



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2021 00628**

(22) Data de depozit: **15/10/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. **3/2022**

(71) Solicitant:
• **STAȚIUNEA DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU CREȘTEREA
BOVINELOR ARAD, CALEA BODROGULUI,
NR.32, ARAD, AR, RO**

(72) Inventatori:
• **MIHALI CIPRIAN-VALENTIN,
STR.STREIULUI, NR.14, BL.10, SC.B,
AP.11, ARAD, AR, RO;**
• **ILIE DANIELA-ELENA, STR.POETULUI,
NR.10, BL.R9, ET.2, AP.17, ARAD, AR, RO;**
• **NEAMȚ RADU IONEL, STR. CRÂNGULUI,
NR.6, ARAD, AR, RO;**
• **MIZERANSCHI ALEXANDRU-EUGENIU,
ALEEA TOPOLOG, NR.4, BL.H6, SC.B,
ET.4, AP.37, CONSTANȚA, CT, RO**

(54) **METODĂ DE ANALIZĂ DUBLU-SENS A SECVENȚELOR ADN
PENTRU GENA CSN2 CU SCOPUL IDENTIFICĂRII VACILOR
CARE PRODUC LAPTE DE TIP A2A2**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de analiză genetică a secvențelor de ADN pentru gena CSN2 cu scopul identificării vacilor care produc lapte de tip A2A2. Metoda, conform invenției, constă în analiza computerizată în dublu sens a secvențelor ADN pentru gena A2A2 la poziția 8101 cu identificarea formelor homo/heterozigote A1A1, A1A2 și A2A2 ale genei CSN2 care

exprimă proteina β caseină în laptele de vacă și selecția animalelor homozigote pentru alela A2 de interes în producția unui lapte non-alergenice și care nu induce condiții patologice prin consumul la oameni.

Revendicări: 2
Figuri: 1



27

**METODĂ DE ANALIZĂ DUBLU-SENS A SECVENȚELOR ADN PENTRU GENA
CSN2 CU SCOPUL IDENTIFICĂRII
VACILOR CARE PRODUC LAPTE DE TIP A2A2**

1. DESCRIEREA INVENȚIEI

Invenția se referă la o metodă de analiză genetică a ADN-ului la vacile pentru lapte în vederea identificării formelor alelice/variante A1A1, A1A2 și A2A2 ale genei CSN2 responsabilă pentru prezenta proteinei β caseină în laptele de vacă. Variantele genice A1A1, A1A2 ale genei CSN2 care exprimă proteina β caseină din lapte induc dereglări în tractul gastrointestinal de la om cu formarea unor metaboliți secundari numiți β -casomorfine, aceștia fiind implicați în etiologia unor boli digestive, diabet și boli neurologice. Prin analiza ambelor catene ale ADN-ului se pot identifica vacile de lapte care prezintă varianta genică/alelică A2A2, singura din cele 3 menționate anterior, care nu produce probleme digestive prin consumul de lapte la om. Variantele A1 și A2 diferă în termeni de aminoacizi la poziția 67, pentru tipul A1 histidina este prezentă în locul prolinei (β -caseina A2) [detalii spre consultare în referința 1]. Prezența histidinei pentru β -caseina A1 mărește susceptibilitatea proteinei la scindarea celor șapte aminoacizi precedenți, producând β -casomorfina-7 (BCM-7), o exorfină cu activitate moderată agonistă asupra receptorilor μ și care afectează funcția gastrointestinală sau cauzează / exacerbează inflamația gastrointestinală. Polimorfismul și variabilitatea alelelor cu implicații în secreția diferitelor tipuri de cazeine din laptele de vacă pot fi utilizate în vederea implementării unei selecții asistate de markeri moleculari, cu scopul de a produce lapte hipoalergenic destinat consumului uman, cu efecte benefice asupra siguranței alimentare a persoanelor afectate de acest tip de alergii.

Prezența metodologiei are ca scop îmbunătățirea calitativă a laptelui din consumul uman prin selecția genetică a vacilor care produc lapte.

Se mai cunoaște o metodă de selecție genetică a vacilor de lapte pentru identificarea variantei A2A2 pentru gena CSN2 utilizând analiza polimorfismului de lungime a fragmentelor de restricție, dar aceasta prezintă următoarele dezavantaje:

1. Necesită un interval de timp mai mare;
2. Tehnica nu prezintă o rată ridicată de similaritate a rezultatelor;

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unei identificări sigure prin utilizarea unei metodologii de analiză în dublu sens a secvențelor ADN pentru gena CSN2 cu identificarea variantelor genice/alelice homo/hetrozigoate A1A1, A1A2, A2A2 care exprimă proteina β caseină în laptele de vacă. Prin acesta se poate realiza selecția animalelor cu scopul

obținerii unui lapte calitativ superior care conține doar varianta alelică A2A2 a expresiei genice a genei CSN2 pentru proteina β caseină din laptele de vacă și care nu provoacă probleme medicale în consumul uman.

