



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **99-00055**

(22) Data de depozit: **30.06.1997**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.01.2006** BOPI nr. 1/2006

(30) Prioritate:

19.07.1996 US 60/022, 180;
01.11.1996 US 08/742, 805;
06.03.1997 US 08/812, 208

(41) Data publicării cererii:

29.10.1999 BOPI nr. 10/1999

(86) Cerere internațională PCT:

Nr. US 97/11508 30.06.1997

(87) Publicare internațională:

Nr. WO 98/03682 29.01.1998

(73) Titular:

**• IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION INC.,
OFFICE OF INTELLECTUAL PROPERTY &
TECHNOLOGY TRANSFER, 310 LAB OF
MECHANICS IOWA 50011-2131, AMES, US**

(72) Inventatori:

**• ROTHSCHILD MAX F., IOWA STATE
UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION,
INC., 310 LAB OF MECHANICS, AMES, US;**
**• VINCENT AMY L., IOWA STATE
UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION,
INC., 310 LAB OF MECHANICS, AMES, US;**
**• TUGGLE CHRISTOPHER K.,
IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC., 310 LAB OF
MECHANICS, AMES, US**

(74) Mandatar:

**CABINET ENPORA S.R.L.,
ȘOSEAUA IANCUȘII NR.7, BL. 109 B,
SC. B, ET. 1, AP. 46, SECTOR 2,
COD 73371, BUCUREȘTI**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

WO 9633288; US 5374 526

(54) **METODĂ PENTRU DETERMINAREA UNUI MARKER
GENETIC, PENTRU SELECȚIA PORCILOR NĂSCUȚI
ÎN ACEEAȘI GENERAȚIE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă pentru selecția porcilor, cu scopul de a determina pe cel mai probabil să producă un număr mai mare de purcei fătați în prima generație, la un primer utilizat pentru amplificarea regiunii pentru prezența sitului polimorfic Alul de la gena

receptor prolactină de la porc și la o moleculă ADN asociată cu gena receptor prolactină de la porc.

Revendicări: 22

Figuri: 4



Invenția se referă la o metodă pentru selecția porcilor, pentru a determina pe cel mai probabil să producă un număr mai mare de purcei fătați în prima generație, la un primer utilizat pentru amplificarea regiunii pentru prezența sitului polimorfic Alul de la gena receptor prolactină de la porc și la o moleculă ADN asociată cu gena receptor prolactină de la porc.

Eficiența reproductivă, care poate fi definită ca numărul de purcei produși per femelă de rasă, este factorul principal de limitare în producția eficientă de porci. Numărul purceilor născuți vii în Statele Unite totalizează o medie de aproximativ 9,5 purcei per generație. Ereditatea pentru numărul de purcei născuți în aceeași generație este scăzută (10% - 15%) și metode genetice standard ale selectării femelelor de rasă pe baza numărului de purcei născuți în aceeași generație nu au fost eficiente. De aceea, există necesitatea unei abordări a problemei care să opereze cu o selecție pentru reproducere la nivel ADN sau celular.

Sunt cunoscute rasele chinezești pentru atingerea pubertății la o vârstă timpurie și pentru numărul mare de purcei născuți în aceeași generație. Rasele americane sunt cunoscute pentru vitezele lor mari de creștere și lipsa de grăsime a cărnii. Astfel, este de dorit să se combine cele mai bune caracteristici ale ambelor tipuri de rase îmbunătățind, prin urmare, eficiența producției de porci din Statele Unite. Aceste eforturi ar fi puternic susținute de descoperirea genelor sau markerilor genetici, care s-au asociat cu numărul crescut de purcei născuți în aceeași generație.

Analizele RFLP au fost folosite de mai multe grupuri pentru a studia ADN de porc. Jung și col., *Theor. Appl. Genet.* 77 : 271-274 (1989) încorporat aici prin referință, dezvăluie folosirea tehnicilor RFLP pentru a arăta variabilitatea genetică între două rase de porci. La aceste rase, s-a demonstrat polimorfismul pentru genele Clasa I antigen leucocitar porcine (SLA). Hoganson și col., Abstract for Annual Meeting of Midwestern Section of the American Society of Animal Science, martie 26 - 28, 1990, încorporat aici prin referire, relatează despre polimorfismul genelor complexului histocompatibil principal (MHC CLASA I) porcine pentru porci chinezești, de asemenea, demonstrat prin analiza RFLP. Jung și col. *Animal Genetics*, 26:79-91 (1989) încorporat aici prin referire, relatează despre analiza RFLP a genelor Clasa I SLA la unii vieri. Autorii declară că rezultatele sugerează că poate exista o asociere între gene Clasa I SLA/MHC porcine și producție și trăsăturile de performanță. Ei declară suplimentar că utilizarea fragmentelor de restricție SLA Clasa I, ca markeri genetici, poate avea potențial de îmbunătățire a performanței de creștere a purceilor în viitor.

Suplimentar, brevetul **US 5.550.024** al lui Rothschild și col., descrie un polimorfism în gena receptor estrogen de porc, care s-a asociat cu numărul mai mare de purcei născuți în aceeași generație, a cărui descriere este încorporată aici, prin referire.

Alt hormon de porc, legat de succesul reproductiv, este prolactina. Prolactina (PRL) este un hormon peptidă al glandei pituitare anterioare implicat în diferite activități endocrine, dar este esențial pentru succesul reproductiv. Una din funcțiile ei cel mai bine caracterizate este reglarea producției de lapte la mamiferele adulte. PRL este necesar pentru stimularea lactogenezei sau sinteza proteinelor din lapte. Această acțiune este mediată prin receptorul său (PRLR). PRLR aparține superfamiliei citokină/GHR/PRLR. Când s-a activat prin PRL, PRLR devine o cale de transducție semnal, care în cele din urmă activează transcripția genelor cum ar fi (3-caseină și α -lactalbumină. Când se activează prin PRL, PRLR devine o cale de transducție semnal care se crede că implică tirozin kinaza Jak2. Mutațiile la capătul carboxi-terminal al proteinei care schimbă un rest fosfotirozină specific împiedică receptorul din activarea Jak2 și interferează în cele din urmă cu activarea transcripției genei (β -caseinei (Lebrun). Formele lungi și scurte ale proteinei receptor, la fel ca și diferite mărimi de transcript au fost caracterizate la șobolan, șoarece, iepure și om (Boutin, Edery, Lesueur). Totuși, s-a demonstrat că forma scurtă nu este capabilă de transcripția activării genelor proteinei

laptelui. mARN-urile observate atât de departe originează de la același transcript primar și se datorează îmbinării alternative, în special, în regiunile netranslate la iepure și om. Recent, PRL s-a arătat de asemenea, că stimulează producerea progesteronului, necesar pentru menținerea sarcinii, *in vitro*, în celule luteale mari porcine. PRLR se crede că mediază efectele injecțiilor cu hormon de creștere (bST) asupra producției mai mare de lapte la bovine și astfel poate fi important în varierea producției de lapte la porci. La oameni și șoareci, receptorul hormonului de creștere (GHR) și harta PRLR se închid împreună (Arden et al., 1990; Karker și col., 1992) făcând probabil ca aceste două gene să fie legate la porci. GHR a fost trecut pe hartă la purcei la cromozomul 16, în timp ce PRLR nu a fost trecut pe hartă și nu a fost raportată variabilitatea genetică pentru PRLR.

Prezenta invenție asigură un marker genetic, pe baza descoperirii polimorfismelor, în gena receptor prolactină, care se asociază cu un număr mediu mai mare al purceilor născuți în aceeași generație. Aceasta va permite transcrierea genetică a porcilor pentru genele lor receptor prolactină și pentru determinarea relației RFLP-urilor cu creșterea numărului de purcei născuți în aceeași generație. De asemenea, se va permite identificarea indivizilor masculi și femele, care poartă gena pentru sporuri de creștere. În cazul femelelor, ar da posibilitatea ca o femelă să fie de așteptat să producă un număr de purcei născuți în aceeași generație mai mare decât media rasei sale, sau în cazul masculilor pentru urmașele sale femele, de a avea fătări cu mai mulți născuți per generație decât media rasei. Astfel, markerii vor fi instrumente de selecție în programe de reproducere pentru a dezvolta linii și rase care produc fătări cu un număr mai mare de urmași per generație.

