

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

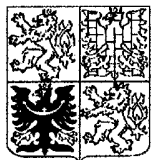
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

161-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30. 06. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **19.07.96,
01.11.96, 06.03.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/022180, 96/742805,
97/812208**

(33) Země priority: **US, US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16. 06. 99**
(Věstník č. 6/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/11508**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/03682**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 G 1/68
C 07 H 21/04

(71) Přihlášovatel:

IOWA STATE UNIVERSITY RESEARCH
FOUNDATION, INC., Ames, IA, US;

(72) Původce:

Rothschild Max F., Ames, IA, US;
Vincent Amy L., Ames, IA, US;
Tuggle Christopher K., Ames, IA, US;

(74) Zástupce:

Guttman Michal JUDr. Ing., Nad Štolou
12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Gen receptoru prolaktinu jako genetický
marker zvýšení velikosti vrhu u prasat**

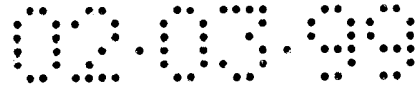
(57) Anotace:

Popisují se genetické markery velikosti vrhu u prasat, způsoby stanovení takových markerů a způsoby testování prasat za účelem stanovení těch, které s větší pravděpodobností produkují větší vrhy. Tyto prasata se přednostně vybírají pro účely chovu. Markery jsou založeny na přítomnosti nebo absepci polymorfismů v kódující oblasti genu receptoru prasečího prolaktinu.

```
AAGTCAACAA AGATGGAGCA CTGGCGTTGC TCCCAAACA GCAGGAGAAC  
GGCGACCGGC CGGAGAAGGC TGCCGCCCT GAAACCAGCA AGGAATACG  
CCCAGGTGTC CCGGGTGATG GATAACCACA TCCTGGTGT AGTGCCAGGAT  
CCGCGAGCTC GAAACGTGGC TCCGTTTGA GAACCAACCA AGGAGACCCC  
GCCATCCCGG CCGCAGAATC CAGCTGCGAA AGACCTGGCC G/AGCTTCACCA  
CGGCCCGGG CCACTGCAGA CACCCCTGG GTGGGCTGGA TTACCTCGAT  
CCCGCAGGCT TTATGCACTC CTTCAGTGA GAGCTTGGT CATGGGATGA  
TGGGTTACAA GGTGGGGTT TTTTCAGGTC GCACTACGTG AAATGCACTC  
TACCAGAGAA AGCTCGAAA TGGGGTTAGA ATGACACTAC CCAGACTCAC  
AGTTCACCTCC TCTTCAGGCT CCAATTTCAA CCACTTGGCTCTT
```

G/A = G nebo A v polymorfním místě

CZ 161-99 A3



Gen receptoru prolaktinu jako genetický marker zvýšení velikosti vrhu u prasat.

Oblast techniky

Vynález se obecně týká detekce genetických rozdílů vzhledem k účinnosti reprodukce u prasat. Zvláště pak se týká použití genetického markeru genu receptoru prolaktinu, který nese dědičný rys zvýšeného počtu mláďat ve vrhu.

Dosavadní stav techniky

Hlavním limitujícím faktorem produkce vepřového masa je účinnost reprodukce, která se definuje jako počet prasat produkovaných chovnou prasnicí. V USA je průměrný počet živých narozených selat přibližně 9,5 selete ve vrhu. Dědičnost velikosti vrhu není podstatná (10 % až 15 %) a standardní genetické metody selekce chovných prasnic na základě velikosti vrhu nejsou účinné. Proto je třeba najít způsob, který umožní selekci na základě účinnosti reprodukce na úrovni buňky nebo DNA.

Čínská plemena jsou známa tím, že dříve dospívají a vykazují značnou velikost vrhu. Americká plemena vykazují vyšší rychlost růstu a mají nízký obsah tuku. Proto je žádoucí zkombinovat nejlepší charakteristiky obou typů, přičemž se zlepší účinnost produkce vepřového masa v USA. Toto úsilí se podpořilo objevem genů nebo genetických markerů, které vykazují spojitost se zvýšením velikosti vrhu u prasat.

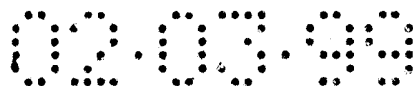
V několika výzkumných skupinách používají při studiu DNA prasat analýzu RFLP. V publikaci Jung et al., Theor. Appl. Genet., 77: 271-274 (1989) se popisuje použití metody RFLP, aby se prokázala genetická variabilita dvou plemen prasat. U těchto plemen se prokázal polymorfismus u genů antigenu třídy I prasečích leukocytů (SLA). V publikaci Hogans et al., Abstract for Annual Meeting of Midwestern Section of the American Society of Animal Science, March 26-28, 1990, se



upozorňuje na existenci polymorfismu genů prasečího hlavního komplexu histokompatibility (MHC) u čínských prasat. Tento polymorfismus se prokázal analýzou RFLP. V publikaci Jung et al., *Animal Genetics*, 26: 79-91 (1989) se popisuje analýza RFLP genů SLA třídy I u určitých vepřů. Autoři uvádí, že výsledky naznačují spojitost mezi geny prasečí SLA/MHC třídy I a produkcí a projevením rysů. Autoři dále uvádějí, že použití restričních fragmentů SLA třídy I jako genetických markerů může mít potenciál zlepšit v budoucnosti růst prasat.

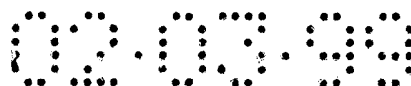
Dále patent USA č. 5,550,024 (Rothschild et al.,) dokládá polymorfismus u genu receptoru prasečího estrogenu, který se spojuje se zvýšením velikosti vrhu.

Jiným prasečím hormonem, který má vztah k úspěšné reprodukci, je prolaktin. Prolaktin (PRL) je hormon vylučovaný předním lalokem hypofýzy, který se účastní řady různých endokrinních aktivit a je podstatný při úspěšné reprodukci. Jednou z jeho nejlépe charakterizovaných funkcí je regulace produkce mléka u dospělých savců. PRL je nutný při stimulaci tvorby mléka nebo při syntéze mléčných proteinů. Toto působení zprostředkovává receptor prolaktinu (PRLR). Receptor prolaktinu (PRLR) patří do super-rodiny cytokin/GHR/PRLR. Když se receptor prolaktinu aktivuje prolaktinem spouští se signální cesta transdukce, která aktivuje transkripci genů, jako je gen β -kaseinu a α -laktalbuminu. Po aktivaci receptoru prolaktinu prolaktinem začíná signální cesta transdukce, která pravděpodobně zahrnuje tyrozinovou kinázu Jak2. Mutace karboxylového konce proteinu, které mění specifický fosfotyrozinový zbytek, brání receptoru aktivovat tyrozinovou kinázu Jak 2 a interferuje s aktivací transkripce genu β -kaseinu (Lebrun, J., Ali, S., Groffin, V., Ullrich, A., Kelly, P. (1995). A Single Phosphotyrosine Residue of the Prolaktin Receptor is Responsible for Activation of Gene Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4031-4035). U krys, myší, králíků a lidí se charakterizovaly dlouhé a krátké formy



receptorového proteinu, stejně jako velikosti transkriptů (Boutin, J., Edery, M., Shirota, M., Jolicoeur, C., Lesueur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J., Kelly, P. (1989). Identification of cDNA Encoding a Long Form of Prolactin Receptor in Human Hepatoma and Brest 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., Djiane, 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.; Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P. (1991). The Prolactin/Growth Hormone Receptor on Prolactin-Induced Milk Protein Gene Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 824-828.). Ukázalo se však, že krátká forma není schopna aktivovat transkripci genů mléčných proteinů. Mediátorová RNA pak pochází ze stejného primárního transkriptu a způsobuje alternativní sestřih zvláště u nepřekládaných oblastí u králíka a u člověka. V poslední době se také ukázalo, že PRL stimuluje in vitro produkci progesteronu ve velkých prasečích luteálních buňkách. Progesteron je nutný při udržení těhotenství. Uvažuje se, že PRLR zprostředkovává účinky injektovaného růstového hormonu (bST) v podobě vyššího výtěžku mléka u telat a proto může být také důležitý při kolísání výtěžku mléka u prasat. U lidí a myši leží receptor růstového hormonu (GHR) a PRLP blízko sebe (Arden et al., 1990; Baker et al., 1992), přičemž je pravděpodobné, že tyto dva geny jsou spojeny také u prasat. U prasat se GHR zmapoval na chromozomu 16, zatímco PRLP není zmapován. V případě PRLP se neuvádí genetická variabilita.

