

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **027258**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2017.07.31

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Номер заявки
201391408

(22) Дата подачи заявки
2012.05.04

(54) **СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СТИЛЯ ПЕРЕДВИЖЕНИЯ У ЛОШАДИ И
ПРИМЕНЕНИЕ УКАЗАННОГО СПОСОБА ДЛЯ ОТБОРА ЛОШАДИ ДЛЯ
РАЗВЕДЕНИЯ**

(31) **1130034-0; 61/514,749**

(56) WO-A1-2010029527

(32) **2011.05.05; 2011.08.03**

WO-A2-03046203

(33) **SE; US**

WO-A2-02092851

(43) **2014.05.30**

WO-A1-2006003436

(86) **PCT/SE2012/050473**

SWINBURNE J. et al. "First Comprehensive

(87) **WO 2012/150905 2012.11.08**

Low-Density Horse Linkage Map Based on Two 3-
Generation Full-Sibling, Cross-Bred Horse Reference
Families", 2000, vol. 66, pages 123-134, Genomics;
see fig. 2 page 131

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
КАПИЛЕТ ДЖИНЕТИКС АБ (SE)

(72) Изобретатель:
**Андерссон Лиса С., Андерссон Лейф,
Линдгрэн Габриэлла (SE)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложен способ прогнозирования стиля передвижения у лошади, включая способность лошади использовать альтернативные аллюры, бежать рысью или иноходью с высокой скоростью и осуществлять выездку. Способ включает определение в полученном у лошади образце наличия или отсутствия нонсенс-мутации в экзоне 2 гена DMRT3 на 23 хромосоме лошади или по меньшей мере одного ассоциированного с указанной нонсенс-мутацией генетического маркера на 23 хромосоме лошади, либо усеченной формы белка DMRT3. В изобретении также предложено применение указанного способа для отбора лошади для разведения.

B1

027258

027258

B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам прогнозирования стиля передвижения у лошадей, включая способность лошади использовать различные аллюры и способность бежать рысью или иноходью на высокой скорости. Способы включают определение в образце ДНК, полученном у лошади, аллель по меньшей мере одного генетического маркера, который расположен на 23 хромосоме лошади, где указанный маркер ассоциирован со способностью использовать различные аллюры.

Предшествующий уровень техники

Лошади демонстрируют значительную вариацию в стиле передвижения как внутри, так и между породами. Три основных аллюра у лошадей представляют собой шаг, рысь и галоп. Лошади используют эти различные аллюры в соответствии со своей скоростью, причем шаг используется при низкой скорости, рысь при более быстром способе передвижения и галоп представляет собой аллюр лошадей, обычно используемый для того, чтобы быстро передвигаться. Тем не менее, некоторые лошади обладают способностью также использовать альтернативные аллюры, например иноходь и рэкинг, и таких лошадей называют латеральными, дрессируемыми на аллюры. Шагающая лошадь перемещает две ноги с одной стороны при латеральном движении в противоположность рысющейся лошади, которая осуществляет диагональное движение, когда расположенные по диагонали передняя и задняя ноги движутся вперед и назад вместе. Кроме того, исландские лошади способны осуществлять пятый аллюр, названный тёлт, который представляет собой четырехтактный аллюр с тем же самым стилем постановки ног, как при ходьбе. Характерная особенность тёлта представляет собой то, что лошадь всегда по меньшей мере одним копытом касается грунта, обеспечивая очень мягкий аллюр. Примеры других похожих альтернативных аллюров, также известных как медленная иноходь, представляют собой фокстрот, рэк, трусца и пасо корт.

