



Genteknologiens betydning for fremtidens kvægavl

*Aspects of gene technologies in
future cattle breeding*

Søren Høj
Afd. for Forsøg med Kvæg og Får

STATENS HUSDYRBRUGSFORSØG

Forskningscenter Foulum, Postboks 39, 8830 Tjele

Tlf.: 89 99 19 00. Fax: 89 99 19 19

Statens Husdyrbrugsforsøg, oprettet 1883, er en institution under Landbrugsministeriet.

Institutionen har til formål at gennemføre forskning og forsøg og opbygge viden af betydning for erhvervsmæssigt husdyrbrug i Danmark og bidrage til en hurtig og sikker formidling af resultater til brugerne.

Der skal i forsknings- og forsøgsarbejdet lægges vægt på ressourceudnyttelse, miljø og dyrevelfærd samt husdyrprodukternes kvalitet og konkurrenceevne.

Institutionen er opdelt i fem forskningsafdelinger, et Centrallaboratorium, en Afdeling for Landbrugsdrift og et Sekretariat. Forskningsafdelingerne omfatter Afd. for Dyrefysiologi og Biokemi samt fire dyreartsorienterede afdelinger: Afd. for Forsøg med Kvæg og Får, Afd. for Forsøg med Svin og Heste, Afd. for Forsøg med Fjerkræ og Kaniner samt Afd. for Forsøg med Pelsdyr.

Abonnement på Statens Husdyrbrugsforsøgs Forskningsrapporter, Beretninger og informationsblad kan tegnes ved direkte henvendelse til Statens Husdyrbrugsforsøg på ovenstående adresse.

NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL SCIENCE

Research Centre Foulum, P.O. Box 39, DK-8830 Tjele

Tel: +45 89 99 19 00. Fax: +45 89 99 19 19

The National Institute of Animal Science was founded in 1883 and is a governmental research institute under the Ministry of Agriculture.

The aim of the institute is to carry out research and accumulate knowledge of importance to Danish animal husbandry and to contribute to an efficient implementation of the results to the producers.

In the research great importance is attached to the utilization of resources, environment and animal welfare and to the quality and competitiveness of the agricultural products.

The National Institute of Animal Science comprises five research departments, a Central laboratory, a department for Farm Management and Services, and a Secretariat. The research departments comprise: Dept. for Animal Physiology and Biochemistry, Dept. for Research in Cattle and Sheep, Dept. for Research in Pigs and Horses, Dept. for Research in Poultry and Rabbits, and Dept. for Research in Fur Animals.

For subscription to reports and other publications please apply directly to the above address.

721

Beretning fra Statens Husdyrbrugsforsøg

Report from the National Institute of Animal Science, Denmark

*Søren Høj
Afd. for Forsøg med Kvæg og Får*

Genteknologiens betydning for fremtidens kvægavl

*Aspects of gene technologies in
future cattle breeding*

Manuskriptet afleveret juli 1993

Trykt i Frederiksberg Bogtrykkeri a/s 1993

Forord

Genteknologien er inde i en rivende udvikling i disse år, og den vil givetvis også få stor betydning for husdyrbruget.

Forfatteren til nærværende beretning har i et ph.d. studium gennemført en omfattende undersøgelse af genetiske polymorfier i kvægets væksthormongen. Resultaterne fra disse undersøgelser er publiceret i internationale tidsskrifter. I denne beretning gives en beskrivelse af de væsentligste genteknologiske principper samt resultater og avls-

mæssige perspektiver, der skønnes at have interesse for praktisk kvægavl.

Lektor Merete Fredholm, Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole samt forsker Mogens Vestergaard og forsøgsleder Bernt Bech Andersen, begge Statens Husdyrbrugsforsøg har bistået med kritisk gennemlæsning af manuskriptet. Assistent Erik Christensen, Landskontoret for Kvæg har rentegnet figurene.

Foulum, juli 1993

A. Neimann-Sørensen

Indholdsfortegnelse

Sammendrag	5
Summary	6
1 Indledning	7
2 De kvalitative og kvantitative egenskabers genetik	7
3 Metoder til identifikation af genetisk variation på DNA niveau	9
4 Genetisk variation på DNA niveau	12
5 Enkelt gener af betydning for husdyr	15
6 Diskussion	16
Litteratur	18

Contents

Summary in Danish	5
Summary	6
1 Introduction	7
2 The genetics of single locus traits and quantitative traits	7
3 Methods for identification of genetic variation at the DNA level	9
4 Genetic variation at the DNA level	12
5 Single loci of importance for livestock	15
6 Discussion	16
Literature	18

Sammendrag

Beretningen er et review af genteknologiske aspekter med relation til kvægavl. Grundlæggende forhold for kvalitative og kvantitative egenskabers genetik, genernes opbygning og funktion er kort omtalt. Basale genteknologiske metoder er nævnt, og der findes en ret udførlig gennemgang af Restriktions Fragment Længde Polymorfi (RFLP) og Polymerase Chain Reaction (PCR), som er to meget anvendte metoder til undersøgelse af genetisk variation og genotypebestemmelse.

Der gives eksempler på anvendelse af RFLP- og/eller PCR-metoder til kønsbestemmelse af

kvægembryoner, genotypning af mælkeproteiner og genetisk test for arvelige sygdomme. Resultater fra forfatterens egne undersøgelser af polymorfier i kvægets væksthormongen er refereret.

Endelig er der en omtale af identifikation af repetetive DNA sekvenser, herunder specielt de såkaldte mikrosatellitter, og deres anvendelse som genmarkører for kvantitative egenskaber og arvelige sygdomme. Til slut er perspektiverne for genteknologiens anvendelse i fremtidens kvægavl diskuteret.

Nøgleord: Kvægavl, genteknologi, RFLP, PCR, DNA polymorfier, væksthormongen, genmarkører.

