

## MİKROSATELLİT DNA MARKÖRLERİ KULLANILARAK ATLARDA EBEVEYN TAYİNİ: BİR VAKA TAKDİMİ

Yusuf Özşensoy<sup>1</sup>, Ercan Kurar<sup>1\*</sup>, Zafer Bulut<sup>2</sup>, Mehmet Nizamlioğlu<sup>2</sup>

### Paternity Testing in Horses by Using Microsatellite DNA Markers: A Case Report

**Geliş Tarihi:** 22.10.2008

**Kabul Tarihi:** 23.11.2008

**Özet:** At yetiştiriciliğinde, hayvanın gerçek değerinin belirlenmesi, soy kütüğü kayıtları, bilimsel çalışmalar ve adli olaylarda ebeveyn ve birey tespiti önem arz etmektedir. Bu amaçla DNA teknolojisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Sunulan bu çalışmanın amacı, T.C. Kars Cumhuriyet Başsavcılığı Hazırlık Bürosu tarafından gönderilen kısır at ve yavru ata ait kan ve kıl örneklerinden DNA düzeyinde ebeveyn tayini ile ana-yavru ilişkisinin belirlenmesidir. Kan ve kıl örneklerinden DNA izolasyonu sonrası, Uluslararası Hayvan Genetiği Derneği (ISAG) tarafından tavsiye edilen 10 adet mikrosatellit lokusu kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yapılmıştır. Yükseltgenen PZR ürünleri Beckman Coulter CEQ-8000 Genetik Analiz sistemine yüklenerek kapiller elektroforez ve fragman analizi sonucunda her bir marköre ait allel ve genotipler belirlenmiştir. Sonuçlar ortak allel yönünden değerlendirilmiştir. Çalışmada Kıl-2 örneği kullanılarak yapılan analizlerden herhangi bir PZR ürünü ve allel elde edilememiştir. Bu örneğin detaylı incelenmesi sonucunda kıl köklerinin bulunmaması, örnekleme çalışmasının makas ile yapıldığını düşündürmektedir. Kıl-1 ve Kan-2 örneklerinde aynı allellerin gözlenmesi, bu örneklerin aynı bireye ait olduğunu göstermektedir. Kan-1 ve Kan-2 örnekleri AHT04, HMS02, HMS03, HTG06 ve VLH20 mikrosatellit lokuslarında en az birer ortak allele sahiptir. Ancak, AHT05, HMS06, HTG07 ve HTG10 lokuslarında ortak allellerin bulunmaması çalışmaya konu olan atlarda ana-yavru ilişkisinin bulunamayacağı kanaatini oluşturmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** At, DNA, Ebeveyn Tayini, Mikrosatellit Markör

**Summary:** Parentage testing is critically important in horse breeding for actual evaluation of an animal, stud registrations, forensic studies and scientific researches. For this reason, DNA technology is widely used. The objective of this study is to determine genetic relationship between a mare and a foal by using blood and hair samples that were sent by the Attorney Generalship of Kars Province. DNA isolations were performed by using blood and hair samples. DNA samples were amplified at 10 horse microsatellite loci which were selected from a list suggested by International Society of Animal Genetics (ISAG). The resulting polymerase chain reaction (PCR) products were separated by capillary electrophoresis using a Beckman Coulter CEQ- 8000 Genetic Analysis System. Allele scoring was accomplished based on their base-pair size by fragment analysis and genotypes were determined each loci. Genotype data were evaluated based on common alleles. PCR products and so allele peaks were not determined for hair sample-2. When this sample was examined in detail, no hair roots were observed, which suggested that sampling was performed by a scissor. The same genotypes were observed between hair sample-1 and blood sample-2, therefore they belonged to the same animal. At least one common allele was observed at each AHT04, HMS02, HMS03, HTG06 and VLH20 loci for blood samples 1 and 2. On the other hand, common alleles were not determined for AHT05, HMS06, HTG07 and HTG10 microsatellite loci. These results suggested that no paternity is possible between the mare and the foal.

