

THE ESTIMATION OF VARIABILITY IN SELECTED SNPs AND OPTION OF THEIR UTILIZATION FOR PARENTAGE TESTING IN DOGS

HODNOCENÍ VARIABILITY VYBRANÝCH SNPs S OHLEDEM NA JEJICH VYUŽITÍ PRO TESTY PARENTITY U PSŮ

Horák, P., Dvořák, J.

Ústav genetiky, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,
Zemědělská 1, 613 00 Brno

E-mail: xhorak02@node.mendelu.cz

ABSTRACT

The parentage verification and identification of individuals are the most common exercises of molecular-genetic methods in animal breeding. The aim of my research was an assessment of variability in selected single nucleotide polymorphisms and evaluation of their suitability for parentage verification in dogs. Three canine SNPs have been studied: the A→ G substitution in the transducin- γ gene (*GNGT1*), the A→ G substitution in the melanocortin 1 receptor gene and the proline deletion in tyrosine-related protein 1 gene (*TYRPI*). The investigated sample population consisted of English Cocker Spaniel and Poodle breeds. In the *GNGT1* gene, only the allele *A* was detected. Similarly, very low variability was observed both in the *MC1R* gene and in the *TYRPI* gene. Therefore, the studied SNPs seem not to be suitable for parentage verification in dogs.

Keywords: dog, *SNP*, the *GNGT1* gene, the *MC1R* gene, the *TYRPI* gene

ABSTRAKT

Metody molekulární genetiky nacházejí v chovatelské praxi uplatnění zejména při ověřování rodičovství a individuální identifikaci jedinců. Cílem práce bylo stanovení variability vybraných jednonukleotidových polymorfismů u psů a vyhodnocení jejich vhodnosti pro ověřování rodičovství. U jedinců plemen anglický kokršpaněl a pudl byly sledovány následující SNPs: A→ G substituce v genu transducinu γ (*GNGT1*), A→ G substituce v genu melanocortin receptoru 1 (*MC1R*) a delece prolinu v genu tyrosine-related proteinu 1 (*TYRPI*). Gen *GNGT1* byl ve zkoumané populaci monomorfní pro alelu *A*. Velmi nízká variabilita byla také zjištěna ve zbývajících dvou lokusech – genu *MC1R* a *TYRPI*. Výsledky tedy naznačují, že ani jeden ze zkoumaných polymorfismů není vhodný pro zařazení do panelu SNPs pro ověřování rodičovství u psů.

Klíčová slova: pes, *SNP*, gen *GNGT1*, gen *MC1R*, gen *TYRPI*

ÚVOD

Překotný vývoj metod molekulární genetiky se sebou přináší možnost jejich aplikace v nových oblastech. Dříve hojně používané (ale z nějakého důvodu nevyhovující- pracnost, přesnost, finanční náročnost) metodiky jsou tak postupně vytlačovány a nahrazovány novými.

V prvopočátku bylo ověřování původu u psů prováděno na základě detekce polymorfních krevních bílkovin. Tento přístup však nevyhovoval pro svou pracnost a nízkou vypovídací schopnost. Byl tedy postupně nahrazen genotypizací mikrosatelitních sekvencí – neboli zkráceně mikrosatelitů (MS). Tyto nekódující úseky DNA se zdály být pro uvedený účel téměř ideální – vykazují vysokou míru polymorfismu, jejich detekce není manuálně náročná apod. V současné době je detekce mikrosatelitů využívána drtivou většinou všech institucí provádějících ověřování rodičovství. Bohužel však nebylo dosaženo mezinárodní dohody mezi jednotlivými laboratořemi, chovatelskými kluby a kynologickými organizacemi ve smyslu sjednocení používané metodiky. Např. International Society for Animal Genetics (*ISAG, 2004*) uznává tři různé panely mikrosatelitů (celkem 29 lokusů). Naopak American Kennel Club využívá 13 mikrosatelitních lokusů (*DeNise, S. et al., 2004*). Výsledky získané jednotlivými laboratořemi tak nejsou vzájemně přenositelné. Nejen proto je snaha nalézt novou metodiku vyznačující se vysokou přesností, bezproblémovou reprodukovatelností, automatizovanou genotypizací, která by byla přijímána a využívána napříč různými laboratořemi a chovatelskými organizacemi. Jako velmi nadějně se z tohoto pohledu jeví využití jednonukleotidových polymorfismů DNA tzv. SNP (Single Nucleotide Polymorphisms).

