

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4607

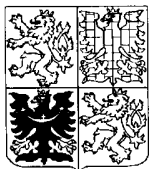
(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 Q 1/68

C 07 K 14/47

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.05.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.05.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/047181**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/10318**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/53102**

(71) Přihlašovatel:

BIOTECHNOLOGY RESEARCH AND
DEVELOPMENT CORPORATION, Peoria, IL, US;
U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE,
Washington, DC, US;
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH, Zurich, CH;

(72) Původce:

Bosworth Brad T., Nevada, IA, US;
Vogeli Peter, Buelad, CH;

(74) Zástupce:

Zelený Pavel JUDr., Hájkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsoby a kompozice pro identifikaci prasat
geneticky resistentních na onemocnění způsobená
F18 E. coli**

(57) Anotace:

Odlišení prasat geneticky senzitivních na onemocnění způsobená infekcí F18 E. coli od resistentních prasat pomocí určení DNA polymorfismů v prasečím genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 (FUT1) použitím polypeptidu a aminokyselinovými substitucemi kodovanými uvedenými polymorfismy, molekulárních diagnostických testů a kitů pro odlišení prasat resistentních, heterozygotních (nosičů) a sensitevních na adhesi F18 E.coli. Molekulární test identifikuje sensitivitu k edematosnímu onemocnění prasat a průjemovým onemocněním po odstavení s vysokou sensitivitou a specificitou. Použití polymorfismu prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasy pro vývoj léků pro léčbu prasat postižených onemocněním, způsobeným E. coli.

Způsoby a kompozice pro identifikaci prasat geneticky resistantních na onemocnění způsobená F18 E. coli

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká prostředků a neinvazivních způsobů pro identifikaci prasat geneticky resistantních na onemocnění E. coli, konkrétně resistantních na střevní onemocnění způsobená kmenem E. coli vybaveným fimbriemi F18. Byly identifikovány polymorfismy v genu pro prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu (FUT1), které odlišují resistantní prasata od prasat citlivých na onemocnění a které poskytují diagnostický test užitečný pro chovatele prasat.

Dosavadní stav techniky

Hlavním problémem chovu prasat jsou onemocnění prasat. Významným problémem jsou střevní onemocnění prasat po odstavení. Omezený počet serotypů toxigenních kmenů Escherichia (E.) coli je příčinou edematosního onemocnění a průjmu po odstavení u prasat, kde tato onemocnění způsobují značné ekonomické ztráty prasečích farem v celém světě, zejména mezi selaty stáří 4 až 12 týdnů. Typickými klinickými příznaky edematosního onemocnění jsou neurologické příznaky jako je ataxie, křeče a paralýza. Při pitvě je edem obvykle přítomen na charakteristických místech, jako jsou oční víčka a čelo, stěna žaludku a mesokolon. Onemocnění je způsobeno variantou Shiga-like toxinu II a enterotoxiny LT, STa, STb, v příslušném pořadí, které jsou produkovány E. coli, která kolonizuje povrch tenkého střeva bez toho, že by způsobovala morfologické změny enterocytů (střevních buněk). Některé typy bakteriálních kmenů E. coli, F18, F4 a K88, jsou hlavními příčinami takových onemocnění. Edematosní choroba prasat je

enterotoxemie charakterizovaná generalizovaným poškozením cév. Toto poškození cév je způsobeno toxinem, variantou Shiga-like toxinu II, který je produkován některými kmeny *E. coli* (Bertschinger et al., 1993). *E. coli* se dělí podle typů řasinek, skupiny adhesivních fimbrií, a fimbrie kmenů související s tímto onemocněním jsou označeny například K88 nebo F18 (Vogeli et al., 1997).

Ne všechna prasata podléhají infekcím *E. coli*. Kolonizace závisí na adherenci bakterií na enterocyty, která je zprostředkována bakteriálními fimbriemi označenými například F18 nebo K88. Bylo prokázáno, že citlivost k adhesi, t.j. exprese receptorů u prasete vhodných pro vazbu fimbrií, je geneticky kontrolována hostitelem a je děděna jako dominantní rys, kdy v případě F18 je B alela způsobující citlivost na adhesi a b je alela způsobující resistenci (Vogeli et al., 1996; Meijerink et al., 1996). Genetický lokus pro tento receptor pro F18 *E. coli* (ECF18R) byl mapován na prasečí chromosom 6 (SSC6), na základě jeho těsné genetické vazby na S lokus a na další lokusy halothanové (HAL) vazebné skupiny na chromosomu 6. Receptor pro K88 *E. coli* je na chromosomu 13.

Zdá se, že mechanismus resistance spočívá v tom, že střevo resistantních zvířat není kolonizováno *E. coli*, t.j. bakterie neadhерují na stěnu střeva resistantních prasat. Bylo prokázáno, že glykoproteinové receptory kartáčového lemu střeva jsou odpovědné za rozdíly mezi adhesivními a neadhesivními fenotypy pro určité *E. coli* a proto že genotyp prasat určuje resistenci. Také byly studovány bakterie nesoucí fimbrie (WO 9413811).

Současné způsoby pro identifikaci prasat, která jsou resistantní na onemocnění způsobená F18 *E. coli* jsou: (1) odběr vzorků střeva od prasat při porážce a provedení mikroskopického

testu adheze; (2) infekce zvířat virulentní *E. coli* ("kolonizační test"); nebo (3) provedení typizace A-O(S) systému krevních skupin. První dvě metody nejsou praktické pro identifikaci chovných resistantních zvířat. Ačkoliv stanovení krevní skupiny identifikuje resistantní zvířata, není možno tímto testem určit, zda jsou zvířata citlivá na onemocnění homozygotní nebo heterozygotní pro citlivost. Znalost genotypu zvířat s ohledem na tyto alely (stav genu) je zásadní pro vývoj úspěšného chovného programu. Účelem tohoto chovného programu je produkce prasat, která jsou resistantní na onemocnění způsobená F18 *E. coli*, která decimuje chov po odstavení.

V jedné publikaci autoři uvádějí, s ohledem na edematosní onemocnění prasat, že "probíhá výzkum vhodných genetických markerů... (Bertschinger et al., 1993, str. 87) a citují Walterse a Sellwooda, 1982:

"Křížení resistantních prasat je atraktivní metodou pro prevenci onemocnění, pro která neexistuje účinná profylaxe. Proveditelnost tohoto přístupu závisí na prevalenci genu kodujícího resistenci v populaci prasat, lepších metodách pro detekci resistantních prasat a na absenci negativních genetických rysů selektovaných současně s touto resistencí."

Genetický "markerový" lokus je kodující nebo nekodující lokus, který je v blízkosti vybraného lokusu, ale nemusí to nutně být lokus sám. Detekovatelné fenotypy zahrnují kontinuální nebo diskontinuální rysy, například polymorfismus délky restričních fragmentů, produkci, bakteriální adhezi, kolorimetrické a enzymatické reakce a resistenci na antibiotika. S lokus kontroluje expresi antigenů A a O krevních skupin. Prasata homozygotně recesivní v S lokusu neexprimují A ani O antigeny krevních skupin. Podobná situace existuje u lidí a je způsobena

mutacemi genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu, která koduje lidskou krevní skupinu H (Kelly et al., 1994; viz také WO 9628967). Nedávno byl sekvencován gen pro prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu (Cohney et al., 1996). Tento gen je s velkou pravděpodobností přítomen v S lokusu u prasat.