Vynález popisuje genetický marker založený na objevu polymorfizmů u genu receptoru prolaktinu, který se spojuje se zvýšením průměrné velikosti vrhu u prasat. To umožní u prasat provést genetické typování genů receptoru prolaktinu a



stanovit vztah specifických RFLP a zvýšené velikosti vrhu. To také umožní identifikaci jednotlivých samců a samic, které nesou gen způsobující větší vrhy. V případě samic je pak možné očekávat, že jejich vrh bude větší, než je průměr u jejich plemene. V případě samců se očekává, že jejich potomstvo samičího pohlaví bude vykazovat silnější vrhy než je průměr u daného plemene. Marker se pak stane selekčním nástrojem pro vývoj linie a plemene, které produkuje vrhy s vyšším počtem mláďat.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje způsob testování prasat za účelem vytypování těch, které s velkou pravděpodobností budou produkovat silné vrhy.

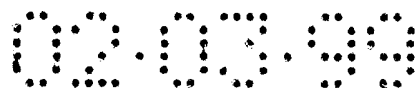
Vynález dále popisuje způsob identifikace genetických markerů velikosti vrhu u prasat.

Dále vynález popisuje způsob produkce genetických markerů velikosti vrhu u prasat.

Vynález také popisuje kit, který hodnotí vzorek prasečí DNA podle přítomnosti specifických genetických markerů velikosti vrhu.

Další předměty a výhody vynálezu jsou uvedeny v následujícím popisu vynálezu a částečně vyplývají z popisu nebo mohou vyplynout z použití vynálezu. Předmětů a výhod vynálezu se dosáhne prostřednictvím a kombinacemi způsobů uvedených v patentových nárocích.

Aby se dosáhlo jednotlivých předmětů vynálezu a v souladu s účelem vynálezu, jak se zde uvádí, se popisuje způsob testování prasat za účelem zjištění, která prasata pravděpodobněji produkuje silnější vrh, když jsou březí, nebo za účelem selekce prasat, jenž nesou alely indikující slabší vrh. Termín „vrhy se zvýšenou velikostí, (silnější vrhy)“ znamená podstatné zvýšení velikosti vrhu ve srovnání s průměrným vrhem dané populace. Tak vynález popisuje způsob



testování prasat za účelem zjištění, která prasata s větší nebo menší pravděpodobností produkují silnější vrhy. Tento způsob zahrnuje 1) získání vzorku genomové DNA z prasete; a 2) analýzu genomové DNA získané v kroku 1) za účelem stanovení, která(é) receptorová(é) alela(y) je (jsou) přítomny. Vzorek genetického materiálu se získal z prasete a analyzuje se za účelem stanovení přítomnosti nebo absence polymorfismu v kódující oblasti genu prolaktinového receptoru, který koreluje se zvýšenou velikostí vrhu.

V preferovaném provedení vynálezu termín polymorfismus znamená polymorfismus délek restričních fragmentů a test zahrnuje identifikaci genu receptoru prasečího prolaktinu v izolovaném prasečím genetickém materiálu; působení restričního enzymu na gen za vzniku restričních fragmentů genu o různých délkách; separaci restričních fragmentů za vzniku restričního paternu, přičemž separace se může uskutečnit elektroforézou nebo použitím HPLC; a srovnání výsledného paternu restričních fragmentů vytvořeného z genu receptoru prasečího prolaktinu, o kterém se ví, že nese nebo nenese požadovaný marker. Jestliže test přítomnosti markeru u prasete je pozitivní, prase se může zařadit do chovu. Jestliže test prasete není pozitivní, prase se vyřadí ze skupiny a použije se jiným způsobem.

V případě nejvíce preferovaného provedení se izoloval gen za použití primerů a DNA polymerázy za účelem amplifikace specifické oblasti genu, která vykazuje polymorfismus. Dále amplifikovaná oblast se pak štěpí restričním enzymem a fragmenty se opět separují. Vizualizace paternu RFLP se uskutečnila jednoduchým barvením fragmentů nebo značením buď primerů nebo nukleosid-trifosfátů, které se používají při amplifikaci.

V případě jiného provedení vynález zahrnuje způsob identifikace genetického markeru velikosti vrhu u určité populace prasat. Chovají se samci a samice prasat stejného



plemene nebo kříženého plemena nebo podobné genetické linie, stanoví se počet potomků, které produkuje každá samice. Stanoví se polymorfismus genu receptoru prolaktinu každého prasete a stanoví se souvislost s počtem potomků. Upřednostňuje se, aby se pro stanovení polymorfismu použila analýza RFLP a nejvíce se upřednostňuje, aby se DNA štěpila restriční endonukleázou AluI.

Je také možné stanovit spojení mezi specifickými alelami alternativních markerů DNA a alelami markerů DNA, o kterých se ví, že jsou spojeny s určitým genem (např. zde diskutovaný gen receptoru prolaktinu), o kterém se už dříve zjistilo, že je spojen s určitým rysem. Pak v současné situaci je možné za použití genu receptoru prolaktinu nepřímo vybrat prasata, která pravděpodobně produkují slabé vrhy. Selektce se provádí na základě jistých alel markeru asociovaného s receptorem prolaktinu prostřednictvím selektce specifických alel alternativních markerů chromozomu 16. Příklady takových markerů, o kterých se ví, že jsou spojeny s receptorem prolaktinu na prasečím chromozomu 16, zahrnují SW1305, S0077, S0006, SW2411, SW1035 a S0111. Uvedené markery jsou mikrosatelity a receptor růstového hormonu (GHR).

Vynález dále zahrnuje kit vhodný pro hodnocení vzorku prasečí DNA na základě přítomnosti požadovaného genetického markeru v genu receptoru prasečího prolaktinu, který indikuje nedědičný rys, kterým je silný vrh. Kit tvoří přinejmenším kontejner s jedním nebo více činidly, která identifikují polymorfismus genu promotoru prasečího prolaktinu. Upřednostňuje se, aby činidlem byla sada lignonukleotidových primerů schopných amplifikovat fragment genu receptoru prasečího prolaktinu, který vykazuje polymorfismus. Upřednostňuje se, aby kit dále obsahoval restriční enzym, který štěpí gen receptoru prasečího prolaktinu alespoň v jednom místě. V případě nejvíce preferovaného provedení



vynálezu je uvedeným restriktivním enzymem AluI nebo enzym, který rozeznává stejné místo štěpení.

Vynález popisuje genetické markery velikosti vrhu u prasat. Dále popisuje způsob testování prasat za účelem stanovení, která prasata, na základě přítomnosti nebo absence polymorfismu v genu receptoru prolaktinu, který koreluje se zvýšením velikosti vrhu, budou pravděpodobně vykazovat silné vrhy. Termín „zvýšení velikosti vrhu“ znamená biologicky podstatné zvýšení velikosti vrhu ve srovnání s průměrným vrhem dané populace.

Vynález se týká genetických markerů a způsobů identifikace těchto markerů u prasat určitého plemene, druhu, populace nebo skupiny, přičemž samice prasat s velkou pravděpodobností vykazují vrh, který je podstatně větší (počet mláďat) ve srovnání s průměrným vrhem určitého plemene, druhu, populace nebo skupiny. Může se použít libovolný způsob identifikace přítomnosti nebo absence tohoto markeru, například analýza SSCP (polymorfismus jednořetězcové konformace, RFLP analýza analýza heteroduplexu, gelová elektroforéza s denaturačním gradientem a elektroforéza z teplotním gradientem, ligázová řetězcová reakce nebo dokonce přímé sekvenování genu receptoru prolaktinu a testování paternu po štěpení restriktivním enzymem AluI ve 3' překládané oblasti.

Další možné metody zahrnují systémy, které neprobíhají na gelu, jako je TaqMan™ (Perkin Elmer). V případě uvedeného systému se oligonukleotidové primery navrhuje tak, aby lemovaly diskutované mutace a umožňují PCR amplifikaci oblasti. Třetí oligonukleotidová sonda se navrhuje tak, aby došlo k hybridizaci s oblastí obsahující základní subjekt, který je rozdílný u různých alel genu. Tato sonda je značena fluorescenčními barvivy na obou koncích 3' a 5'. Barviva se vybrala tak, že fluorescence jednoho barviva je, v případě, že se barviva nacházejí v takové blízkosti, utlumena druhým barvivem a není možné ji detekovat. Extenze pomocí Taq DNA



polymerázy z primeru PCR umístěného na 5'-konci templátu vzhledem k sondě vede ke štěpení barviva připojeného na 5'-konci navázané sondy prostřednictvím nukleázové aktivity Taq DNA polymerázy na 5'-konci. Tato skutečnost odstraňuje efekt tlumení fluorescence, což umožňuje detekci fluorescence uvolněné z barviva na 3' konci sondy. Diskriminace mezi různými sekvencemi DNA vzniká na základě skutečnosti, že jestliže hybridizace sondy s templátovou molekulou není kompletní, to znamená že zde existuje chybné párování některé z forem, neproběhne štěpení barviva. K odstranění jevu tlumení fluorescence dojde pouze v případě, že nukleotidová sekvence oligonukleotidové formy je zcela komplementární s templátovou molekulou, na kterou se váže. Reakční směs může obsahovat dvě sondy s různými sekvencemi, kdy každá je navržena proti různým alelám, které mohou být přítomny, což umožňuje detekovat obě alely v jedné reakci.