Podstatou vzniku SNPs je změna sekvence DNA vznikající delecí, substitucí, inverzí nebo inzercí jednoho nukleotidu. Tyto záměny se vyskytují v kódujících i nekódujících částech savčího genomu s četností 1 SNP na každých 50-500 bp.

Uvažuje se, že pro testaci parentity a individuální identifikaci jedinců bude prováděna automatizovaná (např. microarray) detekce panelu cca 40 –50 jednonukleotidových polymorfismů. Při sestavování uvedeného panelu SNPs je třeba především zohlednit umístění jednotlivých lokusů na odlišných chromozomech, jejich obdobnou variabilitu v různých populacích, selekční neutralitu, vyrovnanou četnost alel atd..

Cílem naší práce bylo na základě literárních údajů vybrat vhodné jednonukleotidové polymorfismy a na referenčním souboru zvířat ověřit jejich variabilitu u různých plemen psů.

Pro počáteční fázi práce jsme zvolili následující tři SNPs:

- 1) A → G substituci v genu transducinu γ (*GNGT1*)
- 2) A → G substituci v genu melanocortin receptoru 1 (*MC1R*)
- 3) delecii prolinu v genu tyrosine-related proteinu 1 (*TYRPI*)

MATERIÁL A METODIKA

Referenční populace byla tvořena celkem 11 jedinci následujících plemen – pudl (6 jedinců) a anglický kokršpaněl (5 jedinců).

Pro amplifikaci specifických úseků jednotlivých genů pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) bylo použito následujících primerů:

- 1) gen *GNGT1* (Wang et al., 1997):

F 5'-GAT GAC CAA AAA TTA GTA CTG TC - 3'

R 5'-GTC TCC AAA TGT TGT GAA GAA GT- 3'

- 2) gen *MC1R* (Schmutz et al., 2001)

F 5'-GGA GGT GTC CAT CTC TGA CGG- 3'

R 5'-CCG GGC CAG CAT GTG GAC GTA- 3'

- 3) gen *TYRPI* (Schmutz et al., 2002)

F 5'-ACC AAT GGT GCA ACG TCT TCC TGA ACC G -3'

R 5'-GCC TTC CAC TGT GTT TCG GAA ACT G-3'

PCR byla prováděna na teplotním cykleru PTC-100TM (fy MJ Research. Inc.). Složení reakční směsi bylo následující:

- 1) gen *GNGT1* (celk. objem 25 μ l) - 3 μ l lyzátu DNA, 7,87 μ l dest. H₂O, 2,5 μ l 10 x PCR Buffer (bez MgCl₂), 0,5 μ l dNTP (10 mM), po 1 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,13 μ l *Taq* DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l) a 2 μ l MgCl₂ (25 mM).
- 2) gen *MC1R* (celk. objem 15 μ l) - 1 μ l lyzátu DNA, 6 μ l dest. H₂O, 1,5 μ l 10 x LA PCR Buffer, 0,3 μ l dNTP (10 mM), po 1 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,2 μ l LA DNA Polymerases Mix (5 U/ μ l)
- 3) gen *TYRPI* (celk. objem 15 μ l) - 1 μ l lyzátu DNA, 5,2 μ l dest. H₂O, 1,5 μ l 10 x PCR Buffer (bez MgCl₂), 0,3 μ l dNTP (10 mM), po 1 μ l obou primerů (10 pmol/ μ l), 0,1 μ l *Taq* DNA Polymerase recombinant (5 U/ μ l) a 0,9 μ l MgCl₂ (25 mM)

Teplotní profil PCR byl dodržen přesně dle původních metodik jednotlivých autorů:

- 1) gen *GNGT1* (Wang et al., 1997): počáteční denaturace 94 °C / 3 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 1 min., annealing 56 °C / min, elongace 72 °C / 1 min., závěrečná elongace 70 °C / 10 min.
- 2) gen *MC1R* (Schmutz et al., 2001): počáteční denaturace 94 °C / 3 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 15 s, annealing 62 °C / 45 s, elongace 72 °C / 30 s, závěrečná elongace 72 °C / 4 min.
- 3) gen *TYRPI* (Schmutz et al., 2002): počáteční denaturace 94 °C / 4 min., 30 cyklů - denaturace 94 °C / 50 s, annealing 57 °C / 50 s, elongace 72 °C / 50 s, závěrečná elongace 72 °C / 4 min.