Summary

This report is a review of gene technologies in relation to cattle breeding. The basic knowledge of genetics of single locus traits and quantitative traits, genes and gene action are briefed. Basic gene technologies are described and there is a thorough description of the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and Polymerase Chain Reaction (PCR) techniques, and their application to genotyping.

Examples of investigations on genetic variation at the DNA level are sexing of bovine embryos,

milkproteins, genes coding hormones, repetitive DNA sequences as gene markers and inherited diseases. Results from the author's experiments on RFLPs in the bovine growth hormone gene are summarized.

Furthermore, the identification of repetitive DNA sequences, especially microsatellites, and their application as gene markers for quantitative traits and inherited diseases are described. Finally, the applications of gene technologies to use in cattle breeding are discussed.

Key words: Cattle breeding, gene technology, RFLP, PCR, DNA polymorphism, growth hormone gene, gene markers.

1 Indledning

Når genteknologien de senere år har fået meget stor opmærksomhed, skyldes det især, at den har givet helt nye muligheder for fremstilling af medicinske produkter (f. eks. insulin fremstillet af gensplejsede mikroorganismer). Endvidere har genteknologien på flere områder revolutioneret den biologiske forskning, og udviklingen af transgene planter og dyr (f. eks. de såkaldte supermus) har haft mediernes bevågenhed.

Det har samtidig ført til store investeringer i genteknologisk forskning specielt inden for fremstilling af medicin. Det største og mest ambitiøse projekt er kortlægningen af menneskets gener, som på nuværende tidspunkt har ført til identifikation af flere tusinde gener. Og det forventes, at samtlige humane gener er sekventeret omkring år 2000.

For husdyrproduktionen er interessen for genteknologi især koncentreret om vaccinefremstilling, sygdomsdiagnostik, gensplejsede mikroorganismer til vom- og tarmflora, samt undersøgelser af enkelt gener, genmarkører og genkortlægning.

I de følgende afsnit gives en kort gennemgang af den grundlæggende molekylær genetik og to meget anvendte molekylær biologiske metoder til undersøgelse af genetisk variation. Derefter følger nogle eksempler på metodernes praktiske anvendelse, og resultater fra forfatterens undersøgelse af genetiske variation i kvægets væksthormongen er omtalt. Til slut er forventningerne til metodernes anvendelse i fremtidens kvægavl diskuteret.

2 De kvalitative og kvantitative egenskabers genetik

De egenskaber, som er blevet forbedret gennem det hidtidige avlsarbejde betegnes kvantitative egenskaber. Disse egenskaber (f.eks. mælkeydelse og tilvækst) er genetisk set bestemt af et stort antal gener. Andre egenskaber f.eks. mælkeproteiner, blodtyper og flere arvelige sygdomme, er kvalitative egenskaber, og deres nedarvning bestemmes af enkelt-gener.

De arvelige anlæg - *generne* - er indkodet i DNA-molekylerne, som findes i cellekernene, hvor

de er pakket med proteiner til en velordnet struktur. Et DNA-molekyle består af en dobbeltspiral, hvor der i de to kæder indgår 4 forskellige baser: Adenin (A), cytosin (C), guanin (G) og thymin (T). I dobbeltspiralen sidder baserne overfor hinanden to og to, A overfor T og C overfor G.

Tidligere blev et *gen* defineret ud fra et biologisk grundlag, som den del af kromosomet, der bestemmer én arvelig egenskab. Molekylær biologien har imidlertid ændret ved opfattelsen af

generne. Således defineres et *gen* ud fra et molekylær biologisk grundlag som de DNA sekvenser, der tilsammen kan producere et mRNA, hvorfra der herefter produceres et specifikt protein, f.eks. et struktur protein, et enzym eller et hormon. Således indeholder et gen en kode for en bestemt rækkefølge af aminosyrer i et specifikt protein samt regulatoriske DNA-sekvenser.

Husdyrenes arvemasse - *genom* - består af ca. 3 mia. DNA-basepar, og det skønnes at indeholde ca. 100.000 gener. Hele den proces, som fører fra DNA-koden via RNA (transkription) til proteinsyntesen (translation), betegnes under tiden *det centrale dogme*, fordi processen er universel for alle levende organismer - bakterier, planter og dyr. Dog er der flere væsentlige forskelle mellem prokaryoter og eukaryoter, idet eukaryote celler har kromosomerne i en cellekerne, og i generne hos flercellede eukaryoter findes ikke-kodende elementer - såkaldte *introns*.

Et gen kan opdeles i den regulerende enhed - *promoteren* - og den kodende enhed, som indeholder den genetiske kode for en aminosyrekæde. Promoteren er som regel placeret før startpositionen for transkriptionen af den kodende enhed, og promoterens vigtigste funktion er at binde de enzymer, som igangsætter transkriptionen af den kodende enhed. Foruden promoteren har mange gener andre regulatoriske sekvenser - *enhancere* - der påvirker transkriptionen. Den kodende enhed består af aminosyrekodende enheder - *exons*, adskilt af ikke-kodende sekvenser - *introns*.

Det første trin i oversættelsen fra DNA til protein er transkriptionen fra DNA til mRNA. Først dannes pre-mRNA, hvor hele den kodende enhed med både exons og introns fra DNA'et

oversættes til RNA. Herefter splejses de enheder, som svarer til introns, ud. Dernæst samles de enheder, som exons koder for, til det færdige mRNA. Endelig oversættes - *translateres* - mRNA til aminosyrekæder. Som i DNA indgår der 4 forskellige baser i mRNA-sekvensen, blot er thymin erstattet af uracil (U). Tre sådanne baser i rækkefølge koder for én bestemt aminosyre. For hver 3 baser i RNA-kæden sættes én aminosyre på proteinkæden under translationen af mRNA til protein.

De fleste promotorer er af størrelsesordenen 500-1.000 baser, mens de kodende elementer som hovedregel består af ca. 2.000 til 50.000 baser, hvor introns udgør 50-90%. Hos pattedyr udgør generne kun en mindre del - højst 10% - af hele genomet. De resterende ca. 90% af genomet er ikke-kodende DNA eller "fyld". Dette DNA har fået forskellige betegnelser som: Satellit DNA, non-sense DNA, sekundært DNA, junk, selfish DNA etc. De forskellige betegnelser for dette DNA afspejler, at betydningen af det ikke-kodende DNA er ukendt.

