

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193103** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.31

(51) Int. Cl. *C12Q 1/683* (2006.01)
C12Q 1/686 (2006.01)
C12Q 1/6827 (2006.01)
A61D 99/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.15

(54) СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ ГАПЛОТИПА ФЕРТИЛЬНОСТИ HH1 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА

(31) **2021/0529.1**

(32) **2021.09.02**

(33) **KZ**

(96) **KZ2021/071 (KZ) 2021.11.15**

(71) Заявитель:
**НЕКОММЕРЧЕСКОЕ
АКЦИОНЕРНОЕ
ОБЩЕСТВО "КАЗАХСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ АГРАРНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ" (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Багдат Айгерим Багдаткызы,
Бименова Жанат Жолшыбайкызы,
Усенбеков Есенгали Серикович,
Шорманова Маржан Муратовна,
Тургумбеков Асет Абдымаратович,
Касымбекова Шинара Николаевна,
Хусаинов Дамир Микдатович (KZ)**

(74) Представитель:
Сериков М.С. (KZ)

(57) Изобретение относится к области молекулярной биологии, в частности идентификации носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы, и может быть использовано для диагностики носителей скрытой точечной мутации в кодирующей части гена ARAF1 (в позиции 63150400, C→T, сборка генома UMD 3.1) методом полимеразной цепной реакции в сочетании с полиморфизмом длин рестриционных фрагментов. Задачей изобретения является разработка способа детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC, исключающий замены одного нуклеотида в составе обратного праймера. Задача решается путем постановки ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC и праймеров в следующей нуклеотидной последовательности

F 5' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'

R 5' - ACCTACTTACCCCACTCCAGGT - 3'

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в разработке эффективного способа детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ анализа.

A1

202193103

202193103

A1

Способ детекции носителей гаплотипа фертильности НН1 у крупного рогатого скота голштинской породы методом ПЦР-ПДФ анализа

Изобретение относится к области молекулярной биологии, в частности идентификации носителей гаплотипа фертильности НН1 у крупного рогатого скота голштинской породы и может быть использовано для диагностики носителей скрытой точечной мутации в кодирующей части гена АРАF1, (в позиции 63150400, С→Т, сборка генома UMD 3.1) методом полимеразной цепной реакции в сочетании с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов.

Известен способ детекции носителей гаплотипа фертильности НН1 у крупного рогатого скота голштинской породы путем постановки ПЦР-ПДФ анализа, с использованием праймера, включающего, геном крупного рогатого скота в следующей последовательности

F 5' - T A T A G A C T G T G A G A A T T T C C A G G - 3'

R 5' - T T A T C G A C C T C C T G C T T G T C C T G C - 3'

[Романенкова О.С. Исследование полиморфизмов в генах АРАF1, SMC2 и GART, ассоциированных с гаплотипами фертильности НН1, НН3 и НН4 голштинского и голштинизированного крупного рогатого скота. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Дубровицы – 2016].

Существующий способ детекции носителей гаплотипа фертильности НН1 у крупного рогатого скота включающий ПЦР-ПДФ определение полиморфизма С→Т в позиции 63150400 гена АРАF1. При этом амплификацию фрагмента гена, содержащего мутацию, проводят с использованием прямого и обратного праймеров. В обратный праймер вводится нуклеотидная замена, приводящая к исключению специфического сайта рестрикции эндонуклеазы BstC8I, расположенного на расстоянии 10 п.о. «down stream» от места исследуемой мутации, с последующим

рестрикционным гидролизом продуктов ПЦР эндонуклеазой BstC8I. Фрагменты меньшей длины (123 п.н., 33 п.н), образующиеся в результате рестрикции, соответствуют мутантному типу аллели, в то время как нерестрицированный фрагмент большей длины (156 п.н.) соответствует дикому типу аллели.

Недостатком указанного способа является небольшой размер фрагментов ПЦР продукта после рестрикции эндонуклеазой BstC8I, которые имеют длину: 156 п.н. (пар нуклеотидов) и 33 п.н., в зависимости от генотипа животных, которые слабо визуализируются при горизонтальном электрофорезе и введение замены одного нуклеотида в составе обратного праймера, которая снижает эффективность и специфичность амплификации нужного участка гена ARAF1.

