



Panel komórek hybrydowych stworzony na bazie napromieniowanych komórek – nowoczesna metoda mapowania fizycznego genomu świni

Agnieszka Korwin-Kossakowska, Jolanta Kurył

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec

Radiation Hybrid Panel – modern method for physical mapping of porcine genome

Summary

The creation of high-resolution maps is central to genetics: maps allow genes to be associated with phenotypes and can be used as tools for gene cloning. Maps for the human genome and other mammalian species are being created both by classical recombination methods and by physical mapping techniques. One powerful method for creating physical maps is the use of irradiation and fusion gene transfer (IFGT) to make radiation hybrid maps. Goss and Harris who showed that chromosome fragments, generated by lethal irradiation of donor human cells, could be “rescued” by fusion to rodent recipient cells originally developed this technology. Each resulting hybrid cell, which includes both hamster and human DNA, can be grown up to yield a hybrid cells or hybrid cell line of cells containing the same random subset of the human genome. A radiation hybrid panel (RH) consists of a number of different hybrid cell lines (sometimes just called hybrids or clones). The recombinant clone is tested for the presence or absence of each DNA marker (for example microsatellites). By estimating the frequency of breakage, and thus the distance between markers, it is possible to determine their order along chromosome. The successful use of RH panels to map the human genome has led to the development of WG-RH (whole genome radiation hybrid) maps in other species, for example of the porcine genome. This map provides a resource for rapid, large scale physical mapping of the swine genome and facilitates resolving genetic and physical distances prior to designing strategies for positional candidate cloning of the gene(s) contributing to economically important traits. WG-RH panels have now been used to create chromosomal maps in several species: rat, horse, bovine, cat, dog and mouse.

Adres do korespondencji

Agnieszka
Korwin-Kossakowska,
Instytut Genetyki
i Hodowli Zwierząt
Polska Akademia Nauk,
Jastrzębiec,
05-552 Wólka Kosowska;
e-mail:
a.kossakowska@ighz.pl

biotechnologia

3 (66) 184–192 2004

Key words:

genome mapping, radiation, hybrid panel, pig.

1. Wstęp

Jednym z centralnych zadań genetyki jest tworzenie wysoko rozdzielczych map genetycznych człowieka i innych ssaków. Umożliwia to charakterystykę specyficznych rejonów genomu, pozwalając znaleźć powiązanie genów, a właściwie ich produktów z fenotypem. W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp w mapowaniu genomu człowieka. Strategia, technika, i rozwój różnorodnych metod powstałych przy pracach nad ludzkim genomem są wykorzystywane do tworzenia map genetycznych zwierząt gospodarskich i mapowania QTL (*Quantitative trait loci* – loci cech ilościowych) związanych z kompleksem cech ważnych z ekonomicznego punktu widzenia (ETL – *economically important trait loci*). Mapy genomu człowieka oraz innych organizmów są tworzone dwiema drogami: klasyczną metodą rekombinacji (mapy genetyczne, sprzężeniowe) oraz technikami mapowania fizycznego (1).

