



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120479** (13) **C2**

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2018 06588**

(22) Дата подання заявки: **11.06.2018**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.12.2019**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.10.2018, Бюл.№ 19**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.12.2019, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):

**Таряник Катерина Анатоліївна (UA),
Литвиненко Наталія Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ
ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА
МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА
АКАДЕМІЯ",**

вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

US 850216 B1, 06.08.2013

ALIEVA A.KH. et al. Polymorphisms in the
SNCA Gene: Association with the risk of
development of the sporadic form of
Parkinson's disease and the level of SNCA
gene Expression in peripheral blood of
patients from Russia. 2013, Neuroscience &
Medicine, Vol. 4, no. 4, P. 208 – 214
ELBAZ A. et al. Independent and joint effects
of the MAPT and SNCA genes in Parkinson
disease. Ann Neurol., 2011, Vol. 69, no. 5, P.
778 – 792

JIAN CD et al. SNCA rs3822086 C>T
Polymorphism increases the susceptibility to
Parkinson's disease in a chinese han
population. Genet Test Mol. Biomarkers, 2015,
Vol. 19, no. 9, P. 481 – 487

HAN W. et al. Alpha-synuclein (SNCA)
polymorphisms and susceptibility to
Parkinson's disease: a meta-analysis. Am J
Med Genet B Neuropsychiatr Genet., 2015,
Vol.168B, no. 2, P. 123 – 134

(54) СПОСІБ ПЛР-ПДРФ АНАЛІЗУ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА АЛЬФА-СИНУКЛЕЇНУ SNCA rs2583988

(57) Реферат:

Винахід належить до способу ПЛР-ПДРФ аналізу однунуклеотидного поліморфізму гена альфа-синуклеїну SNCA rs2583988, шляхом рестриктного аналізу фрагмента гена SNCA, попередньо ампліфікованого за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

UA 120479 C2

Запропонований спосіб стосується галузі медицини, а саме до медичної та молекулярної генетики.

Він може бути використаний в діагностичній та дослідницькій роботі.

Більшість неінфекційних захворювань розвиваються в результаті складної взаємодії безлічі генів і навколишнього середовища. Людина не народжується з захворюванням, але може мати високий ризик його придбання. Це називається генетичною схильністю або сприйнятливістю. Генетична схильність до певного захворювання пов'язана з наявністю мутацій одного або декількох генів, і/або комбінації їх алелів. Розвиток методів молекулярної генетики надав можливість виявляти схильність до того чи іншого захворювання задовго до його клінічних проявів, вчасно вживати профілактичних заходів, запобігши його розвиток або полегшити його перебіг і з урахуванням індивідуальних особливостей застосовувати терапію. У зв'язку з цим виник новий напрям - предиктивна (персоналізована) медицина. Під цим поняттям розуміють профілактичний напрямок молекулярної медицини, що характеризується індивідуальним характером (геном кожної людини індивідуальний) [Баранов В.С. Программа "Геном человека" как научная основа профилактической медицины. Вестник РАМН. 2000; 10:27-37.]. У предиктивної медицині проблеми класичної медицини (діагностика, профілактика та лікування) вирішуються на рівні нуклеїнових кислот і продуктів їх експресії - РНК і білків. Основа предиктивної медицини - аналіз поліморфізмів генів [Баранов В.С. Полиморфизм генов, экогенетические болезни и предиктивная персонализированная медицина. Экологическая генетика человека. 2011; IX(3): 3-14.].

В даний час вважається, що ключовою ланкою в патогенезі хвороби Паркінсона є агрегація пресинаптичного білка альфа-синуклеїну (SNCA). У ряді досліджень виявлено зв'язок ризику розвитку хвороби Паркінсона з локусом, що містить ген SNCA. За результатами мета-аналізу для поліморфного варіанту гена SNCA rs2583988 (C/T), встановлено значну асоціацію з розвитком хвороби Паркінсона [Han W, Liu Y, Mi Y, Zhao J, Liu D., Tian Q. Alpha-synuclein (SNCA) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2015;168B(2):123-34.], а T-алель поліморфного варіанту гена SNCA rs2583988, зустрічається значно частіше у пацієнтів із когнітивними порушеннями [Campêlo CLC, Cagni FC, de Siqueira Figueredo D, Oliveira LG Jr, Silva-Neto AB, Macedo PT, Santos JR4, Izidio GS, Ribeiro AM, de Andrade TG, de Oliveira Godeiro C Jr, Silva RH. Variants in SNCA Gene Are Associated with Parkinson's Disease Risk and Cognitive Symptoms in a Brazilian Sample. Front Aging Neurosci. 2017; 9:198. doi: 10.3389/fnagi.2017.00198. eCollection 2017].

Відомі способи аналізу поліморфізму гена SNCA rs2583988:

- полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (англ. Real-time PCR) [Linnertz C, Lutz MW, Ervin JF, Allen J, Miller NR, Welsh-Bohmer KA, Roses AD, Chiba-Falek O. The genetic contributions of SNCA and LRRK2 genes to Lewy Body pathology in Alzheimer's disease. Hum Mol Genet. 2014; 23(18): 4814-21];

- секвенування ДНК (англ. DNA sequencing) [Touchman JW, Dehejia A, Chiba-Falek O, Cabin DE, Schwartz JR, Orrison BM, Polymeropoulos MH, Nussbaum RL. Human and mouse alpha-synuclein genes: comparative genomic sequence analysis and identification of a novel gene regulatory element. Genome Res. 2001; 11(1):78-86];

