

# Wykorzystanie mikromacierzy DNA w badaniach dzikich zwierząt

*Marlena Wojciechowska, Wanda Olech*

**Abstrakt:** Współcześnie genetyka molekularna dostarcza wielu narzędzi umożliwiających prowadzenie monitoringu oraz wspierających ochronę populacji zwierząt dziko żyjących. Jedną z metod, która zyskuje coraz większe zainteresowanie jest analiza całego genomu na podstawie markerów SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphism) z wykorzystaniem mikromacierzy DNA. Podstawową zaletą tej metody jest możliwość analizy kilkudziesięciu tysięcy markerów genetycznych jednocześnie, co zapewnia wysoką wydajność prowadzonych badań. Znaczną część badań wykorzystujących mikromacierze SNP prowadzano na gatunkach zwierząt gospodarskich. Od niedawna możliwości tej metody wykorzystywane są w badaniach populacji gatunków zwierząt dziko żyjących. W takim przypadku monitoring genetyczny prowadzony jest w kierunku analizy zmienności genetycznej poszczególnych gatunków i populacji. Otrzymane w ten sposób informacje są cennym źródłem wiedzy o gatunku nieznajującym się pod bezpośrednim wpływem człowieka. W niniejszej pracy omówiono możliwości wykorzystania mikromacierzy SNP na przykładzie wybranych gatunków.

**Słowa kluczowe:** mikromacierz, SNP, marker genetyczny

**Abstract. The use of DNA microarray in the study of the wild animal species.** Currently molecular genetics provides multiple tools to carry out the monitoring and conservation of wild animal populations. One of the methods gaining more attention is genome-wide analysis based on SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) using DNA microarrays. The main advantage of this method is possibility to genotype tens of thousands of genetic markers simultaneously, which provides a high efficiency of research. Significant part of research using SNP microarrays was carried out on domestic species. Recently, possibilities of this method are used in studies of wild animal populations. In that case genetic monitoring is conducted on analysis of genetic variability of different species and populations. Obtained information are valuable source of knowledge about species that are not under direct influence of human. In this paper the possibility of using SNP microarray is presented based on the examples of selected species.

**Key words:** microarray, SNP, genetic marker

## Markery genetyczne – wiadomości ogólne

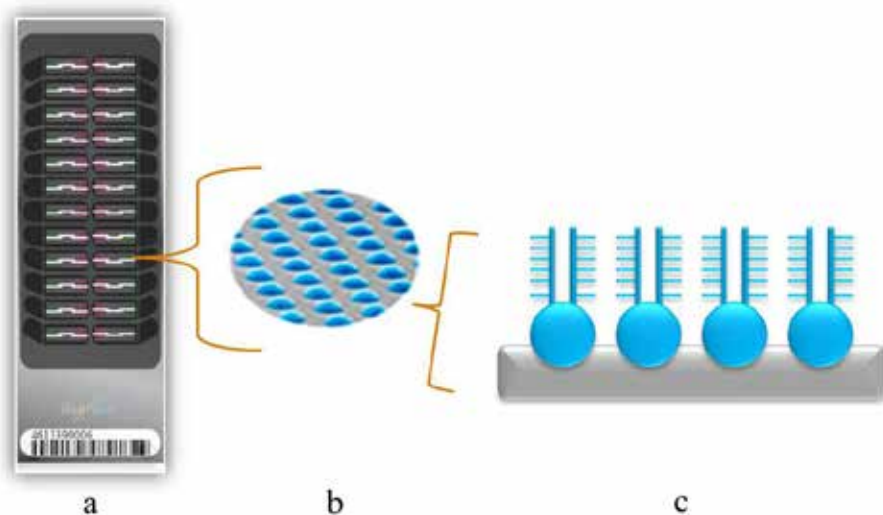
Zastosowanie różnorodnych metod genetyki molekularnej pozwala poznać zmienność genetyczną populacji, jak i określić przepływ genów między populacjami. Możliwe jest także ustalenie istnienia i stopnia hybrydyzacji, np. pomiędzy różnymi gatunkami. Dokładne poznanie struktury genetycznej pomaga w aktywnej ochronie gatunków. Monitoring genetyczny prowadzony jest głównie poprzez analizę markerów genetycznych, czyli swego rodzaju znaczników w genomie, których polimorfizm pomiędzy osobnikami lub grupami taksonomicznymi, pozwala ocenić różnorodność genetyczną badanych zwierząt. Polimorfizm ten odnosi się do zmian w sekwencji DNA i może dotyczyć pojedynczego nukleotydu bądź określonej sekwencji nukleotydowej. Różne metody analizy polimorfizmu DNA dostarczają informacji o wielu formach markerów genetycznych. Niezależnie od rodzaju badanego polimorfizmu, różne wersje tego samego markera określane są mianem alleli, natomiast miejsce w genomie, gdzie jest on zlokalizowany nosi nazwę *locus*. Jeden osobnik w danym *locus* może mieć maksymalnie dwa różne allele (jedna kopia od matki, druga od ojca), natomiast liczba różnych alleli tego samego markera w populacji może i powinna być zdecydowanie wyższa. Wybór markera zależy w dużej mierze od celu i problemu badawczego jaki podejmujemy.