**Key Words:** Horse, DNA, Poternity testing, Microsatelit marker

### Giriş

At yetiştiriciliği insanlık tarihinde önemli bir yere sahiptir. Ancak, son zamanlarda makineleşmenin artması sonucu atlar artık yaygın olarak spor, yarış ve eğlence hayvanları olarak kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'nin kırsal bölgelerinde atın iş gücünden halen yararlanılmaktadır.

At yetiştiriciliğinde soy kütüğü kayıtları, bilimsel çalışmalar ve adli olaylarda ebeveyn ve birey tespiti önemlidir. Ebeveyn tayini çalışmalarında "benzer benzeri meydana getirir" ilkesi ile don, nişane gibi

fiziksel markörler kullanılmaktadır. 1960 yıllardan sonra Mendel kalıtımı gösteren farklı atlara ait kan grubu (A, C, D, K, P, Q, U) ve protein (A1B, ALB, ES, GC, HBA, PGM, PGD, TF) sistemleri keşfedilmiş ve ebeveyn tayini çalışmalarında kullanılmıştır. Ebeveyn testlerinde, bir popülasyonda bulunan rasgele bir bireyin potansiyel ebeveyn olasılığının dışlanması ve testlerin güvenilirliğinin tespitinde istatistiksel olarak Dışlama Gücü (DG; Exclusion Power) kullanılmaktadır (Jamieson, 1965). Farklı at ırklarında 15 adet kan grubu ve protein sistemi kullanılarak 0,960-0,980 DG elde edilmiştir (Bowling, 2001). Bu

\* ekurar@selcuk.edu.tr

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, KONYA  
Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

amaçla Uluslararası Hayvan Genetiği Derneği (ISAG; International Society of Animal Genetics) tarafından standartlar geliştirilmiştir. Ancak kan grubu ve protein markör sistemlerinin belli kromozomlar üzerinde yoğunlaşması, polimorfizm değerlerinin nisbeten düşük olması, spesifik olarak kan örneklerine gereksinim duyulması, iş yükünün ağır olması ve analizlerin uzun zaman alması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Kurar, 2001).

DNA teknolojisi ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeye paralel olarak daha ekonomik, kolay ve polimorfik olmalarından dolayı özellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli DNA markör sistemleri tercih edilmeye başlanmıştır.

Genel olarak 1–6 bç (baz çifti) motiflerin tekrarlanması ile meydana gelen mikrosatellit markörler (Weber ve May, 1989), genomda ortalama 40000 bç sıklığında bulunmaktadır. Bu tekrar bölgelerini kuşatan DNA dizileri, tür içinde aynı olmasına rağmen tekrar dizilim sayıları bireyler hatta homolog kromozomlar arasında dahi farklılıklar gösterebilmektedir. Mikrosatellitler genomda yaygın olarak bulunmaları, oldukça yüksek oranda polimorfizm göstermeleri, PZR teknolojisi ile kolayca analiz edilebilmeleri, ko-dominant özellikte olmaları nedeniyle genetik linkage analizleri, gen haritalarının oluşturulması, popülasyonların moleküler düzeyde analizi, kantitatif gen ve kromozom bölgelerinin tayini, moleküler islah, filogenetik çalışmalarında adli tıpta birey ve ebeveyn tayini çalışmalarında tercih edilen markör sistemi olmuştur (Kurar, 2001).

Mikrosatellit markörler kullanılarak at (Binns ve ark., 1995a; Bowling ve ark., 1997; Tozaki ve ark., 2001; Luis ve ark., 2002; Lee ve Cho, 2006), kedi (Lipinski ve ark., 2007; •laska ve ark., 2007) sığır (Heyen ve ark., 1997), köpek (Binns ve ark., 1995b; DeNise ve ark., 2004), koyun-keçi (Luikart ve ark., 1999), domuz (Rohrer ve ark., 2007), geyik (Bonnet ve ark., 2002) ve balık (Villanueva ve ark., 2002) türlerinde ebeveyn tayini çalışmalarında kullanılan paneller oluşturulmuştur.