Invenția se referă la o metodă pentru selecția porcilor, pentru a determina pe cei mai probabil să producă un număr mai mare de purcei fătați în aceeași generație, ce constă în obținerea unei probe de material genetic de la porc; și testarea pentru prezența unui polimorfism în gena receptor prolactină în numita probă care s-a asociat cu un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație, iar acest polimorfism este asociat cu situsul de restricție polimorfic AluI la poziția 240 a genei PRLR așa cum este descris în SEQ ID NR.3.

Alt obiect al invenției este de a asigura o metodă pentru identificare a markerilor genetici pentru numărul mai mare al purceilor născuți în aceeași generație.

Invenția se referă, de asemenea, la un primer pentru amplificarea regiunii pentru prezența sitului polimorfic AluI de la gena receptor prolactina de la porc, primerul fiind selectat din grupul constând dintre secvențele SEQ ID Nr.1 și SEQ ID Nr.2, SEQ ID Nr.4 și SEQ ID Nr. 5.

Avantajele invenției vor fi lămurite în partea descrierii care urmează și în parte vor fi evidente din descriere, sau pot fi aflate prin practica invenției. Obiectele și avantajele invenției s-au realizat cu ajutorul mijloacelor și combinațiilor particulare subliniate în revendicările anexate.

Pentru a realiza obiectele și în conformitate cu scopul invenției, așa cum s-a realizat și s-a descris în linii mari aici, prezenta invenție asigură o metodă pentru cercetarea porcilor pentru a determina astfel pe cei mai probabili să producă un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație, când sunt împerecheați sau pentru a nu selecta porcii care au alele ce indică un număr mai mic de purcei născuți per generație. Așa cum s-a folosit aici "un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație" înseamnă o creștere semnificativă, în media mărimii fătării de mai sus, la o populație dată. Astfel, prezenta invenție asigură o metodă pentru cercetarea porcilor, pentru a determina pe cei mai probabil a produce un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație și/sau a celor mai puțin probabil de a produce un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație, metodă care cuprinde etapele 1) obținerii unei probe de AND genomic de la un porc; și 2) analizarea ADN-ului

1 genomic, obținut în 1) pentru a determina care alelă(e) receptor prolactină este/sunt pre-
 2 zentă. Pe scurt, o probă de material genetic s-a obținut de la un porc și proba s-a analizat
 3 pentru a determina prezența sau absența unui polimorfism în regiunea de codificare a genei
 4 receptor prolactină, care s-a corelat cu numărul mai mare de purcei născuți în aceeași
 5 generație.

6 Polimorfismul este un polimorfism de lungimea fragmentului de restricție și testul
 7 cuprinde identificarea genei receptor prolactină de porc de la material genetic de porc izolat;
 8 expunerea genei la o enzimă de restricție care produce fragmente de restricție ale genei de
 9 lungimi diferite; separarea fragmentelor de restricție pentru a forma un model de restricție,
 10 cum ar fi, prin electroforeză sau separare HPLC; și compararea modelului fragment de res-
 11 tricție rezultat cu o genă receptor prolactină de porc care este cunoscut fie a avea, fie a nu
 12 avea markerul dorit. Dacă un porc este testat pozitiv pentru marker, un astfel de porc poate
 13 fi considerat să fie inclus în programul de reproducere. Dacă porcul nu este testat pozitiv
 14 pentru genotipul marker, porcul poate fi exclus din grup și folosit în alt mod.

15 Gena s-a izolat prin utilizarea primerilor și ADN polimerazei pentru a amplifica o
 16 regiune specifică a genei care conține polimorfismul. După regiunea amplificată s-a digerat
 17 cu o enzimă de restricție și fragmentele s-au separat din nou. Vizualizarea modelului RFLP
 18 s-a realizat prin colorarea simplă a fragmentelor, sau prin marcarea fie a primerilor, fie a
 19 nucleozidelor trifosfat utilizați în amplificare.

20 În altă realizare, invenția cuprinde o metodă pentru identificarea unui marker genetic
 21 pentru numărul de purcei născuți în aceeași generație într-o populație specială. S-au născut
 22 purcei masculi și femele ai aceleași rase și rase încrucișate sau descendență genetică simi-
 23 lară și s-a determinat numărul de urmași produs de fiecare scroafă. Un polimorfism în gena
 24 receptor prolactină a fiecărui purcel s-a identificat și s-a asociat cu numărul de progenituri,
 25 preferabil analiza RFLP s-a folosit pentru a determina polimorfismul și mai preferabil, ADN-ul
 26 s-a digerat cu endonucleaza de restricție AluI.

27 De asemenea, este posibil să se stabilească legătura dintre alelele specifice ale
 28 markerilor ADN alternativ și alelele markerilor ADN-ului cunoscuți a fi asociați cu o anumită
 29 genă (de exemplu, gena receptor prolactină prezentată aici), care s-a arătat anterior a fi aso-
 30 ciat cu o trăsătură specială. Astfel, în situația prezentă, luând gena receptor prolactină, va
 31 fi posibil, cel puțin pe termen scurt, să se selecteze porcii probabili să producă un număr mai
 32 mare de purcei născuți în aceeași generație, sau alternativ, să nu se selecteze porci
 33 probabili să producă un număr mai mic de purcei născuți în aceeași generație, indirect, prin
 34 selectarea pentru anumite alele ale unui marker asociat receptor prolactină prin selectarea
 35 alelelor specifice ale markerilor cromozomului 16 alternativ. Exemple de astfel de markeri
 36 cunoscuți a fi legați la receptorul prolactină asupra cromozomului 16 porcine includ SW1305,
 37 S0077, S0006, SW1035 și S0111, markeri care sunt toți microsateliți și receptorul
 38 hormonului de creștere (GHR).

39 Invenția cuprinde, suplimentar, o trusă pentru evaluarea unei probe a ADN de purcel
 40 pentru prezența materialului genetic de porc al unui marker genetic dorit, localizat în gena
 41 receptorului prolactină indicativ al trăsăturii ereditare un număr mai mare de purcei născuți
 42 în aceeași generație. La un minim, trusa este un container cu unul sau mai mulți reactivi care
 43 identifică un polimorfism în gena receptor prolactină de porc. Preferabil, reactivul este un set
 44 de primeri oligonucleotidici capabil de amplificarea unui fragment al genei receptor prolactină
 45 de porc care conține polimorfismul. Preferabil, trusa conține suplimentar o enzimă de res-
 46 tricție care clivează gena receptor prolactină în cel puțin un loc. Într-o realizare mai preferată,
 47 enzima de restricție este AluI sau una care taie la același sit de recunoaștere.

Figurile însoțitoare, care sunt încorporate aici și care constituie parte a acestei descrieri, ilustrează o realizare a invenției și, împreună cu descrierea, servesc la explicarea principiilor invenției.

- fig. 1, reprezintă secvența 3' de codificare și regiunea netranslată a genei receptor prolactică de purcel (SEQ ID NR:3). Fragmentul PCR de porc produs de la primerii iepuri/om s-a folosit Amicon Microcon Filters așa cum s-a dirijat (Amicon, Inc.). Secvențierea s-a făcut de către Iowa State University DNA Sequencing and Synthesis Facility. Regiunea în italice reprezintă neclaritate în secvența și poate fi *ccaaaactac* (SEQ ID NR:3) -Primeri PCR de porc. - Secvența iepure/om.

-fig. 2, reprezintă modelul polimorfic al produsului PCR digerat Alul. Primerul sens 5'-CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG-3' și primerul antisens 5'-GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA-3' s-au folosit urmând condițiile reacției de PCR: 93°C timp de 3 min și 35 cicluri de 93°C 30 s, 60°C 1 min, 70°C, 1 min și un final 72°C 3 min. Polimeraza Taq s-a adăugat ultima, în timp ce probele s-au încălzit la 80°C. Produsele PCR s-au tăiat cu Alul (New England Biolabs) și s-au separat pe un gel de 6% agaroză NuSieve (FMC) la 120 volți timp de 4 h, la temperatura camerei. Gelurile s-au colorat cu bromură de etidiu. Banda 1 este scara 1 - kb, benzile 2 - 4 sunt trei genotipuri diferite.

-fig. 3, reprezintă poziția PRLR în cromozomul 16 de porc. Legătura punct multiplu s-a făcut folosind CriMap pentru a produce o hartă optimă medie-sex cu un scor LOD de 3 sau mai mare fiind considerat ca semnificativ.

