowiedzialnych za cechy ważne z punktu widzenia hodowcy. Jak podaje Butler, sekwencje mikrosatelitarne należą do markerów używanych w biologii, które dzięki automatyzacji metod analiz charakteryzują się dużą szybkością

Tab. 1. Charakterystyka analizowanych markerów mikrosatelitarnych zestawu StockMarks

Locus	Rodzaj powtórzenia	Motyw powtarzający	Oczekiwany zakres wielkości (pz)	Lokalizacja na mapie genomowej	Numer dostępu (GenBank)	Barwnik/kolor	Starter wiodący (Forward) (5'-3')	Starter odwrotny (Rwers) (3'-5')
PEZ1	tetra	TATG	92-136	CFA 7	AY672136	FAM/niebieski	GTAGATTAGATCTCAGGCAG	TAGGTCCTGGTAGGGTGTGG
PEZ3	tri	GAA/GCA	95-154	CFA 13/19	AY536266	NED/żółty	CACTTCTCATACCCAGACTC	CAATATGTCAACTATACTTC
PEZ5	tetra	TTTA	97-121	CFA 12	AY375155	JOE/zielony	GCTATCTTGTTCACACAGC	TCACTGTATACAACATTGTC
PEZ6	tetra	GAAA	164-214	CFA 16	AY375156	NED/żółty	ATGAGCACTGGGTGTATAC	ACACAATTGCATTGTCAAAC
PEZ8	tetra	GAAA	222-260	S16/CFA27	AY375154	NED/żółty	TATGCACTTTATCACTGTGG	ATGGAGCCTCATGTCTCATC
PEZ12	tetra	GAAA	250-320	CFA 3	AY758358	JOE/zielony	CCTAAATTAGAGGTCTAACC	TAAGCGGGAATGTGCTCCTC
PEZ20	tetra	AAAT	170-201	nie zmapowany	AF454052	JOE/zielony	CACTTCTCATACCCAGACTC	CAATATGTCAACTATACTTC
FHC2010	tetra	ATGA	210-260	S5/CFA24	NM010856	FAM/niebieski	AAATGGAACAGTTGAGCATGC	CCCCTTACAGCTTCATTTCC
FHC2054	tetra	GATA	140-183	CFA 12	NM005502	FAM/niebieski	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTTGAACCTTCCC
FHC2079	tetra	GGAT	263-299	S5/CFA24	-	NED/żółty	CAGCCGAGCACATGGTTT	ATTGATTCTGATATGCCAGC

uzyskiwanych wyników oraz ich wysoką powtarzalnością i wiarygodnością (1).

Kontrola pochodzenia jest ważnym aspektem pracy hodowlanej. Jest ona prowadzona na podstawie analizy dziedziczenia polimorficznych markerów genetycznych. W przypadku każdej sekwencji mikrosatelitarnej potomek otrzymuje jeden allel od matki, drugi od ojca, dokładnie tak, jak to jest przy cechach monogenowych – jakościowych. Kontrola pochodzenia psów hodowlanych staje się coraz powszechniejszą praktyką. Wyliczone prawdopodobieństwo wykluczenia rodzicielstwa (PE) u psów, na podstawie 12 sekwencji mikrosatelitarnych DNA (CPH2, CPH3, CPH5, CPH6, CPH8, CPH9, CPH10, CPH11, CPH13, CPH14, CPH15, CPH16), wynosi 99,99% (7). W badaniach Klukowskiej i wsp. (4) uzyskano wartości tego parametru wynoszące 0,995. Żeby jednak badanie genetyczne było wiarygodne i dawało pewność na poziomie 99%, nie wystarczy przeprowadzenie analizy jednego locus. Tylko analiza dostatecznie dużej liczby sekwencji mikrosatelitarnych pozwala na ustalenie unikalnego profilu genetycznego dla każdego zwierzęcia (9). Dlatego też, analizując jednocześnie 8-10 różnych markerów mikrosatelitarnych, prawdopodobieństwo popełnienia błędu szacuje się na poziomie bliskim zeru.

