Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 3

Artikel: PCR : der Griff nach der IST-Vaterschaft in der Abstammungskontrolle beim Rind

Autor: Glowatzki-Mullis, Marie-Louise / Ritz, L. / Gaillard, C.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-590535

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 15.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Institut für Tierzucht der Universität Bern

PCR – der Griff nach der IST-Vaterschaft in der Abstammungskontrolle beim Rind

Marie-Louise Glowatzki-Mullis, L. Ritz, C. Gaillard

Zusammenfassung

Die PCR-Technologie eröffnet für die Abstammungskontrolle beim Rind eine neue Dimension. Es ist zu erwarten, dass die Bestimmung von Mikrosatelliten in naher Zukunft die herkömmlichen hämogenetischen Verfahren in der Routine ersetzen und damit die Abstammungsexpertisen noch aussagekräftiger machen wird. Anhand von 100 mit Mikrosatelliten nachuntersuchten Fällen, die mit der Routine-Serologie nicht klärbar waren, wird die Bedeutung dieser DNA-Polymorphismen für die Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen dargestellt.

Schlüsselwörter: **Mikrosatelliten – Abstammungskontrolle – Rind**

PCR – an important step to conclusive paternity in parentage control cases of cattles

PCR-based technology used for genotyping microsatellites is going to add new dimensions to parentage control in cattle. In the very near future the determination of microsatellite polymorphisms is expected to replace the former parentage control of conventional blood typing. Parentage control by microsatellite analysis is even more reliable than by the routine haemogenetic procedures. The potential of microsatellite polymorphisms to clarify family relationships is illustrated by 100 cases which could not be solved by conventional blood typing.

Key words: **microsatellites – parentage control – cattle**

Einleitung

Für die Nutztierzüchtung ist eine gesicherte Abstammung der zur Zucht ausgewählten Tiere unabdingbar. Deshalb wird hierzulande für in der künstlichen Besamung (KB) eingesetzte Stiere und für aus einem Embryotransfer (ET) stammende Tiere die Durchführung einer Elternschaftskontrolle von Gesetzes wegen verlangt (Verordnung über die Rindvieh- und Kleinviehzucht, Art. 18 und 23). Ferner erfolgt bei Doppelbesamungen mit Sperma von verschiedenen Stieren zumindest immer dann eine Überprüfung der Abstammung, wenn die Kuh vor Erreichen des 300. Tages nach der Erstbesamung kalbt, da nicht mit ausreichender Sicherheit entscheidbar ist, ob sie vom ersten oder vom zweiten Stier tragend geworden ist. Weitere Gründe für die Einholung einer Abstammungskontrolle können Natursprünge sein, eine abnorme Trächtigkeitsdauer, das Erwägen einer Kälberverwechslung, eine mögliche Vertauschung von Samenproben, der Verdacht, dass eine Empfängerkuh vor dem Embryotransfer bereits tragend war, falsche Angaben durch den Züchter.

Heute werden in der Routine zur Klärung verwandtschaftlicher Beziehungen beim Rind weltweit Blutgruppen im eigentlichen Sinne (Erythrocyten-Antigene) sowie biochemische, d.h. mittels Elektrophorese nachweisbare Polymorphismen herangezogen (Schmid und Buschmann, 1985; Erhardt, 1991; Tab. 1). Die systematische Suche nach hämogenetischen Unterscheidungsmerkmalen, verbunden mit technisch-apparativen Errungenschaften, hat im Laufe der Zeit zu einem Rüstzeug geführt, das in den meisten Abstammungssachen erlaubt, zu einem im geforderten Rahmen aufschlussreichen Ergebnis zu kommen. Nur wenige Fälle lassen sich mit den herkömmlichen Routinemethoden nicht klären; am Institut für Tierzucht (ITZ) der Universität Bern, das gesamtschweizerisch für die Durchführung von Abstammungskontrollen beim Rind zuständig ist, machen diese 1–2% aus.