Použití RFLP je preferovaným způsobem detekce polymorfismu. Protože však použití analýzy RFLP závisí na polymorfismu a na restričních místech DNA na molekule nukleové kyseliny, mohou se použít i jiné způsoby detekce polymorfismu. Tyto způsoby zahrnují ty, které analyzují produkt polymorfního genu a detekují polymorfismus stanovením výsledných rozdílů v produktu genu.

Analýza RFLP je obecně metoda v oboru dobře známa. Popisuje se například v publikacích USA patentech č. 4,582,788 podaném 15. dubna 1986 (Erlich) a 4,666,828 podaného 19. května 1987 (Gusella), 4,772,549 podaném 20. září 1988 (Frossard) a 4,861,708 podaném 29. srpna 1989 (Frossard). Metoda zahrnuje způsob získání DNA za účelem studia, štěpení DNA restričními endonukleázami, separace výsledných fragmentů a detekci fragmentů různých genů.

Vzorky genetického materiálu prasete podle vynálezu se mohou získat z krve, tkáně, sperma atd. Obecně lze říct, že genetickým materiálem je DNA a jeho zdrojem jsou buňky



periferní krve. Aby bylo dostatek DNA k analýze je nutné získat dostatečné množství buněk. Odborník ví, jaké množství DNA je pro analýzu nutné nebo to může velmi snadno určit. K izolaci DNA z buněk krve se používají metody, které jsou v oboru dobře známy.

Dále se amplifikuje oblast, která zahrnuje polymorfismus, za použití primerů a standardních metod, jako je polymerázová řetězcová reakce. Tyto metody se popisují v publikacích patenty USA č. 4,683,195 podaném 28. července 1987 (Mullis et al.), 4,683,202 podaném 28. července 1987, (Mullis), 4,800,159 podaném 24. ledna 1989 (Mullis, et al.), 4,889,818 podaném 26. prosince 1989 (Gelfand, et al.) a 4,902,624 podaném 20. února 1990 (Clumbus, et al.). Selekcce primerů se diskutuje ve zde uvedených publikacích. Pomocí primerů se amplifikuje 3' kódující oblast a nepřekládaná oblast genu receptoru prasečího prolaktinu, jak zobrazuje obrázek č. 2. Na základě vynálezu a v kombinaci se svými znalostmi může odborník snadno navrhnout jiné takové primery.

Izolovaná DNA se pak štěpí restričními endonukleázami, které hydrolyticky štěpí DNA ve specifické nukleotidové sekvenci, která se nazývá restriční místo. Takové endonukleázy, které se také nazývají restriční enzymy, jsou v oboru dobře známy. V souladu s vynálezem je vhodné, vybrat ten enzym, který štěpí kódující oblast genu receptoru prolaktinu alespoň na jednom místě, za vzniku alespoň dvou fragmentů genu. Metodou známou v oboru ve spojení s obsahem vynálezu se stanoví, zda libovolný z takových fragmentů je či není polymorfní a zda libovolný polymorfismus (RFLP) je spojen s velikostí vrhu. Upřednostňovanou restriční endonukleázou je AluI. Restriční enzym AluI štěpí sekvenci dvouřetězcové DNA 5'-AGCT-3'. Odborník snadno na základě svých znalostí a informací uvedených v popisu vynálezu stanoví množství restričního enzymu, které je nutno přidat ke vzorku, který



obsahuje prasečí DNA a vhodné podmínky, při kterých probíhá štěpení.

Restrikční fragmenty se pak analyzují metodami známými v oboru, které obecně zahrnují buď separaci fragmentů a vizualizaci barvením nebo následné blotování a hybridizaci, přičemž vzniká určitý patern, nebo stanovení různých velikostí fragmentů. Později se určují jeden nebo více fragmentů (markerů), které souvisí se zvýšením velikosti vrhu. Preferovanou metodou separace je gelová elektroforéza.

Při této metodě se aplikací elektrického pole separují výsledné fragmenty štěpení v podpůrném mediu na základě velikosti. Jako podpůrné medium se v obvyklém případě používají gely, jako jsou agarozové nebo akrylamidové gely. Buňky na jednom konci gelu se naplní vzorkem, který obsahuje restrikční fragmenty. Jako kontrola se na stejném gelu dělí jeden nebo více markerů velikosti, což umožní odhad velikosti restrikčních fragmentů. Tento postup obecně umožňuje stupeň rozlišení, který separuje fragmenty, které se od sebe liší například například pouze 1 nebo 2 páry bazí.

U alternativního provedení vynálezu se fragmenty denaturují a fyzicky se přenášejí z gelu na pevnou podporu, upřednostňuje se nylonová membrána, přičemž dochází ke kontaktu gelu s filtrem za přítomnosti vhodných činidel a za vhodných podmínek, které podporují transfer DNA. Taková činidla a podmínky jsou v oboru dobře známa. Tak se udržují relativní pozice fragmentů DNA dosažené způsobem separace.

Dalším krokem je detekce různých kategorií velikostí fragmentů nebo v jiném případě detekce fragmentu určité velikosti. Tento fragment se později může stát zajímavým, protože může být genetickým markerem spojeným se zvýšenou velikostí vrhu. Barvení fragmentů se přednostně provádí za použití etidymbromidu a podobně.

Jiným způsobem je použití hybridizační sondy. Takovou sondou je oligonukleotid nebo polynukleotid, který je



dostatečně komplementární nebo homologní s fragmentem, se kterým hybridizuje za vzniku komplexu sonda-fragment. Upřednostňuje se, aby sondou byla cDNA sonda. Oligonukleotid nebo polynukleotid je značen detekovatelnou látkou. To umožňuje detekci restričních fragmentů, se kterými sonda hybridizuje. Sondy se značí standardními metodami značení, jako je radioaktivní značení, značení enzymem, fluorescenční značení, značení biotinem-avidinem a podobně. Metody značení se popisují v publikacích patentech USA č. 4,711,955 podaném 8. prosince 1987, (Ward et al.,) a 4,868,103 podaném 19. září 1989 (Stavrianopoulos et al.,).

Sondy jsou v kontaktu s nylonovou membránou, která obsahuje restriční fragmenty, po dostatečnou dobu a za vhodných hybridizačních podmínek hybridizují s fragmenty. Upřednostňuje se, aby se promýváním filtru odstranily nenavázané sondy a jiné nežádoucí materiály.

Komplexy sonda-fragment, které jsou navázané na filtru, se pak detekují známými metodami. Je-li sonda například značena radioaktivně (^{32}P), při detekci se na nylonovou membránu přikládá kousek filmu, který je citlivý na radioaktivní záření. Po vhodné době expozice se zviditelní požadovaný fragment spolu s kontrolními fragmenty.

Při detekci vzniká patern, který je výsledkem separace fragmentů na základě velikosti. Srovnání těchto fragmentů s kontrolními fragmenty o známé velikosti, které se také dělily na stejném gelu, umožňuje odhadnout velikost různých skupin fragmentů. Na základě srovnání paternů z řady různých prasat připravených podobnou analýzou DNA se stanoví různé polymorfizmy u genu receptoru prasečího prolaktinu. V případě některých jednotlivých prasat se budou paterny lišit od obvyklých paternů, které vykazuje většina jiných prasat. To je způsobeno výskytem jednoho nebo více polymorfismů délky restričních fragmentů produkovaných nukleázou, která štěpí



gen receptoru prasečího prolaktinu. Polymorfismus indikuje u takových prasat různé sekvence párů bází.

Když se identifikoval určitý RFLP, to znamená restriční fragment určité délky, může se za použití známé metody zkonstruovat sonda k tomuto fragmentu. To umožňuje alternativní a rychlejší úpravy pro detekci takového polymorfismu. Jestliže se například štěpí DNA, může se použít formát sendvičové hybridizace. Takové testy se popisují v patentech USA č. 4,486,539 podáno 4. Prosince 1984 (Ranki, et al.,) a 4,563,419 podáno 7. Ledna 1986 (Ranki, et al.,). Vzorek přichází do kontaktu se sondou, která je imobilizována na pevném nosiči. Sonda se váže na fragment. Nosič se pak promyje a proběhne detekce značení sondy. Po dalším promytí se detekuje detekce sondy, čímž se demonstruje přítomnost požadovaného fragmentu.

