



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/68 (2022.02); C12N 15/00 (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2020135333, 28.10.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.10.2020

Дата регистрации:
15.04.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.10.2020

(45) Опубликовано: 15.04.2022 Бюл. № 11

Адрес для переписки:

115093, Москва, ул. Люсиновская, 35, корп. 7,
ФГАНУ "ВНИМИ", врио директору Галстяну
А.Г.

(72) Автор(ы):

Вафин Рамиль Рашидович (RU),
Гильманов Хамид Халимович (RU),
Галстян Арам Генрихович (RU),
Пряничникова Наталия Сергеевна (RU),
Бигаева Алана Владиславовна (RU),
Лазарева Екатерина Германовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
научное учреждение "Всероссийский
научно-исследовательский институт
молочной промышленности" (ФГАНУ
"ВНИМИ") (RU),
Общество с ограниченной ответственностью
"Керамос-БелГУ" (ООО "Керамос-БелГУ")
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: ГИЛЬМАНОВ Х.Х.
Генотипирование крупного рогатого скота по
генам, определяющим устойчивость к лейкозу,
и генотипирование его этиологического
агента, автореферат диссертации, Казань, 2019,
с.77-91, табл. 29. ГИЛЬМАНОВ Х.Х. и др.
Генотипическая принадлежность изолятов
вируса бычьего лейкоза, циркулирующих в
популяциях крупного рогатого скота (см.
прод.)

(54) Способ генотипирования Bovine leukemia virus

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к молекулярно-генетическим методам исследований в лабораторной диагностике и мониторинге возбудителя лейкоза крупного рогатого скота. Представлен способ генотипирования Bovine leukemia virus (аббр. BLV) с совмещенной техникой полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ). В способе используют стратегию ПЦР-ПДРФ-

генотипирования BLV. Стратегия основана на филогенетическом анализе env-гена возбудителя. В nested ПЦР используют специфические «внешние» TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA и AACAAACAACCTCTGGGAAGGGT и «внутренние» CCCACAAGGGCGGCGCCGGTT и GCGAGGCCGGTCCAGAGCTGG праймеры, и соответствующие эндонуклеазы рестрикции - PvuII-ПДРФ, SspI-ПДРФ, AsuHPI-ПДРФ, HaeIII-ПДРФ и BstX21-ПДРФ. ПДРФ-протокол состоит

из 5 последовательных шагов, инициирующих на завершающем этапе реакции наработку фрагмента env-гена возбудителя. Генотип определяют исходя из анализа выравнивания и рестрикционного картирования последовательностей ДНК локуса env-гена референсных изолятов известных генотипов BLV

с последующим *in silico* моделированием рестриктограмм по 5 эндонуклеазам рестрикции: PvuII, SspI, HphI (изошизомер AsuHPI), HaeIII, BstYI (изошизомер BstX2I). Изобретение обеспечивает идентификацию 11 генотипов вирусного патогена. 2 табл., 2 ил.

(56) (продолжение):

республики Татарстан, Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2018 ВАК, аннотация, с. 34-40. ШАЕВА А.Ю. Генотипическая идентификация вируса лейкоза крупного рогатого скота, автореферат диссертации, Казань, 2011, весь документ. SANCHEZ B.E. et al. Using Genetic and Epigenetic Markers to Improve Differential Diagnosis of Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia by Noninvasive Methods in Mexican Patients. Clin Genitourin Cancer. 2018. 16(4):e867-e877.

RU 2770412 C1

RU 2770412 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/68 (2022.02); C12N 15/00 (2022.02)

(21)(22) Application: **2020135333, 28.10.2020**

(24) Effective date for property rights:
28.10.2020

Registration date:
15.04.2022

Priority:

(22) Date of filing: **28.10.2020**

(45) Date of publication: **15.04.2022** Bull. № 11

Mail address:

**115093, Moskva, ul. Lyusinovskaya, 35, korp. 7,
FGANU "VNIMI", vrio direktoru Galstyanu A.G.**

(72) Inventor(s):