Bis Ende 1993 wurde in mit den Standardmethoden nicht klärbaren Fällen soweit möglich versucht, über eine Bestimmung von Histokompatibilitätsantigenen (BoLA = Bovine Leucocyte Antigens) zu einem aufschlussreichen Ergebnis zu kommen. War dies nicht der Fall, wurde bis etwa Mitte 1992 noch eine DNA-fingerprint-Analyse (Dolf et al., 1992) angeschlossen. Diese Zusatzverfahren hatten trotz ihrer hohen Aussagekraft in ihrer praktischen Anwendbarkeit jedoch nie eine konkrete Chance, anstelle der herkömmlichen serologischen und biochemischen Testverfahren in der Routine eingesetzt zu werden.

Den diesbezüglichen Durchbruch dürften nun die Mikrosatelliten-Polymorphismen schaffen (Fries et al., 1990). Im Genom höherer Eukaryoten und damit auch

Tabelle 1: Am Institut für Tierzucht typisierte hämogenetische Merkmalssysteme

- *Blutgruppen i.eigentl. Sinne (ERYTHROZYTEN-ANTIGENE)*	
Blutgruppensystem	Blutgruppenfaktoren
A-System	A2, H
B-System	B2, G1, G2, I1, K, O1, O2, O3, P, Q, T1, Y2, A', B', D', E'1, E'2, E'3, G', I', J', K', O', Q', Y'
C-System	C1, C2, R1, W, X1, X2
F-System	F1, V
J-System	J
L-System	L
M-System	M
S-System	S, U1, H', U'1, H"
Z-System	Z
N'-System	N'
R'-System	R'
T'-System	T'
- *ELEKTROPHORETISCH NACHWEISBARE POLYMORPHISMEN*	
Hämoglobin(Hb)-System	A, B
Carboanhydrase(CA)-System	F, S
Amylase(Am)-System	B, C
Transferrin(Tf)-System	A, D1, D2, E
gleichzeitig bestimmbar, aber nicht in der Routine-AKR mitgezogen Ptf2, Al, Pa	

von Rindern finden sich weit verbreitet Bereiche mit Sequenzwiederholungen in Tandemanordnung, d.h. ohne zwischengeschaltete andere DNA-Abschnitte (Barendse et al., 1994; Bishop et al., 1994; Moore et al., 1994). Diese Art von repetitiver DNA nennt man Satelliten-DNA. Je nach Länge der jeweiligen Wiederholungseinheit unterscheidet man Maxi-, Midi-, Mini- und Mikrosatelliten. Bei Mikrosatelliten ist die repetierte Einheit am kürzesten, definitionsgemäss bis 6 Basenpaare (bp) kurz; sie sind deshalb auch unter dem Namen Short Tandem Repeat Loci (STR) bekannt. Mit geeigneten Primern lassen sich die interessierenden DNA-Bereiche mit den Sequenzwiederholungen mittels PCR amplifizieren und anschliessend in einem Polyacrylamidgel auftrennen und sichtbar machen. Für die Abstammungskontrolle von Bedeutung ist die Tatsache, dass bei polymorphen Mikrosatelliten-Loci die Zahl der repetierten Einheiten erblich und damit individuenspezifisch ist.

In einer ersten Studie wurden die Typisierbarkeit von 6 Mikrosatelliten-Loci unter den Aspekten der Routine getestet sowie der Informationsgehalt und die Aussagekraft dieser DNA-Polymorphismen für die Abstammungskontrolle beim Rind (AKR) überprüft (Glowatzki-Mullis et al., 1995).

Im vorliegenden Beitrag sollen Ergebnisse aus dem Einsatz von Mikrosatelliten-Polymorphismen als ergänzende Untersuchung in Abstammungskontrollen erörtert und daraus erste Schlussfolgerungen für die Klärung von Abstammungsfragen gezogen werden.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Die untersuchten Blut- und Samenproben stammten teilweise aus dem AKR-Routinelabor, teilweise waren sie für die populationsgenetische Auswertung (Glowatzki-Mullis et al., 1995) noch zusätzlich angefordert worden.