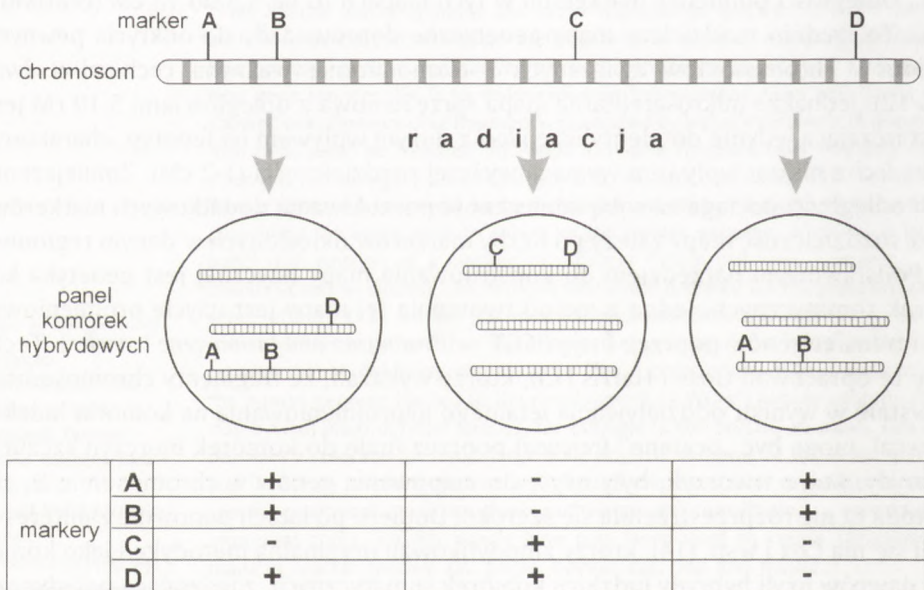
Mapa genetyczna powstaje na bazie częstości występowania rekombinacji i jest otrzymywana w wyniku analiz sprzężeniowych polimorficznych markerów. Podczas pierwszej połowy lat dziewięćdziesiątych opracowano kilka genetycznych map sprzężeniowych świni (2-4). Ogromny zbiór danych opublikowany przez Rohrera i wsp. (5), łączący 1042 markery, z których 996 to były mikrosatelity, zintegrował wszystkie wcześniejsze mapy genetyczne, ale nie dał wystarczającej informacji (odpowiedniej liczby markerów) dla efektywnej, wysoko rozdzielczej mapy kompleksu loci związanych z cechami ważnymi gospodarczo. Od połowy lat dziewięćdziesiątych badacze zaczęli używać tych średnio gęstych map do skanowania genomu pod kątem QTL. Odległości pomiędzy markerami w tych mapach to od 5,5 do 13 cM (centiMorgan). Te średnio rozdzielcze mapy genetyczne doprowadziły do odkrycia pewnych regionów chromosomów związanych z ekonomicznie ważnymi cechami u świń (3,6-12). Jednakże mikrosatelitarna mapa sprzężeniowa z odległościami 5-10 cM jest wystarczająca jedynie do identyfikacji loci z dużym wpływem na fenotyp, charakterystyka loci z niskim wpływem wymaga wyższej rozdzielczości (1-2 cM). Zmniejszenie tych odległości pociąga za sobą konieczność poszukiwania dodatkowych markerów, gdyż rozdzielczość mapy zależy od liczby markerów określonych w danym regionie.

Podstawowym narzędziem do konstruowania mapy fizycznej jest genetyka komórek somatycznych. Jedną z metod tworzenia tej mapy jest użycie promieniowania i transfer genów poprzez fuzję (IFGT – *irradiation and fusion gene transfer*). Technikę tę opracowali Goss i Harris (13), którzy wykazali, że fragmenty chromosomów powstałe w wyniku oddziaływania letalnego napromieniowania na komórki ludzkie (dawca), mogą być „ocalone” (*rescued*) poprzez fuzję do komórek biorczyń szczura. Hybrydy, które stworzyli, były użyte do mapowania genów w chromosomie X, ale metoda ta nie rozprzestrzeniła się szeroko. Dopiero po latach ponownie zainteresowali się nią Cox i wsp. (14), którzy zmodyfikowali oryginalną metodykę i jako komórek dawców użyli hybrydy ludzkich komórek somatycznych, zawierające pojedyncze ludzkie chromosomy. Powstał w ten sposób panel komórek hybrydowych RH (*Radiation Hybrid Panel*).

2. Panel komórek hybrydowych stworzony na bazie napromieniowanych komórek

Panel ten jest używany od 1990 r. i wykorzystywany do konstruowania mapy fragmentów chromosomów. Komórki ludzkie poddano działaniu promieni gamma, które rozbijają każdy chromosom na przypadkowe fragmenty. Fragmenty te są później „ocalone” poprzez fuzję ludzkich komórek ze zdrowymi komórkami chomika. Pozwala to na połączenie przypadkowych fragmentów ludzkiego DNA z chromosomami chomika. Każda uzyskana komórka hybrydowa, zawierająca obydwa fragmenty DNA – chomika i człowieka, może rosnąć jako linia komórek zawierających ten sam przypadkowy fragment ludzkiego chromosomu (zwana linią komórek hybrydowych lub klonem). Klony te mogą zawierać jeden lub wiele fragmentów ludzkich chromosomów lub też nie zawierać ich w ogóle. Tak zrekombinowany klon jest testowany na obecność lub brak wybranego markera DNA, np. mikrosatelity (15). Informacja na temat obecności lub braku markerów w panelu komórek hybrydowych jest użyta do szacowania odległości między nimi.