Štěpení jednotlivých PCR-produktů příslušnými restričními endonukleázami probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 3 hod. při níže uvedeném složení restriční směsi:

- 1) gen *GNGT1*: 10 µl PCR-produktu, 3,3 µl dest. H₂O, 1,5 µl pufru NEB2, 0,2 µl restriční endonukleázy *XmnI*
- 2) gen *MC1R* : 5 µl PCR-produktu, 3,6 µl dest. H₂O, 1 µl pufru Y⁺/Tango, 0,4 µl restriční endonukleázy *Hin6I*
- 3) gen *TYRPI*: 5 µl PCR-produktu, 3,7 µl dest. H₂O, 1 µl pufru G⁺, 0,3 µl restriční endonukleázy *MnII*

Separace štěpených PCR-produktů probíhala na agarosovém gelu a jednotlivé alely resp. genotypy byly odečítány dle následujícího klíče:

- 1) gen *GNGT1*: 3 % agarosový gel, 181 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 138 bp a 51 bp (alela *B*) či zůstává neštěpen (alela *A*)
- 2) gen *MC1R* : 4,5 % agarosový gel, 545 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 313 bp, 194 bp a 38 bp (alela *A*) nebo na fragmenty 217 bp, 194 bp, 96 bp a 38 bp (alela *B*)
- 3) gen *TYRPI*: 4 % agarosový gel, 121 bp dlouhý PCR – produkt je štěpen na fragmenty 73 bp a 48 bp (alela *N*) či zůstává neštěpen (alela *D*)

VÝSLEDKY A DISKUSE

Souhrn získaných výsledků je uveden v Tab. 1. Gen *GNGT1* byl ve sledované populaci zvířat monomorfní pro alelu *A*, což koresponduje s výsledky Wang et al. (1997), kteří také uvádějí velmi vysoké zastoupení (0,906) alely *A*. Je tedy možno předpokládat, že i při zařazení většího počtu jedinců do referenčního souboru zůstane frekvence alely *B* minimální.

V genech *MC1R* a *TYRP1* byly u sledovaných jedinců zachyceny obě alternující alely, i když frekvence výskytu mutované alely byla v obou uvedených případech velice nízká (shodně 0,091).

Tab. 1: Frekvence genotypů a alel genů *GNGT1*, *MC1R* a *TYRP1* u sledovaných plemen psů

Lokus	n	Frekvence genotypů			Frekvence alel	
		<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>GNGT1</i>	11	1,0	0	0	1,0	0
<i>MC1R</i>		<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
		0	0,182	0,818	0,091 ± 0,061	0,909 ± 0,061
<i>TYRP1</i>		<i>DD</i>	<i>ND</i>	<i>NN</i>	<i>D</i>	<i>N</i>
		0,091	0	0,909	0,091 ± 0,061	0,909 ± 0,061

ZÁVĚR

Prvotní výsledky naznačují, že ani jeden z vybraných jednonukleotidových polymorfismů nevykazuje dostatečnou míru variability, aby mohlo být uvažováno o jeho využití v panelu SNPs pro individuální identifikaci jedinců a ověřování rodičovství u psů. Uvedený závěr je však nezbytné potvrdit screeningem rozsáhlejší populace zahrnující více jedinců několika plemen.

Výsledky byly získány a publikovány s podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, projekt FRVŠ č. 172/2004 a Grantové agentury České republiky, doktorský projekt č. 523/03/H076.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ISAG, 2004: ISAG recommended species panels for identity and parentage analysis, 2003.
<http://www.isag.org.uk/journal/comparisonguide.asp>

DeNise, S. , Johnston, E., Halverson, J., Marshall, K., Rosenfeld, D., 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. Gen. 35, 2004: 14-17

Schmutz S. M. et al., 2001: An SNP is used to map MC1R to dog chromosome 5. Animal Genetics 32, 43-44.

Schmutz S. M. et al., 2002: *TYRP1* and *MC1R* genotypes and their effect on coat color in dogs. Mammalian Genome 13: 380-387.

Wang W. et al., 1997: PCR/RFLP marker in the canine transducin- γ gene (GNGT1). Animal Genetics 28, 319-320.