



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **129744** (13) **U**  
(51) МПК (2018.01)  
**G01N 1/00**  
**G01N 27/26** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<p>(21) Номер заявки: <b>u 2018 05035</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>07.05.2018</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>12.11.2018</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>12.11.2018, Бюл.№ 21</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Паленка Олена Євгенівна (UA), Литвиненко Наталія Володимирівна (UA), Кривчун Анжеліна Михайлівна (UA), Почерняєв Артем Костянтинович (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ", вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b></p>
--	--

**(54) СПОСІБ МОДИФІКАЦІЇ ТИПУВАННЯ ГЕНА АПОЛІПОПРОТЕЇН Е ЛЮДИНИ**

(57) Реферат:

Спосіб модифікації типування гена аполіпопротеїн Е (АроЕ) людини включає дослідження гена АроЕ. Модифікацію гена АроЕ здійснюють шляхом розробки олігонуклеотидних праймерів, повністю гомологічних нуклеотидній послідовності гена АроЕ.

**UA 129744 U**



Корисна модель належить до експериментальної медицини, зокрема, медичної генетики, та може бути використана в нейрохірургічній практиці.

Аполіпопротеїн Е (АРОЕ) входить до складу ліпопротеїнів низької щільності (ЛПДНЩ), проміжної щільності (ЛППП) і високої щільності (ЛПВЩ). У залишкових компонентів хіломікронів забезпечує зв'язування всіх цих ліпопротеїдів з апопротеїн-В, Е-рецептором. АРОЕ бере участь також в транспорті холестерину. Найбільш високий вміст АРОЕ - 13 % від загального вмісту білка відзначається в ЛПДНЩ. Він знайдений також в ліпопротеїнів, що утворюються в тонкому кишечнику в процесі всмоктування екзогенних ліпідів - залишкових компонентів хіломікронів. АРОЕ людини являє собою поліпептид з 299 амінокислотних залишків, молекулярна маса якого становить 34200 дальтон. Ген аполіпопротеїна Е (АроЕ) локалізована на 19-й хромосомі, його розмір становить 37 000 нуклеотидів на своїй структурі містить чотири екзона. Ген ароЕ має три мажорні аллелі:  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  і  $\epsilon 4$ , що кодують три ізоформи Е2, Е3 і Е4. Ці ізоформи розрізняються по спорідненості до апопротеїн-В, Е-рецептора і амінокислотним складом в поліморфних ділянках Е2-Arg / Arg, Е3-Arg / Cys і Е4-Cys / Cys.

Повна відсутність апопротеїна Е призводить до накопичення ЛППП і залишкових компонентів хіломікронів, що призводить до розвитку атеросклерозу в молодому віці. АРОЕ є одним з ключових білків метаболізму ліпопротеїнів і холестерину і бере участь в утворенні і секреції ліпопротеїнів. Крім цього передбачається, що він бере участь в клітинному зростанні і диференціюванні, а також в репарації і регенерації пошкоджених тканин. У центральній нервовій системі АроЕ експресується в астроцитах і виявлений в спинномозковій рідині, а також є одним з компонентів сенильних бляшок і нейрофібрилярних клубків, які утворюються при хворобі Альцгеймера. Показано, що активність АРОЕ залежить від алельного стану його гена.

Дослідження дев'яти популяцій (Тіроль, Судан, Індія, Китай, Японія, Угорщина, Ісландія, Фінляндія, і Малайзія) виявили значну гетерогенність, між ними в частотах алелей гена ароЕ і середнім рівнем холестерину в крові. Основні фенотип АРОЕ для всіх груп населення були: фенотип Е3 / Е2 (діапазон частот від 7,0 % у індійців до 16,9 % в малайців), Е3 / Е3 (діапазон частот від 39,8 % у суданців до 72,1 % у японців), і Е3 / Е4 (діапазон частот від 11,3 % у японців до 35,9 % у суданців). Середні рівні холестерину в знаходилися в діапазоні від 144,2 мг / дл в суданській до 228,5 мг / дл в ісландській популяціях. Двохфакторну дисперсійний аналіз впливу популяції і фенотипу АРОЕ на рівень холестерину не показали значного взаємозв'язку, тобто, вплив фенотипу АРОЕ на рівень холестерину суттєво не відрізняється серед різних популяцій. Ці дані вказують на те, що різні алельні варіанти гена АроЕ діють щодо одноманітно в різних популяціях, незважаючи на відмінності в генетичному тлі і екологічних факторах.