Rozwój wiedzy o polimorfizmie i lokalizacji sekwencji mikrosatelitarnych w genomie psa okazuje się również bardzo przydatny w odniesieniu do innych gatunków z rodziny psowatych, np. lisów pospolitych i lisów polarnych (5). Szacowane prawdopodobieństwo wykrycia nieprawidłowego pochodzenia na podstawie dziewięciu loci mikrosatelitarnych psa wynosiło 0,99 (6). Natomiast gdy tych samych sekwencji starterowych użyto w badaniach lisa pospolitego i polarnego, otrzymano współczynnik wykluczenia dla lisa pospolitego 0,98 (4) oraz 0,99 dla lisa polarnego (5).

Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG) zaleca przeprowadzanie rutynowej kontroli

pochodzenia na podstawie wybranego zestawu sekwencji mikrosatelitarnych i ocenę wybranych mikrosatelitów w badaniu populacji zwierząt. Tego rodzaju badania dotyczą różnych gatunków zwierząt w Polsce: bydła, koni, owiec i psów (9).

Celem przeprowadzonych badań była ocena przydatności 10 par sekwencji starterowych wchodzących w skład komercyjnego zestawu StockMarks® for Dogs Canine Genotyping Kit firmy Applied Biosystems do identyfikacji osobniczej zwierząt gospodarskich z rodziny *Canidae*, ponadto wskazanie na ewentualne zastosowanie go do kontroli pochodzenia zwierząt.

### Materiał i metody

Materiał do badań pochodził z dwóch ferm zwierząt futerkowych położonych w południowo-wschodniej Polsce. Badaniami objęto po 30 zwierząt należących do trzech gatunków: lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*), lisa polarnego (*Alopex lagopus*) oraz jenota (*Nyctereutes procyonoides*).

Po uzyskaniu przez zwierzęta pełnej dojrzałości zimowej okrywy włosowej, tj. na przełomie listopada i grudnia, pobrano od nich krew do sterylnych probówek podciśnieniowych z antykoagulantem EDTA z żyły dostopowej. DNA izolowane było z krwi pełnej za pomocą zestawu do izolacji materiału genetycznego QIAamp DNA Blood Mini Kit. Na bazie wyizolowanego genomowego DNA przeprowadzono amplifikację wybranych sekwencji metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) przy użyciu fluorescencyjnie znakowanych starterów. Do sporządzenia mieszaniny reakcyjnej użyto następujących komponentów wchodzących w skład zestawu Stock Marks: H<sub>2</sub>O – 1,9 µl, bufor PCR Stock Marks 1,4 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> – 0,36 µl, dNTP – 2,2 µl, startery – 2,8 µl, polimeraza Tag Gold – 0,36 µl, genomowe DNA 1 µl.

Reakcję PCR przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o całkowitej objętości 10 µl przy zastosowaniu odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego składającego się z: denaturacji wstępnej (95°C, 10 min.); 20 cykli: denaturacji (95°C, 30 s.), przyłączania (58°C, 30 s.) oraz wydłużania starterów (72°C, 1 min.); 15 cykli: denaturacji (95°C, 30 s.),

przyłączenia (56°C, 30 s.) oraz wydłużania starterów (72°C, 1 min.) końcowego wydłużania starterów (72°C, 30 min.) oraz chłodzenia do temp. 4°C. W skład zestawu wchodzi sekwencje: PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, FHC2079 (tab. 1). Każdy z badanych gatunków był porównywany do psa domowego (*Canis familiaris*). Uzyskane produkty PCR poddawano rozdzielności elektroforetycznej w analizatorze genetycznym ABI Prism 3100 Avant, a następnie analizowano przy użyciu programu komputerowego Gene Mapper™ v. 3.5. Dla wszystkich *loci* mikrosatelitarnych obliczono częstość (frekwencję) alleli oraz indeks stopnia polimorfizmu (PIC) oraz heterozygotyczność obserwowaną (HET). Wszystkie obliczenia wykonano z wykorzystaniem pakietu statystycznego SAS – moduł SAS/Genetics™ 9.1.3.