-fig. 4, diagramă a fragmentelor obținute de la testul PCR folosind primerii PCR SEQ ID NR: 1 și 2.

Referința se va face acum, în detaliu, la realizări prezente referitoare la invenție, care împreună cu exemplele următoare servesc la explicarea principiilor invenției.

Invenția se referă la markeri genetici pentru numărul de purcei născuți în aceeași generație. Se asigură o metodă pentru selecția porcilor, pentru a-i determina pe aceia mai probabil să producă un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație, când se reproduc, prin identificarea prezenței sau absenței unui polimorfism la gena receptor prolactină, care este corelată cu un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație. Așa cum s-a utilizat aici, termenul "număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație" înseamnă o creștere biologică semnificativă în numărului urmașilor peste media unei populații date.

Astfel, invenția se referă la markeri genetici și metode de identificare a acestor markeri la un porc al unei anumite rase, tulpini, populații sau grup, cu ajutorul cărora o scroafa este mai probabil să producă un număr de urmași, care este semnificativ crescut față de media numărului de urmași pentru acea rasă anumită, tulpină, populație sau grup. Poate fi folosită orice metodă de indentificare a prezenței sau absenței acestui marker, incluzând, de exemplu, analiza polimorfismului configurației monocatenare (SSCP), analiza RFLP, analiza heteroduplex, electroforeza pe gel în gradient de denaturare și electroforeza în gradient de temperatură, reacția de ligare în lanț sau chiar secvențiere directă a genei receptor prolactină și examinare pentru modelul de recunoaștere Alul, în regiunea 3' translată.

Alte tehnici posibile includ sisteme non-gel, cum ar fi TaqMan™ (Perkin Elmer). În acest sistem, primerii PCR oligonucleotidici s-au desemnat ca flancând mutația în discutată și ca permițând amplificarea PCR a regiunii. O a treia sondă oligonucleotidică s-a desemnat apoi pentru a hibridiza la regiunea care conține subiectul de bază, pentru a schimba între alelele diferite ale genei. Această sondă s-a marcat cu colorant fluorescent atât la capătul 5', cât și la capătul 3'. Acești coloranți s-au ales astfel încât în timp ce în această vecinătate față de fiecare, fluorescența unuia dintre ei este stopată la celălalt și nu poate fi detectată.

Extensia prin polimerizarea ADN de la primerul PCR poziționat 5' pe matrița relativă la sondă duce la clivarea colorantului atașat la capătul 5' al sondei normalizate prin activitatea nucleazei 5' a ADN polimerazei Taq. Aceasta înlătură efectul de stopare care permite detectarea fluorescenței de la colorant la capătul 3' al sondei. Diferențierea dintre diferite secvențe ADN crește prin faptul că dacă hibridizarea sondei la molecula matriță nu este completă, adică, există vreo nepotrivire, clivajul colorantului nu are loc. Astfel, numai dacă secvența nucleotidică a sondei oligonucleotidice este complet complementară moleculei matriță la care s-a legat, stoparea va fi îndepărtată. Un amestec de reacție poate conține două secvențe de sondă diferite, fiecare desemnată față de alelele diferite care trebuie să fie prezente permițând astfel detectarea ambelor alele într-o reacție.

Folosirea RFLP-urilor este o metodă preferată de detectare a polimorfismului. Totuși, deoarece utilizarea analizei RFLP depinde, în cele din urmă, de polimorfisme și siturile de restricție ADN de-a lungul moleculei de acid nucleic, pot fi folosite, de asemenea, alte metode de detectare a polimorfismului. Astfel de metode le includ pe cele care analizează produsul polimorfic al genei și detectează polimorfisme prin detectarea diferențelor rezultate în produsul genei.

Analiza RFLP, în general, este o tehnică bine cunoscută celor cu pregătire în domeniu. Vezi de exemplu, brevetele **US 4.582.788**, eliberat lui Erlich, la 15 aprilie 1986 și **US 4.666.828**, eliberat lui Gusella, la 19 mai 1987, **US 4.772.549**, eliberat lui Frossard, la 20 septembrie 1988 și **US 4.861.708**, eliberat la 29 august 1989 lui Frossard, toate fiind încorporate aici prin referință. În linii mari, tehnica implică obținerea ADN-ului de studiat digerând ADN-ul cu endonucleaze de restricție, separând fragmentele rezultate și detectând fragmentele diverselor gene.

În prezenta invenție, o probă de material genetic s-a obținut de la un porc. Probele pot fi obținute de la sânge, țesut, spermă, etc. În general, celule de sânge periferic sunt utilizate ca sursă și materialul genetic este ADN. O cantitate suficientă de celule s-a obținut pentru a asigura o cantitate suficientă de ADN pentru analiză. Această cantitate va fi cunoscută sau se va determina rapid de către specialiștii în domeniu. ADN-ul s-a izolat din celule de sânge prin tehnici cunoscute celor cu pregătire în domeniu.

În continuare, regiunea care conține polimorfismul s-a amplificat prin utilizarea primelor și tehnicilor standard, cum ar fi reacția de polimerizare în lanț. Această tehnică este descrisă în brevetele **US 4.683.195**, eliberat lui Mullis și col., la 28 iulie 1987, **US 4.683.202**, eliberat lui Mullis, la 28 iulie 1987, **US 4.800.159**, eliberat lui Mullis și col., la 24 ianuarie 1989, **US 4.889.818**, eliberat lui Gelfand, la 26 decembrie 1989 și **US 4.902.624**, eliberat lui Clumbus și col., la 20 februarie 1990, care sunt încorporate aici prin referință. Selectarea primerilor s-a discutat în referințele menționate și sunt încorporate aici. Primerii ar trebui să amplifice regiunea de codificare 3' și regiunea netranslată a genei receptor prolactină de porc, așa cum s-a demonstrat în fig. 2. Alți asemenea primeri sunt desemnabili de către cei specialiști în domeniu cu tehnicile de aici.

ADN-ul izolat s-a digerat apoi cu o endonuclează de restricție care clivează sau taie hidrolitic ADN la o anumită secvență nucleotidică, denumită un sit de restricție. Astfel de endonucleaze, de asemenea numite enzime de restricție, sunt bine cunoscute specialiștilor din domeniu. Pentru prezenta invenție, se va alege una care clivează regiunea de codificare a genei receptor prolactină de porc în cel puțin un loc, producând cel puțin două fragmente de genă. S-a făcut o determinare dacă un astfel de fragment este polimorfic sau nu și dacă vreun polimorfism (RFLP) s-a asociat cu numărul de urmași născuți în aceeași generație prin tehnici cunoscute în domeniu în conjunctura cu expunerile conținute aici. De preferință, endonuclează de restricție este Alul. Alul taie ADN dublu catenar la secvența 5'-AGCT-3'.