В даний час, спосіб дослідження ділянки гена АроЕ запропонований Hixson J.E. і Vernier D.T. широко використовується як в дослідних роботах, так і в клінічній діагностиці. Наприклад, подібний підхід був повторений з опублікуванням результатів досліджень ряду авторів:

1. Поліморфізм гена АРОЕ і ішемічний інсульт в городской популяції Западной Сибири / М.И. Воевода, С.В. Шишкин, В.Н. Максимов и [др.] // Сибирский научный медицинский журнал. - 2010. - №30/3. - С. 119-123.

2. Функциональная значимость полиморфизма генов АроЕ и SOD2 в формировании хронической HCV-инфекции / Семёнова Н. А и [др.] // Сибирская медицина. - 2009. - № 3. - С. 64-69.

3. Поліморфізм гена аполіпопротеїна Е и активность белка-переносчика эфиров холестерина в плазме крови больных сахарным диабетом типа 2 // Chaaba R и [др.] // Молекулярная биология. - 2008. - № 42/6. - С. 931-936.

Найбільш близьким до запропонованого є спроба відтворити спосіб дослідження гена АроЕ запропонованого Hixson JE і Vernier DT. (Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. // Hixson JE, Vernier DT // Arteriosclerosis. - 1990. - №31. - P. 545-548.) Недоліком даного методу є те, що було визначено відсутність специфічної ампліфікації в полімеразної ланцюгової реакції з використанням олігонуклеотидних праймерів F4 і F6.

В основу корисної моделі поставлена задача модифікації методу визначення алельних варіантів  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  і  $\epsilon 4$  гена АроЕ людини.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі модифікації типування гена аполіпопротеїн Е (АроЕ) людини, що включає дослідження гена АроЕ, згідно з корисною моделлю модифікацію гена АроЕ здійснюють шляхом розробки олігонуклеотидних праймерів, повністю гомологічних нуклеотидній послідовності гена АроЕ.

Спосіб здійснюють наступним чином: ДНК виділяють з крові стабілізованою ЕДТА з використанням іонообмінної смоли Chelex-100. Типування поліморфних кодонів 112С> Т і 158С> Т гена АроЕ виконували методом ПЛР-ПДРФ. Для аналізу був використаний

модифікований спосіб Nixson J.E. і Vernier D.T. 1990. Модифікація полягала в розробці олігонуклеотидних праймерів повністю гомологічних нуклеотидної послідовності гена ApoE. Вирівнювання нуклеотидної послідовності гена ApoE (NG\_007084) і нуклеотидної послідовності праймерів проводили з використанням програми MEGA 4.0. Структура олігонуклеотидних праймерів повністю гомологічних нуклеотидної послідовності гена ApoE підбрана за допомогою програми FastPCR. Олігонуклеотидних праймери наступної структури APOE2F-5 'ACGCGGGCACGGCTGTCCAAGGA 3" (прямий) і APOE2R-5 TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACA 3" (зворотний), були синтезовані (Metabion GmbH, Німеччина). Ампліфікацію за допомогою полімеразної ланцюгової реакції виконували з використанням реагентів (MBI Fermentas, Литва) на ампліфікаторі "Терцик" (ДНК-технологія, Росія). Електрофоретичне поділу ампліфікованих фрагментів ДНК гена apoE проводили в 2 % агарозному гелі в трисборатном буфері (1 x TBE). Рестрикцію ендонуклеази Hha I (GCG ↓ C) виконували з використанням реагентів (MBI Fermentas, Литва). Електрофоретичне поділу фрагментів ДНК гена apoE проводили в 8 % поліакриламідному гелі в протягом 2 годин при силі струму 50 мА. в трисборатном буфері (1 x TBE). Розміри фрагментів ДНК визначали з використанням маркерів молекулярної маси GeneRuler 50bp DNA Ladder і ДНК pUC19 / Msp I (MBI Fermentas, Литва). Після закінчення електрофорезу гель фарбували розчином бромистого етидія і документували за допомогою цифрової камери.

В результаті даного способу була підбрана структура пари олігонуклеотидних праймерів, дозволила отримувати специфічні продукти ампліфікації розміром 227 п.н. (фіг. 1)

На фіг. 1 показано електрофоретичний поділ ампліфікованих фрагментів ДНК гена ApoE людини в 2 % агарозному гелі. M1 - ДНК pUC19 / Msp I, 1, 2, 3, 4 - продукти ампліфікації гена ApoE (температура відпалу олігонуклеотидних праймерів 58 °C; 5,6,7,8-60 °C; 9,10,11,12-63 °C.