V jiném provedení vynálezu v případě, když se stanovil RFLP patern nebo určitý polymorfni fragment, se srovnává se známým RFLP paternem nebo fragmentem, který koreluje se zvýšenou velikostí vrhu. Tento druhý patern nebo fragment se také stanovil v případě genu receptoru prasečího prolaktinu za použití stejné restriční endonukleázy jako u prvního paternu a stejné sondy nebo jejího ekvivalentu za stejných podmínek.

V jiném provedení vynálezu se mohou restriční fragmenty detekovat hybridizací v roztoku. V případě této metody se fragmenty nejdříve hybridizují se sondou a pak se separují. Separované komplexy sonda-fragment se pak detekují způsoby, které se zmiňují shora v textu. Takové komplexy se detekují na gelu, aniž se musí přenést na filtrační papír.

V jiném preferovaném provedení vynálezu se polymorfismus detekuje PCR amplifikací, aniž se použije libovolná sonda. Tento způsob je známý v oboru a popisuje se v patentech USA č. 4,795,699 s názvem „DNA Polymerase“ a v patentu USA č. 4,965,188 s názvem „Process for Amplifying, Detecting, and/or Cloning Nucleic Sequences Using a Thermostable Enzyme“.



Při tomto způsobu se musí zkonstruovat primery tak, aby se amplifikovala oblast, ve které leží polymorfismus. Co se týče primerů, které přednostně tvoří 4 až 30 bází, jsou vytvořeny na základě sekvence obklopující polymorfismus a zahrnují forward 5'primer a reverzní nebo anti-sense primer 3' polymorfismu. Není nutné, aby primery byly zcela komplementární. Přijatelné jsou také sekvence v podstatě ekvivalentní. Pak se přidá DNA polymeráza, jako je Taq polymeráza (v oboru je známa řada takových polymeráz a jsou také běžně dostupné) v přítomnosti čtyř nukleosid-trifosfátů. Reakce často zahrnuje pufrující činidlo. Detekce se provádí jednoduchým barvením separovaných produktů, jako je například barvení etidiumbromidem, aby se detekovaly předpovídané velikosti na základě velikosti amplifikované oblasti. Odborník dobře zná reakční čas, reakční činidla a sekvenci primerů. Uvedené parametry se popisují v uvedených patentech. Dále, PCR amplifikace se může použít v kombinaci s metodou polymorfismu jednořetězcové konformace (SSCP). Tento způsob se popisuje v publikaci „Detection of Polymorphism of Human DNA by Gel Electrophoresis as Single-Strand Conformation Polymorphisms, Orita et al., PNAS 86 (8) April 1989 (2766 - 70); a Lessa et al., Mol. Ecol 2 (2) p. 119-29 duben 1993 „Screening Techniques for Detecting Allelic variation in DNA Sequences“.

Ačkoli shora uvedené metody se popisují v souvislosti s použitím jednoho restrikčního enzymu a jedné sady primerů, metody však nejsou tímto omezeny. Jestliže je to nutné může se použít jeden nebo více dalších restrikčních enzymů a/nebo sond a/nebo primerů. Další enzymy, konstruované sondy a primery se mohou stanovit rutinními experimenty.

Genetické markery velikosti vrhu u prasat se stanovily následovně. Páří se samci a samice prasete stejného plemene nebo zkříženého plemene nebo odvozené od podobných genetických linií. Stanovuje se počet potomků, které produkuje každá samice prasete. Analýza RFLP rodičovské DNA se provádí způsoby



uvedenými shora v textu za účelem stanovit polymorfismus genu receptoru prolaktinu každého prasete. Polymorfismus se spojuje s počtem potomků. Pro tato stanovení se používá alespoň 20 a přednostně alespoň 40 samic prasat. Každá samice vrhne alespoň jednou. Upřednostňuje se, aby samice vrhly dvakrát a s výhodou třikrát.

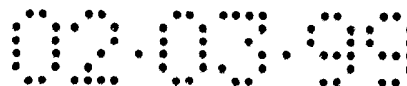
Když proběhne uvedená analýza, pomocí PCR RFLP analýzy za použití restriční endonukleázy AluI se stanoví polymorfismus a amplifikační primery se navrhnou za použití analogových známých sekvencí lidského nebo králičího prolaktinu, což umožňuje vysoká homologie v oblasti obklopující polymorfismus. Primery se mohou také navrhnout za použití dat známé sekvence genu prasečího prolaktinu, jak je uvedeno na obrázku č. 1, nebo se dokonce navrhnou na základě sekvencí získaných z dat spojení genů, který přímo obklopuje polymorfismus. Vybrala se sada primerů podle vynálezu, které amplifikují fragment tvořený 457 bázemi (forward primer 5'- CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG -3' (SEQ ID NO: 1) a reverzní primer 5'- GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA -3' (SEQ ID NO: 2)) pak se vytvoří restričně polymorfní fragmenty, které přibližně obsahují 124, 110, 79, 77 a 67 párů bází. Polymorfní místo se nachází na fragmentu o velikosti 110 párů bází. Jestliže je přítomné polymorfní místo štěpení, vytvoří se fragment o velikosti 90 párů bází. Ukázalo se, že polymorfní fragmenty jsou alely a každá má spojitost se zvýšenou velikostí vrhu u různých plemen. Tak prase, které je heterozygotní v případě fragmentu AluI, bude vykazovat patern o velikosti fragmentů 124, 110, 90, 79, 77 a 67. Homozygot v případě polymorfního místa štěpení bude vykazovat patern o velikosti fragmentů 124, 90, 79, 77, 67, zatímco jiný homozygot vykazuje patern o velikosti fragmentů 124, 110, 79, 77, 67. Genotyp spojovaný s vyšší velikostí vrhu u různých plemen alternuje. Tento závěr je podobný situaci, která se popisuje v patentu USA 5,374,523 s názvem „Allelic variants of Bovine Somatotropin gene: Genetic marker for Superior Milk



Production in Bovine", kde polymorfismus alely je gen somatotropinu a jedna forma alely je výhodou jerseyjského skotu a alternativní forma je výhodou holsteinského skotu.

Činidla vhodná pro aplikaci metod podle vynálezu mohou být obsahem konvenčního kitu. Kit obsahuje nezbytné materiály zabalené do vhodných kontejnerů. Kit obsahuje alespoň činidlo, které identifikuje polymorfismus genu receptoru prasečího prolaktinu, který se spojuje se zvýšenou velikostí vrhu. Je výhodné, aby uvedeným činidlem byla sada pro PCR (sada primerů, DNA polymeráza a č nukleosid-trifosfat), která hybridizuje s genem receptoru prasečího prolaktinu nebo její fragment. Je výhodné, aby kit zahrnoval sadu pro PCR a restriční enzym, který štěpí gen receptoru prasečího prolaktinu alespoň na jednom místě. U zvláště preferovaného provedení vynálezu je primerem sekvence označená SEQ ID NO: 1 nebo SEQ ID NO: 2 a restričním enzymem je AluI. Upřednostňuje se, aby kit dále obsahoval činidla pro detekci nebo měření detekovatelné látky nebo obsahoval kontrolu. Jestliže se to požaduje, kit může zahrnovat jiná činidla používaná při hybridizaci, prehybridizaci, extrakci DNA, vizualizaci atd.

Způsoby a materiály podle vynálezu se mohou také použít při hodnocení DNA prasat, při genetickém typování jednotlivých prasat a při detekci genetických rozdílů u prasat. Zvláště vzorek genomové DNA prasete se může hodnotit srovnáním s jednou nebo více kontrol, aby se stanovilo, zda je přítomen polymorfismus v genu receptoru prolaktinu. Upřednostňuje se, aby RFLP analýza proběhla s ohledem na gen receptoru prasečího prolaktinu a výsledky se porovnaly s kontrolou. Jako kontrola slouží výsledek analýzy RFLP genu receptoru prasečího prolaktinu různých prasat, o kterém se ví, že nese polymorfismus. Podobně se může stanovit genotyp receptoru prolaktinu u prasat tak, že se získá vzorek genomové DNA prasete a gen receptoru na DNA se podrobí RFLP analýze a výsledky se srovnají s kontrolou. Kontrolou je opět výsledek



analýzy RFLP genu receptoru prolaktinu u různých prasat. Výsledky geneticky typují prasata tím, že specifikují polymorfismus v jeho genech receptoru prolaktinu. Genetické rozdíly u prasat se mohou stanovit způsobem, který zahrnuje tento postup: získají se vzorky genomové DNA alespoň dvou prasat, určí se přítomnost nebo absence polymorfismu v genu receptoru prolaktinu a výsledky se porovnají.