**Vafin Ramil Rashidovich (RU),
Gilmanov Khamid Khalimovich (RU),
Galstyan Aram Genrikhovich (RU),
Pryanichnikova Nataliya Sergeevna (RU),
Bigaeva Alana Vladislavovna (RU),
Lazareva Ekaterina Germanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
nauchnoe uchrezhdenie "Vserossijskij
nauchno-issledovatel'skij institut molochnoj
promyshlennosti" (FGANU "VNIMI") (RU),
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennostyu
"Keramos-BelGU" (OOO "Keramos-BelGU")
(RU)**

(54) **METHOD FOR GENE IDENTIFICATION OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, namely, to molecular genetic research methods in laboratory diagnostics and monitoring of the causative agent of bovine leukemia. Proposed is a method for gene identification of Bovine leukemia virus (abbr. BLV) with a combined technique of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). In the method, a strategy of PCR-RFLP genotyping of BLV is used. The strategy is based on phylogenetic analysis of the env gene of the causative agent. Specific "external" TCTGTGCCAAGTCTCCAGATA and AACAACAACCTCTGGGAAGGGT and "internal" CCCACAAGGGCGGCGCCGTT and GCGAGGCCGGTCCAGCTGG primers, and

corresponding restriction endonucleases - PvuII-RFLP, SspI-RFLP, AsuHPI-RFLP, HaeIII-RFLP, and BstX21-RFLP are used in nested PCR. The RFLP protocol consists of 5 consecutive steps initiating the development of a fragment of the env gene of the causative agent at the final stage of the reaction. The genotype is determined based on the analysis of alignment and restriction mapping of the DNA sequences of the env gene locus of reference isolates of known genotypes of BLV, followed by in silico modelling of restrictograms for 5 restriction endonucleases: PvuII, SspI, HphI (an AsuHPI isoschizomer), HaeIII, BstYI (a BstX2I isoschizomer).

EFFECT: invention ensures identification of 11 genotypes of a viral pathogen.
1 cl, 2 tbl, 2 dwg

RU 2 770 412 C1

RU 2 770 412 C1

Изобретение относится к молекулярно-генетическим методам исследований в лабораторной диагностике и мониторинге возбудителя лейкоза крупного рогатого скота, и представляет собой способ геноидентификации Bovine leukemia virus (аббр. BLV) с совмещенной техникой полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ).

Сфера применения изобретения: генотипическая идентификация вируса лейкоза крупного рогатого скота (аббр. ВЛКРС или ВБЛ - вирус бычьего лейкоза) в системе противолейкозных мероприятий в ветеринарии, перерабатывающей и пищевой промышленности.

Молекулярно-генетические методы исследования позволяют оценить генетическое многообразие BLV, и являются наиболее информативными подходами к его геноидентификации, как при использовании филогенетического анализа секвенируемых нуклеотидных последовательностей ДНК провируса, так и ПЦР-ПДРФ-анализа в соответствии с филогенетической классификацией возбудителя. А проводимый молекулярный мониторинг инфицированности стад крупного рогатого скота генотипами BLV способен прояснить экологию возбудителя с объективным контролем эпизоотического процесса и перспективой эффективного искоренения инфекции.

Современная филогенетическая классификация BLV представлена одиннадцатью генотипами, первые семь из которых описали аргентинские ученые в 2009 г. (S.M. Rodriguez et al., 2009), восьмой генотип - исследователи из России (А.Ю. Шаева и др., 2011, 2012; Р.Р. Вафин и др., 2013), Хорватии (D. Balić et al., 2013) и коллаборация европейских ученых (M. Rola-Łuszczak et al., 2013) в 2011-2013 гг.; девятый генотип - группа аргентинских, чилийских и японских ученых в 2016 г. (M. Polat et al., 2016); десятый генотип - группа исследователей из Таиланда и Южной Кореи в том же году (E. Lee et al., 2016), и одиннадцатый генотип - китайские исследователи в 2019 г. (C. Yu et al., 2019).

Из уровня техники известна стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV, позволявшая на момент ее совершенствования идентифицировать 10 генотипов изучаемого вирусного патогена диагностически значимой интерпретацией генерируемых 57 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей (I.M. Donnik et al., 2019).