Комбінації трьох алелей гена ApoE ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  і  $\epsilon 4$ ) детермінує шість фенотипів APOE (E2 / E2, E3 / E3, E4 / E4, E2 / E3, E2 / E4, E3 / E4). Ця генетична варіабельність виникла в результаті односторонніх замін в двох сайтах ДНК, що кодують амінокислотні залишки APOE 112 і 158.

Крім трьох алелей гена ApoE ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  і  $\epsilon 4$ ), був виявлений рідко зустрічається алельний варіант ApoE ( $\epsilon 1$ ). Він виник в результаті односторонніх замін в триплеті 127, що було підтверджено наявністю сайту рестрикції Taq I в цьому алельному варіанті гена ApoE.

Завдяки даному способу було виявлено і визначено тільки всі мажорні алельні варіанти  $\epsilon 2$  (91,78 п.н.),  $\epsilon 3$  (91,48,30 п.н.) і  $\epsilon 4$  (72,48,30) (фіг. 2).

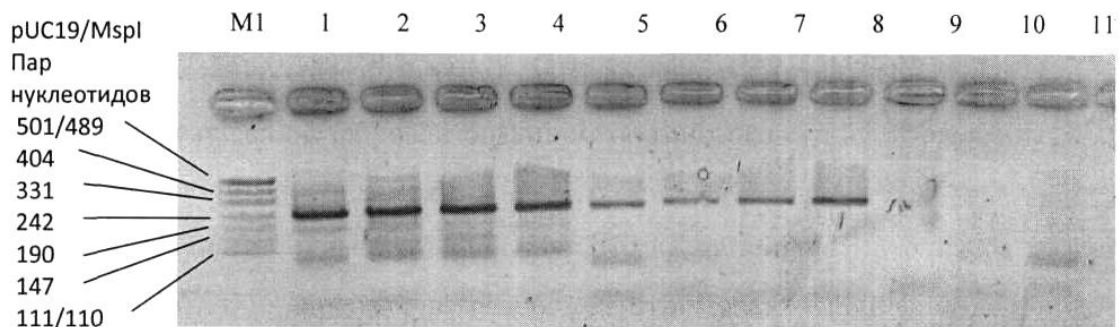
На фіг. 2 показано електрофоретичний поділ фрагментів ДНК гена ApoE людини в 8 % поліакриламідному гелі. M1-GeneRuler 50bp DNA Ladder, M2 - ДНК pUC19 / Msp I, 1 - алелі  $\epsilon 2$  (91, 78 п.н.) і  $\epsilon 3$  (91, 48, 30 п.н.), 2 - алель  $\epsilon 3$  (91, 48, 30 п.н.), 3 - алелі  $\epsilon 3$  (91, 48, 30 п.н.) і  $\epsilon 4$  (72, 48, 30), 4 - алелі  $\epsilon 2$  (91, 78 п.н.) і  $\epsilon 3$  (91, 48,30 п.н.).

Таким чином, було продемонстровано можливість коректного типування гена ApoE з використанням запропонованих олігонуклеотидних праймерів.

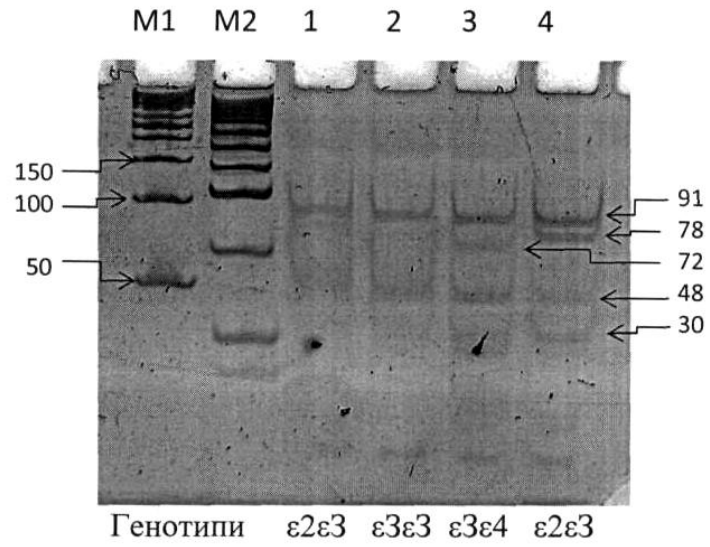
#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

40

Спосіб модифікації типування гена аполіпопротеїн Е (ApoE) людини, що включає дослідження гена ApoE, який **відрізняється** тим, що модифікацію гена ApoE здійснюють шляхом розробки олігонуклеотидних праймерів, повністю гомологічних нуклеотидній послідовності гена ApoE.



Фіг. 1



Фиг. 2

---

Комп'ютерна верстка І. Мироненко

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

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