Krevní skupiny H a Se byly mapovány geneticky a fyzikálně na lidský chromosom 19q13.3. Tento region je evolučně konzervován a obsahuje geny homologní k HAL skupině genů u prasat. Gen kodující krevní skupinu H se také nazývá FUT1, zatímco Se gen se také nazývá FUT2 gen. FUT1 určuje expresi H antigenu v erytroidní buněčné linii, zatímco FUT2 reguluje expresi H antigenu v sekrečním epitelu a slinách. Konzervace FUT1 genu byla prokázána u nižších savců, jako jsou krysy a králíci a exprese mRNA byla prokázána v králičí mozkové tkáni a krysím tlustém střevu. U všech těchto druhů byly popsány dva druhy genů pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu, které jsou strukturálně velmi podobné lidským FUT1 a FUT2 genům, ale zejména u genů homologních s FUT1 byla prokázán velmi specifický charakter exprese. U lidí je FUT1 gen odpovědný za syntézu H antigenů v prekursorech erytrocytů. Nicméně, u prasat se erytrocyty pasivně adsorbují na H-podobné antigeny ze séra, podobně jako tomu je u lidských Lewis antigenů. U prasat všechny H antigeny souvisejí s exokrině sekreční tkání a exprese FUT2 (sekrečního) genu je pozorována v sekrečních tkáních jiných živočišných druhů. Proto může být exprese determinant A-O krevních skupin prasat, které zkříženě reagují s protilátkami proti lidským krevním skupinám H a A, ovlivněna FUT2 genem.

Další informace o krevních skupinách a onemocnění prasat způsobených E. coli zahrnují to, že uhlovodanová struktura antigenů krevních skupin zprostředkuje adhesi některých patogenních mikroorganismů na tkáň hostitele, například *Helicobacter pylori* adheruje na antigeny Lewis^x krevní skupiny a

E. coli způsobující infekce močových cest adheruje na substance krevní skupiny P. Geny kodující glykosyltransferasy, které jsou odpovědné za tvorbu specifických uhlovoanových struktur krevních skupin, proto představují kandidáty pro kontrolu bakteriální kolonizace hostitelem. Lokalizace těchto genů je ve stejném chromosomálním regionu jako lokus odpovědný za adhesi/non-adhesi F18 pozitivních *E. coli* v tenkém střevu prasat. Prasata neexprimují antigeny krevních skupin A a O do odstavení, což je stejná doba, kdy se stanou citlivými na onemocnění způsobená F18 *E. coli*.

Existuje potřeba nových diagnostických testů a terapie pro onemocnění prasat způsobená *E. coli*. Pro některá onemocnění prasat byla navržena detekce genetických mutací jako diagnostický test (maligní hypotermie) (Fujii et al., 1991; U.S. patent č. 5358649), ale pro diagnostiku nebyly popsány polymorfní markery. Byly popsány vakciny pro vývoj resistance na kolonizaci *E. coli* (U.S. patent č. 5552144; WO 8604604), ale není pravděpodobné, že by byly výhodným způsobem pro prevenci onemocnění způsobených *E. coli*, vzhledem k obtížnosti podávání orální živé vakciny novorozeným selatům a z důvodu regulačních omezení. Existují účinná antibiotika pro léčbu, ale nejsou úspěšnou profylaxí.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález obsahuje prostředky a neinvazivní způsoby pro detekci a eliminaci prasat, která jsou citlivá na onemocnění způsobená *E. coli*. Neinvazivní způsob pro identifikaci prasat resistantních na střevní kolonizaci *E. coli* F18 obsahuje následující kroky: určení toho, zda je v biologickém vzorku od prasete přítomen genetický polymorfismus spojený s resistencí na kolonizaci; a vyvození toho, že prase je resistantní, pokud je prase homozygotní pro polymorfismus. (Polymorfismus je změna v

nukleotidové sekvenci způsobená mutací, která existuje v populaci).

Přesněji, způsob je určení toho, zda je v biologickém vzorku získaném od prasete v genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu base v pozici 307 adenin nebo guanin; a identifikace prasete jako resistantního, pokud je bazí v pozici 307 adenin.

Pro stanovení toho, zda je v biologickém vzorku přítomen polymorfismus, je analyzována délka restrikčních fragmentů na gelu, který je separuje podle jejich molekulové hmotnosti. Restrikční enzymy jsou endonukleasy, které reprodukovatelně štěpí molekuly nukleové kyseliny ve specifických místech, což vede ke vzniku fragmentů nukleové kyseliny rozdílných molekulových hmotností, podle lokalizace míst štěpení.

Vynález se také týká křížení prasat tak, aby byly resistantní na onemocnění způsobená *E. coli*, za použití selekce takových prasat pro chov, která mají genetický polymorfismus v genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1, který určuje, že jsou resistantní na onemocnění způsobená *E. coli*, a potom křížením takových prasat.

Jedním aspektem vynálezu je molekula DNA, která je polymorfní pro gen pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 u prasat, která má sekvenci uvedenou na obr. 1. Dalšími aspekty vynálezu jsou molekuly se sekvencí nukleotidů komplementární k sekvenci podle obr. 1.

Jiným aspektem vynálezu je izolovaná molekula DNA se substitucí adeninu za guanin v pozici 307. Tato molekula může také obsahovat substituci adeninu za guanin v pozici 857. Jiné izolované molekuly DNA podle předkládaného vynálezu jsou ty molekuly, které obsahují mutaci v nukleotidu 229 sekvence podle

obr. 1, kde je kodon CTT změněn na TTT, takže místo aminokyseliny leucinu koduje fenylalanin. Mutace v nukleotidu 714 je z GAT na GAC, ale při této změně nedochází ke změně kodované aminokyseliny.

Polypeptidy kodované DNA molekulami podle předkládaného vynálezu a mající $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasovou aktivitu jsou také aspektem předkládaného vynálezu.

Molekulární test pro detekci receptorů pro F18 E. coli u prasat spočívá v: (a) izolaci DNA z jaderných buněk prasete; (b) amplifikaci DNA v polymerasové řetězové reakci (PCR) za použití oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární k DNA sekvenci genu pro prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu; (c) provedení trávení restrikními enzymy za použití alespoň jednoho restrikního enzymu, například CfoI; (d) separaci výsledných fragmentů gelovou elektroforesou; a (e) určení příslušného počtu a délky fragmentů na gelu; a (f) stanovení toho, které receptory jsou přítomné na prasečích buňkách, podle počtu a délky fragmentů F18. Použití zde popsaných větších amplifikovaných fragmentů pro analýzu polymorfismu délky restrikních fragmentů (RFLP) - oproti použití menších fragmentů - je méně nákladné, protože DNA proužky mohou být analyzovány na agarosových gelech v relativně menších koncentracích. Také je pro produkci některých fragmentů potřebný pouze jeden restrikní enzym pro konstantní restrikní místo sousedící s variabilním diagnostickým místem.

Dalším předmětem vynálezu je kit pro detekci polymorfismu spojeného s F18 receptory E. coli obsahující oligonukleotidy v oddělených kontainerech, které jsou komplementární k DNA sekvenci genu pro prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 a které odlišují resistantní prasata od citlivých prasat. Test může být proveden na prasatech jakéhokoliv věku.

