

# VERIFICATION AVAILABILITY MICROSATELLITES PANEL FOR PARENTAGE IDENTIFICATION OF DIFFERENT CANINE BREEDS

## OVĚŘENÍ VHODNOSTI VYUŽITÍ PANELU MIKROSATELITŮ PRO URČENÍ PARENTITY VYBRANÝCH PLEMEN PSŮ

**Bryndová M., Knoll A.**

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Faculty of Agronomy, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Czech Republic

E-mail: bryndova.marta@seznam.cz, knoll@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

We tested 124 individuals of different canine breeds (number of 7 Dachshunds, 5 Schnauzers, 12 German Spitzs, 4 Yugoslavian Shepherd Dogs, 6 Rhodesian Ridgebacks, 5 Belgian Shepherds, 64 Bernese Mountain Dogs, 8 Czech fousek, 5 Irish Wolfhounds, 8 Golden Retrievers). They were chosen for determination reliability microsatellites panel of commercial kit StockMarks® for Dogs Canine Genotyping System, firm Applied Biosystems (FHC 2010, FHC 2054, FHC 2059, PEZ 1, PEZ 3, PEZ 5, PEZ 6, PEZ 8, PEZ 12 and PEZ 20). We evaluated statistic values from gained data (Polymorphism information content, Theoretical heterozygosity, Paternity exclusion, Combined exclusion probability). PIC in population ranged from 0 (FHC 2054 and FHC 2079 Golden Retriever and PEZ 6 Belgian Shepherd) to 0,7786 (PEZ 1 Dachshund). Theoretical heterozygosity was from 0 (FHC 2054 and FHC 2079 for Golden Retriever, PEZ 6 for Belgian Shepherd) to 0,7813 (PEZ 1 for German Spitz). The highest CEP was quantified for Dachshund (0,9977, 0,9645, 0,9999), on the other hand the lowest CEP was for Belgian Shepherd (0,8607, 0,6135, 0,9619). Used microsatellite panel is supposed to be high reliable for parentage testing and individual identification these canine breeds.

**Key words:** canine microsatellites, markers, parentage verifying

## ÚVOD

Určení parentity dnes patří mezi běžné metody, které nacházejí široké uplatnění v živočišné říši. V laboratořích se často používají komerčně dodávané kity, které usnadňují jak izolaci DNA tak i vlastní mikrosatelitní analýzu v sekvenátoru. Tyto analýzy se řadí mezi zaběhnuté postupy a poskytují vysoké informační hodnoty a vysokou spolehlivost. I přesto je důležité určit vhodnost použití těchto genetických markerů u jednotlivých plemen psů a v konkrétních populacích.

Hlavním cílem této studie bylo zpracování metodiky pro analýzu 10 ti mikrosatelitů pro určení parentity u psů, odběr vzorků a následná izolace DNA z krve resp. dalších tkání, laboratorní testování vzorků, výpočet frekvence alel a genotypů a skutečné heterozygotnosti u vlastních vzorků a vzorků z databáze LamGen. Dalším úkolem byl výpočet statistických hodnot: polymorfní informační obsah (PIC), teoretická heterozygotnost, pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů; pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li genotyp jednoho z rodičů neznámý a pravděpodobnost vyloučení obou rodičů, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů, diskuze ke spolehlivosti využití uvedené metody a panelu mikrosatelitů, srovnání metod.

## MATERIÁL A METODIKA

Pro pokus byl vybrán soubor zvířat, který obsahoval celkem 124 jedinců. Z toho 7 psů představovalo plemeno jezevčků (J), 5 kníračů (K), 12 německých špiců (NŠ), 4 šarplaninští pastevečtí psi (ŠP), 6 rhodéských ridgebacků (RR), 5 belgických ovčáků (BO), 64 bernských salašnických psů (BSP), 8 českých fousků ČF), 5 irských vlkodavů (IV), 8 zlatých retrívrů (ZR). Většina výsledků otestovaných vzorků byla získána z databáze LamGen Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně. 17 vzorků bylo získáno odběrem z bukální sliznice jedince, byla provedena izolace DNA a následně vlastní určení mikrosatelitů.