Genetické markery, způsoby a kity podle vynálezu se také používají v chovných programech za účelem zlepšení velikosti vrhu v rámci plemene, linie nebo populace prasete. Pokračující selekce a chov prasnic, které jsou vzhledem k polymorfismu spojované se zvýšením velikosti vrhu alespoň heterozygotní a s výhodou homozygotní, povede ke vzniku plemene, linie nebo populace, která vykazuje vysoký počet mláďat v každém vrhu samic uvedeného plemene nebo linie. Tak lze říct, že markery jsou selekčními nástroji.

Rozumí se, že odborník je schopen aplikovat informace podle vynálezu na specifický problém nebo prostředí.

Zde přiložené obrázky ilustrují jedno provedení vynálezu a spolu s popisem slouží ke vysvětlení principů vynálezu.

Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 je zobrazena sekvence 3' konce kódující nepřekládnou oblast genu receptoru prasečího prolaktinu (SEQ ID NO: 3). Prasečí PCR fragment produkovaný pomocí králičích/lidských primerů se izoloval použitím filtrů Amicon Microcon (Amicon, Inc.). Sekvenování se provedlo v instituci Iowa State University DNA Sequencing and Synthesis Facility. Oblast popsaná italikou reprezentuje dvojznačnost v sekvenci a může být *ccaaaactac* (SEQ ID NO: 3) → prasečí PCR primery. - Králičí/lidská sekvence.

Na obrázku č. 2 je zobrazen patern polymorfizmu produktu PCR štěpený restriční enzymem AluI. Při PCR se používaly



následující primery: forward primer 5'-CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG-3'; reverzní primer 5'- GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA-3'. PCR proběhlo za následujících podmínek: teplota 93 °C po dobu 3 minut a 35 cyklů při teplotě 93 °C po dobu 30 vteřin, teplota 60 °C po dobu 1 minuty, teplota 70 °C po dobu 1 minuty a nakonec teplota 72 °C po dobu 3 minut. Naposledy, když se vzorky držely při teplotě 80 °C, se přidala Taq polymeráza. Produkty PCR se štěpily restričním enzymem AluI (New England Biolabs) a separovaly se na 6% NuSieve (FMC) agarózovém gelu při napětí 120 voltů po dobu 4 hodin a teplotě místnosti. Gely se obarvily etidumbromidem. V dráze 1 je marker velikosti, každý dílek znázorňuje 1 kb, dráhy 2 až 4 zahrnují tři rozdílné genotypy.

Obrázek č. 3 znázorňuje pozici PRLR na prasečím chromozomu 16. Spojení na více místech se provedlo za použití CriMap za účelem vytvořit mapu pohlaví. Za podstatné se považuje skóre LOD 3 nebo větší.

Obrázek č. 4 znázorňuje diagram fragmentů získaných z testu PCR za použití primerů SEQ ID NO: 1 a 2.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Na základě vysoké homologie a podobnosti při zpracování transkriptu sekvence lidské (Boutin, J., Edery, M., Shirota, M., Jolicoeur, C., Lesueur, L., Ali, S., Gould, D., Djiane, J., Kelly, P. (1989). Identification of cDNA Encoding a Long Form of Prolactin Receptor in Human Hepatoma and Brest Cancer Cells. Mol. Endocrinol.3, 1455-1461.) a králičí (Edery, M., Jolicoeur, C., Levi-Meyrueis, C., Dusanter-Fourt, I., Petridou, B., Boutin, J., Lesueur, L., Kelly., P., Djiane, J. (1989). Identification and Sequence Analysis of a Second Form of Prolactin Receptor by Molecular Cloning of Complementary DNA From Rabbit Mammary Gland. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,



2112-2116.) cDNA kódující receptor prolaktinu, se tyto sekvence budou používat pro návrh degenerovaných primerů přesahujících 3' kódující a nepřekládanou oblast. Primery umožnily amplifikovat fragment o velikosti 500 párů bazí ve vzorku prasečí genomové DNA a u lidského kontrolního vzorku. Při PCR za podmínek 93 °C po dobu 3 minut, 6 cyklů při teplotě 93 °C po dobu 30 vteřin, 47 °C po dobu 3 minut, 72 °C po dobu 3 minut, 36 cyklů při teplotě 93 °C po dobu 30 vteřin, 53 °C po dobu 2 minut, 72 °C po dobu 5 minut a nakonec 72 °C po dobu 5 minut se použily forward primer 5'- TCA CAA GGT CAA C/TAA AGA TG-3' (SEQ ID NO: 4) a reverzní primer 5'- TGG/A AGA AAG/A AGG CAA G/ATG GT-3' (SEQ ID NO: 5). Nakonec, zatímco se vzorek udržoval při teplotě 80 °C, se přidala Taq polymeráza.

Fragmenty získané ze dvou zvířat se čistily a sekvenovaly v přímém a zpětném směru. Prasečí sekvence z kódující oblasti se překládaly na aminokyseliny a porovnály se známými sekvencemi. Průzkumem databáze se zjistilo, že v králičí a lidské PRLR sekvenci jsou dvě nejlepší chybné párování s 82 % respektive s 74 % pozitivy. Na základě sekvence prasečí DNA se navrhly primery (forward primer se sekvencí 5'- CCC AAA ACA GCA GGA GAA CG- 3' (SEQ ID NO: 1) a reverzní primer se sekvencí 5'- GGC AAG TGG TTG AAA ATG GA -3' (SEQ ID NO: 2)) za účelem amplifikace fragmentu o velikosti 457 bazí (obrázek č. 1). Ke štěpení amplifikovaného produktu se použily restriční endonukleázy TaqI, Sau3a, PvuII, MspI a AluI. Použitím restriční endonukleázy AluI se zjistil polymorfismus v kódující oblasti genu. Fragmenty se rozdělily použitím elektroforézy na agarozovém gelu (obr. č. 2). Velikosti fragmentů byly přibližně 124, 110, 79, 77 a 67 párů bazí, přičemž polymorfní místo se nachází na fragmentu o velikosti 110 párů bazí. V případě, že je přítomno polymorfní štěpicí místo vzniká fragment o velikosti 90 párů bazí. Na obrázku č. 4 je možné vidět paterny fragmentů. Typovaly se geny referenčních rodin PiGMaP (Archibald, A., Haley, C., brown,



J., Couperwhite, S., McQueen, H., Nicholson, M., Coppieters, W., van de Weghe, A., Stratil, A., Wintero, a., Fredholm, M., Larsen, N., Nielsen, V., Milan, D., Woloszyn, N., Robic, A., Dalens, M., Riquet, J., Gellin, J., Caritez, J.C., Burgaud, G., Olliver, l., Bidanel, J.P., Vaiman, M., Renard, C., Gelderman, H., Davoli, R., Ruyter, D., Verstege, E., Groenen, M., Davies, W., Hoyheim, B., Keiserud, A., Andersson, L., Ellegren, H., Johansson, M., Merklund, L., Miller, J., Anderson Dear, D., Signer, E., Jeffreys, A., Moran, C., Le Tissier, P., Muladno, Rothschild, M., Tuggle, C., Vasek, 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 scofa*). Mamm. Genome 6, 157-175.), přičemž všechny dostupné rodiny jsou jako informační. Za použití software CriMap (Green, P., Falls, K., Crooks, S., (1990). Documentation for CRIMAP , version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis.) se analyzovala přítomnost dvoubodového spojení genotypů, kde je podstatné skóre LOD větší než 3. Lokus PRLR je spojen se třemi markery, které jsou mapovány na prasečím chromozomu 16 publikované mapy spojení PiGMAP. Aby se zhotovila co nejlepší mapa chromozomu 16 (obrázek č. 3) zahrnující všechny připojené markery, provedla se také vícebodová analýza.

Příklad 2: Test PCR genetického markeru receptoru prolaktinu.

PCR amplifikační test se optimalizoval následujícími parametry.