DNA-Extraktion

Aus für eine DNA-Analyse eingesandten EDTA-Blutproben wurde die DNA nach dem Protokoll von Jeanpierre (siehe Dolf et al., 1992) extrahiert; desgleichen aus Samenproben, unter Zusatz von 2-Mercaptoethanol. Für die Extraktion der DNA aus bei -20 °C aufbewahrten Kontrollbluten aus dem hämogenetischen Routinelabor (0,5-1 ml, mit Heparinzusatz) wurde eine Chelex-Extraktion (Walsh et al., 1991, modifiziert nach Dolf et al., 1995) durchgeführt.

Untersuchte Mikrosatelliten-Loci

Zum Standard-Set gehörten die in Tabelle 2 aufgelisteten Mikrosatelliten-Loci. Bei weiterführenden Expertisen, z.B. zur Bestätigung eines einfachen (= isolierten) Ausschlusses oder wenn es für keinen der beiden in einer Doppelbesamung eingesetzten Stiere zum Ausschluss kam, wurden zunächst 3 weitere Mikrosatelliten-Polymorphismen typisiert; war erneut kein aufschlussreiches Ergebnis zu erzielen, kamen der kommerzielle StockMarks Kit von Applied Biosystems (ABI) oder ein Teil davon zur Anwendung.

Die Fragmentlängenbestimmung wurde mit einem 373 Sequencer von ABI durchgeführt. Für die PCR mussten deshalb am 5'-Ende fluoreszenzmarkierte Vorwärtsprimer verwendet werden. Die Farbmarkierung ist dabei so gewählt, dass die PCR-Produkte der 6 Mikrosatelliten-Loci des Standard-Sets sich in ihrem Fragmentlängenbereich nicht gleichfarbig überschneiden, somit für die elektrophoretische Auftrennung in derselben Gelbahn (= lane) aufgetragen und bei Überlappungen aufgrund der Andersfarbigkeit einwandfrei typisiert werden können; das trifft in gleicher Weise für die 3 Loci des Multiplex-Ansatzes 3 und für die 11 Loci des StockMarks Kit zu.

PCR

Bis Ende 1994 wurde für das Standard-Set (Tab. 2) die PCR nach der von Glowatzki-Mullis et al. (1995) beschriebenen Anleitung durchgeführt; seither verwenden wir für alle Multiplex-Ansätze das Basis-Protokoll des ABI StockMarks Kit. Dieses ist in Tabelle 3 aufgeführt; letzterer können auch die unterschiedlichen Annealingtemperaturen der verschiedenen Multiplex-Systeme entnommen werden.

Tabelle 2: Mikrosatelliten-Loci, die am ITZ für die AKR geprüft werden

STANDARD-SET				
Locus	Chromosom	Mikrosat.-Bezeichng	Primer Sequenz (5'-3')*)	Fragmentlängen (bp)/n Allele
MULTIPLEX 1				
BOLADRBP1	23	MHCII	P1: FAM GGACACGTTCTGCAGATACAACTAC P2: GAACTCTCCTTAAGCATACTTGCTC	208-227 / 11
D2S9	2	ETH121	P1: TAMRA CCAACTCCTTACAGGAAATGTC P2: ATTTAGAGCTGGCTGGTAAGTG	181-218 / 13
D21S4	21	ETH131	P1: JOE GTGGACTATAGACCATAAGGTC P2: GCTGTGATGGTCTACGAATGA	139-169 / 21
MULTIPLEX 2				
D5S3	5	ETH10	P1: JOE GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA P2: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	210-226 / 8
D9S1	9	ETH225	P1: TAMRA GATCACCTTGCCACTATTTCCT P2: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	140-156 / 8
D19S2	19	ETH3	P1: FAM GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG P2: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	117-129 / 7

*) Fluoreszenzfärbung: FAM (blau); TAMRA (gelb); JOE (grün).

