



Systemy oceny minisatelitarnego polimorfizmu DNA i możliwości ich wykorzystania w hodowli zwierząt

Małgorzata Zawadzka

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec

The systems of minisatellite DNA polymorphism detection and their applications in animal breeding

Summary

Simple tandem repetitive minisatellite regions of DNA show high level of polymorphism arising from differences in the number of the core sequences of the repeating units. Probes consisting of a core sequence of a minisatellite detect many highly variable DNA fragments (band pattern) by Southern blot hybridisation. Since DNA *fingerprinting* data are based on information from a large number of independent and biparentally inherited hypervariable loci, this technique enables to obtain much more genetic variation than other molecular techniques. Simultaneous screening of many polymorphic loci in the genome provides valuable information for a number of fields ranging from individual identification and determination of relationship to linkage analysis and population genetics. In this paper some applications of DNA *fingerprinting* systems to farm animal breeding were reviewed.

Key words:

genetic markers, DNA *fingerprinting*, animal breeding.

Adres do korespondencji

Małgorzata Zawadzka,
Instytut Genetyki
i Hodowli Zwierząt PAN,
Jastrzębiec,
05-551 Mroków.

biotechnologia

4 (51) 62-79 2000

1. Wprowadzenie

Szczegółowa charakterystyka populacji jako element tradycyjnych badań z zakresu genetyki i doskonalenia zwierząt gospodarskich oparta była dotychczas głównie na analizie polimorfizmu grup krwi, białek surowicy, enzymów. Wykrywany polimorfizm, poza informacjami dotyczącymi struktury różnych populacji i dystansu genetycznego je dzielącego, pozwala również

prześledzić skutki selekcji, inbrodu, dryfu genetycznego oraz odpowiedzi populacji na zmiany zachodzące w środowisku. Wymienione markery posiadają jednak istotne ograniczenia: niski poziom polimorfizmu, tkankowospecyficzną ekspresję, podatność na modyfikacje. Analiza genetyczna stała się bardziej informatywna w wyniku wprowadzenia metod wykrywania polimorfizmu regionów DNA wykazujących zmienność wieloallelową i odpowiednio wysoką heterozygotyczność. Są nimi fragmenty restrykcyjne oraz sekwencje minisatelitarne i mikrosatelitarne. Opracowanie metod wykrywania naturalnie występujących polimorfizmów sekwencji DNA, z których część została wykorzystana jako markery genetyczne, stworzyło możliwości szacowania wartości osobników na poziomie molekularnym. Wykorzystanie systemów markerowych DNA stanowi skuteczne dopełnienie tradycyjnych metod badawczych oraz eliminuje trudności związane z ich stosowaniem przez bezpośrednie wykrywanie dziedziczenia różnicy w strukturze alleli. Badaniom poddaje się segmenty genomu, które ewoluują z różną intensywnością, a w konsekwencji przejawiają odmienny poziom polimorfizmu.

Sekwencje kodujące mRNA i białka stanowią jedynie ok. 5-10% genomu ssaków. Natomiast niekodująca część genomu obfituje w struktury alleliczne spełniające wymagania stawiane markerom genetycznym. Elementy niekodujące, rozproszone w genomie w wielu kopiach, częściej podlegają mutacjom niż elementy unikatowe, stąd mogą być wykorzystywane w badaniach ewolucyjnych dotyczących relatywnie krótkiego przedziału czasowego. W skład niekodującej części genomu wchodzi sekwencje występujące w pojedynczych kopiach, których przykładem są introny, oraz powtarzające się sekwencje DNA. Elementy powtarzalne klasyfikuje się na podstawie struktury motywu, rozmieszczenia i wielokrotności powtórzeń. Występują one jako sekwencje rozproszone w genomie lub ułożone w tandemowo powtarzających się blokach. Te ostatnie zaliczane są do dwóch grup: pierwsza obejmuje sekwencje tworzące duże tandemowe bloki, których jednostki występują kolejno po sobie i reprezentowana jest przez DNA satelitarny, druga to rodziny sekwencji powtórzonych α i β – satelitarnego DNA. W obrębie powtarzalnego DNA należy wyróżnić, poza wymienionymi, powtarzające się wiele razy sekwencje nukleotydów ułożone w małe tandemowo zgrupowane bloki mniej lub bardziej rozproszone w genomie. Zależnie od długości powtarzającego się odcinka i częstości jego powtórzeń są one nazywane minisatelitarnym lub mikrosatelitarnym DNA.

Systemy markerowe oparte na wykrywaniu polimorfizmu sekwencji minisatelitarnych i mikrosatelitarnych stanowią obecnie bogate źródło informacji, które służyć mogą m.in. do opisu struktury genetycznej populacji. Ich zastosowanie w istotny sposób ułatwia ustalenie czy w danej rasie lub populacji występują charakterystyczne allele i z jaką częstością, a w konsekwencji oszacowanie stopnia heterozygotyczności populacji. Pozwala również ocenić wpływ pracy hodowlanej na jej strukturę. Określenie podobieństwa pomiędzy osobnikami w obrębie i między populacjami naturalnymi i sztucznymi umożliwia z kolei ustalenie dystansu genetycznego dzielącego różne rasy danego gatunku jak również linie danej rasy oraz jej dzikich przodków.

2. Charakterystyka sekwencji rdzeniowych minisatelitów

Sekwencje minisatelitarne wyróżniają się największym w genomie polimorfizmem, uwarunkowanym obecnością alleli złożonych ze zmiennej liczby powtarzalnych jednostek. Powtarzający się motyw zawiera od 10 do 100 nukleotydów i jest powielony od dwóch do kilkuset razy w danym *locus* (1). Jeffreys i wsp. (2) donieśli o odkryciu pierwszych tego typu sekwencji w ludzkim genomie. Nakamura i wsp. (3) opisali dalsze *loci* minisatelitarne, wykazali ich polimorfizm i zaproponowali nazwę: zmienna liczba tandemowych powtórzeń VNTR (*variable number of tandem repeats*). Markery VNTR szybko okazały się użyteczne w medycynie m.in. do diagnostyki chorób genetycznych oraz jako istotny element badań medycyny sądowej. Metody opierające się na wykrywaniu polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych zawierających tandemowe powtórzenia stały się również narzędziem genetyki populacyjnej w jej szerokim rozumieniu i źródłem markerów o potencjalnym zastosowaniu w analizie sprzężeń i konstruowaniu map genetycznych.

Pierwszy wysoko zmienny region został wyizolowany z biblioteki ludzkiego DNA przez Wymana i White (4). Używając sondy pAW101 wykryli obecność 8 alleli o różnej długości u 11 analizowanych osobników. Heterozygotyczność próby wyniosła 0,79. Wynik tych badań stanowi o ich jednoznacznej przewadze nad klasycznym systemem markerów RFLP. W następnych latach wykryto kilka innych zmiennych regionów związanych z genem insuliny, genem i pseudogenem zeta-globiny i onkogenem h-ras (5). W przeprowadzonej analizie sekwencji nukleotydowych opisanych elementów potwierdziła charakter polimorfizmu oparty na występowaniu zmiennej liczby tandemowo powtarzalnych jednostek. Dodatkową zaletą nowego systemu markerowego, jak się okazało, jest możliwość używania wielu enzymów restrykcyjnych, wynikająca z polimorfizmu insercyjno-delecyjnego.