Альтернативные аллюры отличаются по стилю опускания ноги, времени и частоте и, как правило, могут быть разделены на четыре категории: иноходь, медленная иноходь с регулярным ритмом, латеральная и диагональная медленная иноходь. В табл. 1 предложена классификация пород лошадей, дрессируемых на аллюры или не дрессируемых на аллюры. В действительности большая часть пород лошадей не дрессируется на аллюры, и исключительно иллюстративные примеры таких пород перечислены в таблице. Лошади, демонстрирующие породы, классифицирующиеся как не дрессируемые на аллюры, никогда или редко способны осуществлять альтернативные аллюры, тогда как большая часть или все лошади пород, дрессируемых на аллюры, могут выполнять альтернативные аллюры. В мире существуют другие породы, дрессируемые на аллюры, дополнительно к перечисленным в табл. 1. Иногда существует значительная вариация также внутри пород в отношении стиля передвижения. Например, исландские лошади классифицируются как четырехаллюрные или пятиаллюрные, где первые могут осуществлять шаг, рысь, галоп и тёлт, тогда как последние способны также к иноходи.

Лошадь стандартbred, используемая для рысистых бегов, обладает уникальной способностью бежать рысью или иноходью с очень высокой скоростью, не переходя в галоп, который является нормальным аллюром у лошади при высокой скорости. В Северной Америке выведена субпопуляция лошадей стандартbred, которые шагают с очень высокой скоростью. Другие породы лошадей, используемые для рысистых бегов, включают породы, такие как холоднокровный рысак, финские лошади, французский рысак и орловский рысак.

Стиль передвижения у лошадей находится под строгим отбором при разведении лошадей. Например, способность бежать с использованием галопа, рыси и шага отбирают у чистокровных верховых лошадей, рысаков стандартbred и иноходцев стандартbred соответственно. Лошади, обладающие способностью использовать альтернативные аллюры, также весьма желанны со стороны некоторых наездников и представляют собой характеристику, в соответствии с которой разрабатывалось множество специализированных пород. Способы прогнозирования стиля передвижения у лошади, т.е. ее способности использовать различные аллюры, может обладать существенной важностью в коневодстве.

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения идентифицировали генетический локус у лошадей, который определяет способность лошади использовать различные аллюры и способность бежать рысью с высокой скоростью. Преждевременный стоп-кодон в гене фактора транскрипции 3, связанном с генами doublesex и tab-3 (DMRT3), обнаружен у всех протестированных лошадей, обладающих способностью осуществлять альтернативные аллюры. Мутантные лошади экспрессируют усеченный белок DMRT3, лишенный последних 174 аминокислотных остатков, но сохраняющий функциональный ДНК-связывающий домен. DMRT3 экспрессируется в подгруппе нейронов спинного мозга лошади.

Соответственно, в настоящем изобретении предложены способы прогнозирования стиля передвижения у лошадей, включая способность лошади использовать различные аллюры, способность бежать рысью или шагать с высокой скоростью и способность к выезде.

В первом аспекте изобретения предложены способы прогнозирования стиля передвижения у лошадей, включая способность лошади использовать альтернативные аллюры, способность бежать рысью с высокой скоростью и способность к выезде, при которых осуществляют экстрагирование белка из образца, полученного у лошади. Способы дополнительно включают определение в указанном белковом образце наличия или отсутствия усеченной формы белка DMRT3. Белок DMRT3 может представлять

собой белок DMRT3, усеченный по аминокислотному положению 300, соответствуя белку SEQ ID NO: 4. Определение может быть осуществлено путем применения иммунохимического способа, такого как вестерн-блоттинг, с использованием антитела против DMRT3.

Во втором аспекте изобретения предложены способы прогнозирования стиля передвижения у лошадей, включая способность лошади использовать альтернативные аллюры, способность бежать рысью с высокой скоростью и способность к выезде, при которых осуществляют экстракцию ДНК из образца, отобранного у лошади. Способы дополнительно включают определение в указанной аллели ДНК по меньшей мере одного генетического маркера, который расположен в области между фланкирующими SNP (однонуклеотидный полиморфизм) по положениям нуклеотидов 22628976 (соответствующим положению 51 в SEQ ID NO: 6) и 23315071 (соответствующим положению 51 в SEQ ID NO: 7) на 23 хромосоме лошади.

Генетический маркер может быть выбран из однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и вставок/делаций (INDEL).