Założeniem jest, że fragmenty chromosomów indukowane promieniowaniem powstają przypadkowo (rys. 1). Obserwując parę markerów A i B, położonych blisko siebie w chromosomie, przyjmuje się, że promieniowanie nie wywoła pęknięcia chromosomu pomiędzy nimi. Równocześnie prawdopodobieństwo, że te dwa mar-



Rys. 1. Fragment chromosomu z markerami A, B, C i D w panelu komórek hybrydowych wg Slonim i wsp. (15).

kery znajdują się w różnych fragmentach DNA jest bardzo małe, proporcjonalne do dystansu pomiędzy nimi. Jeżeli *loci* markerowe są położone blisko siebie w chromosomie, to są one „zatrzymywane” w tym samym fragmencie, co oznacza, że hybryda zawiera albo obydwie albo nie zawiera żadnego z markerów. Przeciwnie dzieje się z markerami położonymi w znacznej odległości. Wówczas fragmenty zawierające markery B i C są zatrzymywane niezależnie przez wiele komórek hybrydowych.

Zadaniem badaczy jest zrekonstruowanie pozycji markerów w oryginalnym chromosomie znając jedynie „częstość zatrzymania” (*retention frequency*) w panelu komórek. Częstość pojawiania się przerw pomiędzy parami markerów w panelu 100-200 niezależnych linii hybrydowych, pozwala ustalić pozycję markerów i zmierzyć dystans między nimi (16). Rozdzielczość RH panelu jest funkcją wielkości fragmentów, które mają związek z dawką napromieniowania. Proces konstruowania mapy markerów RH jest podzielony na dwa etapy: część eksperymentalną (napromieniowanie, fuzja) oraz część analityczną (identyfikacja markerów) o charakterze matematycznym, opartą na algorytmach.

Sukcesy w zastosowaniu RH panelu do tworzenia mapy genomu człowieka WG-RH (*Whole Genome Radiation Hybrid Map* – mapa genomu stworzona na bazie komórek hybrydowych) dały podwaliny do tworzenia map innych gatunków zwierząt.

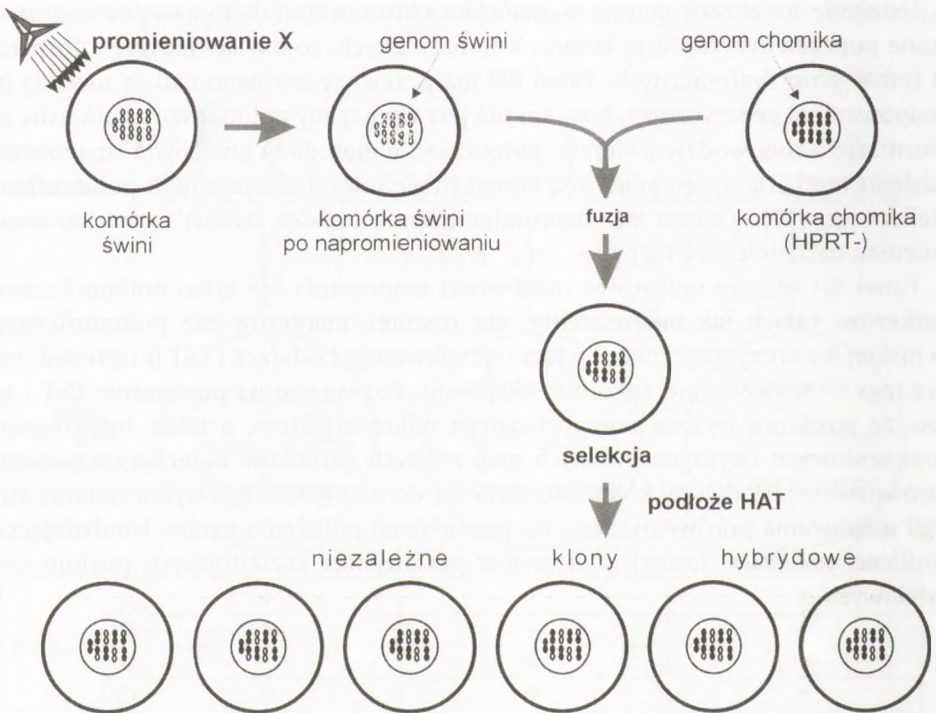
Ustalenie lokalizacji genów w świńskim chromosomie było zasadniczo prowadzone poprzez hybrydyzację komórek somatycznych, co dawało jedynie informację na temat grup syntenicznych. Panel RH ma przewagę zarówno nad tą metodą jak i mapowaniem genetycznym, bowiem nie jest wymagany polimorfizm markerów ani informacje o rodowodzie zwierząt. Jednocześnie metoda ta umożliwia zmapowanie każdego markera w genomie, bez konieczności uwzględniania jego polimorfizmu allelicznego (17). Zmiana siły napromieniowania (dawka radów) może natomiast zmieniać rozdzielczość mapy.