ZUSÄTZLICH EINBEZIEHBARE MIKROSATELLITEN (MS)					
			kommerzieller StockMarks Kit (ABI)		
Locus/MS	Chromosom	Fragment-längen (bp)	Locus/MS	Chromosom	Fragment-längen (bp)
MULTIPLEX 3			MULTIPLEX A		
CYP 21	23	188-224	TGLA 48	7	69-87
BM 1824	1	180-192	TGLA 263	3	100-136
ILSTS005	10	179-191	TGLA 53	16	144-190
			MGTG 7	23	273-329
[ETH 185	17	222-243]	MULTIPLEX B		
			TGLA 57	1	80-104
			TGLA 73	9	110-128
			MGTG 4B	4	134-164
			AGLA 293	5	196-260
			MULTIPLEX C		
			TGLA 227	18	78-104
			TGLA 126	20	109-127
			TGLA 122	21	130-164

Tabelle 3: PCR-Basis-Protokoll des StockMarks Kit von Applied Biosystems

PCR-Mix		*PCR-Bedingungen* Modell 9600 von Perkin Elmer			
1.5 µl	PCR Puffer (100mM Tris, 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$, pH 8.3)	1 Zyklus	93 °C	5 Min.	
		30 Zyklen	93 °C	1 Min.	
			55 °C	1 Min.	StockMarks
3.2 µl	dNTP Mix (1.25 mM)		59 °C	1 Min.	Multiplex 1
0.16 µl	AmpliTaq DNA Polymerase (8u/µl)		59 °C	1 Min.	Multiplex 3
			66 °C	1 Min.	Multiplex 2
0.5 µl	pro Primer 1 (5 pmol/µl)	1 Zyklus	72 °C	10 Min.	
		dann	4 °C		
0.5 µl	pro Primer 2 (5 pmol/µl)				
20 ng	DNA	*Anmerkung:* ramp time zwischen den Temperaturwechseln: 1 Min.; Original-Protokoll = 29 Zyklen			
xx µl	Aq.bid.				
10 µl	Totalvolumen				

Elektrophorese und Genotypbestimmung

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 6%-igen denaturierenden Polyacrylamid (Bio-Rad). Je 0.5 µl der verdünnten PCR-Produkte, die in einer Gelbahn aufzutrennen waren (Verdünnung für Multiplex-Amplifikate 1, 2, 3, A und B = 1:5; für Multiplex C = 1:2.5), wurden zusammenpipettiert, vor dem Auftragen mit 2.5 µl Formamid (Kodak IB72020) und 0.5 µl internem lane standard (je nach Fluoreszenzfarbstoffen GS 2500 Rox bzw. GS 350 oder GS 500 TAMRA von ABI) versetzt, während 2 Min. bei 90 °C hitzedenaturiert und auf Eis gelegt. Die Laufzeit im 373 Sequencer betrug 6-9 Stunden je nach Fragmentlänge. Die Auswertung erfolgte halbautomatisch mit der GeneScan 672 Software (Version 1.2 bzw. 1.2.2-1) von ABI.

Statistische Auswertung

Die Berechnung der Ausschlusswahrscheinlichkeiten erfolgte nach Weir (1990); ihr liegen Allelfrequenzen von 238 Tieren zugrunde.

Resultate

Im vorliegenden Beitrag wird auf die Reproduzierbarkeit von Fragmentlängenbestimmungen und auf populationsstatistische Befunde nicht eingegangen. Hierzu sei auf Glowatzki-Mullis et al. (1995) verwiesen.
Insgesamt wurden 100 Abstammungsfälle, die mit den herkömmlichen hämogenetischen Verfahren entweder nicht schlüssig klärbar waren oder für welche eine Zusatzuntersuchung angefordert wurde, mit Mikrosatelliten nachuntersucht (Tab. 4).