Предпочтительно генетический маркер выбран из генетических маркеров, перечисленных в табл. 4, 5, 7 и 8.

Предпочтительно генетический маркер расположен в области между фланкирующими SNP по нуклеотидным положениям 22919878 и 23011289 на 23 хромосоме лошади.

Предпочтительно генетический маркер выбран из генетических маркеров, перечисленных в табл. 8.

Наиболее предпочтительно генетический маркер расположен в положении 22999655 на 23 хромосоме лошади, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1.

Конкретнее, способы могут включать идентификацию в указанной ДНК нуклеотида в одном или более чем одном конкретном положении, выбранном из положений 22919878; 22920361; 22920434; 22920646; 22920717; 22921203; 22922079; 22922780; 22923569; 22924120; 22924142; 22924299; 22924380; 22924407; 22926098; 22926188; 22926872; 22927387; 22927607; 22928220; 22928537; 22928587; 22929137; 22930011; 22932024; 22932895; 22933218; 22936034; 22940759; 22942423; 22945643; 22946599; 22948774; 22949055; 22949108; 22949240; 22949710; 22956846; 22960132; 22960528; 22960710; 22964042; 22965059; 22967119; 22967656; 22967915; 22968898; 22973984; 22974589; 22979124; 22980014; 22982879; 22984588; 22985746; 22988210; 22988991; 22993092; 22994591; 22999058; 22999655; 23002606; 23003956; 23008772; 23008789; 23009648; 23010164 и 23011289 на 23 хромосоме лошади.

Наиболее предпочтительно способы включают идентификацию в указанной ДНК нуклеотида в конкретном положении 22999655 на 23 хромосоме лошади.

Конкретнее, способы могут включать определение в указанной ДНК наличия или отсутствия:

- 1) нуклеотида С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1,
- 2) нуклеотида А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 3,
- 3) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 5,
- 4) нуклеотида А и/или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 6,
- 5) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 7,
- 6) нуклеотида G и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 8,
- 7) нуклеотида А и/или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 9,
- 8) нуклеотида Т и/или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 10,
- 9) нуклеотида Т и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 11,
- 10) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 12,
- 11) нуклеотида А и/или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 13,
- 12) нуклеотида А и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 14,
- 13) нуклеотида G и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 15,
- 14) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 16,
- 15) нуклеотида G и/или А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 17,
- 16) нуклеотида G и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 18,

- 17) нуклеотида С и/или А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 19,
- 18) нуклеотида Т и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 20,
- 19) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 21,
- 20) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 22,
- 21) нуклеотида С и/или А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 23,
- 22) нуклеотида С и/или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 24,
- 23) нуклеотида А и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 25.

Предпочтительно способы включают определение в указанной ДНК наличия или отсутствия:

- 1) нуклеотида С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1,
- 2) нуклеотида А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 3,
- 3) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 5,
- 4) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 7,
- 5) нуклеотида Т и/или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 20,
- 6) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 21,
- 7) нуклеотида С и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 22,
- 8) нуклеотида С и/или А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 23,
- 9) нуклеотида С и/или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 24
- 10) нуклеотида А и/или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 25.

Наиболее предпочтительно способы включают определение в указанной ДНК наличия или отсутствия:

- 1) нуклеотида С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1 или
- 2) нуклеотида А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 3.

Лошадь может быть выбрана из любой лошади или породы лошадей, относящихся к видам *Equus caballus*. Примеры пород лошадей можно найти в табл. 1.