W ostatnich latach w roli markerów genetycznych najpowszechniej wykorzystywano sekwencje mikrosatelitarne STR (ang. Short Tandem Repeats), zwane potocznie mikrosatelitami. Znajdują się one w regionach niekodujących i są równomiernie rozmieszczone w genomie. Ich polimorfizm polega na zmiennej liczbie tandemowych powtórzeń motywu podstawowego – krótkiej sekwencji kilku nukleotydów. Innym często stosowanym markerem jest polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism). Analiza opiera się na wykorzystaniu enzymów przecinających DNA w określonych miejscach restrykcyjnych. Zmiana jednego nukleotydu w obrębie takiej sekwencji może powodować powstanie miejsca rozpoznawanego lub nie przez enzym restrykcyjny, a w konsekwencji inną długość oraz liczbę uzyskiwanych fragmentów. Warto zaznaczyć, że w odróżnieniu od sekwencji mikrosatelitarnych, które występują jedynie w regionach niekodujących, pojedyncze zmiany nukleotydowe – SNPs (ang. Single Nucleotide Polymorphisms) są rozproszone w całym genomie, występując zarówno w genach, jak i w niekodujących fragmentach. Ich obecność może wpływać na zmiany w strukturze kodowanych białek bądź też mogą być tzw. mutacjami cichymi, niemającymi wpływu na fenotyp. W przypadku analizy RFLP możemy podczas jednej reakcji oznaczyć miejsca polimorficzne w obrębie tylko jednego amplifikowanego fragmentu DNA.

## Mikromacierz SNP – budowa i zasada działania

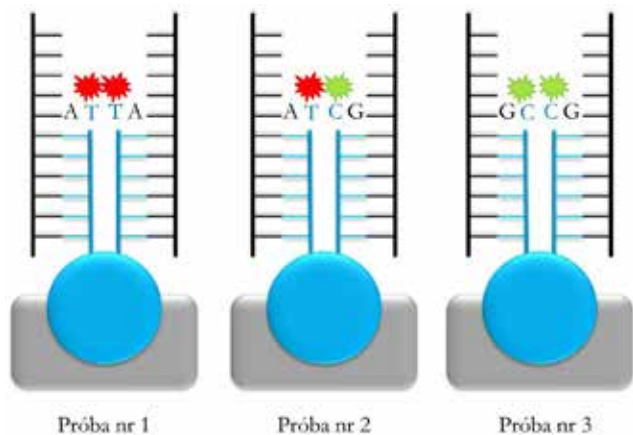
Od kilku lat szczególnym zainteresowaniem cieszą się mikromacierze DNA umożliwiające „skanowanie” genomu poprzez analizę kilkudziesięciu tysięcy SNPs jednocześnie. W analizie polimorfizmów jednonukleotydowych stosowane są mikromacierze z krótkimi sondami oligonukleotydowymi. Zależnie od producenta, sposób ich wytwarzania i budowa mogą się od siebie różnić. W przypadku „statycznych” chipów DNA firmy Affymetrix sondy syntetyzowane są bezpośrednio na płytce z użyciem techniki fotolitografii. Inne rozwiązanie zaproponowała firma Illumina, której mikromacierz tzw. BeadChip zostanie szerzej opisana. Omówiona jest budowa i zasada działania mikromacierzy BovineSNP50v2 BeadChip Illumina®.

która została zaprojektowana do badań genomu bydła domowego. Schemat przedstawiony na ryc. 1 w sposób uproszczony wyjaśnia jej strukturę.



