



(12)

BREVET DE INVENȚIE

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

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2024** BOPI nr. **5/2024**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**ELISA MASSELLA, SILVIA PIVA AND
ANDREA SERRAINO, "EVALUATION OF
BOVINE BETA CASEIN POLYMORPHISM
IN TWO DAIRY FARMS LOCATED IN
NORTHERN ITALY", ITALIAN JOURNAL
OF FOOD AND SAFETY, VOL. 6:6904,
2017;**
**A. M. CAROLI, S. CHESSA, G. J.
ERHARDT, "INVITED REVIEW: MILK
PROTEIN POLYMORPHISMS IN CATTLE:
EFFECT ON ANIMAL BREEDING AND
HUMAN NUTRITION", J. DAIRY SCI.,
VOL. 92, PP. 53335-53352, 2009**

(54) **METODĂ DE SELECȚIE A BOVINELOR PRODUCĂTOARE
DE LAPTE NON-ALERGIC**



1 Inventția 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
3 responsabilă pentru prezența proteinei β caseină în laptele de vacă.

5 Este cunoscut faptul că 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
7 digestive, diabet și boli neurologice. Prin analiza ambelor catene ale ADN-ului se pot identi-
fica vacile de lapte care prezintă varianta genică/alelică A2A2, singura din cele 3 menționate
9 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
11 locul prolinei (β -cazeina A2) [A. M. Caroli, S. Chessa and G. J. Erhardt, *Invited review:*
Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition,
13 ***Journai of Dairy Science Voi. 92 No. 11, 2009:5335-5352 doi: 10.3168/ jds.2009-2461***].
Prezența histidinei pentru β -cazeina A1 mărește susceptibilitatea proteinei la scindarea celor
15 șapte aminoacizi precedenți, producând β -casomorfina-7 (BCM-7), o exorfină cu activitate
moderată agonistă asupra receptorilor μ și care afectează funcția gastrointestinală sau
17 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
19 implementării unei selecții asistate de markeri moleculari, cu scopul de a produce lapte
hipoalergenic destinat consumului uman, cu efecte benefice asupra siguranței alimentare a
21 persoanelor afectate de acest tip de alergii.

În articolul ***Evaluation of bovine beta casein polymorphism in two dairy farms***
23 ***located in northern Italy, E. Massella, S. Piva și A. Serraino Italian Journal of Food and***
Safety 2017, vol. 6:6904 se descrie faptul că β caseina bovină A1 care este una dintre cele
25 mai comune variante la rasele de bovine de lapte este considerat un factor de risc în intole-
ranța la lapte și în alte boli umane importante, din cauza peptidei bioactive beta casomorfina-7
27 (BCM7) produsă de laptele A1 crud sau procesat, dar nu și de laptele A2, în timpul digestiei.
Scopul acestui studiu a fost de a efectua o metodă ieftină și rapidă pentru a investiga poli-
29 morfismul beta-cazeinei la animalele. Metoda a arătat o sensibilitate și specificitate ridicate
cu costuri reduse și consumatoare de timp puțin.

31 De asemenea, în articolul ***Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal***
breeding and human nutrition, A M Caroli, S Chessa, G J Erhardt Invited review: J.
33 ***Dairy Sci. 92:5335-5352 (28 iulie, 2009)*** sunt descrise 6 proteine principale din lapte de la
bovine care sunt codificate de gene extrem de polimorfe caracterizate prin mai multe mutații
35 nesinonime și sinonime, cu până la 47 de variante de proteine identificate. Efectele haplo-
tipului cazeinei asupra trăsăturilor productive au fost investigate luând în considerare infor-
37 mațiile despre întreg complexul de cazeină. Mai mult, s-a demonstrat că mutațiile din sec-
vențele necodificatoare afectează expresia proteinei specifice și, în consecință, compoziția
39 laptelui și fabricarea brânzeturilor. În primul rând, apariția alelelor asociate cu un conținut
redus de diferite cazeine ar putea fi exploatată pentru producerea de lapte cu calități
41 nutriționale speciale; adică lapte hipoalergenic. Mai mult, activitatea biologică a peptidelor
eliberate din digestia proteinelor din lapte poate fi afectată de schimbările de aminoacizi sau
43 delețiile rezultate din mutațiile genelor. În cele din urmă, coevoluția genetică-cultură dintre
genele proteinei din lapte de bovine și genele lactază umană, care a fost evidențiată recent,
45 este o dovadă impresionantă a apariției non-aleatorii a variației genetice a proteinelor din
lapte de-a lungul secolelor.