Таблица 1

Классификация пород лошадей как дрессируемых, так и не дрессируемых на аллюры, где дрессируемые на аллюры лошади обладают способностью осуществлять альтернативные аллюры дополнительно к трем основным аллюрам: шаг, рысь и галоп

Порода	Классификация
Американская верховая	дрессируемая на аллюры
Камполина	дрессируемая на аллюры
Исландская лошадь	дрессируемая на аллюры
Кентуккийская горная верховая лошадь	дрессируемая на аллюры
Мангаларга маршадор	дрессируемая на аллюры
Марварская лошадь	дрессируемая на аллюры
Миссурийский рысак	дрессируемая на аллюры
Пасо фино	дрессируемая на аллюры
Перуанский пасо	дрессируемая на аллюры
Рэкинг хорс	дрессируемая на аллюры
Лошадь скалистых гор	дрессируемая на аллюры
Пятнистая верховая лошадь	дрессируемая на аллюры
Стандартбред *	дрессируемая на аллюры
Теннессийская прогулочная лошадь	дрессируемая на аллюры
Уокалуза	дрессируемая на аллюры
Ахалтекинская	не дрессируемая на аллюры
Американский пейнтхорс	не дрессируемая на аллюры
Андалузская лошадь	не дрессируемая на аллюры
Арабская лошадь	не дрессируемая на аллюры
Бельгийская лошадь	не дрессируемая на аллюры
Дол	не дрессируемая на аллюры
Эксмурский пони	не дрессируемая на аллюры
Фризская	не дрессируемая на аллюры
Гафлингская	не дрессируемая на аллюры
Ганноверская	не дрессируемая на аллюры
Лузитанская	не дрессируемая на аллюры
Северошведская тяжеловозная лошадь	не дрессируемая на аллюры
Норвежский фьорд-пони	не дрессируемая на аллюры
Лошадь ранчо	не дрессируемая на аллюры
Французская верховая лошадь	не дрессируемая на аллюры
Шетлендский пони	не дрессируемая на аллюры
Суффолк панч	не дрессируемая на аллюры
Чистокровная верховая порода	не дрессируемая на аллюры
Тракененская	не дрессируемая на аллюры

* Две отдельные популяции, иноходцы и рысаки, по-видимому, многие рысаки способны демонстрировать тельт.

В соответствии с одним из аспектов изобретения способы в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы для тестирования лошадей на установление отцовства.

Предполагается, что любой способ или композиция, описанные здесь, могут быть отнесены к любому другому способу или композиции, описанными здесь. Использование какого-либо слова в единственном числе в сочетании с термином "содержащим" в формуле изобретения и/или описании может означать "один", но также совместим со значением "один или более чем", "по меньшей мере один" и "один или более чем один". Эти и другие воплощения изобретения будут лучше раскрыты и поняты при рассмотрении в сочетании со следующим описанием и сопровождающими графическими материалами. Тем

не менее, следует понимать, что следующее описание, несмотря на то, что указывает на различные воплощения изобретения и многочисленные конкретные детали, представлено в качестве иллюстрации, не ограничивающей его объем. Множество замен, модификаций, дополнений и/или перестановок могут быть осуществлены в рамках изобретения, не отступая от его сущности, и изобретение включает все такие замены, модификации, дополнения и/или перестановки.

Подписи к графическим материалам

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для того, чтобы дополнительно продемонстрировать некоторые аспекты настоящего изобретения. Изобретение может быть лучше понято со ссылкой на один или более чем один из этих графических материалов в комбинации с подробным описанием представленных здесь конкретных воплощений.

Фиг. 1 - результаты полногеномного анализа 70 исландских лошадей, классифицированных как четырехаллельные или пятиаллельные. Высокоассоциированный SNP в нуклеотидном положении Chr23:22967656 п.о. (пар оснований) обозначен стрелкой.

Фиг. 2 - геномная область, несущая локус *Gait* на хромосоме 23, контролирующая стиль передвижения у лошадей. Ген *DMRT3* неверно отмечен в этой конструкции, но представлен транскриптом Ensembl ENSECAT00000025062, обозначенным стрелкой на данной фигуре. Фигура взята из внешнего источника UCSC геномного браузера (www.genome.ucsc.edu).

Фиг. 3 - нуклеотидное и аминокислотное выравнивание для кодона 296-306 *DMRT3* лошади, включающего кодон 301, в котором нонсенс-мутация происходит в аллели, ассоциированной со способностью к иноходи.