Cantitatea unei astfel de enzimă de adăugat la proba care conține ADN de porc și alte condiții corespunzătoare pentru tratarea probei va fi ușor determinabilă persoanelor specializate în domeniu, dând expunerile conținute aici.	1 3
Fragmentele de restricție s-au analizat apoi prin tehnici cunoscute care implică în general, fie separarea fragmentelor și vizualizarea prin colorare, fie blot-area ulterioară și hibridizarea pentru a obține un model special, fie determinarea mărimilor diferite ale fragmentelor. Ultima permite identificarea uneia sau mai multor fragmente (markeri) pentru numărul mai mare de purcei născuți în aceeași generație. Tehnica preferată de separare este electroforeza în gel.	5 7 9
În această tehnică, fragmentele digerate s-au separat într-un mediu suport prin mărime sub influența unui câmp electric aplicat. Straturile sau bucățile de gel, cum ar fi agaroză sau acrilamidă, s-au folosit tipic ca mediu suport. Proba, care conține fragmente de restricție, s-a adăugat la un capăt al gelului. Unul sau mai mulți markeri de mărime au parcurs același gel precum controalele pentru a permite o estimare a mărimii fragmentelor de restricție. Această procedură permite în general un grad al rezoluției care separă fragmente care diferă în mărime de un altul prin doar 1 sau 2 baze perechi.	11 13 15
În realizări alternative, fragmentele s-au denaturat și transferat fizic de la gel într-un suport solid, de preferință, o membrană de nailon, prin punerea în contact a gelului cu filtrul în prezența reactivilor corespunzători și în condiții corespunzătoare care contribuie la transferul ADN-ului. Astfel de reactivi și condiții sunt bine cunoscuți specialiștilor în domeniu. Astfel, s-au menținut pozițiile relative ale fragmentelor ADN care rezultă de la procedeul de separare.	17 19 21
Următoarea etapă implică detectarea diferitelor categorii ale mărimilor fragmentelor sau, alternativ, detectarea unui fragment de o anumită mărime. Ultima poate fi interesantă, în special, deoarece este un marker genetic asociat cu sporul de creștere a purceilor născuți în aceeași generație. Aceasta este însoțită de preferință prin colorarea fragmentelor cu bromură de etidiu sau altele asemenea.	23 25 27
O tehnică alternativă este utilizarea unei sonde de hibridizare. O astfel de sondă este o oligonucleotidă sau polinucleotidă care este suficient de complementară sau omoloagă fragmentelor pentru a hibridiza cu ele, formând complexe sondă-fragment. De preferință, sonda este o sondă ADNc. Oligonucleotida sau polinucleotidă s-a marcat cu o entitate detectabilă. Aceasta permite detectarea fragmentelor de restricție, la care sondele s-au hibridizat. Sondele s-au marcat prin tehnici de marcă standard, cum ar fi cu o radiomarcare, marcă cu enzimă, marcă fluorescentă, marcă biotin-avidină și altele asemenea. Vezi brevetele US 4.711.955 , eliberat lui Ward et al., la 8 decembrie 1987 și US 4.868.103 , eliberat lui Stavrianopoulos et al., la 19 septembrie 1989, care ambele s-au incorporat aici prin referință.	29 31 33 35
Sondele s-au pus în contact cu membrana de nailon care conține fragmente de restricție pentru o perioadă suficientă de timp și în condiții de hibridizare corespunzătoare pentru ca sondele să hibridizeze la fragmentele. Apoi, filtrul s-a spălat de preferință pentru îndepărtarea sondelor nelegate și alte materiale nedorite.	37 39
Complexele sondă-fragment, care sunt legate la filtru, s-au detectat apoi prin tehnici cunoscute. De exemplu, dacă sonda a fost marcată radioactiv (^{32}P), detectarea implică punerea în contact a hârtiei cu membrană de nailon cu o bucată de film radiosensibil. După o perioadă de expunere corespunzătoare, s-au vizualizat fragmentele de interes, incluzând fragmente de control.	41 43 45
Etapă de detectare asigură un model, care rezultă din separarea fragmentelor după mărime. Compararea acestor fragmente cu fragmente de control de mărime cunoscută care de asemenea, au trecut prin același gel, permite estimarea mărimii diferitelor grupări ale	47

fragmentelor. Polimorfismele diferite în gena receptor prolactină s-au determinat apoi prin compararea modelelor produse prin analiza similară a ADN de la un număr de porci diferiți. Pentru mai mulți porci individuali, modelele vor varia de la modelul uzual produs de majoritatea altor porci. Aceasta se va datora unuia sau mai multor polimorfisme de lungimea fragmentului de restricție, adică, fragmente de restricție ale unei legături diferite produse de endonucleaza care taie gena receptor prolactină de porc. Aceasta indică diferite secvențe baze perechi în astfel de porci.

O dată ce s-a identificat un anumit RFLP, adică, un fragment de restricție de o anumită lungime, o sondă la acest fragment poate fi construită prin utilizarea tehnicilor cunoscute. Aceasta permite formate alternative și mai rapide pentru detectarea unui astfel de polimorfism. De exemplu, o dată ce ADN-ul s-a digerat, poate fi folosit un format de hibridizare sandwich. Un astfel de test s-a dezvoltat în brevetele **US 4.486.539**, eliberat lui Ranki, la 4 decembrie 1984 și **4.563.419**, eliberat lui Ranki, la 7 decembrie 1986, care ambele au fost încorporate aici prin referire. Proba s-a pus în contact cu o sondă de captură care s-a imobilizat pe un purtător solid. Sonda leagă fragmentul. Purtătorul s-a spălat apoi și s-a adăugat o sondă de detecție marcată. După spălarea suplimentară, s-a detectat sonda de detecție, prin aceasta demonstrând prezența fragmentului dorit.

Într-o altă realizare, o dată ce modelul RFLP a fost determinat sau un fragment polimorfic special a fost determinat, s-a comparat cu un al doilea model RFLP cunoscut sau cu fragmentul care s-a corelat cu numărul crescut al purcelor născuți în aceeași generație. Acest al doilea model sau fragment de asemenea, s-a determinat de la gena receptor prolactină de porc, folosind aceeași endonucleaza de restricție ca prima sau aceeași sondă sau un echivalent al acesteia în aceleași condiții.

Într-o realizare alternativă a invenției, fragmentele de restricție pot fi detectate prin hibridizarea soluției. În această tehnică, fragmentele s-au hibridizat mai întâi cu sonda și apoi s-au separat. Complexele sondă-fragment separate s-au detectat apoi cum s-a discutat mai sus. În general, astfel de complexe s-au detectat pe gel fără transfer pe hârtia de filtru.

Într-o realizare mai preferată, polimorfismul s-a detectat prin amplificare PCR fără vreo sondă. Această procedură este cunoscută specialiștilor cu pregătire în domeniu și s-au dezvoltat în brevetele **US 4.795.699**, intitulat "DNA polymerase" și brevetul **US 4.965.188** "Process for Amplifying Detection and/or Cloning Nucleic Sequences Using a Thermostable Enzyme" ambele fiind încorporate aici prin referință.

Pentru această procedură, primerii sunt construiți pentru a amplifica regiunea în care polimorfismul se situează. În conformitate, primerii care sunt, de preferință, baze 4-30 s-au desemnat pe baza secvenței care înconjoară polimorfismul inclusiv un primer 5' sens și un primer 3' antisens al polimorfismului. Nu este necesar ca primerii să fie complement exact și de asemenea s-au acceptat secvențe substanțial echivalente. Apoi s-a adăugat o ADN polimerază cum ar fi polimeraza Taq (mai multe astfel de polimeraze sunt cunoscute și disponibile comercial) în prezența a patru nucleozid trifosfați și, frecvent, a unui agent de tamponare. Detectarea este facilitată prin colorare simplă, cum ar fi cu bromură de etidiu, a produselor separate pentru a detecta mărimile prezise pe baza lungimii regiunii amplificate. Timpi de reacție, reactivii și modelul primerilor sunt toate cunoscute celor specialiști în domeniu și s-au discutat în brevetele încorporate aici prin referire. Amplificarea PCR suplimentară poate fi folosită în combinație cu Single Strand Confirmation Polymorphism (SSCP). Vezi *Detection of Polymorphism, of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms*, Orita și col., PNAS 86(8) Apr. 1989 (2766-70); și Lessa și col., Mol Ecol 2(2), p. 119-29 Apr. 1993 "Screening Techniques for Detecting Allelic variation in DAN Sequences", care sunt încorporate aici prin referință.

Cu toate că metodele de mai sus sunt descrise în termenii utilizării unei singure enzime de restricție și a unui singur set de primeri, metodele nu sunt astfel limitate. Dacă se dorește, pot fi folosite una sau mai multe enzime de restricție și/sau sonde și/sau primeri. Enzime adiționale, sonde construite și primeri pot fi determinați prin experimente de rutină.

Markeri genetici pentru numărul mai mare de purcei născuți în aceeași generație s-au determinat după cum urmează. S-au dus la montă masculi și femele de porc de aceeași rasă sau de rase încrucișate sau derivate de la linii genetice lineare. S-a determinat numărul urmașilor produși de fiecare scroafă. Analiza RFLP a ADN-ului parental s-a realizat așa cum s-a discutat mai sus în scopul determinării polimorfismelor în gena receptor prolactină a fiecărui porc. Polimorfismele s-au asociat cu numărul de urmași. S-au utilizat cel puțin 20 și preferabil, cel puțin 40 scroafe pentru realizarea acestor determinări. Numărul de câte ori fiecare femelă produce o fătare (adică, paritatea) este cel puțin o dată. Preferabil, ciclul de reproducere și nașteri s-a repetat de cel puțin 2 ori și, mai preferabil de 3 ori.