### Wyniki i omówienie

U wymienionych zwierząt badano 10 *loci* mikrosatelitarnych, dla których scharakteryzowano w sumie 107 alleli (tab. 2). Frekwencja alleli u poszczególnych gatunków była następująca: 43 allele u lisa polarnego, 30 alleli u lisa pospolitego i 34 allele u jenota. Liczba alleli w poszczególnych *loci* wykazywała duże wahania u każdego z badanych gatunków

Tab. 2. Wielkość i frekwencja alleli w 10 *loci* mikrosatelitarnych w genomach lisa polarnego, lisa pospolitego i jenota

Locus	Liczbnosci alleli								
	Lis polarny			Lis pospolity			Jenot		
	Wielkość allelu (pz)	Allel	Frekwencja	Wielkość allelu (pz)	Allel	Frekwencja	Wielkość allelu (pz)	Allel	Frekwencja
FHC2010	425	A	0,4500	216	A	0,0789	216	A	0,1000
	429	B	0,2000	220	B	0,7368	220	B	0,8667
	433	C	0,3500	224	C	0,1053	228	C	0,0333
				228	D	0,0789			
FHC2054	228	A	0,7143	184	A	0,3182	161	A	0,7273
	232	B	0,2857	188	B	0,6818	173	B	0,2727
FHC2079	250	A	0,3158	247	A	0,0556	361	A	0,7500
	254	B	0,1316	251	B	0,8333	365	B	0,0417
	258	C	0,1316	255	C	0,1111	381	C	0,2083
	262	D	0,0263						
	266	E	0,0263						
	274	F	0,3158						
PEZ1	170	A	0,6389	139	A	1,0000	141	A	0,0333
	174	B	0,1389				145	B	0,5333
	178	C	0,0556				149	C	0,4000
	182	D	0,1667				153	D	0,0333
PEZ12	250	A	0,3750	248	A	0,5263	362	A	0,4583
	254	B	0,1250	256	B	0,4737	378	B	0,0833
	258	C	0,1250				382	C	0,4583
	262	D	0,0500						
	266	E	0,0250						
	274	F	0,2500						
PEZ20	170	A	0,6176	216	A	0,0789	216	A	0,1000
	174	B	0,1176	220	B	0,7632	220	B	0,8667
	178	C	0,0882	224	C	0,1053	228	C	0,0333
	182	D	0,1765	228	D	0,0526			
PEZ3	104	A	0,0263	104	A	0,2500	110	A	0,1333
	107	B	0,0263	107	B	0,3056	116	B	0,0667
	110	C	0,1579	110	C	0,3889	119	C	0,6333
	113	D	0,3684	113	D	0,0556	122	D	0,0333
	116	E	0,1316				125	E	0,1333
	119	F	0,2895						
PEZ5	97	A	0,5250	97	A	0,2000	161	A	0,4333
	101	B	0,0500	105	B	0,2500	173	B	0,3333
	105	C	0,1250	109	C	0,5500	189	C	0,2333
	109	D	0,3000						
PEZ6	169	A	0,5588	164	A	0,5000	161	A	0,5357
	181	B	0,0588	168	B	0,5000	173	B	0,2500
	185	C	0,3824				189	C	0,2143
PEZ8	234	A	0,3500	182	A	0,0714	198	A	0,3333
	238	B	0,1250	186	B	0,1071	206	B	0,2000
	242	C	0,5250	194	C	0,1429	210	C	0,2000
				198	D	0,2143	214	D	0,1333
				210	E	0,4643	218	E	0,1333

psowatych. Najwięcej alleli odnotowano w populacji lisa polarnego w *locus* FHC2054 i PEZ12 (po 7 alleli), a najmniej w *locus* FHC2054 (2 allele). U lisa pospolitego liczba alleli zawierała się w przedziale od 1 w *locus* PEZ1 do 5 w *locus* PEZ8. Natomiast w populacji jenota 2 allele odnotowano w *locus* FHC2054, a 5 alleli w *locus* PEZ8. Średnia liczba alleli dla każdego z analizowanych *loci* wynosiła, odpowiednio: 4,3 dla lisa polarnego, 3,0 dla lisa pospolitego, 3,4 dla jenota. Łącznie dla wszystkich badanych gatunków otrzymano średnio 10,7 alleli w każdym *locus*.