- мас-спектрометрія ампліконів, одержаних за допомогою ПЛП (англ. Sequenom MassArray iPLEX platform) [Elbaz A, Ross OA, Ioannidis JP, Soto-Ortolaza AI, Moisan F, Aasly J, Annesi G, Bozi M, Brighina L, Chartier-Harlin MC, Destee A, Ferrarese C, Ferraris A, Gibson JM, Gispert S, Hadjigeorgiou GM, Jasinska-Myga B, Klein C, Krüger R, Lambert JC, Lohmann K, van de Loo S, Lioriot MA, Lynch T, Mellick GD, Mutez E, Nilsson C, Opala G, Puschmann A, Quattrone A, Sharma M, Silburn PA, Stefanis L, Uitti RJ, Valente EM, Vilarino-Guell C, Wirdefeldt K, Wszolek ZK, Xiromerisiou G, Maraganore DM, Fairer MJ; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Independent and joint effects of the MAPT and SNCA genes in Parkinson disease. Ann Neurol. 2011; 69(5):778-92.].

Недоліки: дані способи мають зачну вартість обладнання та реактивів. Усунути цей недолік можливо шляхом застосування для аналізу поліморфізму гена SNCA rs2583988 методу поліморфізму довжин рестриктних фрагментів ампліфікованих у ПЛП (англ. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism-PCR-RFLP);

Найбільш близькими до запропонованого є:

Прототип 1: Спосіб дослідження поліморфізму гена SNCA rs3822086 шляхом поліморфізму довжин рестриктних фрагментів ампліфікованих у ПЛП (PCR-RFLP). [Jian CD, Huang JM, Meng LQ, Li XB, Huang RY, Shi SL, Wu Y, Qin C, Chen J, Zhang YM, Wang S, Feng YL, Zhou SN. SNCA rs3822086 C>T Polymorphism Increases the Susceptibility to Parkinson's Disease in a Chinese Han Population. Genet Test Mol Biomarkers. 2015; 19(9):481-7.].

Недоліки прототипу: Спосіб не дозволяє виконувати дослідження поліморфізму гена *SNCA* rs2583988.

В основу корисної моделі поставлена задача створення способу ПЛР-ПДРФ аналізу поліморфізму гена альфа-синуклеїну *SNCA* rs2583988.

5 Задача виконується шляхом створення способу ПЛР-ПДРФ аналізу поліморфізму гена *SNCA* rs2583988, який відрізняється від прототипу специфічними олігонуклеотидними праймерами, прямий - `CCATGACCTCCTTGAGACCT` та зворотній: `TGCCAAAGGACТАААСААТТАСС`, що дозволяють отримувати продукти ампліфікації гена *SNCA* розміром 173 пари нуклеотидів. Після гідролізу ендонуклеазою рестрикції *RsaI* або її ізошизомерів *AfaI*, *Csp6I*, *CviQI* які мають сайт пізнавання (GTAC), за допомогою агарозного або
10 поліакриламідного гель-електрофорезу визначають розміри рестриктних фрагментів. Наявність на електрофореграмі фрагментів ДНК розміром 110 та 63 пари нуклеотидів свідчить про гомозиготний генотип гена *SNCA* rs2583988 *TT*, фрагментів ДНК 173, 110 та 63 свідчить про гетерозиготний генотип гена *SNCA* rs2583988 *TA*, *TC*. Наявність на електрофореграмі
15 фрагментів ДНК розміром 173 пари нуклеотидів свідчить про гомозиготний генотип гена *SNCA* rs2583988.

 Таким чином запропонований спосіб ПЛР-ПДРФ аналізу поліморфізму гена *SNCA* rs2583988 із застосуванням пари специфічних олігонуклеотидних праймерів, прямий - `CCATGACCTCCTTGAGACCT` та зворотний - `TGCCAAAGGACТАААСААТТАСС` та ендонуклеази рестрикції *RsaI* або її ізошизомерів *AfaI*, *Csp6I*, *CviQI* які мають сайт пізнавання (GTAC) приводить до суттєвого зменшення вартості аналізу.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

25 1. Спосіб ПЛР-ПДРФ аналізу однонуклеотидного поліморфізму гена альфа-синуклеїну *SNCA* rs2583988, що передбачає рестриктний аналіз фрагмента гена *SNCA*, попередньо ампліфікованого за допомогою полімеразної реакції, який **відрізняється** тим, що для полімеразної ланцюгової реакції використовується пара специфічних олігонуклеотидних праймерів, прямий `CCATGACCTCCTTGAGACCT` та зворотний
30 `TGCCAAAGGACТАААСААТТАСС`, а для рестриктного аналізу використовуються ендонуклеаза *RsaI* або її ізошизомери *AfaI*, *Csp6I*, *CviQI*, які мають сайт пізнавання (GTAC).

 2. Спосіб за п. 1, де визначення розмірів рестриктних фрагментів виконують з використанням агарозного або поліакриламідного гель-електрофорезу.

35 3. Спосіб за п. 1 або 2, де наявність на електрофореграмі фрагментів ДНК розміром 110 та 63 пари нуклеотидів свідчить про гомозиготний генотип гена *SNCA* rs2583988 *TT*, фрагментів ДНК 173, 110 та 63 свідчить про гетерозиготний генотип гена *SNCA* rs2583988 *TA*, *TC*, а фрагмента ДНК розміром 173 пари нуклеотидів свідчить про гомозиготний генотип гена *SNCA* rs2583988 *AA* або *CC*, причому генотип гена *SNCA* за поліморфізмом rs2583988 *AA* чи *CC* не має суттєвого значення, оскільки прогностичну цінність має *T*-алель.

40

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601