Panel RH oferuje unikatowe możliwości mapowania nie tylko polimorficznych markerów, takich jak mikrosatelity, ale również markerów nie polimorficznych i o niskiej heterozygotyczności, włączając sekwencje kodujące i EST (*Expressed sequence tags* – sekwencyjne znaczniki ekspresji). Pozwala to na powiązanie EST i genów ze strukturą wysoce polimorficznych mikrosatellitów, a także integrowanie sprzężeniowych i cytogenetycznych map różnych gatunków zwierząt (mapowanie porównawcze). W dalszej kolejności dąży się do maksymalnego wykorzystania strategii mapowania porównawczego do poszukiwań położenia genów kandydujących (*positional candidate cloning*) czyli genów potencjalnie kształtujących poziom cech ilościowych.

3. Panel komórek hybrydowych świni domowej skonstruowany we współpracy INRA (Francja) i Uniwersytetu w Minnesocie (USA)

3.1. Powstanie panelu

Wykonano 10 eksperymentalnych fuzji z użyciem diploidalnych komórek fibroblastów lub limfocytów świni. Komórki poddano działaniu promieni rentgenowskich o sile 6000 lub 7000 radów, w zależności od przeprowadzanego doświadczenia (rys. 2). Nastąpiła fuzja limfocytów (fibroblastów) z komórkami Wg3hC12 chomika, pozbawionymi możliwości syntetyzowania fosforybozylotransferazy hipoksantynowej (HPRT), w obecności glikolu polietylenowego (PEG). Następnie komórki umieszczono w medium RPMI z HAT (hypoxantyna, aminopteryna, thymidyna). Medium to umożliwia usunięcie z hodowli komórek drugiego komponentu (chomika) i dokonuje selekcji hybrydów, które zatrzymują gen HPRT. Po wyselekcjonowaniu komórek hybrydowych w trakcie ich dalszej hodowli następują charakterystyczne zmiany w ich genomie, polegające na tym, że chromosomy jednego komponentu



Rys. 2. Schemat oddziaływania promieniowania na genom świni i transfer genów poprzez fuzję wg Walter i wsp. (1).

komórkowego podlegają stopniowej eliminacji (18). Następnie w ciągu 10-15 dni po fuzji poszczególne kolonie umieszczano w osobnych hodowlach, aby stworzyć panel niezależnych klonów hybrydowych. Dla każdego wyselekcjonowanego klonu wyekstrahowano DNA i utrzymywano je w ciekłym azocie (19).

3.2. Ekstrakcja DNA

Każdy klon hybrydowy hodowano w kilku powtórzeniach w celu uzyskania większej ilości DNA, które izolowano zgodnie z procedurą Gross-Belard (20). Poszczególne hybrydy zawierały 2-8 mg DNA. Zawartość tych klonów hybrydowych została scharakteryzowana metodą hybrydyzacji fluorescencyjnej *in situ* – FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) z fragmentami SINE (*Short Interspersed Nucleotide Elements* – krótkie rozproszone elementy nuklotydowe) lub metodą syntezy *in situ* z użyciem oligonukleotydów PRINS (*Primed In Situ Labeling*). Dodatkowo 32 markery mikrosatelitarne o znanym położeniu w chromosomie i jeden marker typu EST były użyte do szacowania „częstości zatrzymania” w każdym klonie hybrydowym.