Invenția se referă în primul rând la **metodologia de analiză genetică al ADN-ului în dublu sens (adică pe ambele catene ale ADN-ului, 5' - 3' și 3' - 5')** la vacile ce produc lapte prin utilizarea secvențierii și a analizei regiunii locusului 8101 pentru gena CSN2 (având ca referință secvența publică cod X14711.1/ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/120> , secvența conține 10338 nucleotide) cu mare precizie și stabilirea formei/variantei alelice la indivizii analizați.

Etapizarea metodologiei presupune următorii pași: extracția ADN-ului genomic, adică tot ADN-ul existent, într-un volum de 300 μ l de sânge prelevat în tuburi de recoltare ce conțin un anticoagulant (heparină). Extracția ADN-ului se face utilizând un protocol clasic de extracție a ADN-ului genomic, protocolul fiind unul cu acces public gratuit. După extracția ADN-ului genomic din probele de sânge recoltate se face verificarea prezenței moleculelor de ADN din soluția care rezultă în urma efectuării protocolului de extracție. Această verificare se realizează prin migrarea electroforetică în gel de agaroză 2,5% (ce conține și bromură de etidiu) a unei cantități de 5 μ l ADN + 1 μ l soluție loading buffer în prezența unui marker de greutate moleculară timp de 30 minute la o tensiune de 100V. Protocolul migrării electroforetice poate fi accesat gratuit utilizând diferite resurse bibliografice atât tipărite cât și electronice. Într-un pas următor se efectuează o examinare a gelului într-un dispozitiv cu lumină UV transmisă prin gel unde în cazul existenței moleculelor de ADN prezenta acestora va fi vizual evidențiată sub forma unor benzi în gelul analizat. Următoarea etapă constă în obținerea produșilor PCR (Reacția de polimerizare în lanț) care ulterior vor fi secvențați prin metoda Sanger pentru a putea studia ordinea de succesiune a nucleotidelor din secvențele obținute prin reacția de amplificare a moleculelor de ADN corespunzătoare probelor de sânge prelevate anterior. Obținerea produșilor PCR se realizează utilizând un protocol public existent în literatura de specialitate [detalii spre consultare în referința 2]. Produșii obținuți prin PCR sunt secvențați prin metoda Sanger, utilizând un protocol public de secvențiere externalizat. Din fiecare probă de ADN extras și amplificat prin PCR se trimit spre secvențiere 2 probe, una ce conține amorsă forward + produși PCR și o a doua ce conține amorsă reverse + produși PCR. În urma secvențierii din fiecare probă de ADN extras (care reprezintă un individ) se obțin 2 secvențe una corespunzătoare direcției forward (înainte) și una corespunzătoare secvenței reverse (înapoi) pentru cele 2 catene ale moleculei de ADN.

Din această etapă metodologia prin care se face analiza computerizată a celor 2 secvențe (una forward/înainte și una reverse/înapoi) la nivelul poziției 8101 pentru gena CSN2 reprezintă invenția prin care se poate determina cu precizie varianta /forma alelică a genei CSN2 din proba analizată. Cele trei variante care pot exista la nivelul acestui locus sunt A1A1, A1A2 (care induc condiții patologice la om prin consumul de lapte de vacă) și A2A2 care nu induc condiții patologice prin consum. Pentru a realiza această evaluare se utilizează analiza computerizată utilizând programe cu licențe publice gratuite, editoare text atât cele încapsulate în medii de operare pe diferite distribuții în Linux fie programe gratuite utilizabile gratuit în distribuții Linux. Cu ajutorul acestor programe secvențele se aliniază la poziția 8101. Secvența revers este procesată pentru a obține reverse-complementul acesteia tot cu ajutorul unui program gratuit pe calculator existent în distribuții Linux. În următoarea etapă se face analiza prin punerea în paralel la nivelul poziției 8101 a secvenței forward cu secvența revers complementului pentru secvența reverse pentru codonul CAT (variante alelică A1) și a codonului CCT (variante alelică A2). Nucleotidul marcat în roșu anterior în cei 2 codoni reprezintă poziția 8101. Detalii suplimentare explicative sunt prezentate în figura 1.