W fundamentalnej dla rozwoju badań dotyczących minisatelitów pracy Jeffreys i wsp. opisali krótką sekwencję złożoną z czterokrotnego powtórzenia motywu 33 par zasad, zlokalizowaną w pierwszym intronie ludzkiego genu mioglobiny (2). Podobne sekwencje odnaleziono także w innych wysoko zmiennych obszarach genomu. Motyw GGGNNGTGGGG występuje w wielu opisanych rejonach charakteryzujących się zmienną liczbą tandemowych powtórzeń i jest częścią jednostki powtarzającej się każdego *locus* minisatelitarnego. Ten rdzeniowy rejon jest prawdopodobnie odpowiedzialny za tworzenie się minisatelitów przez inicjację tandemowej duplikacji unikatowych sekwencji DNA i utrzymywanie różnorodności w liczbie jednostek powtórzonych danego *locus* dzięki nierównemu *crossing-over* między jednostkami. Sekwencja rdzeniowa wykazuje ponadto homologię z sekwencją χ , sygnałem inicjującym rekombinację u *Escherichia coli*.

Sekwencje minisatelitów pochodzących z genu mioglobiny (tab. 1), tworzące wspólną rodzinę, zostały użyte jako sondy molekularne do selekcji klonów rekombinacyjnej biblioteki genomu ludzkiego. Uzyskano w ten sposób sondy wykrywające polimorfizm pojedynczych *loci* (6).

Tabela 1

Sekwencje rdzeniowe wybranych minisatelitów pochodzących z genu mioglobiny

Nazwa minisatelity	Motyw powtórzony
33.1	AAGGTGGGCAGGAAGT
33.5	GGAGGX GGGCAGGAGG
33.6	AGGGCTGGAGG
33.15	AGAGGT GGGCAGGTGG
SEKWENCJA χ <i>E. coli</i>	GCTGGTGG

Pogrubionym drukiem wyróżniono sekwencję konsensusową.

Markery VNTR, jako wysoko informatywny polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, dotyczący tandemowo powtarzalnych jednostek sekwencji nukleotydowych zostały po raz pierwszy opisane przez Nakamurę i wsp. (3). Autorzy ci użyli sondy oligonukleotydowej komplementarnej do tandemowo powtarzalnych regionów genu mioglobiny (sekwencje rdzeniowe), pseudogenu zeta-globiny, genu insuliny, genu X wirusa *Hepatitis B* w celu przeszukiwania kosmidowych bibliotek ludzkiego DNA. Wiele ze sklonowanych, wysoko zmiennych sekwencji nie należało do rodziny sekwencji pochodzących z genu mioglobiny. Z ich sekwencji Nakamura i wsp. wyprowadzili nową sekwencję rdzeniową, różną od sekwencji Jeffreys'a – GNNGTGGG – i używając oligonukleotydów na niej bazujących oznaczyli ponad 200 nowych *loci*.

W genomie człowieka występuje prawdopodobnie kilka tysięcy *loci* VNTR, różniących się sekwencjami rdzeniowymi. Niektóre z nich zlokalizowane są w: końcu 5' genu insuliny, genie mieliny, regionie JH ciężkiego łańcucha immunoglobuliny, końcu 3' genu *h-ras*, genie alfa-globiny, genie kolagenu typu II i genie apolipoproteiny B.

Loci VNTR są rozproszone we wszystkich ludzkich autosomach, chromosomie X i regionie homologii X-Y (nie opisano dotychczas sekwencji charakterystycznej dla chromosomu Y), wykazują jednak preferencje do ich terminalnych rejonów. Rozmieszczenie minisatelitów w chromosomach różnych gatunków zwierząt nie jest dokładnie poznane. Wyniki nielicznych jeszcze badań potwierdzają lokalizację ludzkich minisatelitów w zakończeniach chromosomów, ich niemal równomierne rozproszenie w genomie szczura i pośrednią lokalizację w genomie świni (7). Odcinki DNA zawierające sekwencje minisatelitarne u świni i szczura często korespondują z cytogenetycznymi markerami terminalnych odcinków chromosomów człowieka. Autorzy sugerują, że minisatelity powstają w terminalnych rejonach chromosomów, zaś ich ostateczna lokalizacja jest następstwem reorganizacji struktury chromosomów.

3. Ewolucja i funkcjonalne znaczenie sekwencji minisatelitarnych

Wspólną właściwością sekwencji powtarzalnych jest ich występowanie w dużej liczbie wariantów, różniących się długością powtarzającego się motywu. Ta niestabilność zależna jest od wielu parametrów, których rzeczywista rola jest niejasna: liczby powtórzeń, sekwencji odcinka powtarzającego się, lokalizacji w chromosomie, potencjału naprawczego replikacji w komórce i fazy cyklu komórkowego.

Pochodzenie minisatelitów pozostaje dotąd kwestią otwartą. W przeprowadzonej analizie sekwencji minisatelitów i ich najbliższego otoczenia wykazano, że często bywają one sprzężone z innymi wysoko zmiennymi *loci* oraz elementami rozproszonymi – Alu, L1 – należącymi do bardzo heterogennych klas sekwencji o charakterze retrotranspozonów – SINE i LINE. Jeffreys (2) łączy obecność krótkich 5-9-nukleotydowych prostych powtórzeń flankujących wiele minisatelitów z występowaniem tego typu sekwencji jako docelowych miejsc duplikacji elementów ruchomych. Podobieństwo to nasunęło hipotezę zakładającą zaangażowanie transpozycji w powstawanie minisatelitów, podobnie jak innych elementów genomu o wysokiej zmienności. Sekwencje rdzeniowe mogą również uczestniczyć w powstawaniu minisatelitów w wyniku „poślizgu replikacyjnego”, błędu replikacji nici opóźnionej lub wielokrotnej, nierównej wymiany odcinków pierwotnie powtórzonych (przynajmniej podwojonych) między chromatydami siostrzanymi (8). Zmienność długości alleli minisatelitarnych przypisuje się procesom homologicznej rekombinacji, włączając konwersję genową i procesy nierównego *crossing-over* między jednostkami. Sekwencje powtórzone posiadają ponadto zdolność tworzenia form trypleksu, tetrapleksu lub „szpilki do włosów”, co nasuwa przypuszczenie o wpływie drugorzędowej struktury DNA na ich powstawanie i ewolucję (9). Prawdopodobnie nie ma jednak ogólnej zasady determinującej poziom polimorfizmu sekwencji powtarzalnych, a w jego powstawaniu jednocześnie uczestniczą różne mechanizmy.

Sekwencje minisatelitarne są elementami genomu nie kodującymi struktury białek, stąd nie podlegały w trakcie ewolucji silnemu naciskowi naturalnej selekcji. Prawdopodobne jest, jak się wydaje, że ewoluowały one gwałtownie, osiągając w konsekwencji ogromną różnorodność alleli i zmienność poziomu heterozygotyczności homologicznych *loci* nawet między blisko spokrewnionymi gatunkami, często tracąc przy tym lub zyskując poszczególne *loci* (10).

Wysoko zmienne regiony minisatelitarne pełnią przypuszczalnie rolę organizacyjną podczas łączenia w pary chromosomów homologicznych i rekombinacji. Hipoteza o funkcjonalnym znaczeniu tych *loci* jako uniwersalnych sygnałów rekombinacyjnych opiera się na podobieństwie ich sekwencji do sekwencji χ *E. coli* (por. tab. 1). Chandley i Mitchel (11) opublikowali wyniki hybrydyzacji *in situ* wykonanej na preparatach ludzkich komórek w stadium metafazy I przy użyciu sekwencji rdzeniowej minisatelity 33.15 jako sondy. Miejscem lokalizacji sygnałów pochodzących od wyznakowanej sondy, jak się okazało, są chiazmy, struktury związane z przebiegiem procesu *crossing-over*. Ponadto sonda hybryduje z DNA w regionie połączenia między terminalnymi

rejonami krótkich ramion chromosomów w biwalencie XY oraz w terminalnym rejonie długiego ramienia chromosomu X. W późniejszych wynikach badań potwierdzono znaczenie minisatelitów jako tzw. „gorących miejsc” rekombinacji (12,13).