Derimod er det veldokumenteret fra undersøgelser af såvel mennesker som husdyr, at det ikke-kodende DNA indeholder et meget stort antal såkaldte repeterede sekvenser, dvs. forskellige korte sekvenser på 2-65 basepar, som repeteres mange gange. Disse sekvenser benævnes mini- eller mikrosatellitter afhængig af antallet af basepar i den repeterede sekvens. Genspecifikke repeterede DNA sekvenser er særdeles velegnede som genmarkører, da de ofte har et stort antal forskellige alleler, dvs. antallet af repetitioner udviser stor variation fra individ til individ.

3 Metoder til identifikation af genetisk variation på DNA niveau

Her skal kort omtales nogle grundlæggende molekylærbioologiske laboratorieteknikker: DNA-skæring, gensplejsning og kloning. Desuden forklares *RFLP-* og *PCR-teknikken*, som anvendes til undersøgelse af DNA-sekvens variation. DNA-molekylerne kan skæres i mindre fragmenter med restriktionsenzymmer. Disse enzymer genkender en bestemt DNA-basesekvens på 4-6 baser, og klipper DNA-kæden over. Restriktionsenzymmer har både høj specificitet og stor effektivitet, hvorfor DNA-skæringen med et bestemt enzym er nøjagtig og repeterbar.

Efter skæring af DNA'et kan DNA-fragmenter indsættes - *gensplejse* - i bakterieplasmider, som er ringformede DNA-molekyler, der kan overføres til f.eks. colibakterier. Herefter selekteres de gensplejsede bakterier, hvorefter bakterierne opformerer. Samtidig sker der en opformering af de gensplejsede plasmider. Således fås en klon, dvs. en bakteriestamme, der indeholder et for bakterien fremmed DNA-fragment. En mere detaljeret gennemgang af de basale genteknologiske metoder er lavet af Sejrsen (1989). DNA-fragmenter fra klonede bakterier kan oprenses og den nøjagtige baserækkefølge kan bestemmes ved basesekventering. En anden mulighed er at bruge fragmentet til at undersøge lignende DNA-sekvenser hos andre individer.

RFLP er en forkortelse for *restriktions fragment længde polymorfi*. RFLP teknikken identificerer DNA-sekvens variation mellem forskellige individer, hvis denne variation medfører, at der opstår eller forsvinder specifikke skæringssteder for restriktionsenzymmer. Selve princippet i RFLP metoden omfatter tre trin (figur 1):

1) DNA fra blod eller væv oprenses og skæres med ét restriktionsenzym i mindre fragmenter, og fragmenterne adskilles efter størrelse ved gelelektroforese. DNA-fragmenternes vandringshastig-

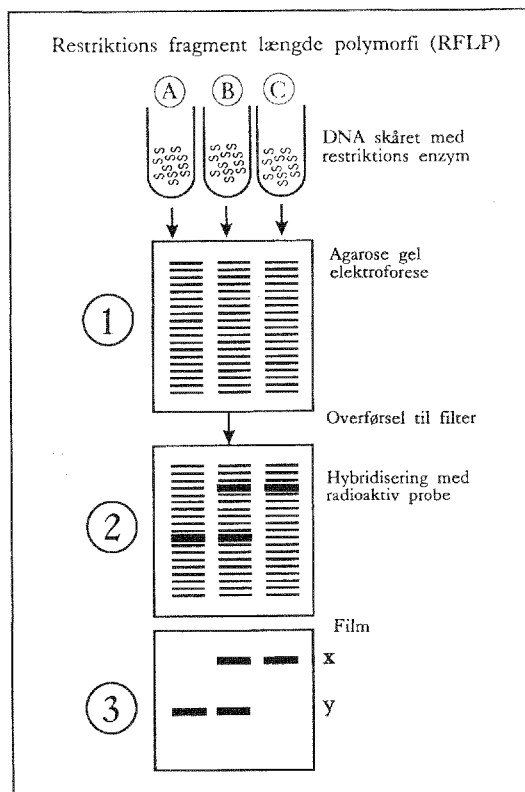
hed i gelen er afhængig af deres størrelse, de små fragmenter vandrer hurtigere end de store fragmenter.

2) Fragmenterne overføres fra gelen til et nylonfilter, denne metode betegnes Southern-blot. Nylonfilteret placeres i et rør med hybridiseringsvæske, som indeholder en radioaktivt mærket DNA-sekvens - en såkaldt *DNA probe*. Det kan f.eks. være DNA-koden for væksthormongen. Da både DNA-fragmenterne på filteret og proben er forbehandlet, således at de er én-strengede DNA-molekyler, vil der ske en sammensmeltning - *hybridisering* - mellem DNA-proben og det/de DNA-fragmenter, der indeholder en DNA-sekvens, som svarer til proben.

3) Efter hybridisering anbringes filteret på en røntgenfilm og den radioaktive probe, som nu er bundet til filteret, vil sværte filmen, således at der fremkommer nogle sorte bånd. Størrelsen af de DNA-fragmenter, der indeholder DNA-sekvenser med samme baserækkefølge som proben, kan herefter aflæses på røntgenfilmen ved hjælp af en størrelsesmarkør.

Hvis der findes forskellige fragmentstørrelser ved undersøgelse af DNA fra forskellige individer, så betegnes det som en *RFLP-polymorfi* (se figur 1). En RFLP-polymorfi er specifik for den undersøgte kombination af probe og restriktionsenzym. Ved at bruge forskellige restriktionsenzymmer, som skærer forskellige steder i DNA'et, kan området i og omkring den udvalgte probe undersøges for RFLP polymorfier.