3.3. Tworzenie mapy RH za pomocą panelu komórek hybrydowych

Drugi etap, szacunkowy, ma na celu ustalenie właściwej kolejności położenia markerów w chromosomie bazując na ich częstości występowania w poszczególnych klonach i oszacowaniu odległości między nimi. Pierwszy program mający na celu tworzenie świńskiej mapy RH został zainicjowana przez Hawken i wsp. (21). Mapa ta została skonstruowana przy użyciu programów komputerowych RHMAP i MAPMAKER (22). Początkowo, na podstawie lokalizacji markerów w genetycznej mapie sprzężeniowej Rohrer'a (5), przydzielono je do grup chromosomowych. Za pomocą programu komputerowego RH2PT z pakietu RHMAP 3.0 markery te umiejscowiono w grupach sprzężeniowych. Wartość współczynnika *lod score* $\geq 4,8$ przyjęto za wskazującą na sprzężenie *loci* markerów. Dystans między markerami wyrażano w cR (centiRay). Dystans 1 cR_N między dwoma markerami odpowiada 1% częstości przerwania chromosomu pomiędzy nimi w wyniku ekspozycji na odpowiednią dawkę promieni X (N = dawka napromieniowania w radach) (21). Zależność między odległością w cR i faktycznym dystansem genetycznym, wyrażonym w cM (centiMorgan), zależy od dawki radiacji (1 cM = 10 cR₃₀₀₀). Analizę wielopunktową i ustalanie położenia markerów dokonywano przy użyciu programu komputerowego RHA-MXLIK, z pakietu RHMAP 3.0. Ponieważ nie zaobserwowano istotnie wyższej częstości zatrzymania fragmentów chromosomów w rejonach centromerowych i telomerowych, użyty został model równej częstości.

Z początkowej liczby 126 linii hybrydowych uzyskanych w wyniku doświadczeń ostatecznie pozostało 118, bowiem 8 klonów z częstością zatrzymania <9% wyeli-

minowano z panelu. Do mapowania użyto 903 markery, głównie mikrosatelity, ale również ESTs i 49 genów. Otrzymano wyniki dotyczące 757 markerów (84%) włączając w to 19 EST i 39 genów. Pozostałych 146 markerów (16%) wyłączono z badań z różnych przyczyn (brak amplifikacji świńskiego DNA, amplifikacja wieloprzątkowa lub amplifikacja DNA chomika). Średnia częstość zatrzymania dla 757 markerów wyniosła 29,3%. Najwyższą częstość (95%) zaobserwowano w chromosomie X dla dwóch markerów: Sw3137 i Sw707. Jednocześnie rozdzielczość mapy (średnia odległość pomiędzy markerami) była dosyć wysoka i wynosiła 35-37 cR (21).

Mapy RH tworzą również doskonałe bazy do mapowania porównawczego, pozwalając na identyfikację regionów homologicznych w strukturze genomu między gatunkami. Mapowanie porównawcze pokazuje jak konserwatywna jest organizacja genomu ssaków. Jest również narzędziem wykorzystywanym do przewidywania lokalizacji w chromosomie genów homologicznych u różnych gatunków zwierząt i człowieka, a ponadto u zwierząt gospodarskich, jako metoda selekcjonowania genów kandydujących, odpowiedzialnych za wzrost wydajności cech istotnych z ekonomicznego punktu widzenia. Moc mapowania porównawczego wzrasta wraz z rozdzielczością map.