Polymorfismy jsou také užitečné pro vývoj léků pro léčbu prasat trpících onemocněním způsobeným *E. coli*. Mutovaná forma prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasy může interferovat s normálním enzymem, což může bránit produkci střevního receptoru pro F18.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1 ukazuje nukleotidovou sekvenci (FUT1) (níže) a předpokládanou aminokyselinovou sekvenci (výše) polymorfismu prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasy podle předkládaného vynálezu, za použití jednopísmenného kodu aminokyselin. Nepřerušovaná dvojitá čára po aminokyselinových sekvencích (=) označuje domnělý transmembránový region; tečkovaná linie pod aminokyselinovou sekvencí označuje potenciální N-vázaná glykosylační místa (...).

■ označuje substituci adeninu (A) za guanin (G) u resistantních prasat.

* označuje terminační kodon.

Zkratky pro aminokyselinové zbytky jsou následující: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; a Y, Tyr.

Molekulární analýza DNA polymorfismů spojených s resistencí prasat na onemocnění způsobené *E. coli* usnadňuje diagnostické testy pro selekci resistantních prasat pro křížení. Resistentní prasata se liší od sensitivních prasat v *E. coli* F18 receptorovém lokusu, jak bylo zjištěno markery polymorfismu podle předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález poskytuje neinvazivní metody a prostředky pro vysoce sensitivní a specifické odlišení prasat geneticky

sensitivních na onemocnění spojená s infekcí F18 E. coli a prasat resistantních na tyto infekce. Bylo zjištěno, že DNA polymorfismus v prasečím genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu (FUT1) odlišuje resistantní prasata od sensitivních prasat. Polymorfismus vzniká mutací (změnou) nukleotidové sekvence, která vede ke vzniku nové alely. Alela je stav genu. V populaci může existovat mnoho alel genu lišících se substitucemi dusíkatých bazí, která pravděpodobně vznikly v důsledku mutací původní DNA molekuly. Současná existence více než jedné alely (které jsou též někdy označovány jako "varianty") v populaci se nazývá genetický polymorfismus. Lokus, ve kterém může existovat více než jedna alela jako stabilní složka populace, je polymorfní lokus. Obvykle má jeden polymorfní lokus v populaci nízkou frekvenci.

Jak je určeno z biologického vzorku, výhodně z krve, mají resistantní prasata v genomech polymorfismus, ve kterém je bazí v pozici 307 (obr. 1) nukleotidové sekvence adenin, zatímco bazí ve stejné pozici u homozygotních sensitivních prasat je guanin. Heterozygotní prasata budou mít oba typy DNA a budou sensitivní. Polymorfismus je variací sekvence prasečího genu (Cohney et al., 1996).

Na prasečích rodinách byla provedena analýza genetické vazby a byly stanoveny genetické asociace mezi polymorfismem ve FUT1 a resistencí na onemocnění u křížených prasat. Podle předkládaného vynálezu byl zjištěn polymorfismus v genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1. Polymorfismus, který má substituci jedné nukleotidové baze v pozici 307, byl použit pro stanovení těsné vazby mezi genem pro fukosyltransferasu a S-systémem, ECF18R lokusem a jinými lokusy HAL skupiny.

Detekce těsné vazby mutace ve FUT1 a ECF18R umožnila vývoj molekulárního testu pro identifikaci prasat resistantních na

adhesi *E. coli* F18, heterozygotů (nosičů) a prasat citlivých na tuto adhesi. Tento diagnostický test identifikuje, s vysokou sensitivitou a specificitou, prasata, která jsou citlivá na edematosní onemocnění a průjemová onemocnění po odstavení. Incidence polymorfismu podle předkládaného vynálezu se liší v chovech prasat. Vogeli et al. (1997) uvádí frekvence M307 alely u 5 prasečích chovů, které nebyly navzájem příbuzné. Dostupnost diagnostického testu pro polymorfismus podle předkládaného vynálezu dává chovatelům možnost účinně eliminovat alelu citlivou na ECF18R z chovů prasat, což umožní eliminaci predispozice pro *E. coli* F18 bakteriální adhesi způsobující edematosní onemocnění a průjem po odstavení prasat.

Předkládaný vynález dále obsahuje nukleotidové sekvence, které jsou variantami sekvence genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 představující různé polymorfismy v bazi 307 a diagnostické molekulární kity pro identifikaci polymorfismů v genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu.

Pro získání kandidátových genů pro lokus receptoru pro F18 *E. coli* (ECF18R) bylo izolováno 5 kosmidů a jeden genomový klon obsahující geny pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasy, FUT14 a FUT2 (Meijerink et al., 1997), z prasečí genomové knihovny. Mapování fluorescence in situ hybridizace umístilo tyto klony v proužku q11 prasečího chromosomu 6 (SSC6q11). Analýza sekvence kosmidů vedla k charakterizaci (a) otevřeného čtecího rámce (ORF), délky 1098 párů bazí, který je z 82,3% identický k lidské FUT1 sekvenci, a (b) druhého ORF, délky 1023 párů bazí, který je z 85% identický k lidské FUT2 sekvenci. FUT1 a FUT2 lokusy se proto zdají být prasečími ekvivalenty lokusů lidské krevní skupiny H a Secreter lokusu. Přímé sekvencování dvou ORF u prasat citlivých nebo resistantních na adhesi a kolonizaci F18 *E. coli* (ECF18R) odhalilo dva polymorfismy v páru bazí 307 (M307) a páru bazí 857

(M857) FUT1 ORF. Nukleotidové pozice jsou počítány od ATG (kodujícího methionin). Analýza těchto mutací u 34 párů Landrace rodin s 221 potomky ukázala těsnou vazbu mezi lokusem kontrolujícím resistanti a sensitivitu na E. coli F18 adhesi a kolonizaci v tenkém střevu (ECF18R) a lokusem inhibitoru krevních skupin S. Proto je M307 mutace dobrým markerem pro selekci zvířat resistantních na E. coli F18 založenou na markeru. Bylo zjištěno, že jiná mutace v nukleotidové pozici 229 vede k polymorfismu, ve kterém je kodon kodující leucin (CTT) změněn na TTT (kodující fenylalanin). Mutace v pozici 714 (GAT -> GAC) (kodující kyselinu asparagovou) nevyvolá aminokyselinovou substituci. Žádný polymorfismus, který by odlišil sensitivní od resistantních prasat, nebyl identifikován ve FUT2.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady ilustrují provedení vynálezu.

Příklad 1: Test na resistantní prasata

Polymorfismus podle předkládaného vynálezu může být snadno identifikován za použití PCR-RFLP testu. V jednom provedení test využívá 160 bp fragment prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasy 1 amplifikovaný pomocí PCR za použití následujících primerů: 5'-CCAACGCCTCCGATTCCTGT-3' a 5'-GTGCATGGCAGGCTGGATGA-3'. Výhodnými podmínkami PCR pro toto provedení je 25 cyklů při následujících dobách a teplotách: 94 °C, 30 s; 60 °C, 45 s; 72 °C, 90 s. Amplifikovaná DNA od resistantních prasat byla trávena restriční enzymem HgaI, ale nebyla trávena restriční enzymem HinPI. Amplifikovaná DNA od homozygotních sensitivních prasat byla trávena restriční enzymem HinPI. Amplifikovaná DNA od heterozygotních sensitivních prasat byla částečně trávena oběma enzymy.

V alternativním přístupu byla DNA izolována z prasečích jaderných buněk za použití standardních postupů. Přímé sekvencování prasečích FUT1 a FUT2 sekvencí a jejich sousedních regionů u zvířat různých ECF18R genotypů (BB, bb) vedlo k identifikaci dvou G --> A změn v pozicích 307 a 857 (označených M307 a M857, v příslušném pořadí) FUT1 ORF. M307 substituce eliminuje restriční místo pro CfoI. Amplifikace DNA izolované z prasečích jaderných buněk byla provedena pomocí standardních postupů s primery P6 a P11 (3 minuty při 95 °C, 30 cyklů o 30 s při 95 °C, 30 s při 56 °C a 30 sec při 72 °C, po kterých následovala 7 minutová konečná extenze při 72 °C), a po ní následovalo trávení CfoI a separace na 3% agarosovém gelu, která vedla k polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP). Homozygotní M307^{AA} zvířata měla 2 proužky. Homozygotní M307^{GG} zvířata měla 93-, 241- a 87 bp fragmenty. Heterozygotní zvířata měla všechny čtyři fragmenty.

Příklad 2: Sensitivita a specifita testu využívajícího $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu v detekci prasat resistantních na F18 E.coli

Byla provedena studie pro stanovení asociace mezi resistencí na onemocnění a polymorfismem v pozici 307 FUT1 genu. 183 odstavených prasat (věku 2-6 měsíců) bylo získáno ze šesti různých chovů. Pouze o jednom chovu bylo před zahájením studie známo, že obsahuje resistantní zvířata a o těchto zvířatech bylo známo, že mají vysokou incidenci prasečího stresového syndromu. U dalších 5 chovů nebyly známky prasečího stresového syndromu a incidence resistance na onemocnění nebyla známá. Prasata z každého chovu byla náhodně vybrána, humaně usmrcena a byly odebrány sleziny a vzorky tenkého střeva. Ze sleziny byla extrahována DNA a byla použita v PCR-RFLP testu popsaném v příkladu 1. Střevní buňky byly přečištěny seškrábnutím

Prasata byla
v roce 2000
všechny
všechny

slizničního povrchu střeva, lýzou buněk v hypotonickém EDTA roztoku a promytím centrifugací. Přečištěné buňky kartáčového lemu střeva byly inkubovány s F18 E. coli. Tato směs byla vyšetřována mikroskopií s fázovým kontrastem. Tento test určil, zda jsou prasata sensitivní (vzorky střeva obsahovaly adherované bakterie) nebo resistantní (vzorky střeva neobsahovaly adherované bakterie). PCR-RFLP test na polymorfismus koreloval s testem vazby bakterií na buňky střeva u 53 z 53 resistantních prasat a u 128 ze 130 sensitivních prasat. Dvě prasata, která byla pomocí testu vazby bakterie na střevní buňky určena jako sensitivní byla chybně určena jako resistantní při použití PCR-RFLP testu. Dva ze šesti vyšetřovaných chovů obsahovaly resistantní prasata, zatímco pouze jeden chov měl prasečí stresový syndrom, což dokazuje, že PCR-RFLP test může identifikovat prasata resistantní na onemocnění u zvířat, která nemají prasečí stresový syndrom.

Příklad 3: Lokalizace FUT1 na chromosomu 6 (SSC6)

Kosmidy ETHs1, -s2, -s3, -s4 a -s6 byly identifikovány po skríníngu kosmidové knihovny FUT1 nukleotidovou sondou získanou z prasečí genomové DNA s primery P7 a P10 a byly mapovány pomocí FISH a DISC-PCR do proužku q11 chromosomu 6.

Příklad 4: Identifikace ORF prasečí FUT1

Hybridizace kosmidů trávených KspI, EcoRI a KspI/EcoRI s radioaktivně značenými FUT1 fragmenty P6-P11 a P7-P10 pro Souther blot analýzu ukázaly identické autoradiografické signály pro ETHs2, -s4 a -s6, zatímco odlišné signály byly získány pro kosmidy ETHs1 a -s3. Z kosmidu ETHs2 KspI byly izolovány subklony délky 940 bp a 6,2 kb, které odpovídají předpokládané délce hybridizujících KspI fragmentů na Souther blot analýze. Sekvence obou subklonů byly kombinovány za zisku 1501 bp sekvence, která

byla v souladu s výsledky přímého sekvencování genomových PCR produktů. 1501 bp sekvence obsahuje otevřený čtecí rámec (ORF) o 1098 bp odpovídající lidskému FUT1 ORF, s 82,3% nukleotidovou a 80,8% aminokyselinovou identitou. ORF koduje polypeptid.

Příklad 5: Identifikace prasečí FUT2 a pseudogenu FUTP

ETHs1 má jeden DNA fragment (2,7 kb), který hybridizuje s FUT1 sekvencí, zatímco ETHs3 má dva (2,7 kb a 8,2 kb). Subklonování a částečné sekvencování 2,7 kb EcoRI fragmentu ETHs1 a -s3 potvrdilo, že tyto dva fragmenty jsou identické. Sekvence má vysokou podobnost s lidským FUT2, ale má několik změn k NH₂- a -COOH terminálních regionech. Tyto změny vedou k posunu čtecích rámců, které nejsou slučitelné s konzervovaným ORF, proto se předpokládá, že sekvence získaná z 2,7 kb fragmentu představuje pseudogen (FUT2P). Po subklonování produktu trávení ETHs3 BamHI byly identifikovány hybridizující sekvence obsažené v 8,2 kb EcoRI fragmentu. Získané subklonované sekvence představují 1023 bp ORF a jsou z 85% identické na nukleotidové úrovni a z 83% identické na aminokyselinové úrovni se sekvencí lidského FUT2. Mezi prasečí FUT2 sekvencí a FUT2P sekvencí získanou z 2,7 kb fragmentu bylo pozorováno mnoho rozdílů v NH₂- a -COOH terminálních regionech. Předpokládaná aminokyselinová sekvence odpovídá částečně určené aminokyselinové sekvenci prasečího Secreter enzymu (Thurin and Blaszczyk-Thurin, 1995). Prasečí FUT1, FUT2 a FUTP sekvence byly uloženy v GenBank pod přírůstkovým číslem U70883, U70881 a U70882, v příslušném pořadí. FUT1 a FUT2 geny mají vysoce homologické sekvence. Toto bylo bráno v úvahu například při přípravě primerů. Kromě toho, enzymová aktivita FUT1 a FUT2 musí být v dalších studiích odlišena.

Příklad 6: Identifikace M307 a M857 mutací a charakterizace M307

DNA byla izolována z prasečích jaderných buněk za použití standardních postupů. Přímé sekvencování prasečích FUT1 a FUT2 sekvencí a jejich sousedních regionů u zvířat různých ECF18R genotypů (BB, bb) vedlo k identifikaci dvou G --> A substitucí v pozicích 307 a 857 (označených M307 a M857, v příslušném pořadí) FUT1 ORF. M307 substituce eliminuje restrikční místo pro CfoI. Amplifikace DNA izolované z prasečích jaderných buněk byla provedena pomocí standardních postupů s primery P6 a P11 (3 minuty při 95 °C, 30 cyklů o 30 s při 95 °C, 30 s při 56 °C a 30 sec při 72 °C, po kterých následovala 7 minutová konečná extenze při 72 °C), a po ní následovalo trávení CfoI a separace na 3% agarosovém gelu, která vedla k polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP). Homozygotní M307^{AA} zvířata měla 2 proužky (93- a 328-bp fragmenty). Homozygotní M307^{GG} zvířata měla 87-, 93- a 241- bp fragmenty. Heterozygotní zvířata měla všechny čtyři fragmenty.

Příklad 7: Charakterizace mutace M857

M857 mutace je substituce, která eliminuje AciI místo. Primer PBEST byl navržen tak, aby eliminoval dvě další místa pro AciI v pozicích 866 a 872. PCR s primery P7 a PBEST (3 minuty při 95 °C, 30 cyklů o 30 s při 95 °C, 30 s při 56 °C a 30 sec při 72 °C, po kterých následovala 7 minutová konečná extenze při 72 °C), po které následovalo trávení AciI, umožnily PCR-RFLP analýzu na 3% agarosovém gelu. Homozygotní M857^{AA} zvířata vykazovala 174 bp fragment, zatímco amplifikační produkty M857^{GG} vykazovaly 136- a 38- bp fragmenty.

Příklad 8: Genetické mapování FUT1 genu

V Landrace prasečích rodinách ukázaly rekombinace mezi M307 a lokusem HAL vazebné skupiny (S, ECF18R, RYR1, GPI, PGD) rekombinační frakce $\theta < 0,04$ (tabulka 2). Lod skóre Z pro celkové rekombinační frakce byly mezi 24,5 a 50,6, což je silným důkazem vazby mezi těmito lokusy. Tato data umožňují genetické mapování FUT1 genu do HAL vazebné skupiny v těsné blízkosti S a ECF18R, které jsou oba ovlivněny FUT1. V pokusných Landrace rodinách byla zjištěna alelická asociace mezi ECF18R a RYR1. Větší počet genotypů RYR1^{TT} v pozici 1834 v RYR1 (genotyp citlivý na halotan) byl pozorován mezi prasaty resistantními na edematosní onemocnění prasat a průjmová onemocnění po odstavení (genotyp ECF18R^{b/b}) (tabulka 3). Tato asociace alel je důsledkem vazebné nerovnováhy, to znamená odchylky pozorovaných haplotypových frekvencí od očekávaných haplotypových frekvencí při nezávislém dělení alel. Vazebná nerovnováha označuje nenáhodnou asociaci alel náležících do vázaných lokusů. Nicméně, vzhledem k nízké rychlosti rekombinace nemůže být žádný lokus určen jako signifikantně lepší než druhý.

Příklad 9: Asociace M307^A s ECF18R^b a M307^G s ECF18R^B

V Landrace (SL) a Large White (LW) prasatech je ECF18R^b (alela resistance na edematosní onemocnění prasat a na průjmová onemocnění po odstavení) 100% asociována s M307^A a ECF18R^B (alela sensitivity na edematosní onemocnění prasat a na průjmová onemocnění po odstavení) 100% asociována s M307^G (kde A je adenin a G je guanin). U SL prasat odpovídá 88% (30/34) S^S všem ECF18R^b a M307^A haplotypům, v příslušném pořadí. Odpovídající hodnoty pro oba S^S-ECF18R^b a S^S-M307^A haplotypy byly 82% (9/11) u Large White prasat. V pokusných SL rodinách byl výskyt M857^A alely v FUT1 lokusu nízký, dokonce nepřítomný, u LW prasat. Proto

nebyla pozorována signifikantní gametická asociace mezi alelami M857 a alelami sousedních genů. G->A substituce v pozicích FUT1 307 a FUT1857 byly zjišťovány s variabilními frekvencemi také u Duroc, Hampshire a Pietrain prasat, což naznačuje, že se tyto substituce mohou vyskytovat také u jiných prasat.

Příklad 10: Distribuce FUT1 genotypů

Tabulka 4 ukazuje, že distribuce FUT1 genotypů v nukleotidové pozici 307 mezi ECF18R typy se statisticky významně odlišuje od očekávaného poměru při hypotéze, že se jedná o dva nezávislé genotypy. Z 119 zvířat ECF18R^{b/b} resistantních na edematosní onemocnění prasat a na průjemová onemocnění po odstavení mělo 118 genotyp M307^{AA} v DNA testu. Jedno resistantní zvíře mělo genotyp M307^{A/G}. Ze 131 sensitivních prasat mělo 130 genotyp M307^{A/G} nebo M307^{G/G}. Jedno zvíře, sensitivní na adhesi E. coli, bylo podle DNA testu homozygotní pro M307^{A/A}. Data z tohoto příkladu a z příkladu 2, spolu s daty předchozích studií, naznačují, že FUT1 gen je přítomen v S lokusu prasat a ECF18 lokusu. Ačkoliv 4 zvířata v tomto příkladu a v příkladu 2 neodpovídala hypotese, je pravděpodobné, že tato zvířata byla nesprávně fenotypizována s ohledem na sensitivitu/resistenci k onemocnění.

Příklad 11: Aminokyselinové změny v $\alpha(1,2)$ fukosyltransferase

G -> změny v bp +307 a bp +857 genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 vedou k substituci aminokyseliny threoninu (neutrální polární) za alanin (neutrální nepolární) a glutaminu (neutrální polární) za arginin (bazická), v příslušném pořadí, kde tyto substituce mohou mít funkční důsledky v kodovaném produktu. C -> T substituce v bp 229 vede k aminokyselinové substituci leucinu (neutrální nepolární) za fenylalanin (neutrální nepolární).

Tabulka 1: Sekvence kodujících (F) a reversních (R) primerů a jejich relativní pozice vzhledem k start kodonům prasečí FUT1 a FUT2²

Jméno primeru	Sekvence primeru	Pozice
FUT1 P6 (R)	5'-CTTCAGCCAGGGCTCCTTTAAG-3'	+489
FUT1 P7 (F)	5'-TTACCTCCAGCAGGCTATGGAC-3'	+720
FUT1 P10 (R)	5'-TCCAGAGTGGAGACAAGTCTGC-3'	+1082
FUT1 P11 (F)	5'-CTGCCTGAACGTCTATCAAGATC-3'	+69
FUT1 P16 (F)	5'-AGAGTTTCCTCATGCCCACAGG-3'	-90
FUT1 P18 (R)	5'-CTGCTACAGGACCACCAGCATC-3'	+1203
FUT1 PBEST (R)	5'-ACCAGCAGCGCAAAGTCCCTGAC GGGCACGGCCTC-3'	+893
FUT2 P16 (R)	5'-CTCCCTGTGCCTTGGAAGTGAT-3'	+1094
FUT2 P17 (F)	5'-AACTGCACTGCCAGCTTCATGC-3'	-83

² Primery FUT1 P10 a FUT1 P11 jsou získány z lidského FUT1 genu.

Tabulka 2: Celkové rekombinační frakce (θ), Lod skóre (Z) a počet informativních zvířat (N) pro M307 a lokus HAL vazebné skupiny v Landrace pokusné populaci

Pár lokusů	N	θ	Z
S-ECF18R	183	0,01	50,6
M307-S	183	0,01	50,6
M307-ECF18R	216	0,01	57,1
M307-RYR1	198	0,02	47,2
M307-GPI	147	0,03	34,2
M307-PGD	147	0,04	24,5

Tabulka 3: Frekvence haplotypů ve čtyřech lokusech (S-FUT1 (M307, M857)-ECF18R-RYR1) v Landrace (SL) pokusné populaci a u náhodně vybraných Large White (LW) prasat

Odrůda	Haplotyp ³ v S-FUT1 (M307, M857)-ECF18R-RYR1)	Frekvence ⁴ (počet)
SL	sAGbT	70 (28)
	sAGbC	5 (2)
	sGGBC	15 (6)
	sGABC	10 (4)
LW	sAGbC	56 (9)
	sGGBC	31 (5)
	sGGBC	13 (2)

³ S: supresorový lokus pro A a O krevní typy (S a s).

FUT1 (M307): alterace adeninu (A) na guanin (G) v nukleotidu 307 genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu (FUT1). FUT1 (M857): alterace adeninu (A) na guanin (G) v nukleotidu 857 genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu (FUT1). ECF18R: E.coli F18 receptor. Dominantní alela citlivosti je označena B a resistantní alela je označena b. RYR1: ryanodinový receptor kosterního svalu. C (cytosin) je dominantně resistantní a T (thymin) je sensitivní alela pro maligní hypertermii.

⁴ Frekvence haplotypů jsou uvedeny v procentech a absolutní počet je uveden v závorkách.

Tabulka 4: Distribuce genotypů, tetrachorické korelace (R) a statistická významnost asociace (χ^2 a $V \times \chi^2$) asociovaných polymorfních FUT1 (M307) a ECF18R lokusů u Landrace (SL) pokusné populace a u náhodně vybraných Large White (LW) prasat.

		FUT1/M307					
Odrůda	Lokus	genotyp	A/G	A/A	r	χ^2	$\chi^2 \times w^5$
SL	ECF18R ⁶	b/b	1	113	0,98	213,1	42,6***
		B/b	106	1			
		A/G					
		genotyp (A/G)	G/G	A/A			
LW	ECF18R ⁶	b/b	0	5	1,0	29,0	11,6***
		B/b, B/B	24	0			

⁵ hmotnostní faktor $w = 0,2$ (SL) a $0,4$ (LW) byl použit pro korekci chybění přesných výsledků vzniklých v důsledku zahrnutí příbuzných zvířat do dat, podle Cotterman (1947. *** $p < 0,001$.

⁶ Zvířata genotypu b/b v ECF18R lokusu jsou resistantní a zvířata genotypů B/b a B/B jsou sensitivní na adhesi F18 ab E. coli.

Způsoby

1. Primery

Primery odvozené z lidského FUT1 genu byly použity pro amplifikaci prasečího protějšku z genomové DNA. Z výsledných prasečích sekvencí byly navrženy specifické primery, které byly použity v další amplifikaci a sekvencování (tabulka 1).

2. Vyhledávání v prasečí genomové knihovně

Prasečí genomové knihovny byly vyšetřovány buď prasečí FUT1 sondou získanou za použití primerů P7 a P10, nebo prasečí FUT1 cDNA. Prasečí genomová knihovna, vytvořená v SuperCOS1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) byla vyšetřována s $\alpha^{32}\text{P}$ dATP značenou (Prime It II, Stratagene) FUT1 sondou získanou z prasečí genomové DNA pomocí primerů P7 a P10. Po hybridizaci dvojitého filtru při 42 °C po dobu 15 hodin (50% formamid, 6 x SSC, 5 x Denhartův roztok, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml lososího spermatu) a dvojitým promytím při 65 °C po dobu 30 minut (1 x SSC, 0,1% SDS) byly identifikovány pozitivní kolonie po expozici na rentgenovém filmu (15 h, -80 °C).

3. In situ hybridizace prasečích chromosomů v metafázi

Kosmidové klony ETHs1, ETHs2, ETHs3, ETHs4 a ETHs6 byly předmětem fluorescentní in situ hybridizace (FISH) (Solinas Toldo et al., 1993) nebo přímé in situ chromosomální PCT (DISC PCR) na prasečích chromosomech v metafázi. Chromosomy v metafázi byly barveny na Q-proužky a byly vyfotografovány před hybridizací. Sondy byly značeny náhodným "primingem" za použití biotin-16-dUTP. Detekce signálu a amplifikace byly provedeny za použití avidin-FITC a biotinylovaného anti-avidinu. Chromosomy byly kontrastně barveny 4,6-diamidino-2-fenylindolem a relativní pozice kosmidů byly určeny způsobem, který popsal Solinas Toldo, 1993.

4. Subklonování

Produkty enzymatického trávení genomových kolonií pozitivní na sondu byly separovány na agarosovém gelu, byly přeneseny na nylonovou membránu a proužky obsahující sondu byly subklonovány

do plasmidů pro sekvencování FUT1. Sekvence FUT1 získaná tímto způsobem je uvedena na obr. 1.

Všechny kosmidy byly tráveny KspI, EcoRI a KspI/EcoRI a produkty trávení byly separovány na 0,8% agarósovém gelu a byly přeneseny na Hybond N nylonovou membránu (Meijerink et al., 1997). Tento blot byl hybridizován s $\alpha^{32}\text{P}$ dATP značenými produkty PCR prasečí FUT1 (primery P6-P11 a P7-P10). Na základě autoradiografických signálů byly ETHs1, -s2 a -s3 podrobeny dalšímu subklonování do pBluescript SK- a (Stratagene) a FUT sekvence byly určeny z těchto subklonů. Sekvence dvou FUT-podobných otevřených čtecích rámců (ORF) (FUT1 a FUT2) získané z kosmidů ETHs2 a -s3 byly srovnávány s ECF18R pozitivními (BB/Bb) a negativními (b/b) zvířaty pomocí přímého sekvencování PCR produktů.

5. Polymerasová řetězová reakce a přímé sekvencování

Za použití Perkin Elmer Ready Reaction Dye Terminator kitu (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) a 10 pmol primeru bylo provedeno cyklické sekvencování s teplotním programem stávajícím z počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut, po které následovalo 25 cyklů při 95 °C po dobu 5 s, 50 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 4 minut. Primery použité pro amplifikaci a sekvencování prasečích genů pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu jsou uvedeny v tabulce 1. Další primery byly navrženy tak, že braly v úvahu křížové tepelné reakce primerů způsobené značnou podobností FUT1, FUT2 a FUT2 pseudogenu. Vzorky byly analyzovány na 373A ABI sekvenátoru (Applied Biosystems Inc.) a analýza sekvence byla provedena s GCG výbavou (Devereux, 1984).

6. Produkce informativního potomstva

Polymorfismy v jednom nukleotidu byly analyzovány na 221 Landrace prasatech, která byla potomky 4 vepřů a 16 prasnic a na 29 Large White prasatech, která byla potomky 9 páření mezi nepříbuznými prasaty. Pro produkci většího počtu informativního potomstva pro vyšetřování vazby mezi prasečími geny kodujícími ECF18 receptory a vybranými lokusy polymorfismu byly provedeny pouze informativní Landrace křížení B/b x b/b.

7. Test kolonizace

Ve studii provedené Bertschingerem et al., 1993, byla výše uvedená Landrace prasata také testována na sensitivitu pro ECF18 v testu kolonizace. Pro tento test byla prasata inokulována těsně po odstavení E. coli kmenu 124/76 serotypu O139:K12(B):H1:F18 (Rippinger et al., 1995). Bakterie ve stolici byly sledovány každý den. Rozsah kolonizace byl vypočítán jako průměr dvou nejvyšších fekálních skóre. Prasata s fekálním skóre 3,5, které odpovídá 6,7 log kolony tvořících jednotek (CFU)/g nebo více, byla považována za sensitivní pro kolonizaci. Tento limit byl stanoven na základě chybění mortality pod touto hodnotou a na skóre získaných od plně resistantních selat.

8. Vazebná analýza nukleotidových polymorfismů

Výsledky jednonukleotidových polymorfismů byly srovnávány s typizačními daty pro ECF18R, která byla získána v in vitro adhesním testu, jak jej popsal Vogeli et al., (1996), a s typizačními daty pro GPI-, PGD-, α -1-B-glykoprotein (A1BG), ryanodinový receptor (RYR1), EAH- a S- lokusy, jak je popsal Vogeli et al., (1996). Analýza párové vazby a výpočet rekombinačních frakcí byly provedeny za použití CRI-MAP verze 2.4

programu (Green et al., 1990). Analýza vícebodové vazby byla provedena sekvenční insercí výše uvedených lokusů do mapy. Haplotypové frakvence byly vypočítány z původních zvířat, pro Landrace rodiny a pro 8 rodičovských Large White zvířat, které byly haplotypovány na ECF18R z informací o potomstvu. Tetrachorické korelace ECF18R a mutací v FUT1 (FUT1/M307) (polymorfismy) byly vypočítány na všem Landrace potomstvu a Large White potomstvu.

10. Souther blot analýza

Byla provedena Souther blot analýza kosmidů ETHs(1-3), ETHs2 (4-6) a ETHs3 (7-9) po trávení enzymy KspI (1, 4, 7), EcoRI (2, 5, 8) a KspI/EcoRI (3, 6, 9) a po separaci na 0,8% agarose. Hybridizace s $\alpha^{32}\text{P}$ dATP značeným 5'-FUT1 fragmentem (primery P6-P11) vedla k vzniku stejného hybridizujícího 940 bp proužku pro produkty trávení KspI (dráha 4) a KspI/EcoRI (dráha 6). Nicméně, hybridizace s 3'-FUT1 fragmentem (primery P7-P10) (tabulka 1) ukázala 6,2 kb KspI proužek ve dráze 4 a 1,1 kb KspI/EcoRI proužek ve dráze 6. Jak 5', tak 3' FUT1 fragmenty hybridizují na stejný 4,6 kb EcoRI fragment ve dráze 5. Tato skutečnost ukazuje na přítomnost KspI místa ve FUT1 genu obsaženém v kosmidu ETHs2. Křížová hybridizace 3' FUT1 fragmentu detekuje 2,7 kb (dráhy 2, 3, 8 a 9) a 8,2 kb (dráhy 8 a 9) proužky, což vede k identifikaci sekvence FUT2 pseudogenu (nekompletní ORF) a FUT2 genu, v příslušném pořadí.

10. Polymorfismus délky restričních fragmentů

Detekce (A) M307 G na A a (B) M857 G na A mutace v prasečím FUT1 genu může být provedena analýzou polymorfismu délky restričních fragmentů, vzniklých trávením různými restričními enzymy. Trávení amplifikovaného FUT1 fragmentu CfoI (A) a AciI

(B) vede k polymorfismu restričních fragmentů. V první dráze je 100 bp marker. Délky fragmentů jsou uvedeny v párech bazí. (A) M307^{A/A} genotyp (dráha 2) vytváří restriční fragmenty délky 328 bp a 93 bp, zatímco M307^{G/G} genotyp (dráha 4) vytváří restriční fragmenty délky 93, 241 a 87 bp a heterozygotní M307^{A/G} genotyp (dráhy 3) vytváří všechny čtyři fragmenty.

(B) Trávení M857^{A/A} genotypu (dráha 2) vytváří restriční fragmenty délky 174 bp, zatímco trávení M857^{G/G} genotypu (dráha 4) vytváří restriční fragmenty délky 136 a 38 bp a trávení heterozygotního M857^{A/G} genotypu (dráhy 3) vytváří všechny tři fragmenty.

11. Zdroj prasat

Data pro Swiss Landrace pokusnou populaci jsou získána z rodokmenů, které byly zjištěny v Institute of Veterinary Bacteriology, University of Zurich. Všechna ostatní prasata Large White, Swiss Landrace, Duroc, Hampshire a Pietran plemen pocházela z různých chovných stád ve Švýcarsku. Ostatní prasata byla náhodně získána z farem na střeozápadě USA.

Odkazy:

- Bertschinger *et al.* (1993) *Veterinary Microbiology* 35:79-89.
- Cohney *et al.* (1996) *Immunogenetics* 44:76-79.
- Devereux *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res. 1*: 387-395.
- Fujii *et al.* (1991) *Science* 253:448-451.
- Green, *et al.*, (1990) Documentation for CRI-MAP, Version 2.4, St. Louis: Washington University School of Medicine.
- Kelly *et al.* (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 91:5843-5847
- Meijerink, E. *et al.* (1997), 25th Int. Conf. on Animal Genetics, p. 44.
- Rippinger, *et al.* (1995) *Vet. Microbial.* 45:281-295.
- Solinas Toldo *et al.* (1993) *Mamm. Genome* 4:720-727.
- Thurin and Blaszczyk-Thurin, (1995) *J. Biol. Chem.* 270 (44):26577-26580.
- Vögeli *et al.* (1996) *Animal Genetics* 27:321-328
- Vögeli *et al.* (1997) *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 139:479-484.
- U.S. Pat. No. 5,358,649, MacIennnon *et al.*
- U.S. Pat. No. 5,552,144, Valery *et al.*
- WO 8604604 987P, Inventor: Peterson.
- WO 9628967, Inventor: Koike, C.
- WO 9413811, Inventors: Imberechts and Lintermans.
- TW 266264, Inventors: Jeng and Liou.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Způsob pro identifikaci prasat resistantních na kolonizaci střeva *E. coli* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) určení přítomnosti genetického polymorfismu asociovaného s resistencí na kolonizaci v biologickém vzorku od prasete; a

b) pokud je prase homozygotní pro polymorfismus, tak určení prasete jako resistantního prasete.

2. Způsob pro identifikaci prasat resistantních na střevní onemocnění způsobená *E. coli* v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) určení toho, zda je v biologickém vzorku od prasete dusíkatá baze v pozici 307 genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 adenin; a

b) identifikaci prasete jako resistantního tehdy, je-li baze v pozici 307 adenin.

3. Způsob křížení prasat resistantních na onemocnění způsobená *E. coli* v y z n a č u j í c í s e t í m, že

a) selekci takových prasat pro křížení, která mají genetický polymorfismus v genu pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1, který je identifikuje jako prasata resistantní na střevní onemocnění způsobená *E. coli*; a

b) křížení uvedených prasat.

4. Způsob podle nároků 1, 2 nebo 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že *E. coli* je kmene F18.

5. Izolovaná molekula DNA, která je polymorfní pro gen pro $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1 u prasat.

6. Izolovaná molekula DNA mající sekvenci nukleotidů uvedenou na

obr. 1.

7. Izolovaná molekula DNA podle nároku 6 ve které je místo guaninu v nukleotidové pozici 307 adenin.

8. Izolovaná molekula DNA, která je komplementární k nukleotidové sekvenci podle nároku 6.

9. Izolovaná molekula DNA podle nároku 6 se substitucí adeninu za guanin v nukleotidové pozici 857.

10. Izolovaná molekula DNA podle nároku 6 s threoninem v nukleotidové pozici 229.

11. Polypeptid kodovaný molekulou DNA podle nároků 5 nebo 6, kde uvedená molekula má $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasovou aktivitu.

12. Část izolovaná molekuly DNA podle nároku 5 nebo 6, kde uvedená část obsahuje nukleotidovou sekvenci, která odlišuje prasata resistantní na kolonizaci E. coli od prasat sensitivních na takovou kolonizaci.