W ostatnich latach opublikowano wyniki szeregu prac dotyczących funkcjonalnych aspektów występowania *loci* VNTR w genomie człowieka. Niektóre frakcje nie podlegających transkrypcji VNTR mogą pełnić rolę wzmacniaczy (*enhancer*) lub regulatorów transkrypcji. Przykładem tego rodzaju aktywności jest sekwencja VNTR występująca w regionie flankującym gen *h-ras*. Część konsensusowej sekwencji jednostki powtarzalnej złożonej z 28 pz jest miejscem wiązania niektórych czynników transkrypcyjnych. Większość alleli tego *locus* występuje w populacji z dużą częstością, jednak obecność jednego lub dwóch rzadkich alleli pociąga za sobą znaczne podwyższenie ryzyka wystąpienia nowotworów wielu tkanek (14).

Sekwencje VNTR podlegające transkrypcji wpływają na stabilność i/lub wydajność translacyjną mRNA. Nakamura i wsp. (15) skonstruowali wektory zawierające w niekodującym rejonie 3' genu lucyferazy dwa rodzaje alleli VNTR. Obecność dłuższego allelu zmniejszyła aktywność lucyferazy o ok. 60-70%, podczas gdy wkłoniowanie do wektora krótszego allelu nie zmieniało w istotny sposób aktywności enzymu. Oznaczono taką samą ilość mRNA w komórkach transfekowanych plazmidami nierekombinowanymi oraz zawierającymi obie formy alleli, co sugeruje, że zmniejszenie aktywności enzymu nastąpiło na skutek zaburzenia procesu translacji.

Obecność odpowiednich alleli VNTR zlokalizowanych w kodujących regionach DNA może również wpływać na aktywność produktu ekspresji genu (15).

4. Systemy profilowania DNA typu *fingerprinting*

Polimorfizm DNA odgrywa zasadniczą rolę w tworzeniu systemów markerowych przydatnych m.in. do identyfikacji osobników i analizy sprzężeń genetycznych. Dotychczas opisane markery RFLP są nisko heterozygotyczne i w związku z tym nie są wystarczająco informatywne dla celów identyfikacji osobników. W odróżnieniu od nich, sekwencje minisatelitarnego DNA wykazują znacząco większy poziom polimorfizmu. Udział w populacji osobników heterozygotycznych pod względem *loci* minisatelitarnych jest także istotnie wyższy. Te ważne dla informatywności układu markerowego cechy pozwoliły na opracowanie i wprowadzenie do praktyki nowych systemów testowania DNA. Należą do nich m.in. zastosowanie wielopozycyjnych sond minisatelitarnych (*multilocus system* – MLS) i sond wykrywających polimorfizm pojedynczych *loci* minisatelitarnych – VNTR.

Profilowaniem DNA określa się zastosowanie różnorodnych testów opartych na wykrywaniu polimorfizmu DNA do celu identyfikacji osobników lub szeroko pojętego określania pokrewieństwa, przy czym termin DNA *fingerprinting* zarezerwowany jest jedynie dla techniki wprowadzonej przez Jeffreys'a i wsp. (16), w której wykorzystywane są sondy wielopozycyjne.

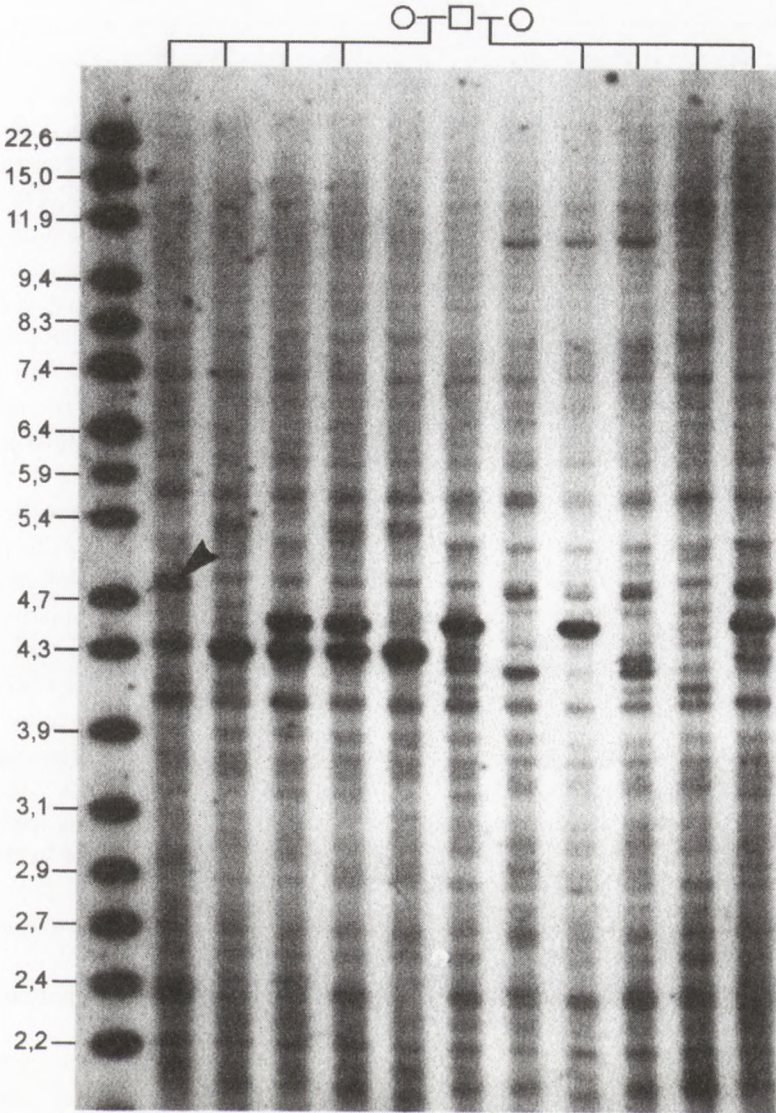
4.1. DNA *fingerprinting*

Wśród dostępnych obecnie systemów profilowania metoda DNA *fingerprinting* wyróżnia się największą specyficnością osobniczą i informatywnością pojedynczej analizy.

Genomowy DNA, izolowany z jąder komórkowych różnych tkanek, poddawany jest trawieniu różnymi enzymami restrykcyjnymi, „przecinającymi” DNA z dużą częstością (*Hinfl*, *HaeIII*, *Mbol*, *AluI*). Sekwencje DNA specyficznie rozpoznawane przez restryktazy leżą poza obszarami tandemowych powtórzeń, w rejonach flankujących allele minisatelitów. W wyniku trawienia DNA uzyskiwane są zatem, spośród wielu innych, również fragmenty restrykcyjne zawierające tandemowo powtarzające się jednostki minisatelitarne. Długość tych fragmentów jest proporcjonalna do liczby zawartych w nich jednostek rdzeniowych minisatelity. Fragmenty restrykcyjne poddaje się elektroforezie w żelu agarozowym w warunkach dobranych tak, aby osiągnąć ich maksymalny rozdział. Rozdzielone fragmenty są następnie unieruchamiane w wyniku przeniesienia na filtry nitrocelulozowe lub częściej nylonowe, wg metody *Southern* (*Southern blotting*), i hybrydyzowane z sondą molekularną zawierającą tandemowe powtórzenia konserwatywnego motywu sekwencji minisatelitarnej.