Mapa WG-RH została również użyta do zlokalizowania 1058 świńskich ESTs. Mapa ta odsłania istnienie korespondujących ze sobą regionów pomiędzy genomami człowieka i świni, zidentyfikowanych wcześniej metodą malowania chromosomów. Znalaziono nowe rejony homologiczne i przeszerogowano markery względem uporządkowania istniejącego u człowieka oraz podniesiono rozdzielczość mapy. Po raz pierwszy stwierdzono również, że istnienie regionów „bogatych” w geny i „ubogich” jest konserwatywne zarówno w genomie człowieka jak i świni (23).

Zebranie informacji na temat mapowania porównawczego pomiędzy genomem człowieka i świni jest użyteczne dla zrozumienia ewolucyjnych zależności pomiędzy tymi dwoma genomami (24).

Po 2000 r. powstał panel skonstruowany przez badaczy japońskich (25), przy użyciu siły napromieniowania 5000 radów, ze zmapowanymi 842 mikrosatelitami oraz panel RH świni drugiej generacji skonstruowany we Francji w 2002 r., przy użyciu 12 000 radów, będący uzupełnieniem poprzedniego (26). Nowo skonstruowany panel jest doskonałym źródłem tworzenia mapy o czterokrotnie wyższej rozdzielczości niż poprzednia (12-14 kb/cR), ze średnią częstością zatrzymania markerów 35,4%. Dotychczas określono położenie m.in. 27 markerów w rejonie występowania genu RN w chromosomie 15, jednak ogólna liczba markerów zmapowanych w trzech interesujących regionach nie jest duża i wynosi około 100. Aktualnie uruchamiany zostaje w Newadzie (USA) program mapowania na bazie tego panelu, jednak planowana ilość markerów nie jest dokładnie znana (Martine Yearle 2003, informacja ustna).

Poza mapami pełnego genomu prezentowano również wiele badań dotyczących indywidualnych chromosomów świni (9,27,28). Szczególnie interesujące jest stworzenie mapy chromosomu 6 obejmującej rejon występowania genu RYR1 (29), waż-

ny z ekonomicznego punktu widzenia oraz jego analiza porównawcza z homologicznym rejonem chromosomu 19 człowieka.

Panele genomu stworzone na bazie napromieniowanych komórek są używane aktualnie do tworzenia map chromosomowych nie tylko człowieka (30-32) i świni, ale również kilku innych gatunków zwierząt: szczura (33-35), myszy (36,37), konia (38,39), bydła (40,41), psa (42-44) i kota (45). Szczegółowe informacje na temat aktualnie istniejących map RH są dostępne na stronie internetowej:

<http://compgen.rutgers.edu/rhmap/>.