Цель изобретения - разработать способ геноидентификации Bovine leukemia virus с совмещенной техникой ПЦР-ПДРФ-анализа в соответствии с филогенетической классификацией возбудителя и с учетом пополняемых знаний о генетическом многообразии 11 известных генотипов BLV.

Нами разработана актуализированная стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV, согласуемая с его филогенетической классификацией, обеспечивающая идентификацию всех открытых на сегодняшний день 11 генотипов вирусного патогена интерпретацией генерируемых 58 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей с присвоенными идентификаторами.

Условия проведения геноидентификации Bovine leukemia virus.

Выделение ДНК из цельной консервированной крови и молока крупного рогатого скота осуществлено коммерческим набором «ДНК-сорб С-М» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора МЗ РФ).

При постановке nested ПЦР с экстрагированными образцами провирусной ДНК BLV использованы «внешние» («env5032» и «env5608») и «внутренние» («env5099» и «env5521») праймеры (таблица 1), иницирующие на завершающем этапе реакции наработку фрагмента env-гена возбудителя длиной 444 bp.

Соответствующие эндонуклеазы рестрикции, использованные при ПЦР-ПДФ-генотипировании BLV, согласуемой с его филогенетической классификацией, указаны в таблице 2.

При ПЦР-ПДФ-моделировании применена программа NEBcutter v.2.0.

Таблица 1. Протокол nested ПЦР
(амплификация фрагмента env-гена BLV)

| 1-ый раунд ПЦР | | | | |
|--|-----------------------|----------------------|---------------|---------------|
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 13,4 | 134 |
| dNTPs | 2,5 мМ | 0,25 мМ | 2 | 20 |
| Буфер для Таq ДНК полимеразы | 10× | 1× | 2 | 20 |
| Таq ДНК полимеразы | 5 ед. | 1 ед. | 0,2 | 2 |
| Внешний праймер «env5032» | 50 мкМ | 0,5 мкМ | 0,2 | 2 |
| Внешний праймер «env5608» | 50 мкМ | 0,5 мкМ | 0,2 | 2 |
| Проба ДНК | | | 2 | |
| ИТОГО | | | 20 | |
| <p>Внешние праймеры: «env5032»: 5'-ТСТGTGCCAAGTCTCCCAGATA-3' (22 н.) «env5608»: 5'-ААСААСААССТСТGGGAAGGGT-3' (22 н.) Режим амплификации: ×1: 94⁰С – 4 мин. ×40: 94⁰С – 30 сек, 62⁰С – 30 сек, 72⁰С – 60 сек. ×1: 72⁰С – 5 мин.</p> | | | | |
| 2-ой раунд ПЦР | | | | |
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 36,6 | 366 |
| dNTPs | 2,5 мМ | 0,25 мМ | 5 | 50 |
| Буфер для Таq ДНК полимеразы | 10× | 1× | 5 | 50 |
| Таq ДНК полимеразы | 5 ед. | 2 ед. | 0,4 | 4 |
| Внутренний праймер «env5099» | 50 мкМ | 0,5 мкМ | 0,5 | 5 |
| Внутренний праймер «env5521» | 50 мкМ | 0,5 мкМ | 0,5 | 5 |
| Проба ДНК 1-го раунда ПЦР | | | 2 | |
| ИТОГО | | | 50 | |
| <p>Внутренние праймеры: env5099: 5'-СССАСААГГГССГССГССГТТТ-3' (22 н.) env5521: 5'-СССАСААГГГССГССГТТТ-3' (22 н.) Режим амплификации: ×1: 94⁰С – 4 мин. ×40: 94⁰С – 30 сек, 68⁰С – 30 сек, 72⁰С – 60 сек. ×1: 72⁰С – 5 мин. Электрофорез в 2,5 % агарозе ПЦР-продукт 444 bp</p> | | | | |