Tabelle 4: Mit Mikrosatelliten nachuntersuchte Fälle zur Klärung der Abstammung

Fallkategorie	*Fragestellung*	*Anzahl*
DKB-Fälle	Abklärung, welcher der zwei in einer Doppelbesamung eingesetzten Stiere als Vater in Frage kommt	56
AK-Fälle	Bestätigung einer Elternschaft bzw. von deren Ausschluss durch die hämogenetische Routineanalyse (Fälle mit mitunter mehreren zu überprüfenden Tieren)	32
Defizienzfälle	Überprüfen einer Elternschaft bei fehlendem anderem Elternteil	9
andere	Abklärung, welcher von *mehr als 2* Stieren als Vater in Frage kommt	3
total		100

Trotz einer instituts-internen Konvention, wonach isolierte Ausschlüsse, d.h. Ausschlüsse in nur einem System als nicht voll beweiskräftig zu gelten haben und den Einbezug weiterer Mikrosatellitensysteme erforderlich machen, liessen sich bereits mit dem Standard-Set (Tab. 2) 95 der 100 Fälle abschliessend klären. Im Durchschnitt wurde pro Ausschluss eine Ausschlusskonstellation in 3 Mikrosatellitensystemen festgestellt (Tab. 5). Ausschlüsse liegen immer dann vor, wenn beim Nachkommen ein Fragment nachgewiesen wird, das sich in seiner Länge keinem der Elterntiere zuordnen lässt.
Die Ausschlusskraft der Mikrosatellitensysteme des Standard-Sets spiegelt sich auch in der anhand von Allelfrequenzen (Glowatzki-Mullis et al., 1995) ermittelten Ausschlusswahrscheinlichkeit wider. Sie liegt im Durchschnitt bei 99% (Tab. 6), was besagt, dass von 100 effektiven Nichtvätern bei einer Analyse mit den 6 Mikrosatelliten im statistischen Mittel deren 99 als solche durch einen Ausschluss in zumindest einem System erkannt würden.

Tabelle 5: Ergebnisse von Mikrosatellitenuntersuchungen in hämogenetisch nicht klärbaren Abstammungssachen

a) Ausschlussstärke des Standard-Sets in DKB-Fällen

	Anzahl Fälle
Ausschluss des einen Stieres in *1* Mikrosatelliten-System:	4
Bemerkungen: Ausschluss in 3 Fällen durch Einbezug weiterer Mikrosatelliten bestätigt; in einem nicht (s. Text; Ausschluss aufgrund «entgegengesetzter Reinerbigkeit»)	
Ausschluss des einen Stieres in 2 Mikrosatelliten-Systemen:	11
Ausschluss des einen Stieres in 3 Mikrosatelliten-Systemen:	23
Ausschluss des einen Stieres in 4 Mikrosatelliten-Systemen:	11
Ausschluss des einen Stieres in 5 Mikrosatelliten-Systemen:	5
Ausschluss des einen Stieres in 6 Mikrosatelliten-Systemen:	2

b) Klärung weiterer Fälle

AK-Fälle (Bestätigung von Befunden aus der hämogenetischen Routine):	Ausschlüsse:	28
	Nichtausschlüsse:	14
	in Übereinstimmung zur Serologie:	40
Bemerkungen: 1 DNA-Nichtausschluss stand in Widerspruch zur Serologie (s. Text; Grund zunächst unklar) 1 serologisch nicht ausgeschlossener Stier wurde ausgeschlossen (s. Text; Exterieur)		
Defizienzfälle (fehlender Elternteil):	Ausschlüsse:	6
	Nichtausschlüsse:	2
Bemerkungen: die Nichtausschlüsse wurden durch den Einbezug weiterer Mikrosatelliten noch untermauert; 1 Fall mit fehlender Mutter und 2 möglichen Vätern konnte nicht gelöst werden (s. Text)		
Fälle mit *mehr als 2 Stieren:* in allen Fällen alle Stiere bis auf jeweils einen ausgeschlossen		
Bemerkung: 1 Nichtausschluss steht dabei in Widerspruch zur Serologie (s. Text; «Chimärismus»-Fall)		