W następstwie hybrydyzacji sekwencji komplementarnych otrzymuje się dla badanego osobnika wiele prążków, będących fizyczną reprezentacją sygnału pochodzącego od odpowiednio wyznakowanej sondy związanej z allelami wielu *loci* na wszystkich chromosomach. Uzyskany profil DNA zależny jest u badanego gatunku od zastosowanej kombinacji sonda/enzym restrykcyjny. Liczba i położenie prążków we wzorze DNA *fingerprinting* są specyficzne dla osobnika, przy ok. 10-20% prążków przypadkowo wspólnych dla dwóch osobników (17). Z wyjątkiem bliźniąt monozygotycznych oraz osobników silnie zimbredowanych, indywidualny wzór DNA *fingerprinting* jest równie niepowtarzalny jak układ linii papilarnych człowieka. Stąd też pochodzi powszechnie przyjęta nazwa tej metody testowania DNA. Prążki wchodzące w skład indywidualnego wzoru (allele minisatelitarne) są dziedziczone w prosty mendelowski sposób, w połowie od obu rodziców, przy częstości mutacji w kierunku nowych alleli ok. 0,001-0,004 na *locus* na gametę (2). Wzór prążkowy jest wysoce stabilny w różnych tkankach oraz w komórkach poddanych hodowli. Jeffreys i wsp. (16) dowodzą niezmienności wzoru uzyskanego z preparatów DNA izolowanego z krwi i DNA izolowanego z linii komórkowych tego samego osobnika po ich transformacji wirusem Epstein-Barr.

W przeprowadzonej identyfikacji sekwencji rdzeniowych minisatelitów jako elementów zaangażowanych w procesy rekombinacji ludzkiego DNA wysunięto przypuszczenie o ich ewolucyjnym konserwatyzmie (18). Zgodnie z przewidywaniami sondy wielopozycyjne, stosowane w testowaniu DNA metodą *fingerprinting* nie są specyficzne gatunkowo. Izolowane z genomu człowieka i wykorzystywane początkowo jedynie do profilowania ludzkiego DNA używane są obecnie z równym powodzeniem w analizie genetycznej innych gatunków. Najczęściej stosowane sondy wielopozycyjne to:



Fot. 1. Analiza segregacji alleli minisatelitarnych w rodzinie gęsi złożonej z samca, dwóch samic i ośmiorga potomstwa. Fragmenty DNA trawionego enzymem *Msp* I hybrydyzowano z sondą 33.6. Strzałką oznaczono pozycję fragmentu mutacyjnego.

– sondy Jeffreys'a 33.6 i 33.15, komplementarne do naturalnie występujących w genomie człowieka sekwencji minisatelitarnych zlokalizowanych na chromosomach: 1cen-q24 i 7q31.3-qter (2), stanowiące wielokrotne (odpowiednio 18- i 29-krotne) powtórzenie sekwencji 33 i 16 zasad. W przypadku DNA człowieka każda z sond wykrywa ok. 17-19 prążków i wykazuje częstość mutacji wzoru 0,0054 i 0,0035.

Obie sondy dają razem ok. 35 niezależnie dziedziczonych alleli, z których ok. 20-25% jest wspólnych dla osób niespokrewnionych, a 65% dla rodzeństwa niejednojąowego (16);

– sonda Vassarta – wzór prążkowy powstaje w wyniku hybrydyzacji z DNA faga M13 posiadającego w genie białka III powtórzony motyw (280 pz) sekwencji konsensusowej GAGGGTGGXGGXTCT (lub w wersji skróconej GGXGGXGGXTCT) (19);

– wysoko zmienny region 3' genu α -globiny złożony z tandemowych powtórzeń jednostki 17 nukleotydowej (20);

– sonda R18.1 (21) – wyizolowany z genomu bydłowego fragment o długości 1027 pz zawierający siedmiokrotnie powtórzony motyw złożony z 10-18 powtórzeń segmentu CA, rozdzielonych zmienną (15% różnic między powtórzeniami) sekwencją 35 par zasad. W przypadku sondy R18.1 wzór prążków DNA *fingerprinting* uzyskiwany jest w wyniku wykrywania alleli zarówno przez elementy poli(CA) jak i jednostkę 35 pz;

– sondy oligonukleotydowe STR, specyficznie wykrywające polimorfizm krótkich sekwencji powtarzalnych: (GATA)₄ i (GACA)₄ oraz poli(GAC/TA), (CAC)₅, poli(CA).

Podstawowe cechy, które decydują o atrakcyjności metody DNA *fingerprinting*, czyniąc ją szczególnie często metodą z wyboru w identyfikacji osobników i badaniach zmienności genetycznej populacji można ująć w następującym zestawieniu:

1. Każda sonda zawierająca sekwencję rdzeniową minisatelity może potencjalnie wykrywać różne formy alleli wielu wysoko zmiennych *loci* równocześnie.

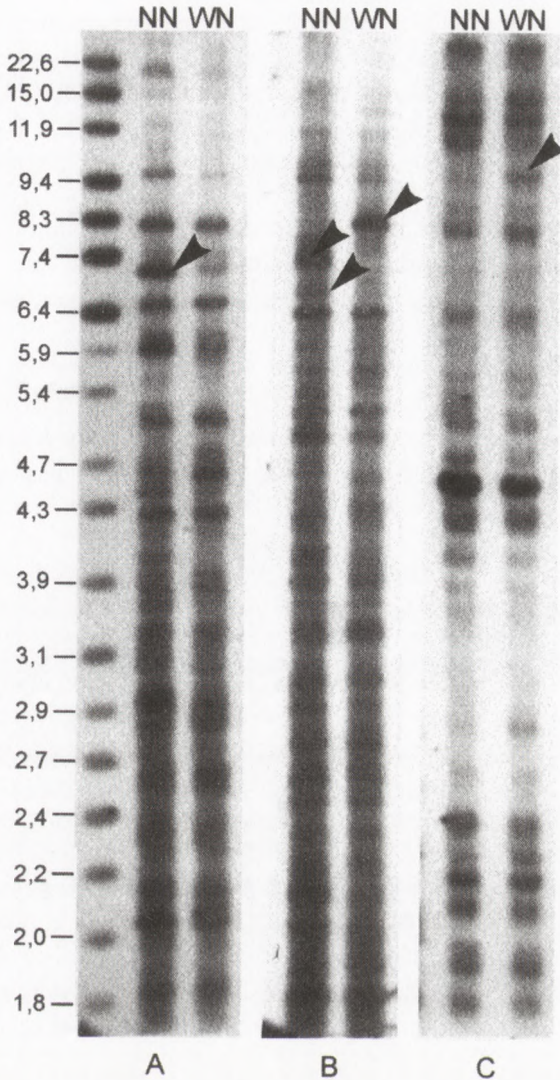
2. Dla każdego osobnika, przy użyciu określonej sondy, allele są ujawniane jako prążki hybrydyzacyjne odpowiadające fragmentom DNA o długości w zakresie od 3 kpz do ponad 23 kpz. Różne osobniki posiadają wykrywalne allele w wielu zestawach *loci*, stąd zmienność pomiędzy osobnikami dotyczy całkowitej liczby alleli, a zatem także wszystkich wykrywanych *loci*.

3. We wzorze DNA *fingerprinting* allele minisatelitarne nie są sprzężone i dziedziczą się u potomstwa niezależnie (18).

4. Większość osobników jest heterozygotyczna pod względem pojedynczego *locus*.

5. Sondy minisatelitarne zawierające różne sekwencje powtarzające się hybrydują do różnych zestawów *loci*. Informatywność analizy znacznie podnosi zastosowanie kilku sond i enzymów restrykcyjnych w różnych układach. Właściwy dobór sond i enzymów decyduje o uzyskaniu wzoru hybrydyzacyjnego o możliwie największym zróżnicowaniu. Użycie kilku sond wielopozycyjnych w hybrydyzacji z fragmentami DNA otrzymanymi w wyniku trawienia kilkoma enzymami restrykcyjnymi umożliwia potencjalnie identyfikację ogromnej liczby wysoko zmiennych, minisatelitarnych *loci*.