Таблица 2. ПДРФ-протокол генотипирования BLV

| 1. PvuII-ПДРФ | | | | |
|--|-----------------------|----------------------|---------------|---------------|
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 5,8 | 58 |
| BSA | 10 мг/мл | 0,1 мг/мл | 0,2 | 2 |
| SE-буфер G | 10× | 1× | 2 | 20 |
| PvuII | 10 ед. | 20 ед. | 2 | 20 |
| ДНК 2-го раунда ПЦР | | | 10 | |
| ИТОГО | | | 20 | |
| Инкубация при 37 ⁰ С в течение ночи | | | | |
| 2. SspI-ПДРФ | | | | |
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 6,8 | 68 |
| BSA | 10 мг/мл | 0,1 мг/мл | 0,2 | 2 |
| SE-буфер K | 10× | 1× | 2 | 20 |
| SspI | 10 ед. | 10 ед. | 1 | 10 |
| ДНК 2-го раунда ПЦР | | | 10 | |
| ИТОГО | | | 20 | |
| Инкубация при 37 ⁰ С в течение ночи | | | | |
| 3. AsuHPI-ПДРФ | | | | |
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 7 | 70 |
| SE-буфер O | 10× | 1× | 2 | 20 |
| AsuHPI | 4 ед. | 4 ед. | 1 | 10 |
| ДНК 2-го раунда ПЦР | | | 10 | |
| ИТОГО | | | 20 | |
| Инкубация при 37 ⁰ С в течение ночи | | | | |
| 4. HaeIII-ПДРФ | | | | |
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 6 | 60 |
| SE-буфер G | 10× | 1× | 2 | 20 |
| HaeIII | 10 ед. | 20 ед. | 2 | 20 |
| ДНК 2-го раунда ПЦР | | | 10 | |
| ИТОГО | | | 20 | |
| Инкубация при 37 ⁰ С в течение ночи | | | | |
| 5. BstX2I -ПДРФ | | | | |
| Реактив | Исходная концентрация | Рабочая концентрация | 1 проба (мкл) | 10 проб (мкл) |
| dH ₂ O | | | 7 | 70 |
| SE-буфер G | 10× | 1× | 2 | 20 |
| BstX2I | 10 ед. | 10 ед. | 1 | 10 |
| ДНК 2-го раунда ПЦР | | | 10 | |
| ИТОГО | | | 20 | |
| Инкубация при 60 ⁰ С в течение ночи | | | | |

Для детекции полученных результатов ПЦР- и ПЦР-ПДРФ-анализа применен горизонтальный электрофорез в 2,5% агарозном геле с буфером TBE (pH 8,0), содержащим бромистый этидий, с последующим рассмотрением электрофореграмм в УФ-трансиллюминаторе ($\lambda=310$ нм). Размеры генерируемых фрагментов ДНК были

оценены сопоставлением со стандартными маркерами молекулярного веса ДНК (ООО «СибЭнзим»).

Секвенирование продуктов ПЦР-амплификации локуса env-гена выявляемых изолятов
 5 провируса BLV проведено на генетическом капиллярном анализаторе (секвенаторе)
 «ABI PRISM 3100» («Applied Biosystems», США) с применением «внутренних»
 олигонуклеотидных праймеров «env5099» и «env5521» в качестве сиквенсных.
 Выравнивание секвенированных последовательностей локуса env-гена изолятов
 провируса BLV с соответствующими нуклеотидными последовательностями
 референсных изолятов BLV, ранее депонированных в GenBank, осуществлено с
 10 использованием программ BLAST и MEGA-4 с последующим филогенетическим
 анализом.

Таким образом, в результате верификации разработанного способа
 геноидентификации Bovine leukemia virus с актуализированной стратегией ПЦР-ПДРФ-
 генотипирования BLV, согласуемой с его филогенетической классификацией, получен
 15 технический результат, выраженный в способности идентифицировать все открытые
 на сегодняшний день 11 генотипов вирусного патогена интерпретацией генерируемых
 58 генотип-ассоциированных комбинаций ПЦР-ПДРФ-профилей с присвоенными
 идентификаторами (фиг. 1, фиг. 2.).

При этом расчетные данные для верификация предложенного способа ПЦР-ПДРФ
 20 были получены также исходя из анализа выравнивания и рестрикционного картирования
 последовательностей ДНК локуса env-гена референсных изолятов известных генотипов
 BLV с последующим *in silico* моделированием рестриктограмм по 5 эндонуклеазам
 рестрикции: PvuII, SspI, HphI (изошизомер AsuHPI), HaeIII, BstYI (изошизомер BstX2I).

ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

- 25 1. Rodriguez, S.M. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence
 for the existence of two novel clades / S.M. Rodriguez, M.D. Golemba, R.H. Campos, K. Trono,
 L.R. Jones // J. Gen. Virol. - 2009. - V. 90. - N. 11. - P. 2788-2797. DOI: 10.1099/vir.0.011791-
 0.
- 30 2. Шаева, А.Ю. Генотипическая идентификация изолятов ВЛКРС, выявленных в
 хозяйствах Республики Татарстан / А.Ю. Шаева, Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, Б.В. Камалов,
 А.М. Алимов, М.Ш. Тагиров // Ученые записки Казанской государственной академии
 ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2011. - Т. 208. - С. 330-337.
- 35 3. Шаева, А.Ю. Идентификация нового генотипа ВЛКРС / А.Ю. Шаева, З.Р. Гараева,
 Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, А.М. Алимов // Ученые записки Казанской государственной
 академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2012. - Т. 211. - С. 192-197.
4. Вафин, Р.Р. Выявление нового (8-го) генотипа ВЛКРС в различных регионах мира
 / Р.Р. Вафин, Н.З. Хазипов, А.Ю. Шаева, З.Р. Закирова, Л.И. Зайнуллин, С.В. Тюлькин,
 И.Р. Абдулина, А.М. Алимов // Фундаментальные исследования. - 2013. - №10 (часть
 7). - С. 1467-1471.
- 40 5. **Balić, D.** Identification of a new genotype of bovine leukemia virus / **D. Balić,**
I. Lojkić, M. Periškić, T. Bedeković, A. Jungić, N. Lemo, B. Roić, Z. Cač, L.
Barbić, J. Madić // Arch. Virol. - 2012. - V. 157. - N. 7. - P. 1281-1290. DOI: 10.1007/s00705-
 012-1300-4
- 45 6. **Rola-Łuszczak, M.** The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates
 from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny / **M. Rola-Łuszczak, A. Pluta,**
M. Olech, I. Donnik, M. Petropavlovskiy, A. Gerilovych, I. Vinogradova, B. Choudhury,

J. Kuźmak // PLoS One. - 2013. - V. 8. -N. 3. - P. e58705. DOI: 10.1371/journal.pone.0058705.

7. Polat, M. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis / M. Polat, S.N. Takeshima, K. Hosomichi, J. Kim, T. Miyasaka, K. Yamada, M. Arainga, T. Murakami, Y.

5 Matsumoto, V. de la Barra Diaz, C.J. Panei, E.T. **González, M.** Kanemaki, M. Onuma, G. Giovambattista, Y. Aida // Retro virology. - 2016. - V. 13. - N. 4. DOI: 10.1186/s12977-016-0239-z.

8. Lee, E. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle / E. Lee E, E.J. Kim, J. Ratthanophart, R. Vitoonpong, B.H. Kim, IS. Cho, J.Y. Song, K.K. Lee, Y.K. Shin // Infect. Genet. Evol. - 2016. - V. 41. - N. 245-254. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.04.010.

9. Yu, C. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China / C. Yu, X. Wang, Y. Zhou, Y. Wang, X. Zhang, Y. Zheng // BMC Vet. Res. - 2019. - V. 15. - N. 179. DOI: 10.1186/s12917-019-1863-3.

10. Donnik, I.M. Genetic identification of bovine leukaemia virus / I.M. Donnik, R.R. Vafin, A.G. Galstyan, A.S. Krivonogova, A.Y. Shaeva, Kh.Kh. Gilmanov, R.G. Karimova, S.V. Tyulkin, **J. Kuźmak** // Foods and Raw Materials. - 2018. - V. 6. - N. 2. - P. 314-324. DOI: 10.21603/2308-4057-2018-2-314-324.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Пояснение к Фиг. 1.

Актуализированная стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV в соответствии с его филогенетической классификацией

Примечания:

Г - генотип. К - комбинация. ID - идентификатор.