Bu çalışmanın amacı T.C. Kars Cumhuriyet Başsavcılığı Hazırlık Bürosu tarafından gönderilen kısır ve yavru ata ait kan ve kıl örneklerinden DNA seviyesinde ebeveyn tayini ile ana-yavru genetik ilişkisinin belirlenmesidir.

## MATERYAL ve METOD

### Materyal

Çalışmanın materyalini, T.C. Kars Cumhuriyet Başsavcılığı Hazırlık Bürosu tarafından S.Ü. Veteriner Fakültesine gönderilen kısır ile yavrusu olduğu iddia edilen taya ait kan ve kıl örnekleri oluşturmaktadır.

### DNA İzolasyonu

Fermentas Genomik DNA İzolasyon Kit'i (Katalog # K0519) ve üretici firma tarafından tavsiye edilen protokol kullanılarak K3-EDTA'lı kan örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Kıl örneklerinden ise kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2008). Yaklaşık 20 adet kıl kökü eppendorf tüplere konuldu ve üzerine 50ml 200mM NaOH eklenip 94°C de 10 dakika bekletilmiştir. Örnekler oda ısısına kadar soğutulup üzerine 50ml 200mM HCl eklendi ve PZR analizlerine hazır hale getirilmiştir.

### Mikrosatellit Markörler

Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokusları ISAG tarafından tavsiye edilen listeden seçilmiştir (Hoffmann ve ark., 2004). Kapiller elektroforez ve fragman analizinde kullanılması amacıyla her bir lokusun forward primeri Beckman Coulter CEQ-8000 Genetik Analiz Sistemine uygun WELL-RED (D4, D3 veya D2) floresans ile işaretlenmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu oligoları Sigma-Proligo tarafından sentezlenmiştir (Tablo 1).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu protokolü olarak bir reaksiyonunda 1x Mg<sup>++</sup> free PCR buffer (Fermentas), 200 mM dNTP (Fermentas), 1.5 mM MgCl<sup>++</sup>, 0.375 ünite Taq polimeraz (Fermentas), 5 pM her bir primer çifti (Tablo 1) ve 2ml kan ve kıl örneklerinden izole edilen DNA template olarak kullanıldı. Her bir PZR reaksiyonu, toplam 15 µl hacimde hazırlandı.

Polimeraz zincir reaksiyonları, BioRad MyCycler ve touchdown PZR profili kullanılarak iki aşamada gerçekleştirildi. 95°C'de 4 dakika ile tam bir denatürasyon sonrası I. aşamada 16 döngü için 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primerlerin ideal bağlanma noktasının sağlanması için 60°C'den başlayarak her bir döngüde 0,5°C düşürülen ve 30 saniye süren annealing ve 72°C'de 30 saniye elongation sağlandı. İkinci aşamada 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 30 saniye annealing ve 72°C'de 30 saniye elongation olacak şekilde toplam 25 döngü kullanıldı. Son olarak örnekler 72°C'de 10 dakika tutularak tam bir adenilizasyona olanak sağlandı.

### Kapiller Elektroforez ve Fragman Analizi

Floresans WELL-RED işaretli primerler (Tablo 1) kullanılarak yükseltgenen 0,5 µl PZR ürününe 25 µl formamide içeren SLS (Sample Loading Solution) ve S-400 DNA standardı eklenmiştir. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında bulunan Beckman Coulter CEQ-8000 Genetik Analiz Sistemi kullanılarak kapiller elektroforez işlemi uygulanmıştır. Kapiller elektroforez işlemlerinde FRAG-3 yöntemi (95°C'de 2 dakika denatürasyon, 2.0 kV'da