**Ryc. 1.** Schemat obrazujący budowę mikromacierzy BovineSNP50v2 BeadChip Illumina®  
*Fig. 1. Diagram illustrating construction of the BovineSNP50v2 BeadChip Illumina® microarray*

Na silikonowej płytce wielkości szkiełka podstawowego znajdują się 24 pola (ryc. 1a), każde z pól to odrębna mikromacierz przeznaczona do analizy jednej próby, co pozwala na analizowanie 24 prób na jednej płytce jednocześnie. Każda mikromacierz zawiera 54609 rodzajów sond (ryc. 1b). Sondy zakotwiczone są za pomocą krótkiego łącznika na powierzchni silikonowych ziaren (ang. beads) o średnicy ok.  $3\mu\text{m}$ , każde ziarno pokryte jest setkami tysięcy kopii jednej sondy. Ziarna z kolei umieszczone są w dołkach silikonowej powierzchni płytki (źródło internetowe 1, 2). W celu uproszczenia, na ryc. 1c przedstawiono ziarna z dwiema kopiami sondy. Analizę z użyciem mikromacierzy poprzedza izolacja DNA z materiału biologicznego, następnie DNA zostaje powielone w izotermalnym procesie amplifikacji oraz pofragmentowane. Tak przygotowana próba nanoszona jest na powierzchnię mikromacierzy. Jednoniciowe fragmenty DNA hybrydują (łączą się) z sondami o komplementarnej sekwencji. W kolejnym etapie analizy następuje wydłużenie sondy o jeden nukleotyd, komplementarny do sekwencji przyłączonego fragmentu DNA. Dobudowane do sondy nukleotydy znakowane są fluorescencyjnie. To, jaki nukleotyd został przyłączony do sondy identyfikuje rodzaj SNP występującego u danego osobnika.



**Ryc. 2.** Analiza polimorfizmu jednonukleotydego. Czarne elementy przedstawiają fragmenty DNA przyłączone do sond (kolor niebieski) na mikromacierzy

*Fig. 2. Single nucleotide polymorphism analysis. Black elements represent the DNA fragments attached to the probes (blue) on the microarray*

Załóżmy, że osobnik nr 1 (ryc. 2) jest homozygotą pod względem analizowanego *locus*, czyli posiada dwa allele A (nukleotyd zawierający adeninę) odpowiednio na obu chromosomach homologicznych. Sondy do których przyłączył się fragment DNA z badanym miejscem wydłużone zatem zostaną o nukleotyd T zawierający tyminę. Osobnik nr 3 również jest homozygotą, ale posiada dwa allele G (nukleotyd zawierający guaninę), w związku z tym sondy wydłużą się o nukleotyd C, zawierający cytozynę. Osobnik nr 2 jest heterozygotą, co oznacza, że na jednym chromosomie posiada allele A, natomiast na drugim chromosomie homologicznym do niego allele G. W efekcie do sond na powierzchni silikonowego ziarna hybrydyzować będą dwa różne rodzaje fragmentów DNA. Jednym z ostatnich etapów omawianej metody jest skanowanie mikromacierzy i odczyt intensywności świecenia poszczególnych fluorochromów oraz analiza uzyskanych wyników (źródło internetowe 3).

## Wykorzystanie mikromacierzy DNA w badaniach populacji dzikich zwierząt na przykładzie wybranych gatunków

Mikromacierze stworzone zostały z myślą o analizach genomu człowieka oraz zwierząt użytkowych i modelowych, jak np. bydło, trzoda chlewna, owce i myszy. Większość badań dotyczących zwierząt gospodarskich odnosiła się do poszukiwań QTL (ang. Quantitative Trait Loci) związanych z cechami płodności i produkcyjnymi (Pimentel *et al.* 2010, Glick *et al.* 2011, Nishimura *et al.* 2012 Peñagaricano *et al.* 2012), ale również do identyfikacji i kontroli pochodzenia zwierząt bądź produktów (Hara *et al.* 2010, Nishimura *et al.* 2012). Od niedawna potencjał mikromacierzy SNP jest również skutecznie wykorzystywany w badaniach populacji zwierząt dziko żyjących. W ich przypadku monitoring genetyczny prowadzony jest w kierunku analizy zmienności genetycznej poszczególnych gatunków oraz ich identyfikacji. Wytypowa-