Пояснение к фиг. 2.

Электрофореграмма ПЦР-ПДРФ-профилей 1-го генотипа BLV, интерпретированных актуализированной стратегией генотипирования.

Обозначения:

1, 7) ДНК-маркеры 100 bp + 50 bp (СибЭнзим). 2-6) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N-1» (Г1, К1, ID1.1): 2) PvuII-ПДРФ (444 bp); 3) SspI-ПДРФ (399/45 bp); 4) HphI-ПДРФ (224/220 bp); 5) HaeIII-ПДРФ (198/94/87/32/27/6 bp); 6) BstYI-ПДРФ (198/128/118 bp). 8-12) ПЦР-ПДРФ-профиль изолята провируса BLV «N-4» (Г1, К4, ID1.4): 8) PvuII-ПДРФ (444 bp); 9) SspI-ПДРФ (399/45 bp); 10) HphI-ПДРФ (224/220 bp); 11) HaeIII-ПДРФ (198/94/87/32/27.6 bp); 12) BstYI-ПДРФ (246/198 bp). Примечания:

Г - генотип. К - комбинация. ID - идентификатор.

(57) Формула изобретения

Способ геноидентификации Bovine leukemia virus с совмещенной техникой полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, отличающийся тем, что используется стратегия ПЦР-ПДРФ-генотипирования BLV, основанная на филогенетическом анализе env-гена возбудителя, которая обеспечивает идентификацию 11 генотипов вирусного патогена за счет использования в nested ПЦР подобранных специфических «внешних» TCTGTGCCAAGTCTCCCAGATA и ААСААСААССТСТGGGAAGGGT и «внутренних» CCCACAAGGGCGGCGCCGGTT и GCGAGGCCGGGTCCAGAGCTGG праймеров и соответствующих эндонуклеаз рестрикции - PvuII-ПДРФ, SspI-ПДРФ, AsuHPI-ПДРФ, HaeIII-ПДРФ и BstX21-ПДРФ, использованных в ПДРФ-протоколе, состоящем из 5 последовательных шагов, инициирующих на завершающем этапе реакции наработку фрагмента env-гена

возбудителя, генотип определяют исходя из анализа выравнивания и рестрикционного картирования последовательностей ДНК локуса env-гена референсных изолятов известных генотипов BLV с последующим *in silico* моделированием рестриктограмм по 5 эндонуклеазам рестрикции: PvuII, SspI, HphI (изошизомер AsuHPI), HaeIII, BstYI (изошизомер BstX2I).