Literatura

1. Walter M., Spillett D. J., Thomas P., Weissenbach J., Goodfellow P. N., (1994), *Nature Genet.*, 7, 22-28.
2. Ellegren H., Chowdhary B. P., Johansson M., Marklund L., Freedholm M., Gustavsson I., Andersson L., (1994), *Genetics*, 137, 1089-1100.
3. Rohrer G. A., Alexander L. J., Keele J. W., Smith T. P., Beattie C. W., (1994), *Genetics*, 136, 231-245.
4. Archibald A. L., Haley C. S., Brown J. F., Couperwhite S., McQueen H. A., et al., (1995), *Mamm. Genome*, 6, 157-175.
5. Rohrer G. A., Alexander L. J., Hu Z., Smith T. P. L., Keele J. W., Beattie C. W., (1996), *Genome Res.*, 6, 371-391.
6. Andersson L., Haley C. S., Ellegren H., Knott S. A., Johansson M., Andersson-Eklund L., Edfors-Lilja T., Fredholm M., Hansson I., Akansson J., Lundstrom K., (1994), *Science*, 263, 1771-1774.
7. Milan D., Bidanel J. P., Le Roy P., Chevalet C., Woloszyn N., Caritez J. C., (1998), *Proceedings of 6th Word Congres of Genetics Applied to Livestock Production*, 26, 414-417.
8. Paszek A. A., Beattie C. W., Flickinger G. W., Wilkie P. J., Schook L. B., (1998), *Proceedings of 6th Word Congres of Genetics Applied to Livestock Production*, 26, 418-421.
9. Robic A., Jeon J. T., Rey V., Amarger V., Chardon P., Looft C., Andersson L., Gellin J., Milan D., (2001), *Mamm. Genome*, 12, 380-386.
10. Rohrer G. A., Keele J. W., (1998a), *J. Anim. Sci.*, 76, 2247-2254.
11. Rohrer G. A., Keele J. W., (1998b), *J. Anim. Sci.*, 76, 2255-2262.
12. Wilkie P. J., Paszek A. A., Flickinger G. H., Rohrer G. A., Alexander L. J., Beattie C. W., Schook L. B., (1996), *25th Internat. Conf. Anim Genet. Anim. Genet.*, 27 (Suppl.2), 117.
13. Goss S. J., Harris H., (1975), *Nature*, 255, 680-684.
14. Cox D. R., Burmeister M., Price E. R., Kim S., Myers R., (1990), *Science*, 250, 245-250.
15. Slonim D., Kruglyak L., Stein L., Lander E., (1997), *J. of Comp. Biol.*, 4, (4), 487-504.
16. Boehnke M., Lange K., Cox D., (1991), *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 1174-1188.
17. Amaral M. E. J., Kata S. R., Womack J. E., (2002), *Genome*, 13, 268-271.
18. Świtoński M., (1992), *Biotechnologia*, 1 (16), 76-84.
19. Yerle M., Pinton P., Robic A., Alfonso A., Palvadeau Y., Delcros C., Hawken R., Alexander L., Beattie C., Schook L., Milan D., Gellin J., (1998), *Cytogenet. Cell Genet.*, 82, 182-188.
20. Gross-Belard M., Oudet P., Chambon P., (1973), *J. Biochem.*, 36, 32-38.
21. Hawken R., Murtaugh J., Flickinger G., Yerle M., Robic A., Milan D., Gellin J., Beattie C., Schook L. B., Alexander L., (1999), *Mamm. Genome*, 10, 824-830.
22. Lange K., Boehnke M., Cox D. R., Lunetta K. L., (1995), *Genome Res.*, 5, 136-150.
23. Rink A., Sntschi E. M., Eyer K. M., Roelofs B., Hess M., Godfrey M., Karajusuf E. K., Yerle M., Milan D., Beattie C. W., (2002), *Mamm. Genome*, 13, 578-587.
24. Shi X. W., Fitzsimmons C. J., Tuggle C. K., Genet C., Prather R., Whitworth K., Green J. A., (2001), *Anim. Genet.*, 32(4), 205-209.
25. Hamasima N., Suzuki H., Mikawa A., Morozumi T., Plastow G., Mitsuhashi T., (2003), *Anim. Genet.*, 34 (3), 216-220.