RO 135598 B1

Se mai cunoaște o metodă de selecție genetică a vacilor de lapte pentru identificarea variantei A2 A2 pentru gena CSN2 utilizând analiza polimorfismului de lungime a fragmen- telor de restricție, dar aceasta prezintă următoarele dezavantaje:	1 3
- necesită un interval de timp mai mare;	
- tehnica nu prezintă o rată ridicată de similaritate a rezultatelor.	5
Prezenta invenție prezintă o metodă de îmbunătățirea calitativă a laptelui din consumul uman prin selecția genetică a vacilor incluse în această producția de lapte.	7
Metoda conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin faptul că include etapele de extracție a ADN-ului genomic, verificarea prezenței moleculelor de ADN prin migrare electroforetică, examinarea gelului cu lumină UV, obținerea produselor PCR și secvențierea produselor obținute prin PCR prin metoda Sanger și în care, pentru fiecare probă de ADN extrasă și amplificată prin PCR se trimit spre secvențiere 2 probe, una care conține amorsa forward+produși PCR și a doua care conține amorsa revers+produși PCR astfel încât la nivelul poziției 8101 pentru gena CSN2 se vor identifica cele 3 variante alelice posibile, apoi se selectează și se lotizează animalele homozigote pentru alela A2, singura de interes pentru producția unui lapte non-alergenic și care nu induce condiții patologice la oameni prin consumul acestuia.	9 11 13 15 17
Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:	
- nu necesită costuri ridicate pentru realizare;	19
- este ușor de utilizat;	
- 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;	21
- 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.	23 25 27
Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unei identificări sigure prin utilizarea unei metodologii de analiză în dublu sens a secvențelot ADN pentru gena CSN2 cu identificarea variantelor genice/alelice homo/hetrozigote A1A1, A1A2, A2A2 care exprimă proteina β cazeină 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 cazeină din laptele de vacă și care nu provoacă probleme medicale în consumul uman.	29 31 33
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 XI4711.1/ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/120 , secvența conține 10338 nucleotide) cu mare precizie și stabilirea formei/variantei alelice la indivizii analizați.	35 37 39
Principalele etape ale protocolului metodologic de realizare a analizei pentru gena CSN2 care exprimă proteina β cazeină pentru variantele alelice A1 și A2 sunt prezentate în tabelul 1, de mai jos:	41 43

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. - 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. - 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-alergenice și care nu induce condiții patologice prin consumul la oameni.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției în legătură cu fig. 1 care reprezintă:

- fig. 1, poziția/locusul 8101 din gena CSN2 (referință publică cod X14/11) 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.

Exemplul 1

Prin această metodă de analiză se poate realiza screening-ul foarte exact 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.

RO 135598 B1

Etapizarea metodologiei presupune următorii pași: extracția ADN-ului genomic, adică tot ADN-ul existent, într-un volum de 300 μl 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 μl ADN + 1 μl 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 prezența 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 [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*]. 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 amorsa forward + produși PCR și o a doua ce conține amorsa 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 acesta 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 aliniaza 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 fig. 1.

Pentru siguranța analizei se iau în evaluare un număr de 100 nucleotide atât anterior cât și posterior față 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.

RO 13598 B1

1 Lista de secvențe:

3

Bovine beta-casein gene

GenBank: X14711.1

5

.....