Задачей изобретения является разработка способа детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC, исключая замену одного нуклеотида в составе обратного праймера.

Задача решается путем постановки ПЦР-ПДРФ с использованием эндонуклеазы BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC и праймеров в следующей нуклеотидной последовательности:

F 5' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'

R 5' - ACCTACTTACACCCACTCCAGGT - 3'

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в разработке эффективного способа детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ анализа.

Гаплотип фертильности HH1 (Haplotype Holsteins 1, ген ARAF1, araprototic peptidase activating factor 1) у крупного рогатого скота голштинской породы появился в результате замены одного нуклеотида С→Т в позиции

(63150400) гена ARAF1, данная точечная мутация отрицательно влияет на воспроизводительную функцию животных, стельность у коров сопровождается эмбриональной смертностью на разных сроках беременности, длина гена ARAF1 составляет 89600 п.н. и он локализован на 5 хромосоме.

Существующий праймер для определения носителей гаплотипа фертильности HH1 на основе полимеразной цепной реакции и гидролиза полученного ПЦР продукта рестриктазой BstC8I включающий геном крупного рогатого скота в следующей последовательности:

F 5' - TATAGACTGTGAGAATTTCCAGG - 3'

R 5' - TTATCGACCTCCTGCTTGTCCTGC - 3'

Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать участок гена ARAF1 длиной 156 п.н.

Изобретение осуществляется следующим образом.

Базовой программой при проведении подбора служит программа Primer 3. Посредством которой осуществляют анализ выбранных участков ДНК для дизайна праймеров, который необходим для амплификации нужного фрагмента гена ARAF1. Основными критериями при выборе праймеров являются следующие параметры: размер ПЦР продукта, наличие сайта рестрикции (GCN/NGC) для рестриктазы BstC8I в составе амплифицируемого фрагмента и достаточная длина фрагментов продукта полимеразной цепной реакции после рестрикции эндонуклеазой BstC8I. С помощью компьютерной программы Primer 3 была подобрана последовательность праймера:

F 5' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'

R 5' - ACCTACTTACACCCACTCCAGGT - 3'

для детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы. Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена ARAF1 длиной 243 п.н. (рис 1),

после рестрикции которого эндонуклеазой BstC8I образуются фрагменты: 176 п.н., 12 п.н, и 55 п.н. у здоровых гомозиготных животных (рис 2), 188 п.н., 176 п.н., 12 п.н. и 55 п.н. у гетерозиготных носителей, у гомозиготных носителей наблюдаются два фрагмента: 188 п.н. и 55 п.н. Следует отметить, что фрагменты 243 п.н., 188 п.н., 176 п.н. и 55 п.н. хорошо видны на электрофореграмме. Нами для детекции аллелей (С -дикий тип, Т-мутантный тип) гена APAF1 была использована рестрикция ПЦР продукта эндонуклеазой BstC8I с сайтом узнавания GCN/NGC.

Аmplифицируемый фрагмент гена APAF1 крупного рогатого скота, гаплотипа фертильности HH1 и локализация точечной мутации в позиции 63150400 C→T в кодирующей части гена:

```
tgatcttggctctggttatgtttctaagcaattccattttgttcataggatggatatagactgtgagaatttccaggagttttta  
tctttaaatggacatcttcttggacgacagccatttcctaafattgtgcaactggggcctctgtgaactggaaacttcagagg  
tttatcgGCA/AGCtaagctGCA/GGCcaagcaggaggtcgataacggaatgctttacctggagtgggtgta  
agtaggt
```

Условия проведения амплификации: денатурация при 95 °С 30 сек, отжиг праймеров при 60 °С 30 сек и элонгация 72 °С 30 сек, количество циклов 35. Использование предложенных праймеров и рестриктазы BstC8I для гидролиза ПЦР продукта позволяет идентифицировать аллели (С и Т) гена APAF1 и выявлять носителей мутации гаплотипа фертильности HH1 (сайт рестрикции в позиции 186-191 амплификата являются общими для всех особей, сайт рестрикции в позиции 174-179 является информативным, т.е. позволяет идентифицировать носителей мутации).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы путем постановки ПЦР-ПДРФ анализа, отличающийся тем, что для детекции носителей гаплотипа используют эндонуклеазу BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC и праймеров в следующей нуклеотидной последовательности:

F 5' – TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'

R 5' - ACCTACTTACACCCACTCCAGGT - 3'.

