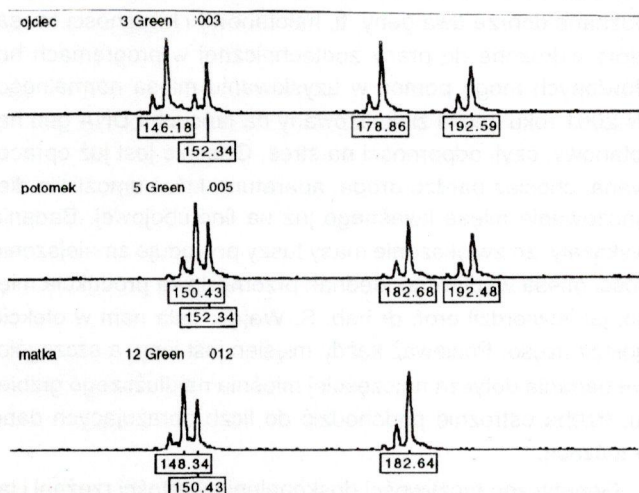


# Markery DNA w kontroli pochodzenia psów

Anna Radko

IZ w Krakowie

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. U organizmów eukariotycznych sekwencje nukleotydów kodujące określone aminokwasy nie są ciągłym odcinkiem biegnącym nieprzerwanie wzdłuż cząsteczki DNA, lecz są podzielone segmentami sekwencji niekodujących. Odcinki kodujące genu zwane są eksonami, zaś niekodujące – intronami. Biologiczne znaczenie prawie 70% sekwencji DNA jest dotychczas niejasne. Sekwencje kodujące białka stanowią jedynie 3% całego genomu, natomiast introny, których funkcja biologiczna jest jeszcze nie wyjaśniona, stanowią nawet do 20-30% powtarzających się sekwencji. Najwyższym polimorfizmem odznaczają się tandemowe powtórzenia DNA, gdzie powtarzające się motywy nukleotydów są ułożone obok siebie i tworzą jedną całość – do tej grupy zaliczamy powtórzenia mini- i mikrosatelitarne. Analiza tych sekwencji stała się możliwa dzięki szybkiemu rozwojowi biologii molekularnej, a zwłaszcza jej metod badawczych. Nastąpił dynamiczny rozwój technik hybrydyzacji, w których wykorzystuje się znakowane radioizotopowo, a ostatnio fluorescencyjnie, sondy molekularne do wykrycia fragmentów DNA przez ich hybrydyzację. Poznano właściwości enzymów restrykcyjnych, mających zdolność rozpoznawania charakterystycznych sekwencji i przecinania ich w obrębie podwójnej nici DNA oraz opracowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR – polymerase chain reaction), która pozwala na zwielokrotnienie nawet pojedynczej kopii danego fragmentu DNA.



Rys. 1. Przykładowa analiza genotypów, na podstawie 2 sekwencji mikrosatelitarnych DNA, w programie Genotyper

Wymienione metody oraz inne techniki służące bezpośredniemu badaniu kwasów nukleinowych umożliwiły wykorzystanie polimorfizmu powtórzeń mini- i mikrosatelitarnych, jako nowych markerów genetycznych stosowanych w kontroli pochodzenia. Ich główną zaletą jest występowanie w populacji kilku lub nawet kilkunastu różnych alleli tego samego markera różniących się liczbą powtórzeń danego motywu, a zatem i długością. Taki wysoki stopień polimorfizmu sekwencji DNA można wyjaśnić nagromadzeniem w czasie ewolucji licznych mutacji, najczęściej pojedynczych zmian sekwencji nukleotydów występujących przeważnie w intronach. Ponieważ są to obszary nie kodujące, mutacje te nie znajdują odbicia w fenotypie i nie podlegają selekcji.

## Sekwencje minisatelitarne DNA

Minisatelity opisane jako tandemowe, powtarzające się elementy o motywie złożonym z 9-80 par zasad do ponad 20 tysięcy par zasad [3], znane są również pod nazwą VNTR (variable number of tandem repeats – zmienna liczba tandemowych powtórzeń). Duża zmienność VNTR polega przede wszystkim na różnej liczbie powtórzeń danego motywu w określonym locus [4].