## Mikrosatellit DNA Markörleri...

No	Lokus	Kromozom	Primer Sekansı (5'→3')	Allel	İşaretleme
1	AHT04	24	aaccgctgagcaaggaagt cccagagagttaccct	140-170	D4
2	AHT05	8	acggacacatccctgctgc gcaggctaaggggctcagc	130-146	D3
3	ASB02	15	ccttcgtagttaagcttctg cacaactgagttctctgatagg	222-254	D3
4	HMS02	10	acggggcaactgccaaggaag cttcagtcgaatgttaataatg	218-238	D2
5	HMS03	9	ccaactcttgcacataacaaga ccatcctcacttttcaacttgtt	150-170	D2
6	HMS06	4	gaagctgccagtattcaaccattg ctccatcttggaagtgaactca	153-169	D3
7	HTG06	15	cctgcttgaggctgtgataagat gttcaactgaatgcaaatctgct	70-107	D3
8	HTG07	4	cctgaagcagaacatccctccttg ataaagtgctggcagagctgct	118-130	D2
9	HTG10	21	caattccgccccacccccgca ttttattctgatctgtcacattt	92-112	D2
10	VLH20	30	caagtccttacttgaagactag aactcaggagaatcttctcag	86-106	D4

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan mikrosatellit lokusları, PZR primerleri. (D2: siyah; D3: yeşil; D4: mavi)

30 saniye injeksiyon ve 50°C kapiller ısısında 6 kV'da 35 dakika seperasyon) ile ayrıştırılmıştır. FragTest programı kullanılarak markör allelleri ve genotipleri her mikrosatellit lokusu için belirlenmiştir. Örneklere ait genotipler ortak allel yönünden değerlendirilmiştir.

### BULGULAR ve SONUÇ

Sunulan çalışmada, T.C. Kars Cumhuriyet Başsavcılığı Hazırlık Bürosu tarafından gönderilen ve hazırlık aşamasında olan bir dava için, iki farklı ata ait kan ve kıl örneklerinden DNA testi yardımıyla genetik olarak ana-yavru ilişkisinin olup olmadığı istenmiştir.

Bu çalışmada, DNA örnekleri ISAG tarafından tavsiye edilen mikrosatellit markörleri (Hoffmann ve ark., 2004) kullanılarak PZR ile yükseltgenmiştir. Markör allellerinin tespiti amacıyla PZR ürünlerine son yıllarda yaygın olarak kullanılan kapiller elektroforez ve fragman analizi yapılmıştır. Kıl-2 örneğinden tekrarlanan analizlerde herhangi bir PZR ürünü ve allel piki gözlenmemiştir (Tablo 2). Ayrıca Kıl-2 DNA örneğinin 260-280 nm UV incelenmesinde DNA varlığı saptanamamıştır. Kıl-2 örneğinin mikroskopik incelenmesinde kıl köklerinin (folikül) bulunmaması, örnekleme çalışmasının makas ile kesilerek yapıldığını düşündürmektedir. Tüm örneklerde ASB02 lokusu için PZR ürünleri elde edilememiştir.

Ana/yavru ilişkisinin istendiği bu çalışmada aygırın genotipinin olmaması nedeniyle kısarak ve yavrunun her lokusta en az birer allelin ortak olması gerekmektedir (Şekil 1). Kan-2 ve Kıl-1 örneklerinin

genotiplerinin aynı olması bu iki örneğin aynı bireye ait olduğunu göstermektedir. Kan-1 ve Kan-2 örnekleri 5 mikrosatellit lokusunda (AHT04, HMS02, HMS03, HTG06 ve VLH20) en az birer ortak allele sahiptir (Tablo 2). Ancak, AHT05, HMS06, HTG07 ve HTG10 lokuslarında ortak allellerin bulunmaması çalışmaya konu olan atlarda ana-yavru ilişkisinin bulunamayacağını tavsiye etmektedir.