nie markerów genetycznych charakterystycznych dla konkretnych gatunków może mieć znaczenie np. w ustaleniu pochodzenia produktów odzwierzęcych, gdy zachodzi podejrzenie, iż mogą być one wytworzone ze zwierząt należących do gatunku objętego ochroną. Analiza SNPs umożliwia również określenie struktury populacji, a także określanie na poziomie molekularnym różnic między populacjami w obrębie jednego gatunku.

W badaniach Miller *et al.* (2011) analizie poddano dwa gatunki: muflona kanadyjskiego *Ovis canadensis* i muflona Dalla *Ovis dalli*. W badaniach uwzględniono 2 osobniki należące do gatunku *Ovis dalli* oraz 52 osobniki gatunku *Ovis canadensis* pochodzące z dwóch populacji (Ram Mountain n=50 i Wyoming n=2). Do analizy zastosowano mikromacierz OvineSNP50 BeadChip (49 034 sond) opracowaną dla owiec domowych. W przypadku muflona kanadyjskiego zgenotypowano 95% (48 230 SNPs) markerów zlokalizowanych na mikromacierzy, zaś liczba polimorficznych SNP wynosiła 570. Nieco mniej markerów zgenotypowano u muflona Dalla (48 004 SNP), a polimorficznych *loci* zidentyfikowano tylko 330. Gdy rozpatrywano oba gatunki jednocześnie oznaczano 868 SNP, z czego 86 markerów było polimorficznych u obu gatunków, natomiast 484 SNPs były polimorficzne tylko u muflona kanadyjskiego, podczas gdy muflon Dalla charakteryzował się 244 markerami polimorficznymi. Tak duża różnica w liczbie polimorficznych loci może wynikać m.in. z liczby zwierząt uwzględnionych w analizie, która w przypadku muflona Dalla była bardzo niska. Na podstawie markerów możliwe było nie tylko rozróżnienie na poziomie molekularnym dwóch gatunków, ale również określenie różnic między populacjami w obrębie gatunku muflon kanadyjski. Wśród muflonów z populacji Ram Mountain uzyskano 441 polimorficznych SNP, podczas gdy zwierzęta z populacji Wyoming charakteryzowały się obecnością 308 polimorficznych markerów. Wśród analizowanych markerów 181 było polimorficznych w obu badanych populacjach.

Kolejne omawiane badania dotyczą dwóch podgatunków kozicy: kozicy tatrzańskiej *Rupicapra rupicapra tatrica* oraz kozicy alpejskiej *Rupicapra rupicapra rupicapra* (Demontis *et al.* 2011). Według danych z jesiennej inwentaryzacji w 2012 roku (źródło internetowe 4), w Tatrach żyje ok. 1096 kozic z czego 286 osobników po polskiej stronie gór. Jest to rekordowa liczebność od początku trwania programów ochronnych tego gatunku. W badaniach wykorzystano mikromacierz BovineSNP50v1 BeadChip (54 001 SNPs) zaprojektowaną dla bydła domowego. Analizie poddano 4 osobniki kozicy tatrzańskiej (3 z obszarów wysokogórskich i 1 z obszarów Niżnych Tatr) oraz 6 kozic alpejskich (3 osobniki z pasma górskiego Wielka Fatra i 3 osobniki z płaskowyżu Słowacki Raj). Celem badań było oszacowanie zmienności genetycznej, określenie struktury populacji i czystości genetycznej badanych kozic. Po wstępnych analizach spośród 505 polimorficznych markerów wytypowano grupy 151 SNPs oraz panel 48 polimorficznych markerów na podstawie których możliwe było osiągnięcie celu badań. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem obu paneli (151 i 48 SNPs) były zbliżone. Analiza wyników przy pomocy programu STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), pozwalającego na przyporządkowanie osobników względem siebie i wybranie najbardziej podobnych genetycznie osobników i łączenie ich w klastry, pokazała że kozice tatrzańskie, niezależnie od miejsca pochodzenia zgrupowane były w jeden klastery, natomiast zaobserwowano wyraźny podział populacji kozic alpejskich zgodnie z miejscem pochodzenia osobników.

