



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 36047
(51) A61B 10/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2021/0529.1

(22) 02.09.2021

(45) 13.01.2023, бюл. №2

(72) Бағдат Айгерім Бағдатқызы; Бименова Жанат Жолшыбайқызы; Усенбеков Есенгали Серикович; Шорманова Маржан Муратовна; Тургумбеков Асет Абдымаратович; Касымбекова Шинара Николаевна; Хусаинов Дамир Микдатович

(73) Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный аграрный университет»

(56) RU 2614117 C1, 22.03.2017

Бағдат А.Б., Собех П. Разработка способа диагностики гаплотипа фертильности НН1 у коров голштинской породы. Конференция: Аграрная наука - Сельскому хозяйству. Барнаул, 07–08 февраля 2019 г.

ADAMS et al, Identification of a nonsense mutation in ARAF1 that is causal for a decrease in reproductive efficiency in dairy cattle, Proc. Plant Anim, 2012.

(54) СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ НОСИТЕЛЕЙ ГАПЛОТИПА ФЕРТИЛЬНОСТИ НН1 У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ГОЛШТИНСКОЙ ПОРОДЫ МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ АНАЛИЗА

(57) 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 ARAF1, (в позиции 63150400, С→Т, 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 НН1 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' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, выражается в разработке эффективного способа детекции носителей гаплотипа фертильности НН1 у крупного рогатого скота голштинской породы методом ПЦР-ПДРФ анализа.

(19) KZ (13) B (11) 36047

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 APAF1, (в позиции 63150400, C→T, сборка генома UMD 3.1) методом полимеразной цепной реакции в сочетании с полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов.

Известен способ детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы путем постановки ПЦР-ПДРФ анализа, с использованием праймера, включающего, геном крупного рогатого скота в следующей последовательности

F 5' - TATAGACTGTGAGAATTTCCAGG - 3'

R 5' - TTATCGACCTCCTGCTTGTCCCTGC - 3'

[Романенкова О.С. Исследование полиморфизмов в генах APAF1, SMC2 и GART, ассоциированных с гаплотипами фертильности HH1, HH3 и HH4 голштинского и голштинизированного крупного рогатого скота. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Дубровицы - 2016].

Существующий способ детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота включающий ПЦР-ПДРФ определение полиморфизма C→T в позиции 63150400 гена APAF1. 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 APAF1.

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 анализа аллели (C и T) гена APAF1 при условиях проведения амплификации:

денатурация при 95°C 30 сек, отжиг праймеров при 60°C 30 сек и элонгация 72°C 30 сек, количество циклов 35 с, а для детекции носителей гаплотипа используют эндонуклеазу BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC и праймеров в следующей нуклеотидной последовательности:

F 5' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'

R 5' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 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 APAF1, apoptotic peptidase activating factor 1) у крупного рогатого скота голштинской породы появился в результате замены одного нуклеотида C→T в позиции (63150400) гена APAF1, данная точечная мутация отрицательно влияет на воспроизводительную функцию животных, стельность у коров сопровождается эмбриональной смертностью на разных сроках беременности, длина гена APAF1 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' - TTATCGACCTCCTGCTTGTCCCTGC - 3',

использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать участок гена APAF1 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 APAF1. 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' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3',

для детекции носителей гаплотипа фертильности HH1 у крупного рогатого скота голштинской породы. Использование данной пары праймеров позволяет амплифицировать фрагмент гена APAF1 длиной 243 п.н. (фиг 1), после рестрикции которого эндонуклеазой BstC8I образуются фрагменты: 176 п.н., 12 п.н. и 55 п.н. у здоровых гомозиготных животных (фиг 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 АРАF1 была использована рестрикция ПЦР продукта эндонуклеазой BstC8I с сайтом узнавания GCN/NGC.

Аmplифицируемый фрагмент гена АРАF1 крупного рогатого скота, гаплотипа фертильности НН1 и локализация точечной мутации в позиции 63150400 С→Т в кодирующей части гена:

```
tgatcttgctctgggtatgtttctaagcaattccattttgttcacataggtgggata
gactgtgagaatttccaggagtgtttatctttaaaggacatcttctggacgaca
gccatttcctaattgtgcaactggcctctgtgaactggaactcagagggtt
atcgGCA/AGCtaagctGCA/GGCcaagcaggaggtcgataacgg
aatgctttacctggagtggtgtaagtaggt
```

Условия проведения амплификации: денатурация при 95°C 30 сек, отжиг праймеров при 60°C 30 сек и элонгация 72°C 30 сек, количество циклов 35. Использование предложенных праймеров и рестриктазы BstC8I для гидролиза ПЦР продукта позволяет идентифицировать аллели (С и Т) гена АРАF1 и выявлять носителей мутации гаплотипа фертильности НН1 (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).

Всего ПЦР-ПДРФ методом были протестированы 411 образцов ДНК голштинской породы зарубежной селекции, выявлены 15 гетерозиготных носителей мутации гаплотипа фертильности НН1.

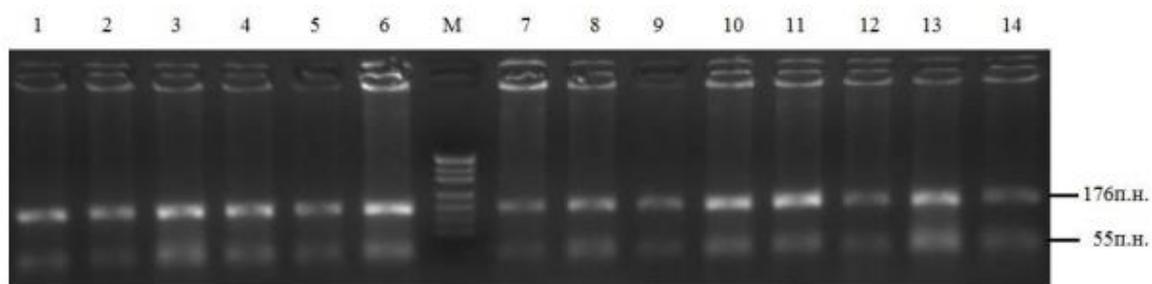
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ детекции носителей гаплотипа фертильности НН1 у крупного рогатого скота голштинской породы, включающий ПЦР-ПДРФ анализ, *отличающийся* тем, что осуществляют анализ аллели С и Т гена АРАF1, проводят амплификацию: денатурация при 95°C 30 сек, отжиг праймеров при 60°C 30 сек и элонгация 72°C 30 сек, количество циклов 35 с, а для детекции носителей гаплотипа используют эндонуклеазу BstC8I с сайтом рестрикции GCN/NGC и праймеров в следующей нуклеотидной последовательности:

F 5' – TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'
R 5' - TGATCTTGGCTCTGGTTATGTTT - 3'.



Фигура 1. Электрофореграмма ПЦР продукта гена АРАF1, длина амплификата 243 п.н., М – ДНК маркер рUC19/MspI.



Фигура 2. Электрофореграмма ампликата после рестрикции эндонуклеазой BstC8I, М – ДНК маркер рUC19/MspI, лунки 1-6, 7-14 гомозиготные здоровые животные, фрагменты 176 п.н. и 55 п.н.