Von den 100 Fällen liess sich nach Einbezug weiterer Mikrosatellitensysteme nur noch einer bislang nicht abschliessend klären. Dies hängt primär damit zusammen, dass es sich um einen Defizienzfall handelt, in welchem die Mutter bereits geschlachtet war und keine Asservate von ihr zurückbehalten wurden, die eine nachträgliche DNA-Extraktion möglich gemacht hätten; hinzu kommt, dass es sich bei den beiden als Väter zur Diskussion stehenden Stieren um Vater und Sohn handelt.
In 2 Fällen liess sich der Ausschluss aus der hämogenetischen Routine nicht bestätigen, auch nicht unter Einbezug weiterer Mikrosatellitensysteme. In einem der zwei Fälle war, wie sich nachvollziehen liess, die serologische Ausschlusskonstellation durch Chimärismus nur vorgetäuscht worden. Im zweiten Fall war der Grund bei Redaktionsschluss noch nicht klar, doch schien die Annahme aufgrund des Nichtausschlusses in 17 Mikrosatellitensystemen berechtigt, dass es sich auch hier lediglich um einen formalen serologischen Ausschluss handelte. Dies hat sich mittlerweile bestätigt; wir hatten vom betreffenden Stier eine falsche Bluttypenkarte bekommen.
In einem weiteren Fall liess sich eine isolierte Ausschlusskonstellation zur Mutter eines Nachkommen fest-

Tabelle 6: Ausschlusseffizienz des Mikrosatelliten-Standard-Sets

	Ausschluss-Wahrscheinlichkeiten			
	Simmentaler	Braunvieh	Holsteiner	Eringer
BOLADRBP1	.631	.694	.501	.668
D2S9	.602	.565	.696	.653
D21S4	.508	.541	.624	.435
D5S3	.416	.501	.518	.324
D9S1	.509	.601	.478	.492
D19S2	.516	.435	.421	.359
zusammen	.990	.993	.992	.986

stellen. Dieser «Ausschluss» widersprach aber nicht nur dem Befund aus der hämogenetischen Routineanalyse, sondern ist bei kritischer Würdigung auch DNA-mässig nicht haltbar. Zum einen handelt es sich um einen Ausschluss in nur einem Mikrosatellitensystem, der trotz Einbezug von mehr Loci als jenen des Standard-Sets (Tab. 2) nicht durch eine weitere Ausschlusskonstellation bestätigt werden konnte, zum andern erscheinen Mutter und Nachkomme für ein Fragment mit jeweils anderer Länge «homozygot». Bei dieser Sachlage ist vielmehr davon auszugehen, dass bei der Mutter eine Mutation in einem der Primerbereiche vorliegt, so dass nur ein Fragment amplifiziert werden konnte. Diese Mutation hat sie ihrem Sohn weitervererbt; bei ihm konnte demnach nur das väterliche Allel amplifiziert werden. Und da dieses eine andere Länge aufweist als das nicht mutierte und damit amplifizierte der Mutter, kam es zwischen Mutter und Sohn zu einer nur vorgetäuschten, de facto aber nicht bestehenden Ausschlusskonstellation aufgrund entgegengesetzter Reinerbigkeit.