W badaniach Gwilym i Latch (2012) wykorzystano próby od 12 osobników jelenia czarnogonowego *Odocoileus hemionus columbianus* i 12 jeleni mulak *Odocoileus hemionus hemionus* oraz 4 osobniki jelenia wirginijskiego *Odocoileus virginianus*. W celu identyfikacji SNPs charakterystycznych dla badanych zwierząt zastosowano mikromacierz BovineSNP50v2 Bead-

Chip (54 609 SNPs). Analizując wspólnie wszystkie osobniki otrzymano 1068 polimorficznych markerów, z czego 429 SNPs było polimorficznych dla jelenia mulak, 434 SNPs u jelenia czarnoogonowego oraz 469 polimorficznych markerów u jelenia wirginijskiego. W wyniku analizy struktury genetycznej przy pomocy programu STRUCTURE otrzymano najbardziej prawdopodobną liczbę klastrow równą 2, gdzie jeleni mulak i jeleni czarnoogonowy zgrupowane zostały wspólnie, natomiast jeleni wirginijski znalazł się w odrębnej grupie. Powtórzona analiza z wyłączeniem jelenia wirginijskiego, wykazała zróżnicowanie między podgatunkami *Odocoileus hemionus*, przypisując je do osobnych klastrow.

Ostatnim omawianym przykładem są badania zagrożonego gatunku jakim jest żubr *Bison bonasus*. Jest on największym dziko żyjącym ssakiem lądowym w Europie, a jego istnienie na początku XX wieku było skrajnie zagrożone. Obecnie w obrębie gatunku wyróżnia się dwie linie genetyczne: nizinną, zwaną też białowieską (LB), która wywodzi się od 7 żubrów podgatunku nizinnego *Bison bonasus bonasus* oraz nizinno-kaukaską (białowiesko-kaukaską), oznaczaną symbolem LC, której początek dały przedstawiciele dwóch podgatunków, w tym ostatni przedstawiciel podgatunku kaukaskiego *B. b. caucasicus* (Olech 1999). Bardzo mała liczba założycieli skutkuje wysokim poziomem inbrodu oraz znaczną utratą zmienności genetycznej, dlatego też możliwość zastosowania rozbudowanego panelu SNP jest obiecującym narzędziem w genotypowaniu żubrów. Jedne z pierwszych badań wykorzystujących mikromacierze dla tego gatunku prowadzili Pertoldi *et al.* 2009. Analizie z użyciem BovineSNP50 BeadChip poddano 54 osobniki żubra linii nizinnej oraz łącznie 56 osobników dwóch podgatunków bizona (*Bison bison athabasca* i *Bison bison bison*). Najniższą liczbę polimorficznych *loci* zidentyfikowano u żubra (929 SNPs). Badania te dotyczyły jednak tylko jednej, nizinnej linii genetycznej żubra. W innych badaniach Kamiński *et al.* 2012 stosując taką samą mikromacierz przeanalizowali żubry należące do obu linii genetycznych: 5 osobników z linii nizinnej i 5 z linii nizinno-kaukaskiej. Otrzymano 1337 markerów polimorficznych, a frekwencja 50 z nich istotnie różnicowała obie linie genetyczne.

## Wnioski

Omówione przykłady badań wskazują, że możliwe jest stosunkowo szybkie zidentyfikowanie dużej liczby informatywnych markerów genetycznych dla gatunków niemodelowych, poprzez wykorzystanie mikromacierzy DNA opracowanych dla zwierząt użytkowych. Otrzymane w ten sposób dane są cennym źródłem informacji m.in. o strukturze genetycznej gatunku nieznajdującym się pod bezpośrednim wpływem człowieka. Możliwość zastosowania nowych metod badawczych ułatwia poznanie i przyspiesza gromadzenie nowych informacji.

## Literatura

- Demontis D., Czarnomska S. D., Hajkova P., Zemanova B., Bryja J., Loeschcke V., Pertoldi C. 2011. Characterization of 151SNPs for population structure analysis of the endangered Tatra chamois (*Rupicapra rupicapra tatrica*) and its relative, the Alpine chamois (*R. r. rupicapra*). *Mammalian Biology* 76, 644-645.
- Glick G., Shirak A., Seroussi E., Zeron Y., Ezra E., Weller J.I., Ron M. 2011. Fine Mapping of a QTL for Fertility on BTA7 and Its Association With a CNV in the Israeli Holsteins.G3: Genes Genomes Genetics. Vol. 1, 65-74.
- Gwilym H.D., Latch E. K. 2012. Identification of Novel Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Deer (*Odocoileus spp.*) Using the BovineSNP50 BeadChip. *PLoS ONE* Volume 7, Issue 5, e36536.

- Hara K., Kon Y., Sasazaki S., Mukai F., Mannen H. 2010. Development of novel SNP system for individual and pedigree control in a Japanese Black cattle population using whole-genome genotyping assay. *Animal Science Journal*. 81, 506-512.
- Kamiński S., Olech W., Oleński K., Nowak Z., Ruś A. 2012. Single nucleotide polymorphisms between two lines of European bison (*Bison bonasus*) detected by the use of Illumina Bovine 50 K BeadChip. *Conservation Genet Resour* 4: 311-314.
- Miller J. M., Poissant J., Kijas J.W., Coltman D.W. 2011. A genome-wide set of SNPs detects population substructure and long range linkage disequilibrium in wild sheep. *Molecular Ecology Resources* 11, 314-322.
- Nishimura S., Watanabe T., Mizoshita K., Tatsuda K., Fujita T., Watanabe N., Sugimoto Y., Takasuga A. 2012. Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the PLAG1-CHCHD7 QTN for stature in Japanese Black cattle. *BMC Genetics*. 13: 40.
- Nishimura S., Watanabe T., Ogino A., Shimizu K., Morita M., Sugimoto Y., Takasuga A. 2012. Application of highly differentiated SNPs between Japanese Black and Holstein to a breed assignment test between Japanese Black and F1 (Japanese Black x Holstein) and Holstein. *Animal Science Journal*.
- Olech W. 1999. The number of ancestors and their contribution to European bison (*Bison bonasus* L.) population, *Ann. Warsaw Agricult. Univ. – SGGW, Anim. Sci.* 35:111-117.
- Peñagaricano F., K. A. Weigel, H. Khatib. Genome-wide association study identifies candidate markers for bull fertility in Holstein dairy cattle. *Animal Genetics*. 2012. 43 (Suppl. 1), 65-71.
- Pertoldi C., Tokarska M., Wójcik J.M., Demontis D., Loeschcke V., Gregersen V. R., Coltman D., Wilson G. A., Randi E., Hansen M. M., Bendixen C. 2009. Depauperate genetic variability detected in the American and European bison using genomic techniques. *Biology Direct* 4: 48.
- Pimentel E. C. G., S. Bauersachs, M. Tietze, H. Simianer, J. Tetens, G. Thaller, F. Reinhardt, E. Wolf and S. König. 2010. Exploration of relationships between production and fertility traits in dairy cattle via association studies of SNPs within candidate genes derived by expression profiling. *Animal Genetics* 42, 251-262.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics* 155, 945-959.
- [http://www.illumina.com/technology/beadarray\\_technology.ilmn](http://www.illumina.com/technology/beadarray_technology.ilmn), (odczyt z dn. 12-04-2013)
- [http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_bovine\\_snp50.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_bovine_snp50.pdf), (odczyt z dn. 12-04-2013)
- [http://support.illumina.com/documents/MyIllumina/ab0e2b61-7bf1-44e8-b8d1-385d49e6e2c1/Infiniti-mII\\_MultiSample\\_Assay\\_Guide\\_11230143\\_RevA.pdf](http://support.illumina.com/documents/MyIllumina/ab0e2b61-7bf1-44e8-b8d1-385d49e6e2c1/Infiniti-mII_MultiSample_Assay_Guide_11230143_RevA.pdf), (odczyt z dn. 12-04-2013)
- Serwis Nauka w Polsce – [www.naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news,392664,rekordowa-liczba-kozic-w-tatrach.html](http://www.naukawpolsce.pap.pl/aktualnosci/news,392664,rekordowa-liczba-kozic-w-tatrach.html), (odczyt z dn. 12-04-2013)

**Marlena Wojciechowska, Wanda Olech**

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt,  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
[marlena\\_wojciechowska@wp.pl](mailto:marlena_wojciechowska@wp.pl)