De hidtidige resultater fra RFLP undersøgelser viser, at RFLP polymorfier kan betragtes som loci, hvis nedarvning følger de kendte Mendelske arvelove. RFLP'er omkring enkelt gener har som regel to alleler, mens RFLP'er omkring repeterede sekvenser som regel har multiple alleler.



Figur 1 Restriktions fragment længde polymorfi (RFLP). (1) DNA fra tre dyr (A, B og C) oprenses og skæres med et restriktionsenzym. DNA-fragmenterne overføres til en gel, hvor de adskilles efter størrelse ved elektroforese. (2) DNA'et overføres til et filter og hybridiseres med en radioaktiv mærket probe, hvorved proben bindes til de fragmenter med DNA sekvenser, der er komplementære til proben. (3) Filteret placeres på en røntgenfilm, og den radioaktive probe sværter filmen så der fremkommer sorte bånd. Dyr A er homozygot YY, dyr B er heterozygot XY og dyr C er homozygot XX.

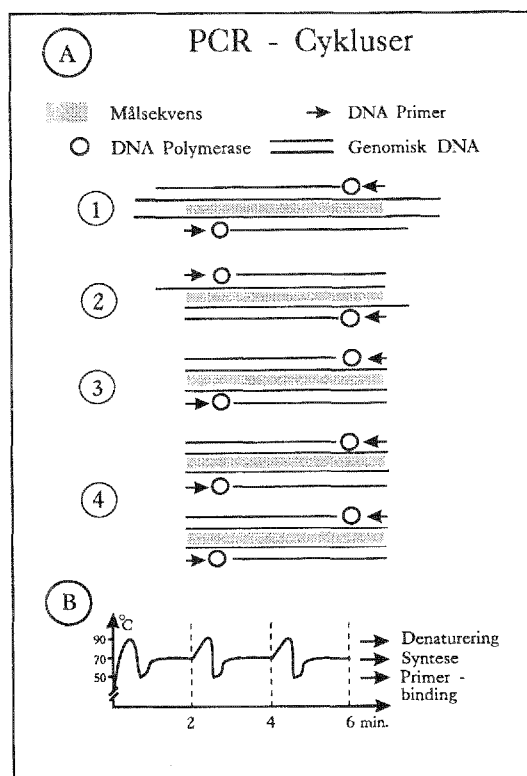
Restriction fragment length polymorphism (RFLP). (1) DNA from three animals (A, B, and C) is purified and digested with a restriction enzyme. The DNA fragments are separated according to their size by gel electrophoresis. (2) The DNA fragments are transferred to a filter and hybridized with a radioactive probe and the probe ties to the fragments with complementary DNA sequences. (3) The filter is put on a X-ray film and the radio-

active probe blacken the film, and black bands appear. Animal A is homozygotic YY, animal B is heterozygotic XY, and animal C is homozygotic XX.

PCR er en forkortelse for *Polymerase Chain Reaction*. PCR-teknikken kan bruges til at opformere DNA-sekvenser af størrelsesordenen 300-2.000 baser. Metoden forudsætter, at man på forhånd kender baserækkefølgen af mindst 20 baser i hver ende af den DNA-sekvens, man ønsker at opformere. Afgrænsning af den DNA-sekvens, der skal opformeres, sker nemlig ved at syntetisere to korte DNA-sekvenser - *primere* - på hver ca 20-30 baser. Primernes baserækkefølge skal være fuldstændig komplementær til baserækkefølgen i hver ende af den DNA-sekvens, som skal opformeres.

Selve opformering er en efterligning af den DNA-kopiering - *replikation*, som sker når en celle deler sig (figur 2). Hele processen sker i et lille rør indeholdende bl.a. genomisk DNA fra det dyr, der skal undersøges for polymorfi, DNA-primere og et enzym - Taq-DNA-polymerase, der kan kopiere DNA. Røret anbringes i et PCR-apparat, hvis eneste funktion er, at det kan programmeres til at udføre en bestemt temperaturcyklus, som derefter gentages ca. 25-45 gange. I hver cyklus fordobles mængden af DNA-kopier af den sekvens, som ønskes opformet. Når PCR reaktionen er fuldført indeholder røret et meget stort antal kopier af det ønskede DNA-fragment. Dette DNA kan bruges direkte som udgangsmateriale til DNA-skæring, og DNA-fragmenterne kan efter farvning ses direkte på en gel.

Til bestemmelse af genotypen for et bestemt locus, f.eks. mælkeproteinet κ -kasein, er det en stor fordel at bruge PCR-teknikken fremfor RFLP-metoden. Fordi PCR genotypning kan laves direkte på blodceller uden forudgående oprensning af cellernes DNA, og hele proceduren kan derfor udføres på én dag. Desuden undgår man brug af radioaktivt materiale, og PCR-metoden har generelt højere repeterbarhed end RFLP-metoden.



Polymerase Chain Reaction (PCR) is a cyclical reaction where a specific DNA sequence (the hatched area) are copied 25-50 times. (A) (1) The target sequence is delimited by two short DNA primers consisting of approx. 25 bases complementary to each end of the target. In the first step is synthesized DNA strands longer than the target sequence. (2) The DNA strands from the previous cycle now serve as template, and therefore the new synthesized DNA strands are equal to the target. (3) DNA strands are synthesized with the DNA strands from the previous cycle as template. (4) In the following cycles the amount of target DNA is doubled. Theoretical the target is amplified to $2^{25} = 33$ mill. copies after 26 cycles. (B) Each cycle consists of three temperature levels. At approx. 94°C the DNA is denaturated and the two DNA strands separated, at approx. 58°C the primers ties to the target DNA, and at approx. 72°C new DNA is synthesized by the DNA polymerase.