Normalerweise werden Nichtausschlüsse aus der hämogenetischen Routine nicht mit Mikrosatelliten nachuntersucht. Wurde aber aufgrund des Ausschlusses eines Elterntieres Blut oder Sperma eines anderen möglichen Elterntieres eingesandt, haben wir dieses nachuntersuchte Tier auch bei einem Nichtausschluss in der Routineanalyse noch in eine Mikrosatellitenbestimmung einbezogen; dies um Erfahrungswerte zu sammeln. In keiner solch gelagerten Elternschaftsüberprüfung ergab sich ein Widerspruch zum Befund aus der hämogenetischen Routine. In einem Fall wurde aufgrund des Exterieurs des Nachkommen eine Nachuntersuchung des serologisch nicht ausgeschlossenen Stieres mit Mikrosatelliten in Auftrag gegeben: diese bestätigte den morphologisch bestehenden Verdacht der Nichtvaterschaft.

Diskussion

Die Bestimmung von Mikrosatelliten-Polymorphismen ist gegenwärtig zweifelsohne die Methode der Wahl unter den DNA-Analysen zur Klärung von Abstammungsfragen. Mikrosatelliten werden sich als biologisches System voraussichtlich lange halten können und haben eine gute Chance, die herkömmlichen hämogenetischen Systeme bei entsprechender Automatisierung aus der Routine zu verdrängen. Es ist zudem zu erwarten, dass technische Fortschritte ihre Typisierung noch vereinfachen werden.

Tabelle 7: Vorteile von Mikrosatelliten- Polymorphismen gegenüber den klassischen Merkmalen

1. UNTERSUCHUNGSMATERIAL

Nicht nur Blut untersuchbar, sondern auch Sperma, Haare,.... (kernhaltige Zellen), und dies in kleinsten «Mengen».
Lebensalter des untersuchten Tieres spielt keine Rolle.
Untersuchbarkeit eines Asservates nicht zeitlich begrenzt.

2. METHODEN

Einheitliche Technik (PCR, Fragmentanalyse).
Keine Immunisierungen zur Herstellung und keine Produktion von Antiseren.
Bessere Reproduzierbarkeit von Laborbefunden .
Keine Phänotyp-, sondern Genotypbestimmungen und damit Vereinfachung der Allelbildung (Dominanz, Rezessivität, Penetranz und Expressivität spielen keine Rolle).

3. AUSWERTUNG DER LABORBEFUNDE

Allelbildung einfach (z. B. B-System in der herkömmlichen Typisierung sehr kompliziert, da über 1200 Faktorenkombinationen vorkommen, die geschlossen vererbt werden = Phänogruppen).
Erfahrung des Gutachters fällt weniger ins Gewicht.

4. AUSSAGEKRAFT

Höher als mit herkömmlichen Systemen.
Befunde können unschwer statistisch ausgewertet werden (Vaterschaftswahrscheinlichkeit, Ausschlusschance).

Mikrosatelliten-Polymorphismen erfüllen die Anforderungen, die grundsätzlich an ein Merkmalssystem für den Einsatz in der Abstammungskontrolle zu stellen sind. So ist das Untersuchungsmaterial, um Mikrosatelliten bestimmen zu können, leicht zu gewinnen, die Vererbung dieser Merkmale folgt einfachen Erbgängen, sie sind umweltstabil, und der Polymorphismus ist für die individuelle Kennzeichnung geeignet. Hinzu kommen objektive Beurteilungskriterien bei der Auswertung der Befunde sowie eine i.d.R. gute Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse.

Stellt man Mikrosatelliten-Polymorphismen in Vergleich zu den herkömmlichen hämogenetischen Merkmalssystemen, lassen sich für erstere vor allem gegenüber den klassischen Blutgruppen eindeutige Vorteile feststellen (Tab. 7).