10

15

20

25

30

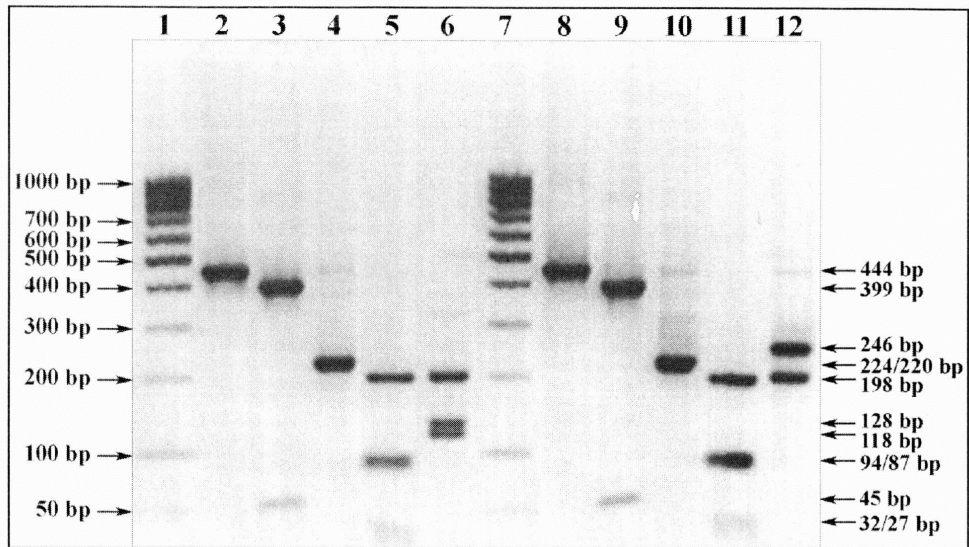
35

40

45

| Г | Изолят | GenBank A/N | ЩР- продукт (bp) | ПДРФ-фрагменты (bp) | | | | | К | ID |
|----|----------------|----------------|------------------------|---------------------|-------------|---------------|----------------------|---------------|----|------|
| | | | | <i>PvuII</i> | <i>SspI</i> | <i>HphI</i> | <i>HaeIII</i> | <i>BstYI</i> | | |
| 1 | AL-63 | FJ808571 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 198/128/118 | 1 | 1.1 |
| 1 | Cow 527 | AF007764 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 285/94/32/27/6 | 198/128/118 | 2 | 1.2 |
| 1 | 23 | U87873 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 312/94/32/6 | 198/128/118 | 3 | 1.3 |
| 1 | AL-2106 | FJ808578 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 246/198 | 4 | 1.4 |
| 1 | UruC06II | FM955558 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 285/94/32/27/6 | 246/198 | 5 | 1.5 |
| 1 | VdM | M35239 | 444 | 444 | 399/45 | 224/181/39 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 6 | 1.6 |
| 1 | Kurdistan | EU266062 | 444 | 444 | 399/45 | 220/196/28 | 198/119/94/27/6 | 198/128/118 | 7 | 1.7 |
| 2 | AL-164 | FJ808574 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 198/128/118 | 8 | 2.1 |
| 2 | PL-4960 | FJ808590 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 198/87/49/45/32/27/6 | 198/128/118 | 9 | 2.2 |
| 2 | ARGSF8 | AF485773 | 444 | 280/164 | 399/45 | 444 | 198/94/87/32/27/6 | 198/128/118 | 10 | 2.3 |
| 2 | AL-1453 | FJ808577 | 444 | 280/164 | 444 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 198/128/118 | 11 | 2.4 |
| 3 | USCA-1 | EF065647 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 285/94/32/21/6/6 | 198/128/96/22 | 12 | 3.1 |
| 3 | USCA-2 | EF065648 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 285/94/32/27/6 | 198/128/96/22 | 13 | 3.2 |
| 3 | JPFU | EF065650 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 285/94/32/27/6 | 198/128/118 | 14 | 3.3 |
| 4 | BG | EF065638 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 444 | 15 | 4.1 |
| 4 | 3 | U87872 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 444 | 16 | 4.2 |
| 4 | IS-c16 | JQ353652 | 444 | 280/164 | 399/45 | 444 | 198/94/87/32/27/6 | 444 | 17 | 4.3 |
| 4 | N023 | KC867149 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 253/191 | 18 | 4.4 |
| 4 | I_BY | HQ902258 | 444 | 280/164 | 444 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 444 | 19 | 4.5 |
| 4 | N034 | KC886611 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 198/121/87/32/6 | 444 | 20 | 4.6 |
| 4 | IS-c9 | JQ353640 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 198/119/94/27/6 | 444 | 21 | 4.7 |
| 4 | NK11 | JQ686117 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/220 | 285/94/32/27/6 | 444 | 22 | 4.8 |
| 4 | IS-c10 | JQ353650 | 444 | 280/164 | 399/45 | 220/145/79 | 198/94/87/32/27/6 | 444 | 23 | 4.9 |
| 5 | CRAS-1 | EF065635 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/181/39 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 24 | 5.1 |
| 5 | CRGC | EF065639 | 444 | 280/164 | 399/45 | 224/181/39 | 285/94/32/27/6 | 316/128 | 25 | 5.2 |
| 5 | CRLC-1 | EF065655 | 444 | 280/164 | 444 | 224/181/39 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 26 | 5.3 |