Figur 2 Polymerase Chain Reaction (PCR) er en kædereaktion, hvor en bestemt DNA målsekvens (det skraverede felt) kopieres 25-50 gange. (A) (1) Målsekvensen afgrænses af to korte DNA-primere med ca. 25 DNA-baser, som er komplementære til hver ende af målsekvensen. I første trin dannes DNA-strengene, der er længere end målsekvensen. (2) DNA-strengene, der blev dannet i første trin, er nu skabelon for DNA kopieringen, og de DNA-strengene som nu syntetiseres svarer til målsekvensen. (3) DNA-strengene kopieres fra de ny syntetiserede DNA-strengene. (4) I alle efterfølgende cykluser vil mængden af DNA fordobles. Teoretisk bliver der således til $2^{25} = 33$ millioner DNA kopier efter 26 cykluser. (B) Hver cyklus omfatter typisk tre temperaturniveauer. Ved ca. 94°C denatureres DNA'et således at de to strengene adskilles, ved ca. 58°C bindes primere til DNA-strengene, og ved ca. 72°C syntetiseres de nye DNA-strengene af DNA polymerasen.

4 Genetisk variation på DNA niveau

Variation i DNA-sekvenser skyldes mutationer, der kan opstå ved dannelsen af kønsceller. Disse mutationer, som nedarves til afkommet, kan være punktmutationer, insertion eller deletion af en mindre DNA-sekvens eller gentagne kopier af en DNA-sekvens.

Når det gælder bestemmelse af genotyper hos kvæg, så har interessen samlet sig om: 1) Kønsbestemmelse af embryoner. 2) Gener der koder for værdifulde proteiner f.eks. mælkeproteiner. 3) Gener der kunne tænkes at have stor betydning for produktionsegenskaberne f.eks. hormongener. 4) Genmarkører f. eks. mikrosatelitter med høj grad af variation. 5) Gener der koder for arvelige sygdomme.

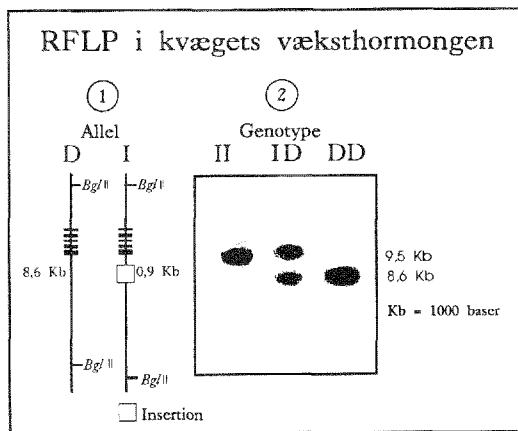
DNA fra én enkelt celle er tilstrækkeligt til at kunne starte en PCR-reaktionen. Det kan f.eks. være et cellesnit fra et kvægembryon. Der er udviklet en PCR procedure til kønsbestemmelse af embryoner (Thomsen et al., 1990). Til denne PCR reaktion bruges Y-kromosom specifikke primere, således at der kun fås et PCR produkt for han-embryoner. Også til bestemmelse af genotypen for mælkeproteinerne κ -kasein og β -laktoglobulin er der udviklet PCR-procedurer (Jørgensen, 1991). Procedurerne er enkle og giver en sikker bestemmelse af genotyperne. Genotypning for mælkeproteiner vil sandsynligvis også kunne foretages på cellesnit fra embryoner samtidig med en kønsbestemmelse af embryonet.

I et Ph.D.-projekt har forfatteren undersøgt for genetisk variation i kvægets væksthormongen.

Undersøgelserne er udført på kalve fra ydelses-selektede linier, og kalvenes væksthormonsekretion er tidligere undersøgt ved fysiologiske funktionsprøver (Løvendahl & Sejrsen 1993). Kvægets væksthormongen er klonet og sekventeret (Woychik et al., 1982; Gordon et al., 1983). Dets størrelse er ca. 1.900 basepar, og det koder for en enkelt proteinkæde på 191 aminosyrer. Undersøgelser af RFLP-polymorfier omkring kvægets væksthormongen fra både udenlandske racer og RDM (Høj et al. 1993a og referencer heri) viser, at der findes to forskellige polymorfier, som forekommer almindeligt i malke racer.

Den ene polymorfi skyldes, at der findes et restriktions skæringssted i 3. intron (ikke-kodende enhed) for et bestemt restriktionsenzym, som har betegnelsen *MspI*. Den anden polymorfi er en *insertion/deletion* af ca 1.000 basepar i det DNA, der ligger umiddelbart efter væksthormongenets kodende sekvens. Startpositionen er ikke præcist fastlagt, men antages at ligge mellem 300 og 1.300 basepar efter den kodende enhed af væksthormongen. De to polymorfier har således ingen indflydelse på aminosyrerækkefølgen i det færdige hormon.

For insertions/deletions polymorfien er anvendt betegnelser I og D for de to alleler, hvilket giver genotyperne II, ID og DD (figur 3). For *MspI* polymorfien er anvendt betegnelserne (+) når *MspI* skæringstedet er intakt og (-) når skæringstedet mangler. Genotypebetegnelserne er da *MspI*(+/+), *MspI*(+/-) og *MspI*(-/-).



Figur 3 Restriktions fragment længde polymorfi (RFLP) i kvægets væksthormongen. (1) Skematisk illustration af de to alleler med angivelse af de fem exons (de kodende enheder) og skæringsstederne for restriktionsenzymet *BglII*. Forskellen mellem de to alleler er sekvensen markeret □, der findes i I-allelen (insertion) og mangler i D-allelen (deletion). (2) Billede af genotypebestemmelse for tre kalve med genotyperne II, ID og DD. D-allelen er ca. 0,9 Kb (dvs. 900 DNA-baser) mindre end I-allelen, og derfor vandrer D-allelen hurtigere end I-allelen ned gennem gelen.

Restriction fragment length (RFLP) in the bovine growth hormone gene. (1) The two alleles, the five exons, and the restriction sites for the BglII enzyme are shown. The difference between the two alleles is the sequence marked □, which appears in the I-allele (insertion) and lack in the D-allele (deletion). (2) Photography of genotyping of three calves of genotype II, ID, and DD. The D-allele is approx. 0,9 Kb less than the I-allele, therefore the D-allele migrates faster than the I-allele through the gel.