6. Hybrydyzacyjny wzór prążkowy DNA *fingerprinting* jest osobniczo specyficzny. Prawdopodobieństwo odnalezienia we wzorze DNA *fingerprinting* osobnika A wszystkich prążków obecnych u osobnika B wynosi dla sondy 33.15 – 3×10^{-11} (16). Prawdopodobieństwo, że oba osobniki posiadają taki sam wzór prążkowy dla tej sondy jest zatem jeszcze niższe, zaś prawdopodobieństwo, że posiadają ten sam



Fot. 2. Reprezentatywne wzory DNA *fingerprinting* grup osobników gęsi charakteryzujących się skrajnymi wartościami nieśności: A – hybrydyzacja fragmentów DNA trawionego enzymem restrykcyjnym *Hinf*I z sondą 33.6; B – hybrydyzacja fragmentów DNA trawionego enzymem restrykcyjnym *Hinf*I z sondą 33.15; C – hybrydyzacja fragmentów DNA trawionego enzymem restrykcyjnym *Msp*I z sondą 33.6. Ścieżki elektroforetyczne oznaczone symbolami NN przedstawiają reprezentatywne wzory wymieszanego DNA grupy osobników o najniższej nieśności i odpowiednio WN – grupy osobników o najwyższej nieśności. Strzałkami oznaczono prążki charakterystyczne dla grup. Długość fragmentów wzorca NICE DNA Analysis Ladder podano w tys. pz.

wzór dla dwóch sond jest niższe niż 5×10^{-19} . System ten pozwala także na identyfikację osobników, które łączy pierwszy stopień pokrewieństwa.

7. Ponieważ analiza typu DNA *fingerprinting* nie wymaga dokładnej wiedzy dotyczącej struktury i organizacji badanego genomu, jest ona szczególnie użyteczna w przypadku badania polimorfizmu DNA u gatunków o stosunkowo słabo poznanej budowie materiału genetycznego.

System wielopozycyjnej analizy DNA, mimo że wysoce informatywny, nie umożliwia analizy genotypów osobników – „fenotypuje” DNA, nie dostarczając danych dotyczących charakterystyki *loci* i alleli. Metoda ta nie pozwala zatem na określenie, które prążki są reprezentacją alleli pochodzących z jednego *locus*. W wielu aplikacjach fakt ten nie stanowi istotnego problemu, natomiast tam gdzie jest to konieczne wykonuje się równoległe indywidualne analizy wybranych *loci*. Szeroko dyskutowany jest w piśmiennictwie również problem opisu i interpretacji statystycznej wyników (22-24). Dotyczy to szczególnie ujednoczenia kryteriów określania pochodzenia, bowiem prawdopodobieństwo potwierdzenia lub wykluczenia ojcostwa nie może być w przypadku analizy wielopozycyjnej szacowane na podstawie częstości alleli.

4.2. Profilowanie DNA za pomocą sond pojedynczego *locus*

Alternatywnym podejściem badawczym jest zastosowanie analizy pojedynczego *locus* VNTR (*single locus system* – SLS). Metodyka analizy pojedynczego *locus* minisatelitarnego obejmuje te same etapy co wykrywanie polimorfizmu wielu *loci*. Różnica dotyczy jedynie warunków w jakich zachodzi proces hybrydyzacji sondy do fragmentów restrykcyjnych badanego DNA. Wymagane jest stosowanie tzw. „hybrydyzacji wysokich wymagań” co gwarantuje precyzyjne przyłączenie sondy do idealnie komplementarnej sekwencji ponad 50. zasad. Hybrydyzacja fragmentów restrykcyjnych DNA z sondą pojedynczego *locus* pozwala na określenie genotypu osobnika (5). Odmienne allele pochodzące z określonego *locus* uwidaczniane są jako prążki hybrydyzacyjne, odpowiadające fragmentom restrykcyjnym zawierającym różną liczbę tandemowych powtórzeń, a zatem migrującym w żelu agarozowym z różną prędkością.

W celu umożliwienia jednoznacznego wnioskowania na podstawie analizy jednopozycyjnej konieczne jest wykonanie badań kilku niezależnych *loci*. Ocenę pokrewieństwa osobników przeprowadza się z uwzględnieniem częstości występowania alleli w populacji. Niektóre sondy pojedynczego *locus*, stosowane w praktyce profilowania ludzkiego DNA, wykrywają jednak ponad 100 różnych alleli, których częstość w populacji jest trudna do ustalenia. Wartość analizy jednopozycyjnej zależy zatem od homogenności populacji. Jednym z najbardziej polimorficznych *loci* jest *locus* D1S8, którego allele o wielkości od 1 do 23 kpz wykrywane są w hybrydyzacji z sondą MS1, przy czym prawie 99% osobników w populacji to heterozygoty. Jednostka powtarzalna złożona jest z 9 pz i przypuszcza się, że w całej populacji występuje ponad 2400 alleli (5). Nie wszystkie te allele mogą zostać rozdzielone elektro-

foretycznie, co pociąga za sobą quasi-ciągły rozkład długości alleli wykrytych w populacji. *Loci* o niższej zmienności (<96%) cechują się mniejszą liczbą odmiennych alleli, dając tym samym możliwość właściwej oceny ich frekwencji.

O ile sondy wielopozycyjne hybrydują do DNA różnych gatunków, to sondy jednopozycyjne są specyficzne gatunkowo. Konieczne jest zatem opracowanie sond pojedynczego *locus* dla każdego badanego gatunku. Sondy takie uzyskuje się przeszukując biblioteki genomowe danego gatunku przy użyciu oligonukleotydów o sekwencjach wzorowanych na sekwencjach rdzeniowych minisatelitów, w celu izolacji klonów wykrywających polimorfizm.

4.3. Metody profilowania DNA typu *fingerprinting* wykorzystujące technikę PCR

Wkrótce po doniesieniu o możliwości wykrywania polimorfizmu minisatelitów Jeffreys i wsp. (25) zaproponowali połączenie czułości i szybkości właściwych technice amplifikacji DNA (PCR) z informatywnością analizy *loci* VNTR. Pozwoliło to na analizowanie *loci* minisatelitarnych nawet na poziomie pojedynczej komórki. Wykorzystanie analizy pojedynczego *locus* VNTR stanowi bogate, obok sekwencji mikrosatelitarnych, źródło polimorficznych markerów genetycznych o potencjalnym zastosowaniu również w konstruowaniu map organizacji genomu zwierząt gospodarskich.

Gwałtowny rozwój techniki PCR pozwolił nie tylko na podniesienie czułości techniki analizy pojedynczego *locus* mini- i mikrosatelitarnego, ale także na opracowanie nowych metod testowania DNA opartych na systemach markerowych typu *fingerprinting*.