Primery:

Forward primer: 5'- CCCAAAACAGCAGGAGAACG-3' (SEQ ID NO: 1)

Reverzní primer: 5'- GGCAAGTGGTTGAAAATGGA-3' (SEQ ID NO: 2)

Podmínky PCR:

Reakční směs 25 µl objem reakce

10x PCR pufr (Promega) 2,5 µl



25 mM MgCl ₂ (Promega)	2,0 μl
10 mM dNTP (Boehringer Mannheim)	0,5 μl
20 pmol/μl forward primeru	0,5 μl
20 pmol/μl reverzního primeru	0,5 μl
dd sterilní voda	17,5 μl
12,5 ng/μl DNA	1,5 μl
Taq polymeráza	0,125 μl

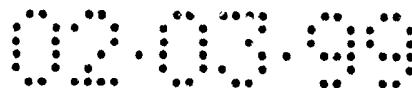
Smíchá se prvních šest činidel a do každé zkumavky se přidá 18,5 μl této směsi. Pak se přidá DNA a směs se zalije kapkou sterilního minerálního oleje. Zkumavky se umístí termálního cykleru a udržují se při teplotě 80°C. Taq polymeráza se smíchá se zbývající reakční směsí a do každé zkumavky se přidá 5 μl, přičemž se špička pipety musí ponořit pod vrstvu oleje..

Program termálního cykleru:

1. teplota 93 °C po dobu 3 minut
2. teplota 93 °C po dobu 30 vteřin
3. teplota 60 °C po dobu 1 minuty
4. teplota 72 °C po dobu 1 minuty
5. zpět na krok 2 opakuje se po 34 cyklů
6. teplota 72 °C po dobu 3 minut
7. udržuje se teplota 4°C

Za účelem kontroly produktu PCR 5 μl produktu PCR a 2 μl 6x koncentrovaného barviva nanese na 1 % agarozový gel. Elektroforéza proběhne za podmínek 120 V a po dobu 30 minut a gel se obarví etidiumbromidem.

Štěpení restrikční endonukleázou AluI:



Štěpící směs (na 20 μ l produktu PCR)	každý
10x NE pufr 2 (New England Biolabs)	2,5 μ l
8 U/ μ l AluI μ l (New England Biolabs)	0,5 μ l
dd sterilní voda	2,0 μ l

Činidla se smíchají a do každé zkumavky se přidá 5 μ l. Vzorky se inkubují přes noc při teplotě 37 °C.

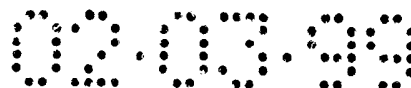
Gelová elektroforéza:

Fragmenty se separovaly na 6 % agarozovém gelu, kam se nanese štěpený produkt a 5 μ l 6x koncentrovaného barviva NuSeive (FMC). Elektroforéza proběhla při napětí 120 voltů po dobu 3 hodin při teplotě místnosti. Velikosti fragmentů PCR-RFLP jsou přibližně 124, 110, 79, 77 a 67, přičemž polymorfní místo se nachází na fragmentu o velikosti 110 párů bází. V případě, že je přítomné polymorfní štěpící místo vzniká fragment o velikosti 90 párů bází. Heterozygot bude mít pruhy o velikosti 124, 110, 90, 79, 77 a 67. Zatímco homozygoty budou vykazovat pruhy o velikosti 124, 90, 79, 77 a 67 respektive 124, 110, 79 a 67.

Obrázek č. 4 je diagram fragmentů získaný z testu PCR (A je alela bez restrikčního místa AluI, B je alela s restrikčním místem AluI).

Příklad 3: Spojitost genotypu s velikostí vrhu.

Test PCR se provedl, jak se detailně popisuje v příkladu 2, na několika prasnicích získaných z Pig Improvement Company, (PIC). Použitá zvířata byla prasnice PIC linie 19, která vrhla mláďata v časovém období šesti měsíců a prasnice, které se narodily během této doby se použily na chov. Posbíraly se krevní nebo tkáňové vzorky a zaslaly se do laboratoře, kde se



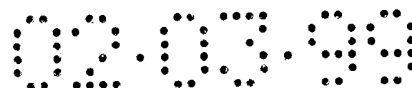
extrahovala DNA a použila se v testu PRLP PCR. Pro analýzu se použily jeden až tři záznamy samic. Odhadovaná hodnota množení pro celkový počet narozených (BV TNB) se odhadl za použití smíšeného lineárního modelu, kde následná parita prasnice je považován za opakovaný záznam. Použily se pouze první tři parity prasnice. Model parity zahrnuje ko-variace věku, při kterém dochází k vrhu, fixní účinky parity, typ ošetřování (přirozený nebo AI), měsíc vrhu a náhodné permanentní účinky prostředí a účinky zvířat. Současná hodnota h^2 je 0,10 a hodnota opakovatelnosti je 0,21. Průměrný počet narozených mláďat (AV NB) se vypočítal tak, že se vzal pro každou prasnici aritmetický průměr všech parit (1 až 3). Srovnání genotypů se udělalo v případě (BV TNB) a (AV NB) tak, že se udělal průměr hodnot BV TNB a AV NB u každého genotypu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Průměrné hodnoty u vzorku zvířat L19 s genotypem PRLR

Genotyp BB		
(n=18)	BV TNB	AV NB
průměr	0,2036	10,32
Standarní odchylka	0,3984	1,746193
Standardní chyba	0,0939	0,411838

Genotyp AB		
(n=75)	BV TNB	AV NB
Průměr AB	0,1203	9,66
Standarní odchylka AB	0,5317	2,77238
Standardní chyba AB	0,0622	0,320136

Genotyp AA		
(n=109)	BV TNB	AV NB



Průměr AA	0,0755	9,75
Standarní odchylka AA	0,5757	2,513279
Standardní chyba AA	0,0551	0,243064

Příklad 4: Shrnutí analýz receptoru prolaktinu u Velké bílé linie, „Meishan“ syntetické linie a „Landrace“ linie.

Do analýzy velikosti vrhu se zahrnuje všech 2 714 záznamů vrhu od 1 077 prasnic. Vlastnosti zahrnují celkový počet narozených mláďat a počet živě narozených mláďat (NBA) z pěti různých linií PIC. Mezi pět testovaných linií patří „Large White“ (dva různé původy) a „Landrace“ linie, stejně jako syntetické linie zahrnující 3/4 „Duroc“, 1/4 „Large White“ a „Large White/Meishan“ Ukázalo se, že genotyp PRLR vysvětluje statisticky podstatné variace velikosti vrhu u třech testovaných linií. Dvě z linií nevykazují žádný statisticky podstatný účinek ($P > 0,1$, výsledky nejsou uvedeny). V tabulce č. 2 jsou shrnuty střední hodnoty nejmenších čtverců TNB a NBA pro každou ze tří statisticky podstatných linií.

DNA se extrahovala z krve nebo z tkáně ocasu. DNA se podrobila analýze, jak se popisuje shora v textu v příkladu 2.

Modely zahrnovaly stejné vlivy: sezónu chovu, typ ošetření, receptor prolaktinu, parita (1, 2, 3+) a ESR (receptor estrogenu) a náhodné účinky: chovný samec.

Testovala se také podstatnost interakce mezi chovem, ESR a receptorem prolaktinu. Dědičnost v případě rysů vrhu se odhaduje jako 0,10 a opakovatelnost jako 0,21. Účinky substituce alely se odhadly substituováním genotypu PRLR heterozygota, který zahrnuje počet přítomných alel A (0,1 nebo 2). Dominantní účinky se odhadly jako odchylky průměru heterozygota z průměrného homozygotního genotypu.

Hlavní závěry:



- linie „Large White synthetic“
 - Indikace dominantního účinku.
Vzorek obsahoval 400 prasnic s 1 197 záznamů vrhu. Zvířata typu AA vykazují hodnotu Počet živě narozených mláďat (NBA) o 0,66 selete/vrh vyšší než u dvou dalších genotypů ($p < 0,05$). Existují indikace dominantního účinku alely B.

- Linie „Meishan Synthetic“
 - Podstatný dominantní účinek (nadměrná dominance) u všech parit, ale hlavně u první parity.
Vzorek zahrnuje 261 prasnic s 832 záznamy vrhu. U této linie existuje důkaz aditivního účinku v případě hodnot TNB ($P < 0,05$) a NBA ($P < 0,05$) a účinek nadměrné dominance v případě NBA ($< 0,01$).

- Linie „Landrace Synthetic“
 - Indikace aditivního účinku.
Vzorek zahrnuje 416 prasnic s 685 záznamy vrhu. V případě TNB ($P < 0,08$) a NBA ($P < 0,1$) se detekoval mezi dvěma homozygotními genotypy rozdíl ve vrhu mláďat větší než jedno prase na vrh, přičemž favoritní je alela A.

Účinky na TNB vykazují pro každou populaci stejné trendy jako NBA. Výsledky uvedené v tabulce č. 2 indikují, že u tří běžně dostupných linií, měřeno TNB a NBA, má PRLR podstatný účinek na velikost vrhu. Je zřejmé, že genetické vybavení každé rozdílné linie je součástí způsobu a velikosti jakou je rys ovlivněn. U libovolné z testovaných linií nebyly nalezeny žádné podstatné rozdíly v hodnotě průměrné váhy mláďat po narození. V normálním případě existuje inverzní vztah mezi velikostí vrhu a průměrnou váhou při narození. Alela receptoru prolaktinu může proto poskytnout způsob zvýšení váhy při narození větších vrhů.