Undersøgelse af 58 RDM kalve fra linier selekteret for henholdsvis høj og lav fedtydelse viste at:

1) Dyr med genotype II havde samtidig genotypen *MspI*(+/+), dyr med genotype ID havde samtidig genotypen *MspI*(+/-), og endelig havde genotype DD dyr samtidig genotypen *MspI*(-/-). Der fandtes altså kun to [*I-MspI*(+) og *D-MspI*(-)] ud af fire mulige kombinationer - *haplotyper* - mellem alleler fra de to forskellige polymorfier.

2) Antallet af dyr med de forskellige genotyper af ID-polymorfien er vist tabel 1. Dyr med genotypen ID forekom hyppigst blandt dyrene fra linien selekteret for høj fedtydelse. Blandt 36 dyr fra høj linie fandtes 17 II dyr, 17 ID dyr og to DD dyr. Blandt de 22 dyr fra lav linie var der 20 II dyr og kun to ID dyr.

3) Analyser af sammenhængen mellem I/D polymorfien og væksthormonsekretionen under fysiologiske funktionsprøver viste, at der var en tendens til, at dyr af genotypen II havde en større thyrotropin-releasing hormon (TRH) stimuleret væksthormonsekretion end dyr af genotypen ID (Høj et al. 1993b).

Forskellen i allelfrekvenser mellem de to linier kan skyldes, at selektion for fedtydelse har påvirket den undersøgte I/D polymorfi, *MspI* polymorfi eller anden genetisk variation, der er koblet med de undersøgte polymorfier. En mulig forklaring på sammenhængen mellem insertions/deletions polymorfien og væksthormonsekretionen kunne være, at der er sekvenser i deletions/insertions elementet, som påvirker transkriptionen af væksthormongen.

Table 1 Antal kalve fra høj og lav linie med de forskellige genotyper af ID-polymorfien i 3'-regionen af kvægets væksthormon gen.
Number of calves in the high and the low line with the different genotypes at the insertion(I)/deletion(D) site in the 3'-region of the growth hormone gene in cattle.

Selektions linie <i>Selection line</i>	Genotype <i>Genotype</i>		
	II	ID	DD
Høj <i>High</i>	18	16	2
Lav <i>Low</i>	20	2	-
Alle kalve <i>All calves</i>	38	18	2

Der er også fundet en sammenhæng mellem en RFLP-polymorfi i prolaktinogenet og avlsværdi for ydelse (Cowan et al., 1990). I undersøgelsen fandtes en tyrefader, der var heterozygot for det undersøgte locus. Efterfølgende blev genotypet 26 tyre, som alle var afkom efter denne tyr. En analyse af sammenhængen mellem sønnernes avlsværdi og genotype viste, at der var en signifikant forskel på 293 kg mælk (predicted difference) mellem de to typer af homozygoter.

Repeterede sekvenser har fået en meget stor opmærksomhed samtidig med udvikling af RFLP og PCR teknikkerne. Disse DNA markører inddeles efter størrelsen af den repeterede sekvens:

1) VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) eller såkaldte *minisatellitter* har en repeteret sekvens af 16-64 basepar, som gentages op til ca. 100 gange. Med RFLP teknikken kan minisatellitter bruges til fremstilling af såkaldte DNA-fingerprint. Et individs DNA-fingerprint er unikt og kan bruges til en meget præcis bekræftelse af forældreskab. Hos kvæg er påvist ca. 50 forskellige minisatellitter (Georges & Massey, 1991).

2) *Mikrosatellitter* er to til fire basepar som gentages op til 50 gange. Hos kvæg er der påvist over 100 sådanne sekvenser (Womack, 1991). Det antages, at der findes mere end 150.000 forskellige mikrosatellitter fordelt over hele genomet. I

modsætning til VNTR/minisatellitter er mikrosatellitter væsentlig lettere både at identificere og genotype, da det kan gøres med PCR teknikken.

Der findes flere arvelige sygdomme (f.eks. Muldyrfod, Liggekalve, Weaver og RVC) hos kvæg, som skyldes et enkelt recessivt arveanlæg. Dyr med dobbelt recessivt anlæg (homozygoter) kan erkendes klinisk, hvorimod anlægssbærere (heterozygoter) kun kan udpeges ved testparinger, hvilket både er langsommeligt, arbejdskrævende og dyrt.

En nylig påvist arvelig sygdom hos sortbroget kvæg (SDM) er Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD), som skyldes en ændring af et glycoprotein, der findes på overfladen af neutrofile granulocytter (Nielsen et al., 1992 og referencer heri). Afficerede kalve har et dårligt fungerende immunsystem, hvilket medfører infektioner og utrivelighed i en sådan grad, at de dør i løbet af første leveår.

Der er i USA udviklet en PCR teknik, der kan påvise anlægssbærere af denne sygdom. Mange af de mest brugte importtyre af Holstein Friesian racen har vist sig at være bærere af denne sygdom, men muligheden for at påvise anlægssbærere ved en simpel genteknologisk test gør, at spredning af det recessive anlæg meget nemt kan forhindres.

Der er således iværksat test for BLAD af alle danske SDM-avlstyre, som har en kendt BLAD-bærer i afstamningen. I perioden 1991-92 blev der udført test for BLAD på Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Sektion for Husdyrgenetik. Ved test af 405 avlstyre blev 208 tyre identificeret som

bærere af BLAD (Jørgensen et al., 1993). Til test for Weaver er nylig identificeret en mikrosatellit, som er meget tæt koblet til Weaver-genet (Georges et al., 1993). Det giver mulighed for at foretage test af eventuelle bærere af Weaver.

5 Enkelt gener af betydning for husdyr

Klassiske eksempler på enkelt gener hos husdyr er genet for hornløshed, genet for dobbelt muskulatur hos Blåhvidt belgisk kvæg og genet for Halothan følsomhed hos svin. Der er i de sidste 30-40 år lavet mange undersøgelser af potentielle genmarkører som f.eks. blodtyper, vævstyper og mælkeproteiner og disses sammenhæng med kvantitative egenskaber.