– Losowa amplifikacja polimorficznego DNA – RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Podstawą metody RAPD, wprowadzonej przez Williamsa i wsp. (26), jest amplifikacja DNA z wykorzystaniem starterów oligonukleotydowych (najczęściej 10-merów) o arbitralnie ustalonej sekwencji. Większość genomów zawiera odpowiednią liczbę miejsc hybrydyzacji dla krótkiego startera, dlatego każdy użyty w metodzie RAPD starter zapoczątkowuje reakcję amplifikacji wielu *loci*. Wykrywany polimorfizm jest wynikiem zarówno zmian sekwencji w miejscu przyłączenia startera (mutacje punktowe), jak też zmian długości matrycy (delecje, insercje), powodujących nieskuteczność amplifikacji. Dokładność analizy zależy głównie od warunków reakcji PCR, co bywa przyczyną braku powtarzalności wyników. Markery RAPD dziedziczą się ponadto w sposób dominacyjny, czyniąc niemożliwe odróżnienie osobników heterozygotycznych od homozygotycznych. Jednocześnie metoda ta nie wymaga wstępnej informacji o sekwencji analizowanego DNA i pozwala na uzyskanie wyniku w bardzo krótkim czasie.

– Polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów DNA – AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). AFLP (27) jest najnowszą metodą otrzymywania obrazu polimorfizmu DNA, używaną początkowo jako źródło markerów typu *fingerprinting*.

ting w badaniach genomu roślinnego. Metoda opiera się na selektywnej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych całkowitego genomowego DNA. Procedura wymaga trzech etapów: 1) trawienia genomowego DNA restryktazami i przyłączenie do otrzymanych fragmentów oligonukleotydowych adapterów, 2) selektywnej amplifikacji zestawu fragmentów restrykcyjnych, 3) elektroforetycznego rozdziału produktów amplifikacji. Amplifikacja fragmentów restrykcyjnych przeprowadzana jest przy użyciu starterów o sekwencji komplementarnej do sekwencji adapterów, które posiadają wybrane nukleotydy na końcach 3'. W rezultacie otrzymuje się zestaw fragmentów restrykcyjnych (średnio około 50-100) ujawnionych za pomocą PCR bez znajomości sekwencji nukleotydowej regionów flankujących. Ponieważ polimorficzne fragmenty segregują zgodnie z prawami mendlowskimi, a metoda cechuje się dużą efektywnością i powtarzalnością wyników, wykorzystywana jest również w badaniach genomu zwierząt gospodarskich.

5. Wybrane przykłady zastosowania metody DNA *fingerprinting* w hodowli zwierząt

Ze względu na ograniczony zakres prezentowanego przeglądu zrezygnowano ze szczegółowego opisu możliwości płynących z zastosowania metody DNA *fingerprinting* w naukach biologicznych i medycznych, zarówno w ich aspekcie poznawczym jak i praktycznym. Warto jednak wymienić niektóre z nich: weryfikacja pochodzenia linii komórkowych, badania epidemiologiczne szczepów bakteryjnych i innych patogenów, detekcja zmian w DNA zachodzących podczas procesów nowotworzenia, monitorowanie procesu transplantacji, pośrednia diagnostyka chorób dziedzicznych (także w badaniach prenatalnych), potwierdzanie lub wykluczanie domniemanego ojcostwa, identyfikacja bliźniąt jedno- i dwujajowych.

Sekwencje minisatelitarne stanowią bogate źródło markerów genetycznych szeroko stosowanych w analizach rodzinowych, demograficznych, filogenetycznych i biochemicznych wielu gatunków zwierząt dzikich i gospodarskich oraz w badaniach mających bezpośredni związek z praktyką hodowlaną.

5.1. Identyfikacja osobników, określanie zależności między osobnikami wewnątrz populacji i między populacjami

Metoda DNA *fingerprinting* znajduje szerokie zastosowanie w określaniu podobieństwa i zależności między osobnikami: identyfikacja, kontrola pochodzenia i weryfikacja rodowodowa, ustalanie podobieństwa osobników w obrębie populacji i szacowanie poziomu wsobności (*inbred*). Stopień podobieństwa między wzorami DNA *fingerprinting* blisko spokrewnionych populacji stanowi również podstawę do szacowania dystansu genetycznego dzielącego badane populacje.

W badaniach struktury naturalnych populacji nieodzowne jest poznanie wzajemnych relacji między osobnikami, jednak wiarygodne określenie pochodzenia (potwierdzenie lub wykluczenie ojcostwa) nie jest w pełni możliwe przy użyciu tradycyjnych systemów markerowych. Dla licznych gatunków przeciwności nie są dostępne albo *loci* nie są wystarczająco polimorficzne, stąd w pracach dotyczących demografii, ewolucji i zachowania naturalnych populacji często stosowana bywa metoda DNA *fingerprinting*.

Właściwe ustalenie pochodzenia jest szczególnie istotne w przypadku zwierząt gospodarskich, w których hodowli ponoszone są często wysokie nakłady na programy sztucznego unasieniania i przenoszenia zarodków, zaś wartość hodowlana osobników oceniana jest na podstawie oceny ich potomstwa. Możliwość ustalenia przynależności osobnika do rodziny, linii lub rasy jest warunkiem koniecznym dla hodowli zachowującej czystość linii lub rasy oraz dla kontroli pochodzenia osobników używanych do reprodukcji (weryfikacja dokumentacji hodowlanej). Dotychczas identyfikacja osobników i kontrola pochodzenia u bydła, koni i innych gatunków przeprowadzona była głównie przy użyciu polimorficznych systemów markerów grup krwi. Prawdopodobieństwo zgodności grup krwi dwóch koni losowo wybranych z populacji jest niskie (waha się między 1 do 25 000 a 1 do 500 000 dla różnych ras). Ellegren i wsp. podają, że przy wykorzystaniu metody DNA *fingerprinting* dla kombinacji sondy (TG)_n i enzymu *Hinfl* prawdopodobieństwo wystąpienia identycznego wzoru prążkowego u niespokrewnionych kłusaków szwedzkich i koni czystej krwi arabskiej wynosi odpowiednio 10⁻⁶ i 10⁻⁵ (28). Jednakże użycie dwóch sond molekularnych (33.6 i (TG)₁₀) powoduje, że prawdopodobieństwo to istotnie maleje i wynosi od 10⁻¹⁰ do 10⁻¹². W przypadku analizy pochodzenia koni wymienionych ras wykorzystane sondy wykluczają fałszywe określenie ojcostwa w 96-99% przypadków, przy założeniu braku prążków będących wynikiem mutacji we wzorach (29).

U wielu gatunków zwierząt zidentyfikowano pozytywną korelację między stopniem pokrewieństwa osobników a odsetkiem wspólnych prążków w ich profilach DNA. Badania tego typu opierają się na założeniu, że prążki wykrywane w poszczególnych profilach DNA *fingerprinting* reprezentują allele pozostające w równowadze sprzężeniowej. Skutecznym sposobem wykluczenia ewentualności naruszenia równowagi sprzężeń jest przeprowadzenie analizy segregacji alleli w możliwie dużych rodzinach badanego gatunku. Analizy takie, zostały dokonane dla wielu gatunków zwierząt gospodarskich: kur, świń, owiec i bydła. Jednocześnie u gatunków tych wykrywano zmienność polimorficznych *loci* minisatelitarnych, a na jej podstawie szacowano heterozygotyczność populacji. Na fotografii 1 przedstawiono przykładowy luminogram analizy segregacji alleli minisatelitarnych w rodzinie gęsi.

Zmienność we wzorze DNA *fingerprinting* wewnątrz populacji zmniejsza się wraz ze wzrostem poziomu wsobności (*inbred*). Wiele komercyjnych linii i rodów drobiu poddawanych jest selekcji w kierunku specyficznego, pożądanego fenotypu. Grupy takie wywodzą się zwykle od niewielkiej liczby osobników i utrzymywane są w stadach zamkniętych. Stopień wsobności tego typu populacji wykrywany jest w anali-

zie wielopozycyjnej DNA *fingerprinting* jako wyższy niż oczekiwany poziom podobieństwa między osobnikami. Opracowano krzywą zależności między zmiennością prążków we wzorze DNA *fingerprinting* a współczynnikiem wsobności, która może być używana do określenia stopnia wsobności w populacjach o nieznanym charakterystyce (30). Jest to szczególnie przydatne dla określania stopnia spokrewnienia osobników w małych izolowanych populacjach zwierząt narażonych na wyginięcie.