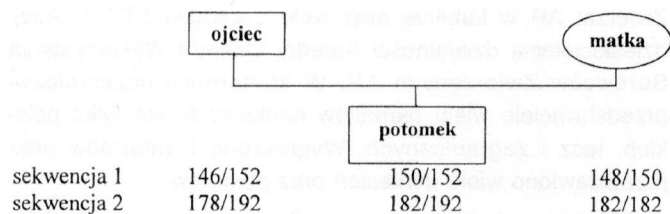
Analizę sekwencji minisatelitarnych przeprowadza się przy pomocy hybrydyzacji (sondowania) strawionego enzymem restrykcyjnym i rozdzielonego elektroforetycznie na żelu agarozowym fragmentu DNA. Położenie fragmentów oznakowanych sondą ustala się przy użyciu autoradiografii, reakcji barwnych lub fluorescencji, w zależności od typu oznakowania sondy. Markery minisatelitarne mogą być również wykrywane techniką PCR przez zwielokrotnienie, określonego starterami, badanego odcinka minisatelitarnego. Punkty amplifikacji cięte są enzymem restrykcyjnym, a następnie poddawane elektroforezie na żelu agarozowym.

Analiza kilku takich loci dla danego osobnika – technikami hybrydyzacji bądź z zastosowaniem metody PCR – pozwala uzyskać charakterystyczny dla niego elektroforetyczny obraz prążków na żelu, określanymi jako „genetyczny odcisk palca” (fingerprint).

Liczba dotychczas odkrytych i scharakteryzowanych sekwencji minisatelitarnych jest zbyt mała, co ogranicza ich wykorzystanie w praktyce.

## Sekwencje mikrosatelitarne DNA

Sekwencje mikrosatelitarne, zwane potocznie mikrosatelitami, występują z dużą częstością w genomach eukariotów i są rozmieszczone dość równomiernie. Zawierają one od 10-15 powtórzeń motywu o długości od 1 do 6 par zasad; przeważ-



Rys. 2. Dziedziczenie sekwencji mikrosatelitarnych DNA. Potomkowie, zgodnie z prawem Mendla, otrzymują po jednym allelu od ojca i matki

nie długość całego odcinka wynosi średnio od 60 do 200 par zasad. Mikrosatelity mogą występować jako ciągłe powtórzenia, np. (AGAT) $n$  lub w formie przedzielonej krótkimi, kilkunukleotydowymi wstawkami, np. (AGC) $n$ TGT(AGC) $n$ . Wyróżnia się też mikrosatelity złożone z kilku powtarzających się motywów następujących po sobie – (AT) $n$ (GC) $n$ (AT) $n$  [2].

Analizę mikrosatelitów wykonywano technikami hybrydyzacji, gdzie produkty PCR po elektroforezie przenoszono na filtry nylonowe i hybrydowano ze znaczonej radioaktywnie starterami użytymi w czasie amplifikacji. Obecnie do badania markerów mikrosatelitarnych wykorzystuje się automatyczne sekwenatory DNA z odpowiednim oprogramowaniem. Startery stosowane w reakcji PCR są znakowane fluorescencyjnie, czterema barwnikami, co umożliwia wykrycie jednocześnie kilkunastu markerów w jednej ścieżce żelu poliakrylamidowego. Do odczytu rozdziału elektroforetycznego używane są czytniki laserowe, co eliminuje etap hybrydyzacji i pozwala na bezpośredni odczyt wyników oraz zachowanie danych w pamięci komputera (rys. 1). Sposób dziedziczenia dwóch sekwencji mikrosatelitarnych przedstawiono na rysunku 2.

Sekwencje mikrosatelitarne stały się w ostatnich latach najliczniejszą grupą markerów DNA stosowanych zarówno w badaniach teoretycznych, jak i bezpośrednio związanych z hodowlą zwierząt. U psów mikrosatelity są wykorzystywane do charakterystyki struktury genetycznej różnych ras psów, do mapowania genów psa (w 1993 roku powstał międzynarodowy program mapowania genomu psa – DogMap) oraz do kon-

troli pochodzenia i identyfikacji osobników. Wciąż wzrastająca liczba zidentyfikowanych markerów mikrosatelitarnych, dzięki pracom nad badaniem genomu psa, daje możliwość prowadzenia precyzyjnej kontroli pochodzenia. Dotychczas w genomie psa zidentyfikowano około 500 sekwencji mikrosatelitarnych DNA. Przeprowadzenie analizy kilku loci mikrosatelitarnych przy zastosowaniu reakcji PCR typu multiplex (gdzie w mieszaninie reakcyjnej znajduje się kilka par starterów, dzięki czemu jednocześnie zachodzi powielenie kilku loci), zapewnia dostateczną liczbę informacji, by potwierdzić lub wykluczyć ojcostwo czy zidentyfikować danego osobnika.