| 6 | PL-1238 | FJ808582 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 285/94/32/27/6 | 316/128 | 27 | 6.1 |
| 6 | I51 | AY185360 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 28 | 6.2 |
| 6 | GS3 | MF574055 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 29 | 6.3 |
| 6 | SC2 | MF574060 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 242/128/74 | 30 | 6.4 |
| 6 | QH1 | MF574057 | 444 | 444 | 213/186/45 | 444 | 198/94/87/32/21/6/6 | 316/128 | 31 | 6.5 |
| 6 | Pucallpa-7 | LC075552 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 198/94/87/32/27/6 | 316/79/49 | 32 | 6.6 |
| 6 | Paraguay-96 | LC075556 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 198/121/87/32/6 | 316/128 | 33 | 6.7 |
| 7 | N28 | HM102356 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 198/94/87/32/27/6 | 294/128/22 | 34 | 7.1 |
| 7 | 176 | AY515276 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 35 | 7.2 |
| 7 | I2 | S83530 | 444 | 444 | 444 | 224/220 | 285/94/32/27/6 | 316/128 | 36 | 7.3 |
| 7 | 14 | AY515274 | 444 | 444 | 444 | 145/137/83/79 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 37 | 7.4 |
| 7 | 30 | DQ059417 | 444 | 444 | 444 | 444 | 198/87/49/45/32/27/6 | 316/128 | 38 | 7.5 |
| 7 | 3S | JF720351 | 444 | 280/164 | 444 | 224/137/83 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 39 | 7.6 |
| 7 | 4T-c19 | JQ353655 | 444 | 444 | 399/45 | 224/137/83 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 40 | 7.7 |
| 7 | IS-c4 | JQ353651 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 198/94/87/32/27/6 | 316/79/49 | 41 | 7.8 |
| 7 | NK17 | JQ686120 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 198/87/49/45/32/27/6 | 316/128 | 42 | 7.9 |
| 7 | 4S | JF720352 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 198/119/94/27/6 | 316/128 | 43 | 7.10 |
| 7 | IS-c6 | JQ353633 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 198/121/87/32/6 | 316/128 | 44 | 7.11 |
| 7 | 4T-c11 | JQ353656 | 444 | 444 | 444 | 224/137/83 | 285/94/32/27/6 | 316/128 | 45 | 7.12 |
| 7 | N067 | KC886618 | 444 | 444 | 444 | 224/137/44/39 | 198/94/87/32/27/6 | 316/128 | 46 | 7.13 |
| 7 | IS-c1 | JQ353649 | 444 | 444 | 444 | 224/220 | 198/94/87/32/27/6 | 444 | 47 | 7.14 |
| 8 | M1/ELG Cro/08 | GU724606 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 225/94/87/32/6 | 198/128/118 | 48 | 8.1 |
| 8 | N174 | JF713455 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 225/94/87/32/6 | 316/128 | 49 | 8.2 |
| 8 | ELG Cro/VRA/09 | JN990072 | 444 | 444 | 444 | 224/220 | 225/94/87/32/6 | 198/128/118 | 50 | 8.3 |
| 8 | 4-6 | HM563764 | 444 | 444 | 399/45 | 224/137/83 | 225/94/87/32/6 | 198/128/118 | 51 | 8.4 |
| 8 | MKC2137 | JQ675759 | 444 | 444 | 399/45 | 444 | 225/94/87/32/6 | 198/128/118 | 52 | 8.5 |
| 9 | Monetro-1 | LC075563 | 444 | 444 | 399/45 | 224/171/49 | 285/94/32/27/6 | 198/128/118 | 53 | 9.1 |
| 9 | Portachello-20 | LC075567 | 444 | 444 | 399/45 | 224/171/49 | 285/94/32/27/6 | 246/198 | 54 | 9.2 |
| 10 | Pa51-A3 | KU233547 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 198/94/81/32/27/6/6 | 444 | 55 | 10.1 |
| 10 | ML45-B3 | KU233540 | 444 | 444 | 399/45 | 224/220 | 279/94/32/27/6/6 | 444 | 56 | 10.2 |
| 10 | L1 | LC154066 | 444 | 444 | 444 | 224/220 | 198/94/81/32/27/6/6 | 444 | 57 | 10.3 |
| 11 | E101 | KU764746 | 444 | 444 | 444 | 224/220 | 285/94/32/27/6 | 444 | 58 | 11.1 |

Фиг. 1



Фиг. 2