Când această analiză s-a realizat și polimorfismul s-a determinat prin analiză PCR RFLP folosind endonucleaza de restricție Alul și primerii de amplificare pot fi desemnați folosind secvențe prolactină cunoscute analoage de om sau iepure datorită omologiei ridicate în regiunea care înconjoară polimorfismul, sau pot fi desemnați folosind date cunoscute privind secvența genei prolactină de porc așa cum s-a exemplificat în fig. 1, sau chiar desemnați de la secvențe obținute de la date de legătură de la gene care înconjoară strâns. S-a generat, conform invenției, un set de primeri selectați care amplifică un fragment de 457 baze perechi 5'-CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG-3' (SEQ ID NR:1) și primerul revers 5'-GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA-3' (SEQ ID NR:2) după fragmente polimorfice de restricție de aproximativ 124, 110, 79, 77 și 67 baze perechi. Situl polimorfic s-a localizat în fragmentul de 110 baze perechi. Când a fost prezent situl tăiat polimorfic, s-a produs un fragment de 90 baze perechi. Fragmentele polimorfice s-au dovedit a fi alele și fiecare s-a dovedit a fi asociat cu numărul mai mare de purcei născuți în aceeași generație pentru diferite rase. Astfel, un porc care este heterozigot pentru fragmentul Alul va prezenta un model de 124, 110, 90-, 79, 77 și 67. Un homozigot pentru situl tăiat polimorfic va prezenta un model 124, 90, 79, 77, 67, în timp ce alt homozigot arată un model 124, 110, 79, 77, 67. Genotipul asociat cu numărul mai de urmași fătați într-o generație alternează pentru diferite rase. Acest rezultat este similar situației descrise în brevetul **US 5.374.523**, intitulat "*Allelic variants of Bovine Somatotropin gene: Genetic marker for Superior Milk Production in Bovine*", în care inventatorul a găsit un polimorfism alelic în gena somatotropină și o formă alelică a fost utilă pentru vacile Jersey și forma alternată a fost utilă pentru vacile Holstein.

Reactivii corespunzători pentru aplicarea metodelor invenției pot fi ambalați în truse convenționale. Trusele asigură materialele necesare, ambalate în recipiente corespunzătoare. La un minim, trusa conține un reactiv care identifică un polimorfism în gena receptor prolactină de porc care este asociată cu un spor de creștere a purceilor născuți în aceeași generație. De preferință, reactivul este un set PCR (un set al primerilor, ADN polimeraza și 4 nucleozid trifosfați) care hibridizează cu gena receptor prolactină de porc sau cu un fragment al acesteia. De preferință, sunt incluse în trusă, setul PCR și o enzimă de restricție care clivează gena receptor prolactină de porc în cel puțin un loc. Într-o realizare a invenției preferată în mod special, primerul este SEQ ID NR: 1 sau SEQ ID NR:2 și enzima de restricție este Alul. De preferință, trusa cuprinde suplimentar mijloace auxiliare, cum ar fi reactivi, pentru detectarea sau măsurarea entității detectabile sau asigurarea unui control. Dacă se dorește, pot fi incluși alți reactivi folosiți pentru hibridizare, prehibridizare, extracție ADN, vizualizare etc.

Metodele și materialele invenției pot fi folosite, de asemenea, mai general, pentru a evalua ADN de porc, tipul genetic individual la porc și diferențele genetice, detectate la porci, în special, o probă de ADN genomic de porc poate fi evaluată prin referire la unul sau mai multe controale pentru a determina, dacă este prezent un polimorfism în gena receptor prolactină. De preferință, analiza RFLP s-a realizat în legătură cu gena receptor prolactină de porc și rezultatele s-au comparat cu un control. Controlul este rezultatul unei analize RFLP a unei gene receptor prolactină de porc a unui porc diferit unde se cunoaște polimorfismul genei receptor prolactină de porc. În mod similar, genotipul receptor prolactină a unui porc se poate determina prin obținerea unei probe din ADN-ul său genomic, realizând analiza RFLP a genei receptor prolactină în ADN și comparând rezultatele cu un control. Din nou, controlul este rezultatul analizei RFLP a genei receptor prolactină a unui porc diferit. Rezultatele clasifică genetic porcii prin specificarea polimorfismului în gene receptor prolactină. În final, diferențe genetice printre porci pot fi detectate prin obținerea de probe ale ADN genomic de la cel puțin doi porci, identificarea prezenței sau absenței unui polimorfism în gena receptor prolactină și compararea rezultatelor.

Aceste teste sunt utile pentru identificarea markerilor genetici în legătură cu numărul de purcei fătați în aceeași generație, așa cum s-a discutat mai sus, pentru identificarea altor polimorfisme în gena receptor prolactină care pot fi corelate cu alte caracteristici și pentru analizele științifice generale ale genotipurilor și fenotipurilor de porci.

Markerii genetici, metodele și trusele invenției, de asemenea, sunt utile într-un program de reproducere pentru a îmbunătăți numărul de purcei fătați într-o generație într-o rasă, linie, sau populație de porci. Selecția continuă și reproducerea scroafelor care sunt cel puțin heterozigote și preferabil homozigote pentru un polimorfism asociat cu numărul mai mare al purceilor fătați într-o generație, va conduce la o rasă, linie sau populație având numere mai mari de urmași la fiecare fătare a femelelor acestei rase sau linii. Astfel, markerii sunt instrumente de selecție.

Se va înțelege că aplicarea expunerilor prezentei invenții la o anumită problemă sau mediu va fi în posibilitățile unui specialist obișnuit din domeniu în lumina a ceea ce s-a prezentat aici.

Exemple de produse și procedee ale prezentei invenții apar în următoarele exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. Datorită omologiei și similarității ridicate de secvență în procesul de transcripție, secvențe ADN_c umane (Boutin și col., 1989) și de iepure (Edery și col., 1989) care codifică receptorul prolactină s-au folosit pentru a proiecta primeri degenerați de acoperire a regiunii 3' de codificare și netranslată. Primerii au amplificat un fragment de aproximativ 500 baze perechi în probe ADN genomic de porc și control uman. Primerul sens 5'-TCA CAA GGT CAA C/TAA AGA TG-3' (SEQ ID NR:4). și primerul antisens 5'-TGG/A AGA AAG/A AGG CAA G/ATG GT-3' (SEQ ID NR:5) s-au folosit în următoarele condiții PCR: 93°C, timp de 3 min, 6 cicluri de 93°C 30 s, 47°C 2 min, 72°C 3 min, 36 cicluri de 93°C 30 s, 53°C 2 min, 72°C 5 min și în final 72°C, 5 min. S-a adăugat ultima polimeraza Taq, în timp ce probele s-au încălzit la 80°C.

Fragmentele de la două animale s-au purificat și secvențat în direcții sens și antisens. Secvența de porc de la regiunea de codificare s-a translat până la aminoacizi și s-a comparat cu secvențe cunoscute. O cercetare a bazei de date a raportat secvențele PRLR de iepure și uman ca cele mai bune două perechi, cu 82% și respectiv, 74% pozitive. De la secvența ADN de porc, primerii (primerul sens 5' - CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG-3' (SEQ ID NR : 1) și primerul antisens 5' - GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA-3' (SEQ ID NR : 2)) s-au desemnat pentru a amplifica un fragment de 457 baze perechi (fig. 1). S-au folosit endonucleaze de restricție TaqI, Sau3a, PvuII, MspI și AluI pentru a digera produsul amplificat și s-a găsit un polimorfism cu AluI în regiunea de codificare a genei. Rezoluția benzilor

RO 120411 B1

s-a obținut folosind electroforeza în gel de agaroză (fig. 2). Mărimile fragmentului PCR-RFLP au fost de aproximativ 124, 110, 79, 77 și 67 baze perechi cu situsul polimorfic fiind localizat în fragmentul de 110 baze perechi. Când a fost prezent situsul tăiat polimorfic, s-a produs un fragment de 90 baze perechi. Vezi fig. 4 pentru modele de fragment produse. Familiile de referință PiGMap (Archibald et al., 1995) s-au genotipat, cu toate familiile disponibile fiind informative. Genotipurile s-au analizat pentru două puncte de legătură folosind CriMap software (Green et al., 1990) cu scoruri LOD mai mari decât 3 fiind semnificative. Locus-urile PRLR s-au legat strâns la trei markeri care s-au trasat la cromozomul 16 de porc al hărtii de legare PiGMap publicate. O analiză la punct multiplu s-a făcut de asemenea pentru a produce cea mai bună hartă a cromozomului 16 (Figura 3) implicând toți markerii legați.

Exemplul 2. TEST PCR pentru marker genetic receptor prolactină

Testul de amplificare PCR s-a optimizat cu următorii parametrii.