Spośród 107 zidentyfikowanych alleli należących do 10 sekwencji mikrosatelitarnych, 1 allel o długości 110 pz należący do *locus* PEZ3 był wspólny dla trzech gatunków.

Liczba i wielkość alleli w poszczególnych *loci* wykazywały duże zróżnicowanie między lisem polarnym, lisem pospolitym i jenotem. Tylko sekwencja PEZ3 miała podobne wielkości alleli dla wszystkich 3 badanych gatunków, natomiast pozostałe *loci* charakteryzowały się zróżnicowanymi długościami. Liczba zidentyfikowanych alleli w zależności od *locus* przyjmowała wartości od jeden w *locus* PEZ1 u lisa pospolitego do siedem w *locus* FHC2079 i PEZ12 u lisa polarnego.

DeNise i wsp. (2) analizowali 17 markerów mikrosatelitarnych u różnych ras psów z czego 9 markerów było takich samych jak te, które wykorzystano do niniejszych badań. Liczba alleli, jaką uzyskali dla poszczególnych sekwencji mikrosatelitarnych była zdecydowanie większa od liczby alleli uzyskanych dla poszczególnych badanych sekwencji. Przykładowo, w *locus* PEZ6 zidentyfikowali 22 allele, FHC2054: 12 alleli, a w *locus* PEZ12: 24 allele, wówczas gdy liczba alleli dla tych samych sekwencji w przeprowadzonych badaniach wynosiła w *locus* PEZ6: 3 u lisa polarnego, 2 u lisa pospolitego i 3 u jenota, w *locus* FHC2054: 7 u lisa polarnego, 2 u lisa pospolitego i 3 u jenota, w *locus* PEZ12: po 2 allele u wszystkich 3 gatunków. Tak duża różnica wynikać może z tego, że startery te skonstruowane zostały do amplifikacji w genomie psa. Pomimo przynależności do tej samej rodziny psowatych istnieją jednak dość duże różnice pomiędzy zwierzętami z tej grupy.

U lisa pospolitego *locus* PEZ1 był monomorficzny. Według Ellegren i wsp. (3), allel w monomorficznych *loci* jest najkrótszy w porównaniu z długościami alleli dla tego samego *locus* u gatunków pokrewnych. W przypadku *locus* PEZ1 długość allelu wynosiła 139 pz, co w porównaniu z allelami tego samego *locus* u lisa polarnego (170-182 pz) potwierdza powyższe stwierdzenie. Jednak porównując tę długość z długościami, jakie uzyskano u jenota dla tego *locus* (141-153 pz) należy zaznaczyć, że istniejąca różnica nie była aż tak duża.

W analizowanych *loci* stwierdzono zróżnicowaną liczbę alleli u badanych gatunków (np. u lisa polarnego w *locus* FHC2079 i PEZ12 – po 7 alleli, a u lisa pospolitego w *locus* PEZ1 – 1 allel).

Analiza 10 sekwencji mikrosatelitarnych wykazała tylko 1 allel w *locus* PEZ3 o długości 110 pz wspólny dla trzech badanych gatunków zwierząt. Największa różnica w rozkładzie częstości alleli wystąpiła w *locus* FHC2010 pomiędzy lisem polarnym a lisem pospolitym i jenotem.