26. Yearle M., Pinton P., Delcros C, Arnal N., Milan D., Robic A., (2002), *Cytogenet. Genome Res.*, 97, 219-228.
27. Rattink A. P., Faivre M., Jungerius B. J., Groenen M. A. M., (2001), *Mamm. Genome*, 12, 366-370.
28. van Poucke M., Yerle M., Tuggle C., Piumi F., Genet C., van Zeveren A., Peelman L. J., (2001), *Cytogenet. Cell Genet.*, 93, 297-303.
29. Martins-Wess F., Milan D., Drogemuller C., Vobeta-Nemitz R., Brenig B., Robic A., Yerle M., Leeb T., (2003), *BMC Genomics*, 4(1), 20.
30. Gyapay G., Schmitt T. K., Fizames C. Jones H., Vega-Czarny N., Spillett D., Muselet D., (1996), *Hum. Mol. Genet.*, 5, 339-346.
31. Stewart E. A., McKusick K. B., Aggarwal A., Bajorek E., Brady S., Chu A., Fang N., Hadley D., Harris M., Hussain S., Lee R., Maratukulam A., O'Connor K., Perkins S., Piercy M., Qin F., Reif T., Sanders C., She X., Sun W. L., Tabar P., Voyticky S., Cowles S., Fan J. B., Cox D. R., (1997), *Genome Res.*, 7, 422-433.
32. Olivier M., Aggarwal A., Allen J., Almendras A. A., Bajorek E. S., Beasley E. M., Brady S. D., Bushard J. M., Bustos V. I., Chu A., Chung T. R., de Witte A., Denys M. E., Dominguez R., Fang N. Y., Foster B. D., Freudenberg R. W., Hadley D., Hamilton L. R., Jeffrey T. J., Kelly L., Lazzeroni L., Levy M. R., Lewis S. C., Liu X., Lopez F. J., Louie B., Marquis J. P., Martinez R. A., Matsuura M. K., Misherghi N. S., Norton J. A., Olshen A., Perkins S. M., Perou A. J., Piercy C., Piercy M., Qin F., Reif T., Sheppard K., Shokoohi V., Smick G. A., Sun W. L., Stewart E. A., Fernando J., Tejada, Tran N. M., Trejo T., Vo N. T., Yan S. C., Zierden D. L., Zhao S., Sachidanandam R., Trask B. J., Myers R. M., Cox D. R., (2001), *Science*, 291, 1298-1302.
33. McCarthy L. C., Bihoreau M. T., Kiguwa S. L., Browne J., Watanabe T. K., Hishigaki H., Tsuji A., Kiel S., Webber C., Davis M. E., Knights C., Smith A., Critcher R., Huxtall P., Hudson J. R. Jr, Ono T., Hayashi H., Takagi T., Nakamura Y., Tanigami A., Goodfellow P. N., Lathrop G. M., James M. R., (2000), *Mamm. Genome*, 1, 791-795.
34. Scheetz T. E., Raymond M. R., Nishimura D. Y., McClain A., Roberts C., Birkett C., Gardiner J., Zhang J., Butters N., Sun C., Kwitek-Black A., Jacob H., Casavant T. L., Soares M. B., Sheffield V. C., (2001), *Genome Res.*, 11, 497-502.
35. Watanabe T. K., Bihoreau M. T., McCarthy L. C., Kiguwa S. L., Hishigaki H., Tsuji A., Browne J., Yamasaki Y., Mizoguchi-Miyakita A., Oga K., Ono T., Okuno S., Kanemoto N., Takahashi E., Tomita K., Hayashi H., Adachi M., Webber C., Davis M., Kiel S., Knights C., Smith A., Critcher R., Miller J., James M. R., (1999), *Nature Genet.*, 22, 27-36.
36. Flaherty L., Herron B., (1998), *Mamm. Genome*, 9, 417-418.
37. McCarthy L. C., Terrett J., Davis M. E., Knights C. J., Smith A. L., Critcher R., Schmitt K., Hudson J., Spurr N. K., Goodfellow P. N., (1997), *Genome Res.*, 7, 1153-1161.
38. Chowdhary B. P., Raudsepp T., Honeycutt D., Owens E. K., Piumi F., Guerin G., Matise T. C., Kata S. R., Womack J. E., Skow L. C., (2002), *Mamm. Genome*, 13, 89-94.
39. Kiguwa S. L., Huxtall P., Smith A. L., Critcher R., Swinburne J., Millon L., Binns M. M., Goodfellow P. N., McCarthy L. C., Farr C. J., Oakenfull E. A., (2000), *Mamm. Genome*, 11, 803-805.
40. Rexroad C. E., Owens E. K., Johnson J. S., Womack J. E., (2000), *Anim. Genet.*, 31, 262-265.
41. Womack J. E., Johnson J. S., Owens E. K., Rexroad C. E. III., Schlapfer J., Yang Y. P., (1997), *Mamm. Genome*, 8, 854-856.
42. Mellersh C. S., Hitte C., Richman M., Vignaux F., Priat C., Jouquand S., Werner P., Andre C., DeRose S., Patterson D. F., Ostrander E. A., Galibert F., (2000), *Mamm. Genome*, 11, 120-130.
43. Priat C., Hitte C., Vignaux F., Renier C., Jiang Z., Jouquand S., Cheron A., Andre C., Galibert F., (1998), *Genomics*, 54, 361-378.
44. Vignaux F., Priat C., Jouquand S., Hitte C., Jiang Z., Cheron A., Renier C., Andre C., Galibert F. T., (1999), *J. Hered.*, 90, 62-67.
45. Murphy W. J., Menotti-Raymond M., Lynos L. A., Thompson M. A., O'Brien S. J., (1999), *Genomics*, 57, 1-8.