Primeri :

primer sens 5'-CCCAAAACAGCAGGAGAACG-3' (SEQ ID NR:1)

primer antisens 5'-GGCAAGTGGTTGAAAATGGA-3' (SEQ ID NR:2)

Condiții PCR :

Amestec reacție	25 µl reacție	19
Tampon 10XPCR (Promega)	2,5 µl	
MgCl ₂ 25 mM (Promega)	2,0 µl	21
dNTP 10 mM (Boehringer Mannheim)	0,5 µl	
primer sens 20 pmol/µl	0,5 µl	23
primer antisens 20 pmol/µl	0,5 µl	
H ₂ O sterilă dd (dedurizată)	17,5 µl	25
ADN 12,5 ng/µl	1,5 µl	
Polimerază Taq (Promega)	0,125 µl	27

Primii şase reactivi se vor amesteca şi 18,5 µl din acest pre-mix adăugat la fiecare eprubetă de reacție. Urmează adăugarea de ADN şi apoi acoperirea cu o picătură de ulei mineral steril. Se plasează eprubetele de reacție pe ciclerul termic încălzit la 80°C. Se amestecă Taq cu cocktail-ul rămas şi se adaugă 5 pi la eprubetele de reacție, asigurându-se submersia sub ulei.

Program cicler termic:

1. 93°C 3 min	5. Reîntoarcere la etapa 2 pentru 32 cicluri	35
2. 93°C 30 s	6. 72°C 3 min	
3. 60°C 1 min	7. 4°C păstrare	37
4. 72°C 1 min		

5 µl produs PCR plus 2 µl colorant de încărcare 6X se vor plasa pe gel 1% agaroză pentru verificare. Trecere la 120 V timp de 30 min şi colorare cu bromură de etidiu.

Digestie Alul:

Amestec de digestie (per 20 µl produs PCR)	Fiecare	43
Tampon 10X NE (New England Biolabs)	2,5 µl	
Alul 8U/µl (New England Biolabs)	0,5 µl	45
H ₂ O sterilă dd (dedurizată)	2,0 µl	

Se amestecă reactivii şi se adaugă 5 µl la fiecare eprubetă. Se incubează probele la 37°C peste noapte.

Electroforeză în gel: fragmentele s-au separat prin încărcarea produsului de digerat plus 5 µl colorant de încărcare 6X pe un gel 6% agaroză NuSieve (FMC) la 120 volți timp de

3 h la temperatura camerei. Gelurile colorate cu bromură de etidiu. Mărimile fragmentelor PCR-RFLP sunt aproximativ 124, 110, 79, 77 și 67 baze perechi cu situl polimorfic fiind localizat în fragmentul de 110 baze perechi. Când a fost prezent situl tăiat polimorfic, s-a produs un fragment de 90 baze perechi. Astfel un heterozigot va avea benzile la 124, 110, 90, 79, 77 și 67. În timp ce homozigoții vor avea benzi la 124, 90, 79, 77 și 67 și, respectiv, 124, 110, 79 și 67.

Fig. 4 este o diagramă a fragmentelor obținute de la testul PCR. (A este alela fără sit Alul, B este alela având situl Alul).

Exemplul 3. Asocierea genotipului cu numărul de purcei fătați într-o generație

Testul PCR s-a realizat așa cum s-a detaliat în Exemplul 2 la mai multe scroafe de la Pig Improvement Company, (PIC). Animalele folosite au fost scroafe linia 19 PIC care au fătat într-o perioadă de 6 luni și purceii care s-au născut în timpul acestei perioade se vor păstra ca stoc de înmulțire. S-au colectat probe de sânge și țesut și s-au trimis la laborator, unde ADN-ul s-a extras și s-a folosit în testul PRLR PCR. Femelele au avut una până la trei înregistrări. Analiza Estimated Breeding Value a numărului total de nașteri (BV TNB) s-a estimat folosind un model linear amestecat, în care fiecare paritate succesivă a scroafei s-a tratat ca o înregistrare repetată. S-au folosit numai-primele trei parități ale unei scroafe. Modelul include covariatul vârstei la purcei fătați o dată de o scroafă adăpostiți în paritate, efectele fixe ale parității, tipul de serviciu (natural sau AI), purceii fătați o dată de o scroafă într-o lună la fermă și efectele randomice permanente ale mediului înconjurător și animalului. S-a presupus h^2 curent ca 0,10 și repetabilitatea ca 0,21. Numărul mediu de nașteri (Average Number Born) (AV NB) s-a calculat prin luarea mediei aritmetice a parităților totale (1 - 3) pentru fiecare femelă. S-au făcut comparații genotipice pentru (BV TNB) și (AV NB) făcând media BV TNB și AV NB individual pentru fiecare genotip.

Rezultatele sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1

Medii pentru o probă de animale L19 prin genotip PRLR

Genotip BB		
(n=18)	<u>BV TNB</u>	<u>AV NB</u>
Medie	0,2036	10,32
Std dev	0,3984	1,746193
Std Err	0,0939	0,411838
Genotip AB		
(n=75)	<u>BV TNB</u>	<u>AV NB</u>
Medie AB	0,1203	9,66
Std Dev AB	0,5317	2,77238
Std Err AB	0,0622	0,320136
Genotip AA		
(n=109)	<u>BV TNB</u>	<u>AV NB</u>
Medie AA	0,0755	9,75
Std Dev AA	0,5757	2,513279
Std Err AA	0,0551	0,243064

Exemplul 4. Rezumatul analizelor pentru receptorul prolactinei cu o linie Large White, o linie sintetică Meishan și o linie Landrace	1
Un total de 2,714 fătări înregistrate de la 1,077 scroafe s-au inclus în analizele numărului de purcei fătați într-o generație. Trăsăturile includ numărul total de născuți (TNB) și numărul de născuți în viață (NBA) de la cinci linii diferite PIC. Cele cinci linii examinate au fost Large White (două origini diferite) și origine Landrace, la fel ca și linii sintetice constând din 3/4 Duroc, 1/4 Large White și origine Large White/Meishan. Genotipul PRLR s-a prezentat pentru a explica o variație suficientă statistică în numărul de purcei fătați într-o generație în trei dintre liniile testate. Două dintre linii nu au arătat nici un efect statistic semnificativ ($P > 0,1$, nu arată rezultate). Media celor mai mici pătrate pentru TNB și NBA pentru fiecare din cele trei linii semnificative statistic s-au rezumat în Tabelul 2.	3 5 7 9 11
ADN-ul s-a extras din sânge și țesut din coadă. ADN-ul s-a analizat cum s-a descris în Exemplul 2 de mai sus.	13
Modelele au conținut efecte fixe de: turmă-sezon, tip serviciu, receptor prolactină, paritate (1,2,3+) și covariabile: ESR (receptor estrogen) și efect randomic: animal de prăsilă. Interacțiunile dintre turmă, ESR și receptor prolactină s-au testat de asemenea pentru semnificație. Ereditatea pentru trăsăturile fătării s-au dedus ca 0,10 și repetabilitatea ca 0,21. Efectele substituției alelei s-au estimat prin substituirea pentru genotipul PRLR a unui heterozigot covariat care a inclus numărul de alele A prezente (0, 1, sau 2). Efectele dominante s-au estimat ca deviația mediei heterozigotului de la media mediilor genotipului homozigot.	15 17 19 21
Principalele concluzii:	
* Sintetic Large White	23
* Indicații ale efectului dominant.	
Proba constă din 400 scroafe cu 1197 fătări înregistrate. Animale AA au un avantaj de 0,66 purcei/fatare în numărul de născuți în viață (NBA) peste celelalte două genotipuri ($< 0,05$), acestea sunt indicațiile unui efect dominant cu alela B.	25 27
* Meishan sintetic	29
* Efectul semnificativ dominant (peste-dominanță)- peste toate paritățile, dar în principal în prima paritate.	31
Proba constă din 261 scroafe cu 832 fătări înregistrate. Există dovada unui efect aditiv pentru TNB ($P < 0,05$) și NBA ($P < 0,05$) și un efect predominant pentru NBA în această linie ($< 0,01$).	33
* Landrace sintetic	
* Indicații pentru un efect aditiv	35
Proba constă din 416 scroafe cu 685 fătări înregistrate. O diferență mai mare decât un purcel per fatăre între două genotipuri homozigote s-au detectat atât pentru TNB ($P < 0,08$), cât și pentru NBA ($P < 0,1$), cu alela A care este favorabilă.	37 39
Efectele asupra TNB au arătat aceleași trăsături ca și NBA pentru fiecare populație. Rezultatele Tabelului 2 arată că PRLR a avut un efect semnificativ asupra mărimii fătării așa cum s-a măsurat prin TNB și NBA în trei linii comerciale. Este evident că fondul genetic al fiecărei diferite linii are un rol în modul și mărimea în care trăsătura a fost afectată. În plus, nu s-au găsit diferențe semnificative pentru media Birth Weight în nici una din liniile testate. Aceasta este o observație potențial valabilă deoarece este normală o relație inversă între mărimea fătării și media greutateii natale. Alela receptor prolactină poate, deci să asigure o metodă pentru creșterea greutateii natale a fătărilor mai mari.	41 43 45 47