Wśród wszystkich analizowanych markerów dla 3 populacji zwierząt za wysoko informatywne (PIC > 0,5) można uznać 15 *loci*, 8 *loci* u lisa polarnego (FHC2079, PEZ1, PEZ12, PEZ20, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8), 3 *loci* u lisa pospolitego (PEZ3, PEZ5, PEZ8) i 4 *loci* u jenota (PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8). Współczynnik heterozygotyczności przyjmował wartości wyższe niż 0,5 w przypadku 19 sekwencji mikrosatelitarnych, z czego 9 u lisa polarnego (FHC2079, FHC2010, PEZ1, PEZ12, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8, PEZ20), 4 u lisa pospolitego (FHC2010, PEZ3, PEZ6, PEZ8), a 6 u jenota (FHC2079, PEZ1, PEZ12, PEZ3, PEZ5, PEZ8), natomiast dla pozostałych sekwencji przyjmował wartości niższe.

## Podsumowanie

Analizowane sekwencje mikrosatelitarne (FHC2010, FHC2054, FHC2079, PEZ1, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ5, PEZ6, PEZ8) w populacji lisa polarnego, lisa pospolitego i jenota wykazują się wysokim stopniem polimorfizmu i dużą przydatnością większości badanych *loci* mikrosatelitarnych do kontroli pochodzenia zwierząt i identyfikacji osobników na fermach lisów i jenotów.

## Piśmiennictwo

1. Butler J. M.: Forensic DNA typing. Biology, technology and genetics of STR markers, 2<sup>nd</sup> ed., Elsevier Academic Press, Burlington, USA 2005.
2. DeNise S., Johnston E., Halverson J., Marshall K., Rosenfeld D. S., McKenna S., Sharp T., Edwards J.: Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. Anim. Genetics 2004, 35, 14-17.
3. Ellegren H., Chowdhary B. P., Fredholm M., Hoyheim B., Johansson M., Brauner Nielsen P. B., Thomsen P. D., Andersson L.: A physically anchored linkage map of pig chromosome 1 uncovers sex- and position-specific recombination rates. Genomics 1994, 24, 342-350.
4. Klukowska J., Jankowski T., Światoński M.: Polimorfizm wybranych sekwencji mikrosatelitarnych i ocena ich przydatności do kontroli pochodzenia w sześciu rasach psów. Medycyna Wet. 2001, 57, 567-570.
5. Klukowska J., Strabel T., Światoński M.: Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. J. Anim. Breed. Genet. 2003, 120, 88-94.
6. Koskinen M. T., Bredbacka P.: A convenient and efficient microsatellite-based assay for resolving parentages in dogs. Anim. Genet. 1999, 30, 148-149.
7. Lingaas F., Aarskaug T., Gerlach J. A., Juneja R. K., Fredholm M., Sampson J., Suter N., Holmes N. G., Binns M. M., Ryder E. J., Van Haeringen W. A., Venta P. J., Brouillette J. A., Yuzbasiyan-Gurkan V., Wilton A. N., Bredbacka P., Koskinen M., Dunner S., Parra D., Schmutz S., Schelling C., Schläpfer J., Dolf G.: A canine linkage map: 39 linkage groups. J. Anim. Breed. Genet. 2001, 118, 3-19.
8. Neff M. W., Broman K. W., Mellersh C. S., Ray K., Acland G. M., Aguirre G. D., Ziegler J. S., Ostrander E. A., Rine J.: A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. Genetics. 1999, 151, 803-820.
9. Radko A.: Markery DNA w kontroli pochodzenia psów. Przeg. Hod. 2001, 10, 23-24.
10. Radko A.: Microsatellite DNA markers in cattle parentage control. Medycyna Wet. 2000, 56, 376-378.
11. Werner P., Mellersh C. S., Raducha M. G., DeRose S., Acland G. M., Prociuk U., Wiegand N., Aguirre G. D., Henthorn P. S., Patterson D. F., Ostrander E. A.: Anchoring of canine linkage groups with chromosome-specific markers. Mamm Genome 1999, 10, 814-823.