Pro izolaci DNA byl použit izolační kit JETQUICK® blood and cell culture dna spin kit od firmy GENOMED (USA). Vyizolovaná DNA byla elektroforeticky ověřena nanesením na 1 % agarózový gel.

PCR reakce byla provedena pomocí termálního cykleru GeneAmp™ PCR System 9700. Pro multiplex PCR byl použit komerční kit StockMarks® for Dogs Canine Genotyping System od firmy Applied Biosystems, USA.

Tab. 1: Složení mastermixu

| <b>Master mix</b>            |   |  |
|------------------------------|---|--|
| <b>Jednotlivé komponenty</b> | <b>Objem (1 vzorek v <math>\mu</math>l)</b> | <b>Objem (17 vzorků v <math>\mu</math>l)</b> |
| StockMarks PCR pufr          | 0,695                                       | 12,51  |
| 25mM MgCl <sub>2</sub>       | 0,18  | 3,24   |
| dNTP mix                     | 1,1   | 19,8   |
| AmpliTag polymeráza          | 0,18  | 25,2   |
| Amplification primer mix     | 1,4   | 3,24   |
| deionizovaná voda            | 0,945                                       | 17,01  |
| Celkový objem ( $\mu$ l)     | 4,5   | 81   |
| <b>DNA</b>                   | 0,5   |  |

Teplotní a časový průběh reakce se skládal z 1 cyklu iniciační denaturace 95°C 10 minut, 20 cyklů (denaturace 95°C 30 sec, annealing 58°C 30 sec, elongace 72°C 60 sec) a závěrečné elongace 72°C 30 minut, 4°C  $\infty$ . Detekováno bylo 10 mikrosatelitů.

Fragmentační analýza proběhla na přístroji ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer. Reakční směs obsahovala 0,5  $\mu$ l GeneScan - 500 ROX Size Standard, 0,5  $\mu$ l PCR produktu a 11,5  $\mu$ l formamidu.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu EXCEL zadáním vzorců pro výpočet polymorfního informačního obsahu, teoretické heterozygotnosti, pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů, pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče, je-li genotyp jednoho z rodičů neznámý, pravděpodobnosti vyloučení obou rodičů, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů, a kombinované pravděpodobnosti vyloučení (KNOLL, 2003).

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Porovnáním molekulárních dat získaných ze souboru 124 jedinců byla získána statistická charakteristika všech 10 ti mikrosatelitů (FHC 2010, FHC 2054, FHC 2059, PEZ 1, PEZ 3, PEZ 5, PEZ 6, PEZ 8, PEZ 12 a PEZ 20), které jsou součástí komerčně dodávaného kitu firmy Applied Biosystems. Hodnocena byla frekvence alel, genotypů, teoretická a pozorovaná heterozygotnost, PIC (polymorfní informační obsah) a CEP (kombinovaná pravděpodobnost vyloučení) u všech plemen (jezevčík, knírač, německý špic, šarplaninský pastevecký pes, rhodéský ridgeback, belgických ovčák, bernský salašnický pes, český fousek, irský vlkodavů, zlatý retrívr).

U některých plemen byly pozorovány alely, které se vyskytly pouze u tohoto konkrétního plemene. Jednalo se o alelu 293 na lokusu FHC 2079 u belgického ovčáka, alelu 144 na lokusu PEZ 3 u českého fouska a alelu 284 na lokusu PEZ 12 u zlatého retrívra. U šarplaninského psa to byla alela 105 (lokus PEZ 3) a alela 288 (lokus PEZ 12), u rhodéského ridgebacka alela 256 (lokus PEZ 12). U plemene jezevčík se objevilo několik jedinečných alel, alela 106 (lokus PEZ 1), alela 273 a 275 (lokus PEZ 12), alela 155 a 163

(lokus PEZ 20). Vysoký počet alel byl také sledován u plemene bernský salašnický pes, alela 196 (lokus PEZ 6), alela 247 (lokus PEZ 8), alela 204 a 300 (lokus PEZ 12) a alela 167 (lokus PEZ 20). Pro upřesnění těchto výsledků by bylo dobré porovnání i s dalšími autory, použitelné informace ovšem v literatuře nebyly nalezeny.