Pentru siguranța analizei se iau în evaluare un număr de 100 nucleotide atât anterior cât și posterior fata de poziția 8101 pentru a confirma similaritatea între cele 2 secvențe analizate. Alinierea secvențelor se realizează pe calculator utilizând programe gratuite de sine stătătoare sau incluse în diferite medii de operare gratuite precum Linux în diferite distribuții așa cum a fost menționat anterior. Principalele etape ale protocolului metodologic de realizare a analizei pentru gena CSN2 care exprimă proteina β caseină pentru variantele alelice A1 și A2 sunt prezentate în tabelul 1, de mai jos:

Tabel 1

Protocol metodologic utilizat pentru genotiparea vacilor care exprimă în lapte proteina β caseină

Etapa	Activitate
1. Obținerea materialului genetic/secvențe ADN utilizate în secvențiere.	<ul style="list-style-type: none"> - recoltare sânge în tuburi ce conțin anticoagulant. - extracție ADN. - verificare prezență ADN prin electroforeza în gel de agaroză. - amplificare ADN prin PCR. - secvențierea produșilor de amplificare PCR, la fiecare individ/probă se obțin 2 secvențe: o

	secvență forward și una reverse, adică pentru ambele sensuri ale ADN-ului dublu catenar provenit de la individul luat în analiză .
2. Analiza secvențelor ADN în dublu sens pentru gena CSN2 la poziția 8101.	<ul style="list-style-type: none"> - analiza secvenței forward și localizarea poziției 8101 pe șirul de nucleotide utilizând un editor text gratuit, fără licență. - prelucrarea secvenței reverse prin obținerea revers complement-ului acesteia urmat de localizarea poziției 8101 utilizând un editor text gratuit sau a unui program gratuit, fără licență. - alinierea celor două secvențe forward și revers complementul secvenței reverse la nivelul poziției 8101 utilizând un editor text gratuit sau a unui program gratuit, fără licență. - identificarea celor 3 variante alelice teoretic posibil prezente la nivelul codonului specific și anume CCT-CCT la indivizii homozigoți tip A2, CAT-CAT la indivizii homozigoți tip A1, respectiv CCT-CAT- la indivizii heterozigoți. - lotizarea în consecință a animalelor homozigote pentru alela A2, singurele de interes în producția unui lapte non-alergenic și care nu induce condiții patologice prin consumul la oameni.

Prin această metodă de analiză se poate realiza screening-ul **PRECIS** la bovinele incluse în producția de lapte orientată spre consumul uman. În urma acestei analize se poate realiza lotizarea animalelor cu obținerea unor populații de la care se recoltează lapte ce conține doar forma alelică A2A2 și care nu produce reacții alergice respectiv diferite condiții de patologie medicală.

Metoda de analiză și screening pentru gena CSN2, varianta alelică A2A2 care exprimă β cazeină la vacile care produc lapte destinat consumului uman prezintă următoarele avantaje:

1. Nu necesită costuri ridicate pentru realizare;
2. Este ușor de utilizat;

3. Laptele de vacă rezultat de la populațiile lotizate prin analiza genei CSN2 pentru varianta alelică A2A2, prin această metodă, este non-alergenic, nu induce condiții patologice;
4. Screening-ul și lotizarea indivizilor prin analiza genei CSN2, varianta alelică A2A2 pentru proteina β cazeină, prin această metodă, are capacitate de creștere a metodologiilor/tehnologiilor utilizate în industria produselor lactate prin creșterea calitativă și de diferențiere a sortimentelor de lapte destinat consumului uman în condiții de siguranță alimentară.

Referințe

1. A. M. Caroli , S. Chessa and G. J. Erhardt, Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition, *Journal of Dairy Science* Vol. 92 No. 11, 2009:5335–5352 doi: 10.3168/jds.2009-2461.
2. Elisa Massella, Silvia Piva, Federica Giacometti, Gaetano Liuzzo, Angelo Vittorio Zambrini, Andrea Serraino, Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms located in northern Italy, *Italian Journal of Food Safety* 2017; 6:6904.