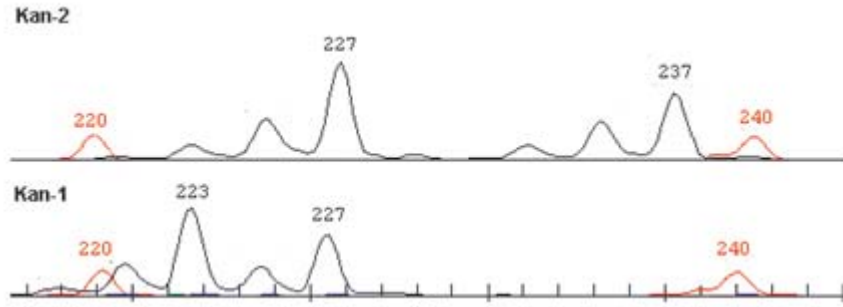
Bu çalışmada, PZR ile yükseltgenen 9 lokusa ait fragman analizleri sonucunda davaya konu olan atlarda ebeveyn ilişkisi araştırılmıştır. Kullanılan bu panelin dışlama gücü (DG) Türkiye'de henüz araştırılmamıştır. Nizamioğlu ve ark. (2006), LEX33, HMS06, HMS02, HTG10 ve AHT04 lokusları ile oluşturulan panelin toplam DG değerini 0,996 olarak bildirmişlerdir. ASB02, HMS03, HTG04, HTG10 ve VLH20 lokusları, Portekiz yerli at ırklarında toplam 0,885 ile 0,996 DG'ne sahiptir (Luis ve ark., 2002). Bu çalışmada LEX33 (Nizamioğlu ve ark., 2006) ve ASB02 (Luis ve ark., 2002) hariç diğer lokuslar kullanılmıştır. Ancak, bu çalışmada kullanılan diğer lokusların da yeterli DG sağlayacağı tahmin edilmektedir. Nitekim 14 mikrosatellit ile 0,998 (Lee ve Cho, 2006), 15 mikrosatellit lokus ile ise 0,999 (Tozaki ve ark., 2001) DG bulunmuştur.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü (2002/058) ve TÜBİTAK (TOVAG 104O464) destekli projelerin alt yapıları kullanılmıştır. Veteriner Hekim Yusuf ÖZŞENSOY, TÜBİTAK-KAMAG 106G114 projesi

Lokus	Örnekler							
	Kan-1		Kan-2		Kıl-1		Kıl-2	
AHT04	<b>142</b>	146	<b>142</b>	156	142	156	0	0
AHT05	130	130	132	134	132	134	0	0
ASB02	0	0	0	0	0	0	0	0
HMS02	223	<b>227</b>	<b>227</b>	237	227	237	0	0
HMS03	150	<b>168</b>	166	<b>168</b>	166	168	0	0
HMS06	158	168	160	166	160	166	0	0
HTG06	78	<b>94</b>	90	<b>94</b>	90	94	0	0
HTG07	125	130	119	127	119	127	0	0
HTG10	101	107	103	103	103	103	0	0
VLH20	88	<b>106</b>	96	<b>106</b>	96	106	0	0

**Tablo 2.** Fragman analizi sonucu elde edilen mikrosatellit allel ve genotipler. Kan-1 ve kan-2 örneklerinde ortak alleller italik olarak işaretlenmiştir.



Şekil 1. Kan-1 ve Kan-2 örneklerinden PZR ile yükseltgenen HMS02 lokusu allellerini gösteren elektroferogram. WELL-RED D2 (siyah) ile işaretlenmiş HMS02 ve S-400 DNA standardına ait (Beckman Coulter p/n 608098) 220 ve 240 bp pikler görülmektedir.

tarafından desteklenmektedir.

#### KAYNAKLAR

Anonim, (2008). <http://www.protocol-online.org/forums/index.php?showtopic=760> [Erişim:28.02.2008].

Binns, M.M., Holmes, N.G., Holliman, A., Scott, A.M. (1995a). The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *Brit. Vet. J.*, 151, 9–16.

Binns, M.M., Marti, E., Bowen, N. (1995b). Dog parentage testing using canine microsatellites. *J. Small. Anim. Pract.*, 36, 11, 493-497.

Bonnet, A., Thévenon, S., Maudet, F., Maillard, JC. (2002). Efficiency of semi-automated fluorescent

multiplex PCRs with 11 microsatellite markers for genetic studies of deer populations. *Anim. Genet.*, 33, 5, 343–350.

Bownling, A.T., Eggleston-Stott, M.L., Byrns, G., Clark, R.S., Dileanis, S., Wictum, E. (1997). Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Anim. Genet.*, 28, 247-252.