Tabelul 2

Mediile celor mai mici pătrate pentru fiecare genotip PRLR de-a lungul tuturor parităților pentru TNB, NBA și greutatea natală medie (ABW) pentru trei linii comerciale de porci

Linie comercială	Genotip PRLR	TNB	NBA
Sintetic Large White	AA	12,51	12,39
	AB	12,35	11,73
	BB	12,71	11,73
Efecte	a	0,10	-0,33 ^b
	b	-0,26	-0,33 ^a
Sintetic Maishan	AA	13,64	12,94
	AB	14,35	13,74
	bb	13,96	13,27
		P<0,05	P<0,05
Efecte	a	0,16 ^b	0,16 ^b
	b	0,55 ^b	0,63 ^c
Sintetic Landrace	AA	12,13	11,33
	AB	11,72	10,92
	BB	10,98	10,31
		P<0,08	P<0,10
Efecte	a	0,51 ^b	0,47 ^b
	b	0,17	0,10

a= efect aditiv; d=efect dominant; efectele sunt semnificative la ^aP<0,1, ^bP<0,05, ^cP<0,01.

Exemplul 5. Variația dintre diferite rase

Suplimentar, probe de la șapte rase au fost caracterizate, incluzând rase SUA Chester White, Duroc, Hampshire, Landrace și Yorkshire; Meishan chinezesc, și Large White european (Tabel 3).

Tabelul 3

Rasă	Frecvență genotip			Frecvență alelă	
	AA	AB	BB	A	B
Landrace n=9	56	33	11	72	28
Duroc n=10	5	5	0	79	21
Yorkshire n=12	0	75	25	37	63
Chester White n=10	1	3	6	25	75
Hampshire n=11	0	09	91	05	95
Meishan n=9	33	44	22	56	44
Large White n=11	09	46	45	32	68

Există diferențe de rasă pentru frecvența genei la PRLR. Existența unui polimorfism localizat la regiunea 3' a genei este interesantă deoarece conexiunea alternativă a PRLR s-a văzut în această regiune a genei la alte specii. Diferențele frecvenței alelei printre rase sugerează că o alelă poate fi selectată pentru unele populații și ocolită pentru altele.

Referințele următoare au fost încorporate aici, în totalitate, prin referință:

Archibald, A., Haley, C., Brown, J., Couperwhite, S., McQueen, H., Nicholson, D., Coppieters, W., Van de Weghe, A., Stratil, A., Wintero, A., Fredholm, M., Larsen, N., Nielsen, V., Milan, D., Woloszyn, N., Robie, A., Dalens, M., Riquet, J., Gellin, J., Caritez, J.C., Burgaud, G., Ollivier, L., Bidanel, J.P., Vaoman, M., Renard, C., Geldermann, H., Davoli, R., Ruyter, D., Verstege, E., Davies, W., Hoyheim, B., Keiserud, A., Andersson, L., Ellegren, H., Johansson, M., Marklund, L., Miller, J., Anderson Dear, D., Signer, E., Jeffreys, A., Moran, C., Le Tissier, P., Muladno, Rothschild, M., Tuggle, C., Vaske, D., Helm, J., Liu, H.C., Rahman, A., Yu, T.P., Larson, R.G., Schmitz, C. (1995) The PiGMAP Consortium Linkage Map of the Pig (*Sus Scrofa*). *Mamm Genome* 6, 157-175.

Boutin, J., Edery, M., Shirota, M., Jolicoeur, C., LeSueur, L., Aii, S., Gould, D., Djane, J., Kelly, P. (1989). Identification of cDNA Encoding a Long Form of Prolactin Receptor in Human Hepatoma and Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol.* 3, 1455-1461.

Edery, M., Jolicoeur, C., Levi-Meyrueis, C., Dusanter-Fourt, I., Petridou, B., Boutin, J., LeSueur, L., Kelly, P., Djyne, J. (1989). Identification and Sequence Analysis of a Second Form of a Prolactin Receptor by Molecular Cloning of Complementary DNA From Rabbit Mammary Gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2112-2116.

Green, P., Falls, K., Crooks S. (1990). Documentation for CRIMAP, version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis.

Jammes, H., Schirar, A., Djiane, J. (1985). Differential Patterns in Luteal Prolactin and LH Receptors During Pregnancy in Sows and Ewes. *J. Reprod. Fertil.* 73, 27-35.

Kelly, P., Djyne, J., Postel-Vinay, M., Edery, M. (1991). The Prolactin/Growth Hormone Receptor Family. *Endocrin. Rev.* 12.235-251.

Lebrun, J., Aii, S., Groffin, V., Ullrich, A., Kelly, P. (1995). A Single Phosphotyrosine Residue of the Prolactin Receptor is Responsible for Activation of Gene Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4031-4035.

LeSueur, L., Edery, M., Aii, S., Paly, J., Kelly, P. (1991). Comparison of Long and Short Forms of the Prolactin Receptor on Prolactin-Induced Milk Protein Gene Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 824-828.

Rothschild, M., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, S., Vincent, A., McLaren, D., Southwood, O., van der Steen, H., Mileham, A., Plastow, G. (1996). The Estrogen Receptor Locus is Associated With a Major Gene Influencing Litter Size in Pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 201-205.

Rui, H., Djeu, J., Evans, G., Kelly, P., Farrar, W. (1992). Prolactin Receptor Triggering. *J. Biol. Chem.* 267, 24076-24081.

Yuan, W., Lucy, M. (1996). Effects of Growth Hormone, Prolactin, Insulin-Like Growth Factors, and Gonadotropins on Progesterone Secretion by Porcine Luteal Cells. *J. Anim. Sci.* 74, 866-872.

Revendicări

1. Metodă pentru selecția porcilor pentru a determina pe cei mai probabil să producă un număr mai mare de purcei fătați în aceeași generație, caracterizată prin aceea că aceasta constă în obținerea unei probe de material genetic de la porc și testarea pentru

prezența unui polimorfism în gena receptor prolactină, în numita probă care s-a asociat cu un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație, iar acest polimorfism este asociat cu situsul de restricție polimorfic Alul la poziția 240 a genei PRLR așa cum este descris în SEQ ID NR.3.

2. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** numita etapă a testării s-a ales din grupul constând din: analiza polimorfismului lungimii fragmentelor de restricție (RFLP), analiza heteroduplex, polimorfismul conformațional al monocatenei (SSCP), electroforeza în gel cu gradient de denaturare (DGGE) și electroforeza în gel cu gradient de temperatură (TGGE).

3. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** numita etapă a testării pentru prezența numitului polimorfism cuprinde etapele: digestia numitului material genetic cu o enzimă de restricție, care clivează gena receptor prolactină de porc în cel puțin un loc; separarea fragmentelor obținute de la numita digestie; detectarea unui profil de restricție, generat de numitele fragmente; și compararea numitului profil de restricție cu un al doilea profil de restricție, pentru gena receptor prolactină de porc, prin folosirea numitei enzime de restricție, în care al doilea profil de restricție s-a asociat cu un număr mai mare de purcei născuți în aceeași generație.

4. Metodă conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** numita enzimă de restricție este enzima Alul.

5. Metodă conform revendicărilor 3 și 4, **caracterizată prin aceea că** numita separare este prin electroforeză în gel.

6. Metodă conform revendicărilor 3, 4 și 5, **caracterizată prin aceea că** numita etapă de comparare a numitelor profile de restricție cuprinde identificarea fragmentelor specifice ale mărimii și compararea mărimilor numitelor fragmente.