Bovine beta-casein gene
GenBank: X14711.1

.....
7021 tggatatgct gatgaaagac agtagggtga cagtgtggca ctaatcctca tctgatcatt
7081 tatcagctgt ataaccttgg ctccatgitt ctctgtacac cattttcttc acctgtaat
7141 tggagaatatt cataattacc cagagttgat gaactgacac acaatgata ttcagtgtt
7201 ttatattata ttgatagct ttatactca cattatgga tgtgtggagt tctaanaagt
7261 attlccatgy cccagatgag agaagtgagy tacagygaca ttgagtatgc aatgtgtga
7321 ccataccaca tagttatata atagcagaac ttgcttaaa acaagattt gcygacaatg
7381 taaatctct tcatatatt actctgttgy taacatatt atctaattat gatatttaag
7441 cttccctctt ttataattga agttgattg ttgycactt agyccaatt ctaaatcaaa
7501 atgaatttac aacttgatgc ctttgaagac tcaagattac cacctctac caagagaagt
7561 agtgcctaga gttggccatt gtttaagrac tccttgaatt aaaaaaacac atattaagac
7621 ttagttttca ttaaaacaaa caaaaataaa cctcagagta actttaaag tcttttaaa
7681 atygatcttt ctttgttata tgaaccagt ttgactatt atccaagta tghtagctacc
7741 actctgcagc aactcaggaa gaggttggat aagtgttga atctccaac cctgatttca
7801 ctgactctc tgalttcacc tgtgaagaaa gtgggttaat gagaatcct tcagtgagca
7861 ttttactcat tagtcttcat atgaccccaa ttcttaacc aaaccaaatg gaagattttc
7921 tttctctctc ttoactgaa talgttttaa aaagagagc ataattcabc atgaataaca
7981 attataactg gattatgac tcaagattt gtttctctc ttccagat gaactccagc
8041 ataaatcca ccccttggc cagacacagt ctctagtcta tcccttccct ggaaccatcg
8101 ataacagcct cccacaanaac atccctcctc ttactcaaac ccctgtgtg gtgccgcct
8161 tccttcagcc tgaagtaatg ggagtctcca aagtgaagga ggctatgct cctaagcaca
8221 aagaatgccc ctccctaata taccagttg agcccttac tgaagccag agcctgactc
8281 tcaactgagt tgaaatctg caccttctc tgcctctgt ccagtcttg atgcaccagc
8341 ctcaaccagc tcttcctcca actgtcatgt ttccctctca gtccgtgtg tcccttctc
8401 agtccaaagt cctgcctgtt ccccagaag cagtgcctca tcccagaga gatatgccc
8461 ttcagycctt tctgctgtac cagygacctg tactcgtcc tgtccgggga cccttcccta
8521 ttattgtaag tctaaattta ctaactgtgc ctgtttaact tctgatgtt gtagatatt
8581 cyagtaata agagtcctat aaaaaaatga ataataatg gtccaanaa aagcatagct
8641 gagattaatg atgtcagca ttagtataa atagaataag ctggagaacc ttcacctccc
8701 ctccaccacc agatctcaat gtctagcctt acccgtgag attctgatgt aattgttctt
8761 tctatgtaga agaacttat tgggaagaa taatataatg gactatgatt taatgtgtct
8821 gttgagaacc aattaatla gatgaagcy ataatgaca ataaagcca aatgaaattt
8881 gataatctca ttggctaaq aataacaac ctaagaagt ttgtatttt ctacaatttt
8941 gaatttctcc ttatgcaca ttatttccac acatgactca ttccacatcg tgttttggat
9001 atatgagcat atgagggaaa aatactgaga tgcattttc aatactcagc gaaaattttat

//

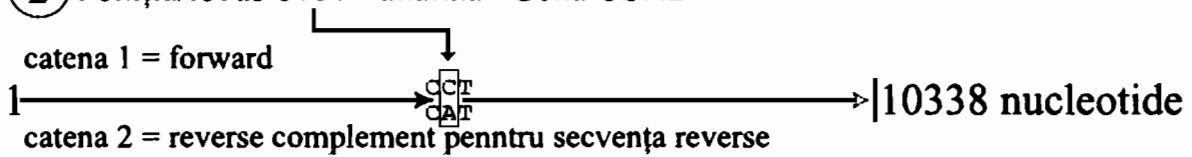
2. Revendicări

1. Laptele de vacă care conține proteina β cazeină de tip A2A2 care nu produce alergii sau stări patologice gastrointestinale **se caracterizează prin aceea că** este obținut de la vaci care prezintă forme alelice de tip A2 situate pe ambele catene ale ADN-ului cu referire la gena CSN2.
2. Laptele de vacă care exprimă varianta A2 a proteinei β cazeină, conform revendicării 1, **se caracterizează prin aceea că** are potențial de stimulare și de diversificare a metodologiilor/tehnologiilor utilizate în industria produselor lactate prin creșterea și diferențierea sortimentelor de lapte destinat consumului uman în condiții de siguranță alimentară.

① Exemplificare obținere secvența reverse complement a secvenței reverse

Secvența reverse/originală obținută prin secvențiere 5' AACTGCTATCCGAGAG 3'
 Complementul secvenței 3' TTGACGATAGGCTCTC 5'
 (perechi complementare cu secvența originală, antiparalele)
 Reverse complementul 5' CTCTCGGATAGCAGTT 3'
 (secvența complement scrisă în direcția 5' către 3')

② Poziția/locus 8101 - analiză - Gena CSN2



③ Variante alelice la gena CSN2 poziția 8101

A1 = A A2 = C; codon CAT = A1 codon CCT = A2

CCT = A2 = nu implică , CAT = A1 sau CAT = A1 implică
 CCT = A2 = patologie , CAT = A1 CCT = A2 = patologie

Figura 1. Poziția/locusul 8101 din gena CSN2 (referință publică cod X14711) unde se poate face discriminarea precisă între formele/variantele alelice A1 și A2. Varianta alelică A1 prezintă în poziția 8101 o bază azotată adenină în timp ce varianta alelică A2 prezintă o bază azotată citozină.