Den klassiske danske undersøgelse er lavet af Neimann-Sørensen og Robertson (1961), de fandt ingen sammenhæng mellem blodtype markører og mælkeproduktionsegenskaber. Resultaterne af mange senere undersøgelser har været både positive og negative og ofte modstridende. Konklusionen på disse undersøgelser må være, at de klassiske genmarkører ikke er anvendelige som selektionsredskab for kvantitative egenskaber. En væsentlig årsag til denne konklusion er, at der er for få markører, og at de ikke ligger spredt ud over hele genomet. F.eks. ligger hele vævstypekomplekset (BoLa) på samme kromosom.

Loci med en større effekt på kvantitative egen

skaber betegnes ofte QTL'er (Quantitative Trait Loci). En statistisk analyse af den arvelige sygdom Weaver hos Amerikansk Brunkvæg har vist, at der er en kobling mellem Weaver locuset og et eller flere QTL'er for fedt- og mælkeydelse (Hoeschele & Meinert, 1990). Køer, der var bærere af Weaver genet (heterozygoter), havde således en genetisk overlegenhed på 26 kg fedt og 674 kg mælk.

På længere sigt skal det vise sig om den mikrosatellit, som er koblet med Weaver locuset (Georges et al., 1993) eventuelt sammen med andre mikrosatellitter, kan bruges til at lokalisere og identificere Weaver locuset, og derefter finde det protein/enzym, som forårsager sygdommen. Samtidig vil eventuelle QTL'er koblet til Weaver locuset kunne undersøges. Undertiden bruges betegnelsen *revers genetik* om princippet for identifikation af gener udfra markører. Metoden har været anvendt med stor succes i human genetikken til at finde gener for arvelige sygdomme bl.a. cystisk fibrose.

6 Diskussion

Som det fremgår af de foregående afsnit er der en utrolig stor genetisk variation på DNA niveau. Denne variation findes dels omkring enkelt gener, hvoraf ca. 100 er kortlagt hos kvæg (Fries, 1990), dels i det ikke-kodende DNA, hvor især mikrosatellitterne udviser høj grad af polymorfi. Metoderne til påvisning og genotypning af såvel enkelt gener som DNA markører er veludviklede, og især PCR teknikken gør typning af enkelt individer hurtig, enkel og repeterbar.

Når det gælder undersøgelse af DNA markører må det understreges, at netop udviklingen af PCR teknikken og opdagelsen af mikrosatellitterne har betydet kolosale fremskridt for mulighederne for at få udarbejdet et genkort med markører, som dækker hele genomet. Det må anses for en overkommelig opgave, også selvom der skal findes mere end 300 markører for at opnå en jævn fordeling af markørerne over genomet. Det må anses for realistisk, at forvente at et sådant genkort er til rådighed for kvæg om ca. 5 år.

Markør selektion, MAS (Marker assisted selection), kan tænkes anvendt til pre-selektion af potentielle avlsdyr eller i kombination med traditionel avlsværdiurdering. Der er lavet mange simuleringstudier til analysering af de avlsmæssige konsekvenser af MAS. Resultaterne viser en øget genetisk fremgang på mellem 0 og 30% stærkt afhængig af:

1) Sammenhængen mellem markører, QTLer og den undersøgte kvantitative egenskab, 2) heritabiliteten og genetisk variation for den kvantitative egenskab, 3) indavlsdepression, 4) den anvendte avlsplan (konventionel, intensiv ægtransplantation dvs. MOET eller linicavl) (Smith et al. 1991 og referencer heri).

For egenskaber med høj arvbarhed ($h^2 > 0.25$) er fordelene ved MAS begrænset. Men egenskaber med lav heritabilitet får stadig højere prioritet i kvægavlen f.eks. sygdomsresistens og frugtbarhed, og disse egenskaber kan kun i begrænset omfang forbedres gennem det konventionelle avlsarbejde.

Identifikation af DNA markører for sygdomsresistens kan blive en mulighed for netop dansk kvægavl, idet den systematiske registrering af sygdoms-

forekomst kan give det nødvendige datagrundlag for identifikation af sådanne DNA markører.

Foruden test for arvelige sygdomme vil DNA markører kunne bruges til identifikation af gener, der måske ikke er direkte anvendelige i avlsarbejdet, men som kan give indsigt i det biologiske grundlag for kvægets produktionsegenskaber. På samme måde kan undersøgelser af den arvelige variation omkring enkelt gener som f. eks. væksthormongenet eller andre gener, hvis produkter har en kendt fysiologisk effekt, medvirke til at beskrive genreguleringen hos vore husdyr.

Der er som omtalt udviklet enkle og sikre PCR procedurer til bestemmelse af forskellige mælkeproteinvarianter. Det avlsmæssige udbytte ved selektion for B-varianten af κ -kasein, er afhængig af flere delvist uafklarede forhold som merværdien af κ -kasein BB-mælk og sammenhængen med andre arvelige egenskaber. Den avlsmæssige fremgang vil være afhængig af bl.a. frekvensen for B-varianten i udgangspopulationen og den valgte selektionsstrategi (Pedersen, 1990). Endelig bør man være opmærksom på det forhold, at selektion for en bestemt allel kan medføre en fiksering af den genetiske variation omkring det udvalgte gen.

Transgene husdyr har været meget i fokus, og der er gennem de sidste 6-7 år lavet forsøg med overførsel af ekstra kopier af væksthormongenet til grise, får og kvæg. Til disse forsøg er brugt fusionsgener, dvs. at promotoren ikke er den naturlige promotor for væksthormongenet, men fra et andet gen (f.eks. metallothionin, et gen der er aktivt i bl.a. leverceller).