13. Molekulární test pro detekci receptorů pro F18 E. coli v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje izolaci DNA z jaderných buněk prasete; amplifikaci uvedené DNA v polymerasové řetězové reakci za použití oligonukleotidových primerů, které jsou komplementární k DNA sekvenci genu pro prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu; provedení trávení restričními enzymy za použití alespoň jednoho restričního enzymu; separaci výsledných fragmentů gelovou elektroforesou; určení příslušného počtu a délky fragmentů na gelu; a stanovení toho, které receptory jsou přítomné na prasečích buňkách, podle počtu a délky fragmentů.

14. Molekulární test podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že restriční enzymem je CfoI.

15. Kit pro detekci receptorů pro F18 E. coli v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje oligonukleotidy v oddělených kontainerech, které jsou komplementární k DNA sekvenci polymorfismu genu pro prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasu 1.

16. Prasečí polypeptid mající $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasovou aktivitu a aminokyselinovou substituci v pozici 103.

17. Polypeptid podle nároku 17, který má aminokyselinovou substituci v pozici 286.

18. Použití polymorfismu prasečí $\alpha(1,2)$ fukosyltransferasy pro vývoj léků pro léčbu prasat postižených onemocněním způsobeným E. coli.

Obr. 1

	M	W	V	P	S	R	R	H	L	C	L	T	F	L	L	V	C	17		
CT	CGA	GCC	ATG	TGG	GTC	CCC	AGC	CGC	CGC	CAC	CTC	TGT	CTG	ACC	TTC	CTG	CTA	GTC	TGT	59
V	L	A	A	I	F	F	L	N	V	Y	Q	D	L	F	Y	S	G	L	D	37
GTT	TTA	GCA	GCA	ATT	TTC	TTC	CTG	AAC	GTC	TAT	CAA	GAC	CTC	TTT	TAC	AGT	GGC	TTA	GAC	119
L	L	A	L	C	P	D	H	N	V	V	S	S	P	V	A	I	F	C	L	57
CTG	CTG	GCC	CTG	TGT	CCA	GAC	CAT	AAC	GTG	GTA	TCA	TCT	CCC	GTG	GCC	ATA	TTC	TGC	CTG	179
A	G	T	P	V	H	P	N	A	S	D	S	C	P	K	H	P	A	S	F	77
GCG	GGC	ACG	CCG	GTA	CAC	CCC	AAC	GCC	TCC	GAT	TCC	TGT	CCC	AAG	CAT	CCT	GCC	TCC	TTT	239
S	G	T	W	T	I	Y	P	D	G	R	F	G	N	Q	M	G	Q	Y	A	97
TCC	GGG	ACC	TGG	ACT	ATT	TAC	CCG	GAT	GGC	CGG	TTT	GGG	AAC	CAG	ATG	GGA	CAG	TAT	GCC	299
T	L	L	A	L	A	Q	L	N	G	R	Q	A	F	I	Q	P	A	M	H	117
ACG	CTG	CTG	GCC	CTG	GCG	CAG	CTC	AAC	GGC	CGC	CAG	GCC	TTC	ATC	CAG	CCT	GCC	ATG	CAC	359
A	V	L	A	P	V	F	R	I	T	L	P	V	L	A	P	E	V	D	R	137
GCC	GTC	CTG	GCC	CCC	GTG	TTC	CGC	ATC	ACG	CTG	CCT	GTC	CTG	GCG	CCC	GAG	GTA	GAC	AGG	419
H	A	P	W	R	E	L	E	L	H	D	W	M	S	E	D	Y	A	H	L	157
CAC	GCT	CCT	TGG	CGG	GAG	CTG	GAG	CTT	CAC	GAC	TGG	ATG	TCC	GAG	GAT	TAT	GCC	CAC	TTA	479
K	E	P	W	L	K	L	T	G	F	P	C	S	W	T	F	F	H	H	L	177
AAG	GAG	CCC	TGG	CTG	AAG	CTC	ACC	GGC	TTC	CCC	TGC	TCC	TGG	ACC	TTC	TTC	CAC	CAC	CTC	539
R	E	Q	I	R	S	E	F	T	L	H	D	H	L	R	Q	E	A	Q	G	197
CGG	GAG	CAG	ATC	CGC	AGC	GAG	TTC	ACC	CTG	CAC	GAC	CAC	CTT	CGG	CAA	GAG	GCC	CAG	GGG	599
V	L	S	Q	F	R	L	P	R	T	G	D	R	P	S	T	F	V	G	V	217
GTG	CTG	AGT	CAG	TTC	CGT	CTA	CCC	CGC	ACA	GGG	GAC	CGC	CCC	AGC	ACC	TTC	GTG	GGG	GTC	659
H	V	R	R	G	D	Y	L	R	V	M	P	K	R	W	K	G	V	V	G	237
CAC	GTG	CGC	CGC	GGG	GAC	TAT	CTG	CGT	GTG	ATG	CCC	AAG	CGC	TGG	AAG	GGG	GTG	GTG	GGT	719
D	G	A	Y	L	Q	Q	A	M	D	W	F	R	A	R	Y	E	A	P	V	257
GAC	GGC	CGT	TAC	CTC	CAG	CAG	GCT	ATG	GAC	TGG	TTC	CGG	GCC	CGA	TAC	GAA	GCC	CCC	GTC	779
F	V	V	T	S	N	G	M	E	W	C	R	K	N	I	D	T	S	R	G	277
TTT	GTG	GTC	ACC	AGC	AAC	GGC	ATG	GAG	TGG	TGC	CGG	AAG	AAC	ATC	GAC	ACC	TCC	CGG	GGG	839
D	V	I	F	A	G	D	G	R	E	A	A	P	A	R	D	F	A	L	L	297
GAC	GTG	ATC	TTT	GCT	GGC	GAT	GGG	CGG	GAG	GCC	GCG	CCC	GCC	AGG	GAC	TTT	GCG	CTG	CTG	899
V	Q	C	N	H	T	I	M	T	I	G	T	F	G	F	W	A	A	Y	L	317
GTG	CAG	TGC	AAC	CAC	ACC	ATC	ATG	ACC	ATT	GGC	ACC	TTC	GGC	TTC	TGG	GCC	GCC	TAC	CTG	959
A	G	G	D	T	I	Y	L	A	N	F	T	L	P	T	S	S	F	L	K	337
GCT	GGT	GGA	GAT	ACC	ATC	TAC	TTG	GCT	AAC	TTC	ACC	CTG	CCC	ACT	TCC	AGC	TTC	CTG	AAG	1019
I	F	K	P	E	A	A	F	L	P	E	W	V	G	I	N	A	D	L	S	357
ATC	TTT	AAA	CCC	GAG	GCT	GCC	TTC	CTG	CCC	GAG	TGG	GTG	GGC	ATT	AAT	GCA	GAC	TTG	TCT	1079
P	L	Q	M	L	A	G	P													365
CCA	CTC	CAG	ATG	TTG	GCT	GGG	CCT	TGA	ACC	AGC	CAG	GAG	CCT	TTC	TGG	AAT	AGC	CTC	GGT	1139
CAA	CCC	AGG	GCC	AGC	GTT	ATG	GGT	CTC	CGG	AAG	CCC	GAG	TAA	CTT	CCG	GAG	ATG	CTG	GTG	1199
GTC	CTG	TAG	CAG	GCT	GGA	CAC	TTA	TTT	CAA	GAG	TGA	TTC	TAA	TTG	GCT	GGA	CTC	AGA	GGA	1259
AAC	CCT	GCA	G																	1269