Tabulka č. 2: Střední hodnoty nejmenších čtverců u každého genotypu PRLR u všech parit v případě TNB, NBA a průměrné váhy při narození (ABW) u všech tří běžných linií prasat.

Běžná linie	Genotyp PRLR	TNB	NBA
„Large White Synthetic“	AA	12,51	12,39
	AB	12,35	11,73
	BB	12,71	11,73
účinky	a	0,10	P<0,05 - 0,33 ^b
	d	- 0,26	- 0,33 ^a
„Meisham Synthetic“	AA	13,64	12,94
	AB	14,35	13,74
	BB	13,96	13,27
účinky	a	P<0,05 0,16 ^b	P<0,05 0,16 ^b
	d	0,55 ^b	0,63 ^c
„Landrace Synthetic“	AA	12,13	11,33
	AB	11,72	10,92
	BB	10,98	10,31
účinky	a	P<0,08 0,51 ^b	P<0,10 0,47 ^b
	d	0,17	0,10

a = aditivní účinek; d = dominantní účinek; účinky jsou podstatné při ^aP < 0,1, ^bP < 0,05, ^cP < 0,01.

Příklad 5: Odlišnosti mezi různými chovy.

Typovaly se vzorky ze sedmi chovů, mezi něž se zahrnuly americké chovy Chester White, Duroc, Hampshire, Landrace a Yorkshire; the Chinese Meishan; a European Large White (Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3

Chov	Frekvence genotypu			Frekvence alel	
	AA	AB	BB	A	B
Landrace n = 9	0,56	0,33	0,11	0,72	0,28
Duroc n = 10	0,5	0,5	0	0,79	0,21

Yorkshire n = 12	0	0,75	0,25	0,37	0,63
Chester White n = 10	0,1	0,3	0,6	0,25	0,75
Hampshire n = 11	0	0,09	0,91	0,05	0,95
Meishan n = 9	0,33	0,44	0,22	0,56	0,44
Large White n = 11	0,09	0,46	0,45	0,32	0,68

U některých plemen existují rozdíly ve frekvencích genu PRLR. Zajímavá je existence polymorfizmu, která se nachází v 3' oblasti genu, protože je možné pozorovat v této oblasti genu alternativní sestřih PRLR u jiných druhů. Rozdíly frekvence alel mezi chovy naznačuje, že jedna alela může být v některých populacích na rozdíl od jiných selektována.

Citace:

Jammes, H., Schirar, A., Djiane, J. (1995) Differential Patterns in Luteal Prolactin and LH Receptors During Pregnancy in Sows and Ewes. *J. Reprod. Fertil.* 73, 27-35.

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

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.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob testování prasat k určení těch, která s větší pravděpodobností vykazují větší vrhy, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se z prasete získá vzorek genetického materiálu; a v uvedeném vzorku se testuje přítomnost polymorfizmu v genu receptoru prolaktinu, který je spojován se zvýšenou velikostí vrhu.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený testování se vybralo ze skupiny, která zahrnuje analýzu polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), heteroduplexovou analýzu, polymorfismus konformace jednořetězcové DNA (SSCP), gelová elektroforéza s denaturačním gradientem (DGGE) a gelová elektroforéza s teplotním gradientem (TGGE).

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e test přítomnosti uvedeného polymorfismu zahrnuje štěpení uvedeného genetického materiálu restrikčním enzymem, který štěpí gen receptoru prasečího prolaktinu alespoň v jednom místě; separaci fragmentů získaných uvedeným štěpením; detekci restrikčního paternu, který tvoří uvedené fragmenty; a srovnání uvedeného paternu s druhým restrikčním paternem genu receptoru prasečího prolaktinu získaného použitím uvedeného restrikčního enzymu, přičemž uvedený druhý restrikční patern je spojován se zvýšenou velikostí vrhu.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený restrikční enzym je AluI.



5. Způsob podle nároku 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená separace se
provádí gelovou elektroforézou.

6. Způsob podle nároku 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e srovnání uvedených
restrikčních paternů zahrnuje identifikaci velikosti
specifických fragmentů a porovnání velikostí uvedených
fragmentů.

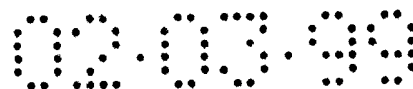
7. Způsob podle nároku 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e před uvedeným štěpením
se amplifikuje množství genu receptoru prasečího prolaktinu
nebo jeho část, která obsahuje uvedený polymorfismus.

8. Způsob podle nároku 3,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený polymorfismus
je polymorfní restrikční místo AluI.

9. Způsob podle nároku 8,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené restrikční
místo se nachází ve 3'kódující oblasti genu receptoru
prasečího prolaktinu.

10. Způsob podle nároku 7,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e amplifikace zahrnuje
selekcí sekvence přímého a zpětného primeru schopného
amplifikovat oblast genu receptoru prasečího prolaktinu, který
obsahuje polymorfní místo AluI.

11. Způsob podle nároku 10,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený přímý a zpětný
primer je vybrán ze a založen na sekvenci SEQ ID NO: 3.



12. Způsob podle nároku 10,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené primery jsou
sekvence SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 5.

13. Způsob podle nároku 12,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený přímý primer
se vybral ze skupiny zahrnující sekvence SEQ ID NO: 1 a SEQ ID
NO: 4 a uvedený zpětný primer je vybrán ze skupiny zahrnující
sekvence SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 5.

14. Způsob podle nároku 12,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená sada primerů
zahrnuje SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 2.

15. Způsob podle nároku 6,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e detekce různých
velikostí uvedených fragmentů zahrnuje separaci uvedených
fragmentů na základě velikosti za použití gelové elektroforézy
v přítomnosti kontrolního fragmentu DNA, jehož velikost je
známa; kontakt uvedených separovaných fragmentů se sondou,
která hybridizuje s uvedenými fragmenty za vzniku komplexů
sonda-fragment; a stanovení velikosti separovaných fragmentů
detekcí přítomnosti komplexů fragment-sonda a stanovení jejich
relativní polohy vzhledem k uvedenému kontrolnímu fragmentu
DNA.

16. Způsob podle nároku 15,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený restriční
enzym je AluI a uvedený RFLP se extrahoval ze skupiny
zahrnující fragment s 110 páry bazí a fragment s 90 páry bazí.

17. Způsob identifikace genetického markeru velikosti vrhu
u prasat, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje
množení samců a samic prasat stejného plemene nebo kříženého

plemene nebo odvozených od podobných genetických linií;
stanovení počtu mláďat produkovaných každou samicí prasete;
stanovení polymorfizmu v genu receptoru prolaktinu u každé
samice prasete; a stanovení spojitosti počtu mláďat
produkovaných každou samicí prasete s uvedeným polymorfismem,
příčemž se identifikuje polymorfismus velikosti vrhu prasete.

18. Způsob podle nároku 17,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále zahrnuje výběr
prasat pro chov, u kterých se předpovídá na základě uvedeného
markeru zvýšená velikost vrhu.

19. Způsob podle nároku 17,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená analýza
zahrnuje štěpení PCR amplifikované DNA restrikčním enzymem
AluI.

20. Způsob podle nároku 14,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený polymorfismus
spojovaný se zvýšenou velikostí vrhu se detekoval použitím
prvního a druhého primeru, které obsahují alespoň 4
konsekutivní báze v sekvencích SEQ ID NO: 1 a 2.

21. Sada pro hodnocení vzorku prasečí DNA,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e v kontejneru obsahuje
činidlo, které identifikuje polymorfismus v genu receptoru
prasečího prolaktinu.

22. Sada podle nároku 21,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedené činidlo je
primer, který amplifikuje gen receptoru prasečího prolaktinu
nebo jeho fragment.



23. Sada podle nároku 24,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dále obsahuje DNA
polymerázu, restriční enzym, který štěpí gen receptoru
prasečího prolaktinu alespoň v jednom místě; a první a druhý
primer schopný amplifikovat oblast genu receptoru prasečího
prolaktinu, který obsahuje polymorfní místo.

24. Primer pro testování přítomnosti polymorfního místa
AluI v genu receptoru prasečího prolaktinu,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený primer
obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 1,
SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 5.

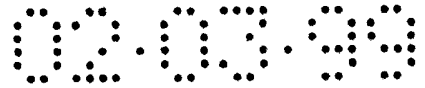
25. Genetický marker spojovaný se zvýšenou velikostí vrhu
u prasat, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje
polymorfismus v genu receptoru prasečího prolaktinu.