Pursel et al. (1989) konkluderer ud fra de hidtidige forsøg med transgene grise, at der opnås en betydelig del af de velkendte effekter af øget væksthormon produktion, bl.a. at dyrene vokser hurtigere og kød/fedtforholdet stiger. Men dyrene får en lang række alvorlige sygdomme som mavesår, ledbetændelse og nyresygdomme, hvilket sandsynligvis skyldes, at den normale regulering af væksthormonsekretionen ikke fungerer, således at dyrene producerer enorme mængder væksthormon. Desuden produceres væksthormon i nogle organer, der normalt ikke producerer væksthormon.

Den nuværende viden om genregulering hos husdyr er utilstrækkelig til en forsvarlig udnyttelse af teknikkerne til frembringelse af transgene dyr til brug i kvægavlen. Derimod synes der at være acceptable resultater med transgene dyr, der i mælkekirtlerne kan producere f.eks. blodfaktorpræparater til medicinsk anvendelse. Ganske få transgene dyr vil måske om få år kunne producere, hvad der svarer til hele verdens forbrug af blødermedicen. Dog kan det være, at de transgene dyr inden da bliver udkonkurreret af transgene cellekulturer, idet der også synes at være en gode resultater fra forskningen i cellekulturer med eukaryote celler.

Genteknologisk forskning stiller store krav til investeringer, laboratoriefaciliteter samt dataindsamling og analysering. Derfor må det ske i et internationalt samarbejde. Men det forudsætter en

veltilrettelagt national genteknologisk forskningsindsats for husdyr.

Erfaringerne fra det Bioteknologiske Forskningscenter for Husdyrbrug og Husdyrsundhed viser, at for mange små projekter vanskeligt kan give det nødvendige forskningsmæssige løft og en rimelig ressourceudnyttelse. Både de gode og de dårlige erfaringer fra det hidtidige arbejde bør derfor komme den fremtidige planlægning af genteknologisk husdyrbrugsforskning til gode.

Der er mange gode perspektiver for genteknologiens anvendelse i kvægavlen. Det gælder både en videreudvikling af avlsarbejdet, men også mulighederne for at få en øget basalviden om kvægets produktionsegenskaber, som er vigtig for at imødekomme samfundets stigende krav til en forsvarlig husdyrproduktion.

Litteratur

- Cowan, C.M., Dentine, M.R., Ax, R.L. & Schuler, L.A. 1990. Structural variation around prolactin gene linked to quantitative traits in an elite Holstein sire family. *Theoretical and Applied Genetics* 79, 577-82.
- Fries R. 1990. The bovine gene map. ETH-Zentrum. Zürich.
- Georges, M. & Massey, J.M. 1991. Velogenetics, or the synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology* 35, 151-159.
- Georges, M., Dietz, A.B., Mishra, A., Nielsen, D., Sargeant, L.S., Sorensen, A., Steele, M.R., Zhao, X., Leipold, H., Womack, J.E. & Lathrop, M. 1993. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of an associated quantitative trait locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1058-1062.
- Gordon, D.f., Quick, D.P., Erwin, C.R., Donelson, J.E. & Maurer, R.A. 1983. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 33, 81-95.
- Hoeschele, I. & Meinert, T.R. 1990. Association of genetic defects with yield and type traits: the Weaver locus effect on Yield. *J. Dairy Sci.* 73, 2503-2515.
- Høj, S., Fredholm, M. Larsen, N.J. & Nielsen, V.H. 1993a. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim. Genet.* 24, 91-96
- Høj, S., Løvendahl, P. & Sejrsen, K. 1993b. Growth hormone gene polymorphism related to growth hormone release in calves selected for milk fat yield. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Anim Sci.* (Accepted).
- Jørgensen, C.B. 1991. κ -kasein- og β -laktoglobulin-genotypning af kvæg med PCR-metoden. Hovedopgave, Den Kgl. Veterinær og Landbohøjskole, Inst. for husdyrbrug og husdyrsundhed. 81 pp.
- Jørgensen, C.B., Agerholm, J.S., Pedersen, J. & Thomsen, P.D. 1993. Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency in Danish Holstein-Friesian Cattle. *Acta Vet. Scand.* (Accepted).
- Løvendahl, P. & Sejrsen, K. 1993. Growth hormone release in calves selected for milk fat yield. *Anim. Prod.* (Accepted).
- Neimann-Sørensen, A. & Robertson, A. 1961. The association between blood groups and several production characteristics in three Danish cattle breeds. *Acta Agric. Scand.* 11, 163-196.
- Nielsen, J.S., Jørgensen, C.B. & Thomsen, P.D. 1992. Bovine leukocyte adhesion deficiency syndrome. *Dansk Vet.Tidsskr.* 75, 276-277.
- Pedersen, J. 1990. Selektion for højere frekvens af kappa-kasein variant B hos malkekøer. 687. Beretning fra Statens Husdyrbrugsforsøg. 29pp.
- Pursel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., Bolt, D.J., Campbell, R.G., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. & Hammer, R.E. 1989. Genetic engineering of Livestock. *Science* 244, 1281-1288.
- Sejrsen, K. 1989. Genteknologi i dansk husdyrbrug. Alt det Nyeste, pp 70-77. Jordbrugsforlaget, København.
- Smith, C., Van Arendonk, J.A.M. & Thompson, R. 1991. Possible uses of genetic markers in selection programs in cattle. 42nd Annual Meeting of the EAAP 1991, Berlin. 14pp.
- Thomsen, P.D., Avery, B., Poulsen, P.H. & Jørgensen, C.B. 1990. Hurtigmatte til kønsbestemmelse af kvægembryoner ved PCR. *Dansk VetTidsskr.* 73, 633-637.

Womack, J.E. 1991. State of the art on techniques and available genetic markers in cattle. 42nd Annual Meeting of the EAAP 1991, Berlin. 8pp.

Woychik, R.P., Camper, S.A., Lyons, R.H., Horowitz, S., Goodwin, E.C. & Rottman, F.M. 1982. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. Nucl. Acids Res. 10, 7197-210.