7. Metodă conform revendicărilor 3... 6, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde suplimentar etapa de amplificare a unei cantități de genă receptor prolactină de porc sau o porțiune a acesteia care conține numitul polimorfism, înainte de numita etapă de digestie.

8. Metodă conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** numitul situs de restricție este localizat la capătul 3' al regiunii de codificare a genei receptor prolactină de porc.

9. Metodă conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că** numita etapă de amplificare include etapele de selectarea secvenței sens și antisens a unui primer capabil de amplificare a unei regiuni a genei receptor prolactină de porc care conține situsul polimorfic Alul localizat la nucleotida 240 a genei PRLR descris în SEQ ID NR:3.

10. Metodă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** numiții primeri sens și antisens sunt selectați din și pe baza secvenței SEQ ID NR:3.

11. Metodă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** numitul primer sens s-a ales din grupul constând din SEQ ID NR:1 și SEQ ID NR:4 și numitul primer antisens s-a ales din grupul constând din SEQ ID NR: 2 și SEQ ID NR:5.

12. Metodă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** numitul primer sens este SEQ ID NR :1 iar numitul primer antisens este SEQ ID NR:2.

13. Metodă conform revendicării 9, **caracterizată prin aceea că** numitul primer sens este SEQ ID NR:4 iar numitul primer antisens este SEQ ID NR:5.

14. Metodă conform revendicării 6, **caracterizată prin aceea că** numita etapă de detectare a mărimilor diferite ale numitelor fragmente cuprinde etapele: separarea numitelor fragmente, după mărime, folosind electroforeza în gel, în prezența unui fragment ADN de

RO 120411 B1

control cu mărime cunoscută; punerea în contact a numitelor fragmente separate cu o sondă care hibridizează cu numitele fragmente, pentru a forma complexe din fragmentul din sondă; și determinarea mărimii fragmentelor separate, prin detectarea prezenței complexelor din fragmentul de sondă și determinarea pozițiilor lor relative față de numitul fragment ADN de control.	1 3 5
15. Metodă conform revendicării 14, caracterizată prin aceea că numita enzimă de restricție este enzima Alul și numitul RFLP este selectat din grupul care constă dintr-un fragment de 110 perechi de baze și un fragment de 90 perechi de baze.	7
16. Metodă de identificare a unui marker genetic, pentru numărul de purcei născuți în aceeași generație, caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde următoarele etape: reproducerea porcilor masculi și femele de aceeași rasă sau rase încrucișate, sau derivate de la linii genetice similare; determinarea numărului de urmași produși de fiecare scroafă; determinarea polimorfismului în gena receptor prolactină a fiecărei scroafe în care polimorfismul este situsul polimorfic Alul de la poziția 240 a genei PRLR așa cum este descris în SEQ ID NR:3; și asocierea numărului de urmași produși de fiecare scroafă cu numitul polimorfism identificând prin aceasta un polimorfism pentru numărul de purcei fătați în aceeași generație.	9 11 13 15 17
17. Metodă conform revendicării 16, caracterizată prin aceea că aceasta cuprinde suplimentar etapa selectării porcilor pentru reproducere care sunt presupuși a avea un număr mai mare de purcei fătați în aceeași generație.	19
18. Metodă conform revendicărilor 16 și 17, caracterizată prin aceea că numita analiză cuprinde digestia ADN-ului amplificat prin PCR cu enzima de restricție Alul.	21
19. Metodă conform revendicării 12, caracterizată prin aceea că numitul polimorfism asociat cu un număr mai mare de purcei fătați în aceeași generație este detectat prin utilizarea primului și celui de-al doilea primer cuprinzând cel puțin 4 baze consecutive din SEQ ID NR:1 și SEQ ID NR:2.	23 25
20. Primer utilizat pentru amplificarea regiunii pentru prezența sitului polimorfic Alul de la gena receptor prolactină de la porc, caracterizat prin aceea că numitul primer este ales dintre secvențele selectate din grupul constând din SEQ ID NR:1, SEQ ID NR:2, SEQ ID NR:4 și SEQ ID NR:5.	27 29
21. Moleculă ADN, caracterizată prin aceea că aceasta constă din secvența de la capătul 3' al regiunii translate și netranslate a genei receptor prolactină de la porc, având alele polimorfice asociate cu un număr mai mare de purcei fătați în aceeași generație iar numita secvență este SEQ ID NR:3.	31 33
22. Moleculă conform revendicării 21, caracterizată prin aceea că numitele alele polimorfice descrise în SEQ ID NR:3 sunt asociate cu sporul de creștere în numărul de purcei născuți în aceeași generație, comparativ cu purceii care nu au aceste alele.	35 37

(51) Int.Cl.

C12Q 1/68 (2006.01);

C07H 21/04 (2006.01)

AAGTCAACAA AGATGGAGCA CTGGCOTTGC TCCCAAAACA GCAGGAGAAC
 GGCQACGGC CCGAGAAGGC TGGCGCCCCT GAAACCAGCA AGGAATACG
 CCCAGGTGTC CCGGGTGATG GATAACCACA TCCTGGTGTT AGTGCAGGAT
 CCGCGAGCTC GAAACGTGGC TCCGTTTQAA GAACCAACCA AGGAGACCCC
 GCCATCCCGG CCGCAGAATC CAGCTGCGAA AGACCTGGCC G/AGCTTCACCA
 CGGCCCCGGG CCACTGCAGA CACCCGCTGG GTGGGCTGGA TTACCTCGAT
 CCGGCAGGCT TTATGCACTC CTTTCACTGA GAGCTTGGTT CATGGGATGA
 TGGGTTACAA GGTGGGGTTT TTTTCAGGTC GCACTACGTG AAATGCACTC
 TACCAGAGAA AGCTCGAAAA TGGGGTTAGA ATGACACTAC CCAGACTCAC
 AGTTCACCTC TCTTCATGCT CCATTTCAA CCAGTGGCTCTT

G/A-G sau A la situl polimorfic

Fig. 1

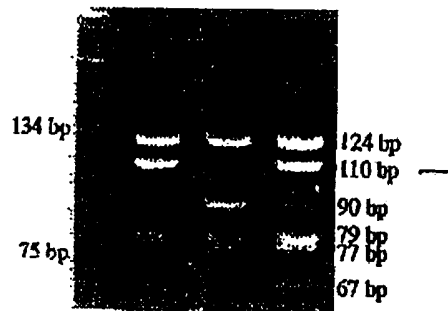


Fig. 2

(51) Int.Cl.

C12Q 1/68 (2006.01);

C07H 21/04 (2006.01)

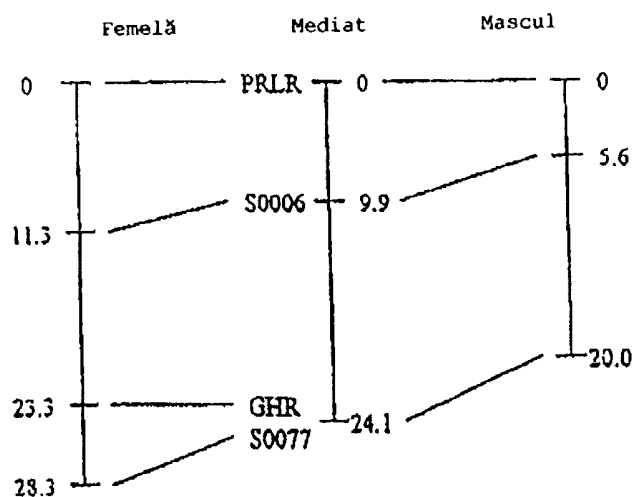


Fig. 3

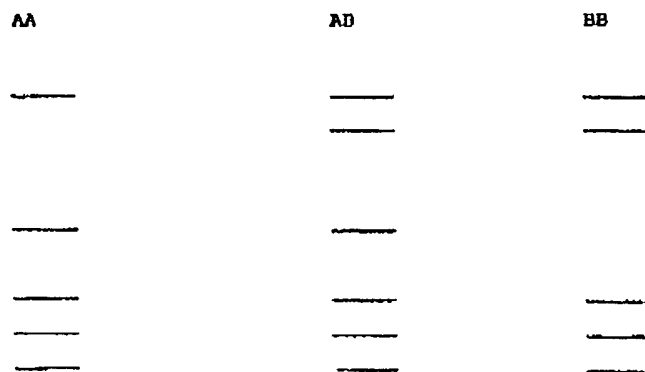


Fig. 4