V populaci bylo identifikováno i několik monomorfních lokusů, byl to lokus FHC 2054 (alela 167) a lokus FHC 2079 (alela 273) u zlatého retrívra, PEZ 6 (alela 180) u plemene belgický ovčák. Příčinou mohl být i úzký koeficient příbuznosti, kdy se mohlo jednat o jednu rodinu jedinců, kteří byli homozygotní v tomto lokusu.

Polymorfní informační obsah (PIC) v populaci byl v rozmezí od 0 (FHC 2054 a FHC 2079 plemeno zlatý retrívra a PEZ 6 plemeno belgický ovčák) do 0,7786 (PEZ 1 plemeno jezevčík). Průměrný polymorfní informační obsah se v celé populaci pohyboval od 0,3134 (belgický ovčák) do 0,6195 (německý špic). Pozorovaná heterozygotnost byla pozorována v rozmezí od 0 (FHC 2054 a FHC 2079 plemeno zlatý retrívra, PEZ 6 plemeno belgický ovčák) do 1 (FHC 2010 plemeno belgický ovčák, FHC 2054 plemeno jezevčík, PEZ 1 plemeno jezevčík, německý špic a šarplaninský pes, PEZ 3 plemeno knírač, šarplaninský pes, PEZ 6 plemeno zlatý retrívra, PEZ 12 plemeno šarplaninský pes a PEZ 20 plemeno irský vlkodav).

Teoretická (očekávaná) heterozygotnost se u sledovaných plemen pohybovala od 0 (FHC 2054 a FHC 2079 u zlatého retrívra, PEZ 6 u belgického ovčáka) do 0,7813 (PEZ 1 u německého špice).

Nejvyšší CEP byl spočítán pro plemeno jezevčík (0,9977, 0,9645, 0,9999), naopak nejnižší byl u plemene belgický ovčák (0,8607, 0,6135, 0,9619).

Tab. 2: Absolutní četnosti alel mikrosatelitů u všech plemen a v celé populaci

| Lokus/MS        | J | NŠ | K | ŠP | RR | BO | BSP | ČF | IV | ZR | Součet alel |
|-----------------|---|----|---|----|----|----|-----|----|----|----|-------------|
| <b>FHC 2010</b> | 3 | 5  | 3 | 3  | 3  | 2  | 4   | 4  | 2  | 2  | <b>5</b>    |
| <b>FHC 2054</b> | 6 | 5  | 2 | 2  | 5  | 3  | 5   | 4  | 3  | 1  | <b>8</b>    |
| <b>FHC 2079</b> | 3 | 3  | 2 | 2  | 3  | 2  | 3   | 4  | 2  | 1  | <b>5</b>    |
| <b>PEZ 1</b>    | 6 | 6  | 4 | 3  | 3  | 2  | 4   | 3  | 3  | 2  | <b>7</b>    |
| <b>PEZ 3</b>    | 4 | 5  | 4 | 4  | 5  | 3  | 7   | 4  | 6  | 2  | <b>12</b>   |
| <b>PEZ 5</b>    | 2 | 3  | 2 | 3  | 3  | 2  | 4   | 2  | 2  | 2  | <b>4</b>    |
| <b>PEZ 6</b>    | 4 | 4  | 3 | 5  | 4  | 1  | 7   | 4  | 3  | 3  | <b>9</b>    |
| <b>PEZ 8</b>    | 4 | 5  | 3 | 3  | 5  | 3  | 7   | 4  | 3  | 2  | <b>7</b>    |
| <b>PEZ 12</b>   | 6 | 4  | 3 | 5  | 4  | 2  | 9   | 2  | 3  | 5  | <b>14</b>   |
| <b>PEZ 20</b>   | 6 | 4  | 2 | 3  | 2  | 2  | 4   | 2  | 2  | 2  | <b>8</b>    |