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% [1]. Tak wysoka skuteczność w ustaleniu genotypu oraz duża ilość zidentyfikowanych dotychczas markerów mikrosatelitarnych u psów, a także stosunkowo prosta i szybka metoda ich analizy, przy użyciu automatycznych sekwenatorów, spowodowała, że są one coraz częściej wykorzystywane w kontroli pochodzenia oraz identyfikacji zwierząt.

**Literatura:** 1. Fredholm M., Wintero A.K.: Anim. Genet. 27, 19-23, 1996. 2. Hirano T., Nakane S., Mizoshita K., Yamakuchi H., Inoue-Murayama M., Watanabe T., Barandse W., Sugimoto Y.: Anim. Genet. 27, 365-368, 1996. 3. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.W.: Nature 314, 67-73, 1985. 4. Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., Kanamori M., White R.: Am. J. Hum. Genet. 43, 854-859, 1988.

## Genetyczne i środowiskowe możliwości dostosowania wartości rzeźnej i jakości mięsa zwierząt do wymagań konsumentów

Na ten temat odbyła się 13 i 14 września br. konferencja naukowa, zorganizowana przez Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt AR w Lublinie oraz Koło Lubelskie PTZ z okazji dziesięciolecia działalności Katedry Oceny i Wykorzystania Surowców Zwierzęcych AR. W konferencji uczestniczyli przedstawiciele wielu ośrodków naukowych, nie tylko polskich, lecz i zagranicznych. Wygłoszono 5 referatów oraz przedstawiono wiele doniesień oraz posterów.

Referat wprowadzający pt. „Zwierzęta rzeźne dawniej i dziś” przedstawił prof. dr hab. E. Prost z AR w Lublinie. Niezwykle interesujący rys historyczny pozwolił nam uzmysłwić sobie, jak różne były zależności człowieka i zwierząt. Człowiek udomawiając zwierzęta zapewniał sobie pożywienie

i skóry, przeznaczone na okrycia, jednak świadoma hodowla zaczęła się dynamicznie rozwijać dopiero w XX wieku. Sposoby uboju zwierząt były wręcz drastyczne. Pierwsze przepisy o uboju humanitarnym wprowadziła Szwajcaria w 1896 r., a pierwsza ustawa o obowiązkowym badaniu zwierząt rzeźnych została wprowadzona przez Prusy w roku 1900. W Polsce pierwsza ustawa o badaniu zwierząt została ogłoszona w roku 1928.

Wykorzystanie osiągnięć genetyki molekularnej w doskonaleniu wieprzowiny przedstawiła prof. dr hab. M. Koćwin-Podsiadła z AP w Siedlcach. Na obecnym etapie wiedzy są poznane dobrze dwa geny, tj. halotanowy i kwaśności mięsa, które wdrożone do pracy zootechnicznej w programach hodowlanych mogą pomóc w uzyskiwaniu mięsa normalnego. W 2001 roku został zlokalizowany na łańcuchu DNA gen halotanowy, czyli odporności na stres. Obecnie jest już opracowana, chociaż bardzo droga, aparatura, która umożliwia diagnozowanie mięsa kwaśnego już na linii ubojowej. Badania wykazały, że zwiększenie masy tuszy powoduje zmniejszenie ilości mięsa wadliwego. Jednak przemysłowa produkcja mięsa, jak stwierdził prof. dr hab. S. Wajda, dała nam w efekcie gorsze mięso. Ponieważ każdy mięsień jest inny, a szczególnie badania dotyczą najczęściej mięśnia najdłuższego grzbietu, trzeba ostrożnie podchodzić do liczb obrazujących dane o tuszach.

Genetyczne możliwości doskonalenia wartości rzeźnej i jakości mięsa bydła były tematem referatu prof. dr hab. Z. Litwińczuka i prof. dr hab. A. Litwińczuk z AR w Lublinie. Na świecie bydło jest wykorzystywane głównie w kierunku mięs-