DNA *fingerprinting* jest także użytecznym narzędziem określania dystansu genetycznego dzielącego populacje tego samego gatunku oraz odtwarzania historii hodowli badanej populacji. Wyniki analizy genetycznej selekcionowanych rozbieżnie linii w populacji zwierząt danego gatunku wskazują, że podobieństwo wzorów DNA *fingerprinting* (określane jako udział wspólnych prążków we wzorach badanych linii) odpowiada genetycznemu podobieństwu między liniami i może być użyte jako wiarygodny wskaźnik oceny dystansu genetycznego. Indeksy dystansu genetycznego otrzymane na podstawie porównania wzorów hybrydacyjnych (proporcja prążków wspólnych, frekwencja poszczególnych prążków) właściwie opisują relacje między populacjami (31). Siegel i wsp. (32) opisali w ten sposób zależności genetyczne między dzikim kurem dżungli a współczesnymi rodami komercyjnymi kur.

5.2. DNA *fingerprinting* jako narzędzie praktyki hodowlanej

Metoda wielopozycyjnej analizy DNA *fingerprinting* znajduje często zastosowanie w rozwiązywaniu problemów praktyki hodowlanej. Jednym z nich jest zjawisko frymartyzmu często powodującego nieplodność zwierząt pochodzących z różnopłciowych cięż mnogich. Przyczyną zaburzeń jest wymiana komórek prekursorowych szpiku kostnego pomiędzy zarodkami bliźniąt u bydła, koni, świń i owiec. Określenie kariotypu osobnika z frymartyzmem identyfikuje obecność linii leukocytów z chromosomami XX i XY. Plante i wsp. (33) wykazali, że stosując sondę minisatelitarną pSRC-7 u bydła można potwierdzić nie tylko występowanie chimeryzmu leukocytarnego, ale również brak wymiany komórek pomiędzy bliźniętami tej samej płci.

Metodę DNA *fingerprinting* można wykorzystać także do wyboru wyselekcjonowanych linii przy krzyżowaniu towarowym dla uzyskania jak największego efektu heterozji. Pozwala ona bowiem ocenić dystans genetyczny pomiędzy osobnikami i populacjami. Heterozygotyczność potomstwa oraz heterozja są zaś wysoko skorelowane z poziomem dystansu genetycznego dzielącego populacje rodzicielskie. Maksymalny efekt heterozji spodziewany jest przy krzyżowaniu linii o minimalnym udziale prążków wspólnych we wzorze (34,35). Ustalenie poziomu heterozygotyczności potomstwa na podstawie częstości markerów w pokoleniu rodzicielskim, może być pomocne do opracowania skutecznego systemu kojarzeń.

W tradycyjnych programach hodowlanych pożądana cecha może być wprowadzana do komercyjnej linii biorcy przez krzyżowanie osobników pomiędzy liniami,

i serię krzyżówek wstecznych, z selekcją potomstwa na ekspresję cechy w każdym pokoleniu. W przypadku hodowli bydła procedura taka trwa kilka lat. Zastosowanie metody DNA *fingerprinting* zwiększa efektywność prac hodowlanych poprzez redukcję liczby pokoleń krzyżówek wstecznych. Hillel i wsp. (36) oceniają, że już dwa pokolenia BC₁ i BC₂ są wystarczające dla odzyskania 99,9% genomu linii biorcy przy natężeniu selekcji ok. 10% w obu pokoleniach.

Największe znaczenie techniki DNA *fingerprinting* w hodowli zwierząt gospodarskich polega na wykrywaniu sprzężeń między *loci* minisatelitarnymi a głównymi genami kontrolującymi ekspresję cech ilościowych – QTL (*quantitative traits loci*). Identyfikacja markerów pozostających w sprzężeniach z QTL pozwala na łatwiejsze manipulowanie zmiennością cech ważnych gospodarczo oraz istotnie zwiększa możliwość potencjalnego lokalizowania genów zaangażowanych w kodowanie tych cech. Powtarzalne sekwencje DNA, jakkolwiek nie zaangażowane w funkcje kodowania informacji o strukturze białek, a zatem nie podlegające procesom selekcji, dostarczają jednak istotnych danych o skutkach tych procesów dotyczących *loci* strukturalnych, z którymi są sprzężone. Mechanizm ten jest szczególnie cenny dla współczesnej hodowli zwierząt ponieważ pozwala na wykorzystanie informatywności markerów w celu identyfikacji genów kontrolujących ważne gospodarczo cechy ilościowe.

Analiza molekularna zmienności o charakterze ciągłym opiera się na założeniu, że osobniki pochodzące z badanej populacji, wykazujące skrajne wartości danej cechy różnią się potencjalnie między sobą w największej liczbie *loci* kontrolujących tę cechę. Porównywanie reprezentatywnych wzorów DNA *fingerprinting* dla grup osobników o najwyższych i najniższych parametrach cechy w jej normalnym rozkładzie fenotypowym (*tail analysis*) może zatem przybliżyć identyfikację sprzężeń. W przypadku braku sprzężenia pomiędzy *loci* QTL a prążkami obecnymi we wzorach DNA *fingerprinting* analizowanych grup, reprezentatywne profile powinny pozostać identyczne (37).

Plotsky i wsp. (38) zastosowali strategię analizy segregacji alleli minisatelitarnych w badaniach dotyczących cechy odkładania tłuszczu wewnętrznego u kur typu mięsnego. Do badań użyto potomstwo linii ojcowskiej, pochodzącej z pokolenia F₁ krzyżówki pomiędzy liniami o niskim i wysokim stopniu odkładania tłuszczu wewnętrznego oraz matczynej, o niskim wskaźniku odkładania tłuszczu. Porównanie reprezentatywnych wzorów prążkowych (uzyskanych przy użyciu sond 33.6 i R 18.1) potomstwa o skrajnych wartościach cechy doprowadziło do zidentyfikowania specyficznego prążka pochodzenia ojcowskiego, związanego z niskim stopniem odkładania tłuszczu. Dunnington i wsp. (39) donieśli o skutecznym zastosowaniu tego typu analizy do identyfikacji sprzężeń pomiędzy profilem DNA *fingerprinting* a długością skoku nieśnością i masą ciała u kur (40). Podjęto także poszukiwania potencjalnych sprzężeń pomiędzy reprezentatywnymi wzorami DNA *fingerprinting* a cechami związanymi z nieśnością u gęsi. Na fotografii 2 przedstawiono wzory prążkowe otrzymane w wyniku analizy grup ptaków o najniższej (26,3 jaj – NN) i najwyższej

(40,8 jaj – WN) nieśności. Zidentyfikowane specyficzne prążki w obrazie DNA *fingerprinting* odróżniające grupy osobników o najniższym i najwyższym poziomie badanej cechy posłużyć mogą jako punkt odniesienia do badań sprzężeń alleli minisatelitarnych z *loci* kontrolującymi cechy ilościowe.

Zastosowanie wielopozycyjnej metody DNA *fingerprinting* w celu poszukiwania genetycznych markerów cech ilościowych jest ograniczone w przypadku gatunków o niskiej plenności z powodu trudności w uzyskaniu odpowiednio licznej reprezentacji potomstwa i relatywnie wysokiego poziomu podobieństwa wzorów pomiędzy osobnikami. U bydła osobniki przydatne do badania sprzężeń są zwykle potomstwem wielu niespokrewnionych matek. Analiza fragmentów pochodzenia matczynego nie jest zatem przydatna z uwagi na niewielką liczbę potomstwa jednej matki. Dlatego sugeruje się raczej porównanie wzorów DNA *fingerprinting* grup córek jednego ojca wykazujących skrajne wartości badanej cechy (41).

Dysponując odpowiednią liczbą potomstwa w badaniach rodzinowych można dokonać identyfikacji zależności między obecnością polimorficznych alleli minisatelitarnych a występowaniem jednostek chorobowych lub ekspresją innych cech. Georges i wsp. (42) donieśli o identyfikacji sprzężenia pomiędzy genem odpowiedzialnym za cechę hipertrofii mięśniowej u bydła a specyficznym prążkiem hybrydacyjnym wykrywanym we wzorze DNA *fingerprinting* generowanym przez sondę EFD134.7, wywodzącą się z genomu człowieka.

Dla pełnego prześledzenia segregacji sprzężeń oraz umiejscowienia *loci* QTL w genomie konieczna jest jednak izolacja i wykorzystanie sond specyficznych dla pojedynczych *loci*, odpowiadających zidentyfikowanemu prążkom (43).

Literatura

1. Tautz D., (1993), *DNA fingerprinting: state of the science*, Eds. Pena S. D. J., Chakraborty R., Epplen J. T., Jeffreys A. J., 21-28, Birkhauser Verlag, Basel.
2. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985a), *Nature*, 314, 67-73.
3. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Krumlin E., White R., (1987), *Science*, 235, 1616-1622.
4. Wyman A. R., White R., (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6754-6758.
5. Jeffreys A. J., Royle N. J., Patel I., Armour J. A. L., MacLeod A., Collick A., Grayl C., Neumann R., Gibbs M., Crosier M., Hill M., Signer E., Monckton D., (1991), *DNA fingerprinting: approaches and applications*, Eds. Burke T., Dolf G., Jeffreys A. J., Wolff R., 1-19, Birkhauser Verlag, Basel.
6. Wong Z., Wilson V., Jeffreys A. J., Thein S. L., (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 4605-4616.
7. Amarger V., Gauguier D., Yerle M., Apiou F., Pinton P., Giraudeau F., Monfouilloux S., Lahrop M., Dutrillaux B., Buard J., Vergnaud G., (1998), *Genomics*, 52, 62-71.
8. Haber J. E., Louis E. J. (1998), *Genomics*, 48, 132-135.
9. Jeffreys A. L., Tamaki K., MacLeod A., Monckton D. G., Neil D. L., Armour J. A. L., (1994), *Nature Genet.*, 6, 136-145.
10. Burke T., Hanotte O., Bruford M. W., Cairns E., (1991), *DNA fingerprinting: approaches and applications*, Eds. Burke T., Dolf G., Jeffreys A. J., Wolff R., 154-168, Birkhauser Verlag, Basel.
11. Chandley A. C., Mitchell A. R., (1988), *Cytogenet. Cell Genet.*, 48, 152-155.
12. Wahls W. P., Wallace L. J., Moore P. D., (1990), *Cell*, 60, 95-103.

13. Wahls W. P., (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 37, 37-75.
14. Wolff R., Nakamura Y., Odelberg S., Shiang R., White R., (1991), *DNA fingerprinting: approaches and applications*, Eds. Burke T., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff R., 20-38, Birkhauser Verlag, Basel.
15. Nakamura Y., Koyama K., Matsushima M., (1998), *J. Hum. Genet.*, 43, 149-152.
16. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., (1985b), *Nature*, 316, 76-79.
17. Bruford M., Burke T., (1991), *Molecular Genetic Analysis of Populations*, Ed. Hoelzel A.R., 225-269, IRL Press, Oxford, London.
18. Jeffreys A. J., Wilson V., Thein S. L., Weatherall D. J., Ponder B. A. J., (1986), *Am. J. Hum. Genet.*, 39, 11-24.
19. Vassart G., Georges M., Monsieur E. A., (1987), *Science*, 235, 683.
20. Fowler S. J., Gill P., Werrett D. J., Higgs D. R., (1988), *Hum. Genet.*, 79, 142-146.
21. Haberfeld A., Hillel J., (1991), *Anim. Biotech.*, 2, 61-73.
22. Krawczak M., Bockel B., (1993), *DNA fingerprinting: state of the science*, Eds. Pena S. D. J., Chakraborty R., Epplen J. T., Jeffreys A. J., 249-255, Birkhauser Verlag, Basel.
23. Krawczak M., Lubjuhn T., (1995), *Electrophoresis*, 16, 16-21.
24. Majumder P. P., (1995), *Electrophoresis*, 16, 1684-1688.
25. Jeffreys A. J., Wilson V., Neumann R., Keyte J., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 10953-10971.
26. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
27. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijmans M., van de Lee T., Iornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuper M., Zabeau M., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.
28. Bernoco D., Byrns G. R., (1991), *Anim. Biotech.*, 2, 145-160.
29. Ellegren H., Andersson L., Johansson M., Sandberg K., (1992), *Anim. Genet.*, 23, 1-9.
30. Kuhnlein U., Zadworny D., Dawe Y., Fairfull R. W., Gavora J. S., (1990), *Genetics*, 125, 161-165.
31. Dunnington E. A., Stallard L. C., Hillel J., Siegel P. B., (1994), *Poultry Sci.*, 73, 1218-1225.
32. Siegel P. B., Haberfeld A., Mukherjee T. K., Stallard L. C., Marks H. L., Anthony N. B., Dunnington E. A., (1992), *World's Poultry Sci. J.*, 48, 147-155.
33. Plante Y., Schmutz S. M., Lang K. D. M., Moker J. S., (1992), *Anim. Genet.*, 23, 295-302.
34. Gavora J. S., Fairfull R. W., Benkel B. F., Cantwell W. J., Chambers J. R., (1996), *Genetics*, 144, 777-784.
35. Haberfeld A., Dunnington E. A., Siegel P. B., Hillel J., (1996), *Poultry Sci.*, 75, 951-953.
36. Hillel J., Schaap T., Haberfeld A., Jeffreys A. J., Plotzky Y., Cahaner A., Lavi U., (1990), *Genetics*, 124, 783-789.
37. Hillel J., Dunnington E. A., Haberfeld A., Lavi U., Cahaner A., Gal O., Plotsky Y., Marks H. L., Siegel P. B., (1993), *Manipulation of the avian genome*, Ed. Etches R., 243-256, CRC Press, London.
38. Plotsky Y., Cahaner A., Haberfeld A., Lavi U., Lamont S. J., Hillel J., (1993), *Anim. Genet.*, 24, 105-110.
39. Dunnington E. A., Haberfeld A., Stallard L. C., Siegel P. B., Hillel J., (1992), *Poultry Sci.*, 71, 1251-1258.
40. Lamont S. J., Lakshmanan N., Plotsky Y., Kaiser M. G., Kuhn M., Arthur J. A., Beck N. J., O'Sullivan N. P., (1996), *Anim. Genet.*, 27, 1-8.
41. Hillel J., Kalay D., Gal O., Plotsky Y., Weisberger P., Haberfeld A., (1993), *J. Dairy Sci.*, 76, 653-657.
42. Georges M., Lathrop M., Hilbert P., Marcotte A., Schwers A., Swillens S., Vassart G., Hanset R., (1990), *Genomics*, 6, 461-474.
43. Kuhnlein U., Zadworny D., Gavora J. S., Fairfull R. W., (1991), *DNA fingerprinting: approaches and applications*, Eds. Burke T., Dolf G., Jeffreys A. J., Wolff R., 274-282, Birkhauser Verlag, Basel.