V porovnání s výsledky studie (DeNISE et al., 2004) byly počty alel všech plemen u jednotlivých lokusů nižší. U lokusu FHC 2010 se počet všech detekovaných alel lišil pouze o 1 alelu, u lokusu FHC 2054 o 4 alely, u lokusu FHC 2079 a PEZ 3 o 5 alel, u lokusu PEZ 1

a PEZ 5 se alely lišily o 3. Nejvyšší rozdíl byl u lokusu PEZ 6, kde DeNISE et al. (2004) detekoval o 13 alel více. U PEZ 8 se alely lišily o 7, u PEZ 12 o 10 a u PEZ 20 o 2.

Tab. 3: Průměrný polymorfní informační obsah u všech plemen a u jednotlivých mikrosatelitů, CEP u všech plemen

| Plemeno    | Průměrný      |               |               |               | Prům.           |               |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|---------------|
|            | PIC           | CEP 1         | CEP2          | CEP3          | Lokus/MS        | PIC           |
| <b>J</b>   | 0,6111        | <b>0,9971</b> | <b>0,9645</b> | <b>0,9999</b> | <b>FHC 2010</b> | 0,4347        |
| <b>K</b>   | 0,4225        | 0,9531        | 0,7803        | 0,9938        | <b>FHC 2054</b> | 0,4891        |
| <b>NŠ</b>  | <b>0,6195</b> | 0,9965        | 0,9547        | 0,9999        | <b>FHC 2079</b> | <b>0,3500</b> |
| <b>BO</b>  | <b>0,3134</b> | <b>0,8607</b> | <b>0,6135</b> | <b>0,9619</b> | <b>PEZ 1</b>    | 0,5276        |
| <b>RR</b>  | 0,5253        | 0,9862        | 0,8858        | 0,9993        | <b>PEZ 3</b>    | <b>0,5873</b> |
| <b>ŠP</b>  | 0,5318        | 0,9880        | 0,9065        | 0,9993        | <b>PEZ 5</b>    | 0,3742        |
| <b>BSP</b> | 0,5209        | 0,9868        | 0,8808        | 0,9995        | <b>PEZ 6</b>    | 0,5080        |
| <b>ČF</b>  | 0,5084        | 0,9810        | 0,8813        | 0,9985        | <b>PEZ 8</b>    | 0,5752        |
| <b>IV</b>  | 0,431         | 0,9592        | 0,8037        | 0,9952        | <b>PEZ 12</b>   | 0,5463        |
| <b>ZR</b>  | 0,3327        | 0,9003        | 0,7222        | 0,9761        | <b>PEZ 20</b>   | 0,4242        |

## ZÁVĚR

Shrnutím výsledků v této práci je možné zhodnotit použitý panel mikrosatelitů za spolehlivý pro ověření původu a individuální identifikaci u populace sledovaných psů. Limitujícím faktorem je ovšem nízký počet použitých jedinců u některých plemen psů, proto mohou mít výsledky nižší vypovídací hodnotu. Mezi objektivní zjištění patří především absolutní zhodnocení výskytu alel a genotypů. Jediným problémem byla izolace DNA ze stěru z bukální sliznice, kdy použitý izolační kit JETQUICK® blood and cell culture dna spin kit poskytoval nízkou výtěžnost vyizolované DNA a následně PCR produktu. Doporučovala bych především změnu kitu nebo získání vzorků z jiné tkáně například z krve nebo chlupových cibulek, což by ale mohlo být u psů obtížnější.

## LITERATURA

APPLIED BIOSYSTEMS. *StockMarks® Horse, Cattle, and Dog Genotyping Kits Protocol*. [online]. © 2007. str 3 - 24. Dostupné z:  
<[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied\\_markets\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_041413.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041413.pdf)>

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 Genet*. 2004; 35:14-17.

KNOLL, A. *Program na výpočet statistických ukazatelů ověřování parentity (EXCEL)*. MZLU v Brně. 2003.