Способ детекции носителей гаплотипа фертильности H11 у крупного рогатого скота голштинской породы методом пир-пдрф анализа

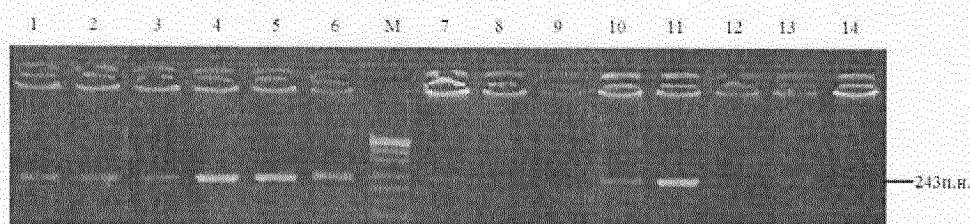


Рисунок 1. Электрофореграмма ПЦР продукта гена ARAF1, длина амплификата 243 п.н., М – ДНК маркер pUC19/MspI.

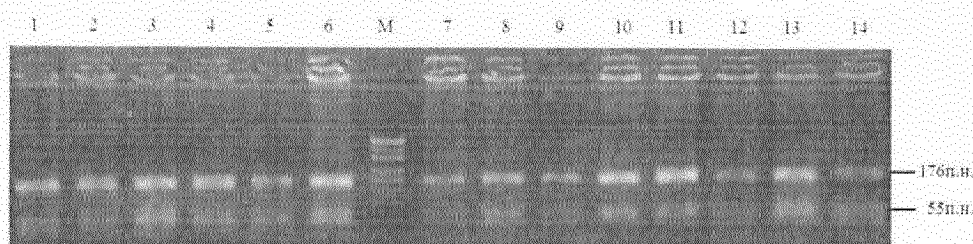


Рисунок 2. Электрофореграмма амплификата после рестрикции эндонуклеазой BstC8I, М – ДНК маркер pUC19/MspI, лунки 1-6, 7-14 гомозиготные здоровые животные, фрагменты 176 п.н. и 55 п.н.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202193103**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**C12Q 1/683 (2018.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
C12Q 1/6827 (2018.01)
A61D 99/00 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12Q 1/683, 1/686, 1/6827, A61D 99/00Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	БАГДАТ А. Б. и др. Идентификация гаплотипов фертильности НН1, НН4 у коров Голштинской породы ТОО «МЕДЕУ КОММЕРЦ» с помощью метода ПДФ-ПЦР анализа. Алматы, Издательство «Издательство-Исследования», результаты, № 1 (85) 2020. ISSN 2304-3334, страницы 33-38	1
X	БАГДАТ А. Б. и др. Разработка способа диагностики гаплотипа фертильности НН 1 у коров голштинской породы. АГРАРНАЯ НАУКА-СЕЛЬСКОМУ ХОЗЯЙСТВУ, Сборник материалов XIV Международной научно-практической конференции. Барнаул, Алтайский Государственный университет, 2019, страницы 97-98	1
A	БАГДАТ А. Б. и др. Молекулярно-генетические методы детекции гаплотипов фертильности у племенных коров. Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны". Санкт-Петербург, 2018, Издательство ФГБОУ ВО СПбГАВМ, страницы 22-23	1

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

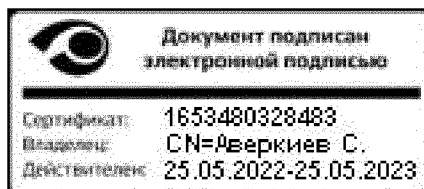
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 06 декабря 2022 (06.12.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев