



Analizy DNA

METODA OKREŚLENIA POKREWIEŃSTWA I USTALENIA OJCOSTWA

Wątpliwości co do ojcostwa szczeniąt mogą pojawić się również u suk skojarzonych w wyniku celowego doboru, np. w sytuacji, gdy przypuszczalnie miało miejsce niezaplanowane pokrycie przez niewłaściwego samca. W skrajnych przypadkach praktykowane przez nierzetelnych hodowców umyślne i nielegalne „podstawianie” szczeniąt z takiego miotu oraz ich sprzedaż z fałszywym rodowodem stanowią problem, z którym stykają się niektóre związki hodowców. Dlatego zarówno wśród hodowców, jak i związków hodowlanych istnieje duże zainteresowanie możliwością dokładnego stwierdzenia pokrewieństwa oraz efektywnej kontroli rodowodów. Do tej pory w razie braku pewności co do pokrewieństwa lub wątpliwości co do prawdziwości rodowodu posługiwano się tradycyjnymi metodami opartymi na podziale krwi na grupy i typy.

Podobnie jak u ludzi, również w przypadku psów istnieje od niedawna możliwość stwierdzenia pokrewieństwa i ustalenia ojcostwa za pomocą badania DNA. W porównaniu z tradycyjnym badaniem serologicznym pod kątem grupy krwi analiza DNA jest znacznie dokładniejszym badaniem i daje pewność rzędu ponad 99,9%. Metoda ta zostanie opisana w dalszej części na autentycznym przykładzie.

OPIS PRZYPADKU

Po skojarzeniu ze specjalnie dobranym reproduktorem suka rasy eurasier uciekła na krótki czas z miejsca zamieszkania. U suki rozpoznano ciążę. Następnie suka się oszczeniła, a miot liczył 8 szczeniąt. Jedno ze szczeniąt znacznie różniło się fenotypem od pozostałych szczeniąt, w wyniku czego nasunęło się podejrzenie, że ojcem co najmniej jednego szczenięcia może być obcy samiec. Przed zarejestrowaniem szczeniąt w księdze hodowlanej należało wyjaśnić kwestię pochodzenia szczeniąt.

Do analizy DNA pobrano wymazy ze śluzówki policzka od szczeniąt, suki i reproduktora. Dla każdego ze szczeniąt sporządzono indywidualny profil DNA, a następnie profile te porównano z profilami suki i reproduktora. Analiza DNA wykazała jednoznacznie, że żadne ze szczeniąt nie pochodzi od reproduktora.

SPORZĄDZENIE PROFILI DNA – TOŻSAMOŚĆ ZWIERZĘCIA

Z materiału pobranego do badania, którym mogą być na przykład komórki śluzówki policzka, izoluje się materiał genetyczny, czyli DNA. Wyizolowanie DNA jest możliwe ze wszystkich komórek posiadających jądro. Do tego celu nadaje się również krew z dodatkiem EDTA. Przy pomocy metody PCR (czyli łańcuchowej reakcji polimerazy) w próbówce powiela się tzw. sekwencje mikrosatelitarne. Sekwencje mikrosatelitarne to fragmenty DNA, które u poszczególnych osobników różnią się długością. Różnice te można zmierzyć przy pomocy analizatora. W zależności od systemu sekwencji mikrosatelitarnych rozróżnia się piętnaście różnych wariantów długości. Ogólna zasada jest taka, że im więcej systemów sekwencji mikrosatelitarnych podda się analizie, tym dokładniejszy i bardziej indywidualny jest profil DNA danego osobnika. Taki indywidualny profil DNA jest punktem wyjściowym wszelkich analiz służących ustaleniu pochodzenia.

Do sporządzenia profilu DNA konieczne jest zbadanie co najmniej ośmiu systemów sekwencji mikrosatelitarnych. Następnie na podstawie uzyskanych danych dla każdego psa sporządza się indywidualny i dający się powielić kod liczbowy.

Każdy osobnik ma swój niepowtarzalny profil DNA. Różni się on nawet wśród rodzeństwa.

Jeżeli zbadanych zostało osiem sekwencji, wówczas prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności kodu u dwóch niespokrewnionych ze sobą zwierząt wynosi 1-50 milionów. Profil DNA jest niezmienną cechą genetyczną, która umożliwia jednoznaczną identyfikację pojedynczego osobnika.

BADANIE POKREWIEŃSTWA – CZY OJCIEC JEST OJCEM?

Celem badania pokrewieństwa jest ustalenie na podstawie profilu DNA, czy potencjalni rodzice zwierzęcia są rzeczywiście jego rodzicami biologicznymi.

Potomstwo dziedziczy materiał genetyczny w połowie po matce i po ojcu. Jeżeli znana jest matka, to wszystkie części profilu DNA potomstwa, które nie pochodzą od matki, musiały zostać odziedziczone po ojcu. Jeżeli nie zgadza się choćby jeden fragment w profilu DNA, wówczas można z wysokim prawdopodobieństwem wykluczyć ojcostwo. Zasada ta obowiązuje analogicznie w odwrotnym przypadku – czyli w odniesieniu do matki.

W systemie sekwencji mikrosatelitarnych D9 istnieje jeszcze możliwość, że ojcem jest reproduktor. Natomiast wyniki uzyskane w systemach D3, D6 i D7 przeczą ojcostwu reproduktora. Na przykład w systemie D6 szczenięta 1. i 2. otrzymały od ojca wariant długości 289, szczenię 3. wariant 273, lecz u reproduktora nie występuje ani wariant 289 ani 273.

PRZYPADK EURASIERKI

Tabela 1 przedstawia wyznaczone profile DNA matki, reproduktora i trzech szczeniąt. System sekwencji mikrosatelitarnych składa się zawsze z wariantu długości pochodzącego od ojca i wariantu długości pochodzącego od matki. Szczenię musi posiadać jeden z wariantów długości matki i jeden z wariantów długości określonego systemu sekwencji ojca.

Jeżeli szczenię posiada inne warianty długości, należy wykluczyć pokrewieństwo z potencjalnym ojcem lub matką.

U każdego ze wspomnianych trzech szczeniąt eurazjerki w sześciu z dziesięciu badanych systemów sekwencji mikrosatelitarnych stwierdzono warianty długości odmienne od wariantów reproduktora. Na przykład w systemie D3 warianty 108 i 112 obecne u szczeniąt nie mogą pochodzić od reproduktora. W ten sposób wykluczone zostało pokrewieństwo szczeniąt i reproduktora.

CO JEST POTRZEBNE DO BADANIA?

Ogólnie rzecz biorąc, do badania nadaje się każdy materiał organiczny zawierający DNA. Do sporządzenia profilu DNA używa się zwykle próbki krwi z EDTA (ok. 0,5 ml) lub wymazu ze słuzówki policyzka. Badanie pokrewieństwa polega na porównaniu kodu genetycznego potomstwa i potencjalnych rodziców. Dlatego do badania niezbędny jest materiał pobrany zarówno od szczeniąt, jak również ich ojca i matki.

U JAKICH RAS MOŻNA WYKONAĆ BADANIE?

Zasadniczo metoda ta jest optymalnym sposobem na określenie pochodzenia u psów każdej rasy, u której występuje wystarczająca liczba zdefiniowanych polimorficznych sekwencji mikrosatelitarnych.

Ponieważ na miarodajność tej metody znaczny wpływ ma częstotliwość występowania w danej populacji badanych cech, czyli wariantów długości, częstotliwość tę należy wyznaczyć na podstawie reprezentatywnego badania. Metodę opartą na sekwencjach mikrosatelitarnych stosuje się obecnie rutynowo u psów takich ras, jak jamnik, west highland white terrier, parson jack russel terrier, eurasier i owczarek niemiecki.

Lista ras psów, wśród których istnieje zapotrzebowanie na badania pokrewieństwa, stale się wydłuża. Badanie wykluczające ojcostwo jest możliwe u psów wszystkich ras, o ile dostępny jest materiał genetyczny szczeniąt, suk i obu samców.



PROFIL DNA JAKO PODSTAWA DO USTALENIA POKREWIEŃSTWA I TOŻSAMOŚCI U KOTÓW

Po wprowadzeniu badań DNA jako narzędzia umożliwiającego ustalenie pokrewieństwa i tożsamości u psów, koni i krów obecnie można je wykonywać również u kotów. Metoda ta daje największą pewność co do pokrewieństwa i pochodzenia cennych kotów hodowlanych.

W tym celu dla każdego kota sporządza się indywidualny i niemożliwy do podrobienia profil DNA, który nie ulega zmianie przez całe życie zwierzęcia i jest możliwy do odtworzenia z różnych tkanek również po śmierci zwierzęcia.

Dzięki temu możliwa jest weryfikacja, czy potencjalna matka lub ojciec kociejka faktycznie są rodzicami biologicznymi. □

dr Elisabeth Müller, dr Petra Kühnlein
Laboklin Polska Sp. z o.o.
ul. Powstańców Śląskich 101
01-495 Warszawa
tel. 0 800 100 101
tel. 022 691 93 10..11..12
e-mail: lab.warszawa@laboklin.pl

LABOKLIN
Polska Sp. z o.o.

System sekwencji mikrosatelitarnych	D1	D2	D3	D6	D7	D8	D9	D12	D13
badane zwierzę									
suka	109;113	117;123	104;104	273;289	178;186	230;234	162;164	137;150	167;167
szczenię 1.	109;113	123;123	104;112	289;289	186;186	226;230	162;170	137;150	167;212
szczenię 2.	109;113	123;132	104;108	289;289	178;186	230;234	154;174	137;137	167;212
szczenię 3.	109;113	123;132	104;108	273;273	178;178	230;234	154;162	150;150	167;208
reproduktor	109;109	123;123	100;104	268;268	174;182	230;234	154;170	147;147	224;267

Tabela 1. Wyznaczone profile DNA