Bownling A.T. (2001). Historical development and application of molecular genetic tests for horse identification and parentage control. *Liv. Product. Sci.*, 72, 111-116.

DeNise, S., Johnstone, E., Halverson, J., Marshall, K., Rosenfeld, D., McKenna, S., Sharp, T., Edwards, J. (2004). Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American

- Kennel Club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Anim. Genet.*, 35, 1, 14-17.
- Heyen, D.W., Beever, J.E., Da, Y., Everts, R., Green, C., Lewin, H.A., Bates, S.R.E., Ziegle, J.S. (1997). Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellite markers in fluorescent multiplexes for semiautomated parentage testing. *Anim. Genet.*, 28, 1, 21–27.
- Hoffmann, I., Marsan, P.A., Barker, J.S.F., Cothran, E.G., Hanotte, O., Lenstra, J.A., Milan, D., Weigend, S., Simianer, H. (2004). New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: Recommendations of a joint ISAG/FAO working group. 29th ISAG (International Society of Animal Genetics) Congress, 11-16 September, 2004, Tokyo.
- Jamieson, A. (1965). The genetics of transferrin in cattle. *Heredity*, 20, 419–441.
- Kurar, E. (2001). Comparative Physical and Linkage Mapping of Bovine Chromosome 24 with Human Chromosome 18. Doktora Tezi. University of Wisconsin-Madison, USA.
- Lee, S.Y. and Cho, G.J. (2006). Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *J. Vet. Sci.*, 7, 1, 63–67.
- Lipinski, M.J., Amigues, Y., Blasi, M., Broad, T.E., Cherbonnel, C., Cho, G.J., Corley, S., Daftari, P., Delattre, D.R., Dileanis, S., Flynn, J.M., Grattapaglia, D., Guthrie, A., Harper, C., Karttunen, P.L., Kimura, H., Lewis, G.M., Longeri, M., Meriaux, J.C., Morita, M., Morrin-O'Donnell, R.C., Niini, T., Pedersen, N.C., Perrotta, G., Polli, M., Rittler, S., Schubbert, R., Strillacci, M.G., Van Haeringen, H., Van Haeringen, W., Lyons, L.A. (2007). An international parentage and identification panel for the domestic cat (*Felis catus*). *Anim. Genet.*, 38, 371–377.
- Luikart, G., Biju-Duval, M.P., Ertugrul, O., Zagdsuren, Y., Maudet, C., Taberlet, P. (1999). Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Anim. Genet.*, 30, 431-438.
- Luís, C., Gus Cothran, E., Oom, M.M. (2002). Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genet. and Mol. Biol.*, 25, 2, 131-134.
- Nizamlioğlu, M., Kurar, E., Bulut, Z., İnal, Ş., Erzurum, F. (2006). Microsatellite analysis of some horse breeds in Turkey: usefulness for parentage testing. 31st FEBS Congress Molecules in Health and Disease. 24-29 Haziran, 2006, İstanbul.
- Rohrer, G.A., Freking, B.A., Nonneman, D. (2007). Single nucleotide polymorphisms for pig identification and parentage exclusion. *Anim. Genet.*, 38, 3, 253-258.
- Slaska, B., Ziba, G., Jeewska, G. (2007). Raccoon dog (*nyctereutes procyonoides gray*) parentage testing based on STR markers. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 10, 3, <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue3/art-16.html>.
- Tozaki, T., Kakoi, H., Mashima, S., Hirota, K., Hasegawa, T., Ishida, N., Miura, N., Choi-Miura, N.H., Tomita, M. (2001). Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. *J. Vet. Med. Sci.*, 63, 11, 1191-1197.
- Villanueva, B., Verspoor, E., Visscher, P.M. (2002). Parental assignment in fish using microsatellite genetic markers with finite numbers of parents and offspring. *Anim. Genet.*, 33, 33-41.
- Weber, J.L. and May, P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. of Hum. Genet.*, 44, 388–396.

**BOŞ SAYFA**