26. Genetický marker podle nároku 25,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený polymorfismus
je restriční místo AluI.

27. Marker podle nároku 25,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedený polymorfismus
se nachází ve 3'překládané a nepřekládané oblasti genu
receptoru prasečího prolaktinu.

28. Sekvence DNA ze 3'překládané a nepřekládané oblasti
genu receptoru prasečího prolaktinu, přičemž uvedená sekvence
zahrnuje SEQ ID NO: 3.

29. Primer navržený pro amplifikaci polymorfního
restričního místa AluI v genu receptoru prasečího prolaktinu,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e jej tvoří nepřetržitá



řada čtyř nebo více bází, které pocházejí ze sekvence SEQ ID NO: 3.

30. Primer navržený pro amplifikaci polymorfního restrikčního místa AluI v genu receptoru prasečího prolaktinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e je reverzním primerem generovaným ze sekvence SEQ ID NO: 3.

31. Způsob testování prasat ke stanovení těch, které s větší a/nebo s menší pravděpodobností produkují větší vrhy, Primer navržený pro amplifikaci polymorfního restrikčního místa AluI v genu receptoru prasečího prolaktinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje stanovení alel receptoru prolaktinu přítomných u prasete; stanovení alel jiných markerů genů známých tím, že ovlivňují velikost vrhu; a selekci zvířat s příznivými kombinacemi alel před zvířaty, které nesou nepříznivé kombinace.

32. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e druhý gen, který určuje velikost vrhu je ESR.

33. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e určení alel receptoru prolaktinu zahrnuje stanovení přítomnosti alespoň jedné alely spojení s alespoň jedním markrem DNA, který je spojený přímo nebo nepřímo s receptorem prolaktinu.

34. Způsob podle nároku 31, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e DNA marker je mikrosatelit.

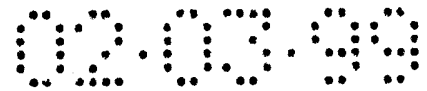


35. Způsob podle nároku 31,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e DNA marker je SW1305,
S0077, S0006, SW2411, SW1035 a S0111.

36. Způsob podle nároku 31,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e DNA marker je receptor
růstového hormonu (GHR).

37. Způsob podle nároku 1,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e existuje spojitost
mezi uvedeným markerem a hmotností narozených mláďat u větších
vrhů.

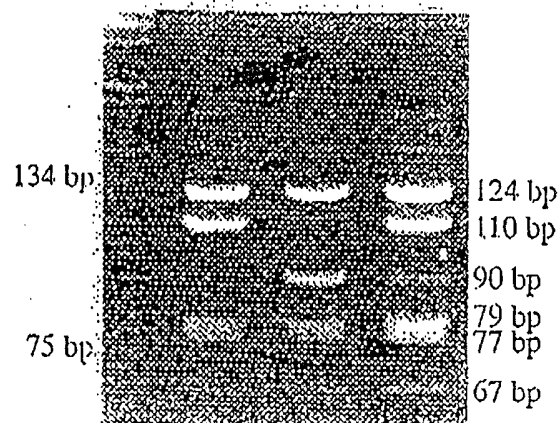
38. Způsob testování prasat ke stanovení těch, které
s větší pravděpodobností produkují větší vrhy,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje získání
genetického materiálu z prasete; a testování přítomnosti
polymorfismu v genu receptoru prolaktinu v uvedeném vzorku,
který je spojován s udržováním hmotnosti narozených mláďat u
větších vrhů.



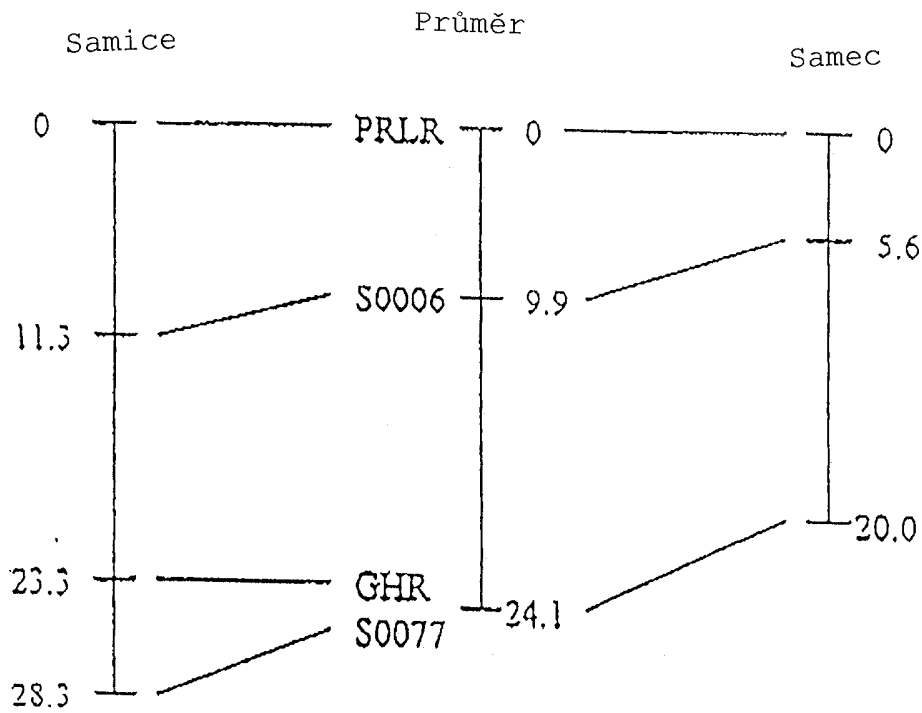
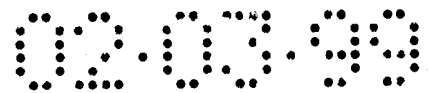
AAGTCAACAA AGATGGAGCA CTGGCGTTGC TCCCAAAACA GCAGGAGAAC
 GCGGACCGGC CGGAGAAGGC TGGCGCCCCT GAAACCAGCA AGGAATACG
 CCCAGGTGTC CCGGGTGATG GATAACCACA TCCTGGTGTT AGTGCAGGAT
 CCGCGAGCTC GAAACGTGGC TCCGTTTGAA GAACCAACCA AGGAGACCCC
 GCCATCCCGG CCGCAGAATC CAGCTGCGAA AGACCTGGCC G/AGCTTCACCA
 CGGCCCCGGG CCACTGCAGA CACCCGCTGG GTGGGCTGGA TTACCTCGAT
 CCCGCAGGCT TTATGCACTC CTTTCAGTGA GAGCTTGGTT CATGGGATGA
 TGGGTTACAA GGTGGGGTTT TTTTCAGGTC GCACTACGTG AAATGCACTC
 TACCAGAGAA AGCTCGAAAA TGGGGTTAGA ATGACACTAC CCAGACTCAC
 AGTTCACTCC TTTTCAGGCT CCAATTTCAA CCACTTGCCTCTT

G/A = G nebo A v polymorfním místě

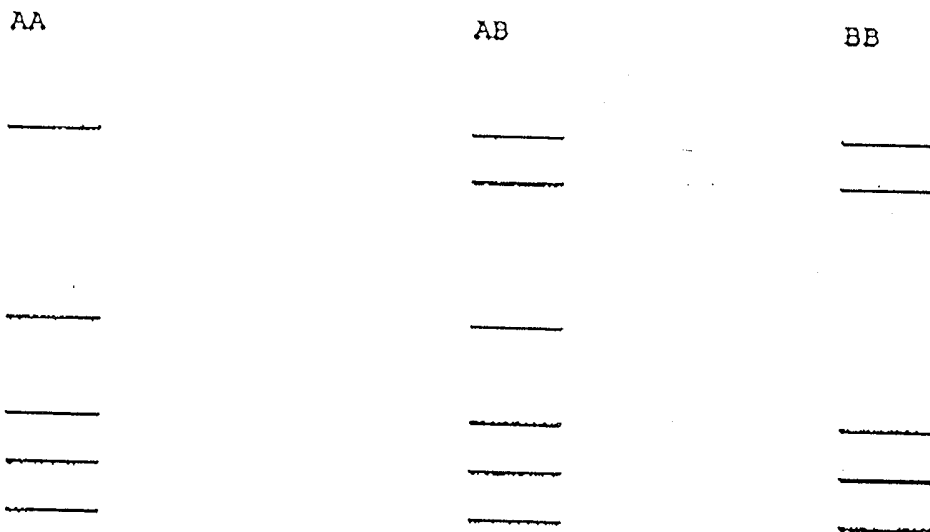
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4