7021 tggatatgct gatgaaagac agtaggggtga cagtgtggca ctaatcctca tctgatcatt
7081 tatcagctgt ataaccttgg ctccatgttt ctctgtacat cttttcttc acctgtaa
7141 tgagaatatt cataattacc cagagttgat gaactgacac acaatgaata ttcagtgggt
7201 ttatatata tttgatagct tttataactca catttatgga tgtgtggaagt tctaaaaagt
7261 atttccattg cccagatgag agaagtgagg tacaggacaa ttgagtatgc aaatgtgtga
7321 ccataccaca tagttattaa atagcagaac ttgcttaaaa acaaggattt gcggaacaatg
7381 taaaattcctt tcattatatt actcttggg taacatattt atctaattat gatatttaag
7441 ctttctctctt ttataattga agtttgattg tttggcactt aggccaaatt ctaaataaaa
7501 atgaatttac aacttgatgc ctttgaagac tcaagattac caccttctac caagagaagt
7561 agtgctagaa gttggccatt gtttaaggaac tccttgaatt aaaaaaac atattaagac
7621 ttagttttca ttaaaacaaa caaaaataaa cctcagagta acttttaag tctttttaa
7681 atggatcttt ctttgttata tgaaaccagt ttggactatt atccaaagta tgtagctacc
7741 actctgcagg aactcaggaa gaggtggaat aagtgttgaa atctccaaac cctgatttca
7801 cttgactctc tgatttcacc tgtgaagaaa gtgggttaat gagaaatcct tcagtgagca
7861 ttttactcat tagtcttcat atgacccaa tttcttaacc aaaccaaag gaagattttc
7921 tttctctctc ttcactgaat tatgttttaa aaagaggagg ataattcatc atgaataaca
7981 attataactg gattatggac tcaaagattt gtttctctc tttccaggat gaactccagg
8041 ataaaatcca ccccttggcc cagacacagt ctctagtcta tcccttccct ggaccatc
8101 ataacagcct cccacaaaac atccctctc ttactcaaac ccctgtggtg gtgcccctt
8161 tccttcagcc tgaagtaatg ggagtctcca aagtgaagga ggctatggct cctaagcaca
8221 aagaaatgcc cttccctaaa tatccagttg agcccttac tgaaagccag agcctgactc
8281 tcaactgatg tgaaaatctg caccttctc tgctctgct ccagtcttg atgcaccagc
8341 ctcaccagcc tcttctctca actgtcatgt ttctctca gtccgtgctg tccctttctc
8401 agtccaaagt cctgcctggt cccagaaaag cagtgcctca tccccagaga gatatgcca
8461 ttcaggcctt tctgctgtac caggagcctg tactcgggcc tgtccgggga cccttcccta
8521 ttattgtaag tctaaattta ctaactgtgc ctgtttaaact tctgatggtt gtatgatatt
8581 cgagtaatta agagtcctat aaaaaatga ataataagtg gttccaaaat aagcatagct
8641 gagattaatg attgtcagca ttagttataa atagaataag ctggagaacc ttcacctccc
8701 ctccaccacc agatctcaat gtctaggctt acccgtggag attctgatgt aattgttctt
8761 tctatgtaga agaaacttat tgggaagaaa taatataatg gactatgat taattggtct
8821 gttgagaacc aattaaatta gatgaaagcg attaagtaca ataaagccaa aattgaattt
8881 gataatctca tttggctaag aataacaaac ctaagaagggt ttgctatatt ctacaatttt
8941 gaagtctcc ttatgcacaa ttatttcacc acatgactca tttcacatcg tgtttttgat
9001 atatgagcat atgagggaaa aatactgaga tgcttatttc aatactcagg gaaaatttat

RO 135598 B1

Revendicare

1

Metodă de selecție a bovinelor incluse în producția de lapte pentru consum uman care cuprinde etapele de extracție a ADN-ului genomic, verificarea prezenței moleculelor de ADN prin migrare electroforetică, examinarea gelului cu lumină UV, obținerea produselor PCR și secvențierea produselor obținute prin PCR prin metoda Sanger, **caracterizată prin aceea că**, pentru fiecare probă de ADN extrasă și amplificată prin PCR se trimit spre secvențiere 2 probe, una care conține amorsa forward + produși PCR și a doua care conține amorsa revers + produși PCR astfel încât la nivelul poziției 8101 pentru gena CSN2 se vor identifica cele 3 variante alelice posibile, apoi se selectează și se lotizează animalele homozigote pentru alela A2, singura de interes pentru producția unui lapte non-alergenici și care nu induce condiții patologice la oameni prin consumul acestuia. 3 5 7 9 11

(51) Int.CI.

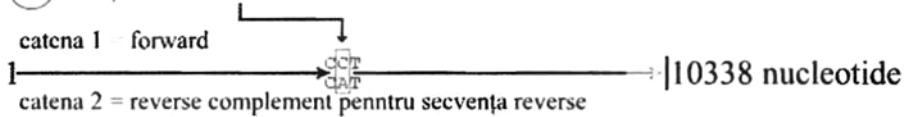
C12Q 1/686 (2018.01),

C12N 15/10 (2006.01)

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 patologic , CAT = A1 sau CCT = A2 patologic



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
 sub comanda nr. 206/2024