Ein totaler Wechsel von der konventionellen Expertise zur Mikrosatelliten-Analyse erscheint aber zum jetzigen Zeitpunkt noch verfrüht. Vor allem fehlen international abgesprochene Richtlinien für die Anwendung von DNA-Polymorphismen in der Abstammungskontrolle, wie Anforderungen an ein Labor zur Erstattung von DNA-Expertisen, Auswahl und erforderliche Mindestzahl geeigneter Mikrosatelliten-Loci, Nomenklatur, Erhebung populationsstatistischer Daten, statistische Auswertung von Befunden, interne und externe Qualitätssicherung, Datentransfer von Labor zu Labor.

Als weiterführende Expertise ist der Einbezug von Mikrosatelliten-Systemen aber bereits jetzt in all jenen Fällen unmittelbar angezeigt, in welchen die herkömmli-

chen hämogenetischen Befunde nicht aufschlussreich waren. Hier ist im Regelfall mit einem schlüssigen Resultat zu rechnen, wie der vorliegende Beitrag eindrucksvoll zeigt. Liegen einmal umfassendere populationsstatistische Daten vor, ist der Griff nach der IST-Vaterschaft nicht mehr weit. Auch wenn sich eine statistische Erhebung immer nur auf eine Gesamtheit bezieht und daraus nicht auf den Einzelfall als solchen geschlossen werden kann, werden die allgemeinen Hinweiswerte auf eine Vaterschaft derart hoch sein, dass man das Fehlerrisiko wird vernachlässigen können.

Durch die PCR-Technik wurde für die Abstammungskontrolle eine neue Dimension eröffnet. Die Typisierung von Mikrosatelliten-Polymorphismen ist offensichtlich die Methode der Wahl, um in der Routine die herkömmlichen hämogenetischen Verfahren zu ersetzen und die Aussagekraft von Abstammungsexpertisen noch zu erhöhen.

Literatur

Barendse W., Armitage S.M., Kossarek L.M., Shalom A., Kirkpatrick B.W., Ryan A.M., Clayton D., Li L., Neibergs H.L., Zhang N., Grosse W.M., Weiss J., Creighton P., McCarthy F., Ron M., Teale A.J., Fries R., McGraw R.A., Moore S.S., Georges M., Soller M., Womack J.E., Hetzel D.J.S. (1994): A genetic linkage map of the bovine genome. Nature Genetics *6*, 227–235.

Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Solinas-Toldo S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J., Beattie C.W. (1994): A genetic linkage map for cattle. Genetics *136*, 619–639.

Dolf G., Glowatzki M.-L., Gaillard C. (1992): DNA fingerprinting in cattle using probe pV47. Animal Genetics *23*, 63–69.

Dolf G., Colomb B., Schläpfer J., Leuenberger J., Märki U. (1995): Charakterisierung von Ratten-Inzuchtlinien mit Hilfe der Mikrosatellitenanalyse. SAT-Sonderausgabe: 10 Jahre PCR.

Erhardt G. (1991): Anwendungsmöglichkeiten hochauflösender elektrophoretischer Trennverfahren bei tierzüchterischen Fragestellungen. Wissenschaftlicher Fachverlag Giessen ISBN 3-928563-09-2.

Fries R., Eggen A., Stranzinger G. (1990): The bovine genome contains polymorphic microsatellites. Genomics *8*, 403–406.

Glowatzki-Mullis M.-L., Gaillard C., Wigger G., Fries R. (1995): Microsatellite-based parentage control in cattle. Animal Genetics *26*, 7–12.

Moore S.S., Byrne K., Berger K.T., Barendse W., McCarthy F., Womack J.E., Hetzel D.J.S. (1994): Characterization of 65 bovine microsatellites. Mammalian Genome *5*, 84–90.

Schmid D.O., Buschmann H.G. (1985): Blutgruppen bei Tieren. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. ISBN 3-432-95381-X.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechnique *10*, 506–513.

Weir B.S. (1990): Genetic data analysis. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, USA, 187.

Korrespondenzadresse: Dr. Marie-Louise Glowatzki-Mullis, Institut für Tierzucht der Universität Bern, Bremgartenstrasse 109 A, CH-3012 Bern