Фиг. 4 - выравнивание аминокислот 249-331 (пронумерованных в соответствии с последовательностью лошади) в белке *DMRT3* различных видов позвоночных животных, включающем дикий тип (WT) и мутантную (MUT) форму белка *DMRT3* лошади. "." обозначает пропуск в выравнивании; "-" обозначает идентичность используемой референсной последовательности (крупный рогатый скот); * указывает на нонсенс-мутацию в кодоне 301 в мутантной аллели лошади.

Фиг. 5 - схематичное представление прогнозируемой формы дикого типа и мутантной (*gait*) формы белка *DMRT3* у лошадей. DM - ДНК-связывающая молекула типа цинковых пальцев. DMA - белковый домен неизвестной функции, представленный в белках *DMRT*.

Фиг. 6 - EMSA (анализ изменения электрофоретической подвижности) с использованием олигонуклеотида, демонстрирующего *DMRT3*-связывающий мотив и транслируемый *in vitro* меченый мус *DMRT3* дикого типа и мутантные белки. Суперсдвиги продемонстрированы с использованием антитела против мус (распознающего обе формы) или антитела против *DMRT3*, распознающего C-концевую часть белка дикого типа, но не усеченную форму. Также использовали олигонуклеотид, соответствующий сайту связывания *DMRT1*, и получили похожие результаты (данные не представлены). Имеющий более низкую температуру гибридизации конкурирующий олигонуклеотид добавляли в 150× избытке. GS - сдвиг на геле, демонстрирующий комплекс между белком *DMRT3* и олигонуклеотидом; SS - суперсдвиг, демонстрирующий комплекс между антителом, белком *DMRT3* и олигонуклеотидом.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что существует локус, названный здесь *Gait*, на 23 хромосоме лошади, который оказывает существенное влияние на стиль передвижения у лошадей. Представленные результаты демонстрируют, что гомозиготность по рецессивной аллели в этом локусе требуется для способности лошади идти шагом. Утверждается, что нонсенс-мутация в нуклеотидном положении 22999655 в экзоне 2 гена *DMRT3* представляет собой причинную мутацию для аллели *Gait*. *DMRT3* представляет собой высококонсервативный ген, представленный у всех позвоночных животных, исследованных до настоящего времени. Функция белка *DMRT3* не установлена в каких-либо предшествующих исследованиях, но факт того, что он экспрессируется в головном мозге и в спинном мозге мыши (MGI, www.informatics.jax.org), согласуется с критической ролью контроля передвижения, что продемонстрировано в настоящем исследовании. Нонсенс-мутация, лежащая в основе аллели *gait*, может оказывать очень хорошее фенотипическое влияние в гетерозиготном состоянии, поскольку она возникает в последнем экзоне *DMRT3* и, как ожидают, приводит к кодированию усеченной формы белка (SEQ ID NO: 4), лишенной последних 174 аминокислот (фиг. 5). ДНК-связывающий домен DM в *DMRT3* расположен в N-концевой части, которая поддерживается в усеченной форме (фиг. 5). Таким образом, мутантная форма *DMRT3* может обладать способностью связываться со своими последовательностями-мишенями ДНК, но может демонстрировать дефекты в отношении взаимодействия с другими белками, необходимыми для ее нормальной функции и поэтому может оказывать доминантно-негативное действие у гетерозигот. Стоит отметить, что только одна из исландских лошадей была гомозиготной в отношении аллели дикого типа (не способной к иноходи) в локусе *Gait*.

В данном исследовании был установлен генетический маркер, который может быть использован для прогнозирования генетического статуса лошади в отношении ее стиля передвижения. Авторы изобретения предполагают, что аллель *gait* представлена у большинства, если не всех, дрессируемых на аллюры пород, некоторые из которых перечислены как дрессируемые на аллюры в табл. 1, и она может обнаруживаться с низкой частотой также у других пород. Этот маркер также позволяет прогнозировать

способность лошади к рыси или иноходи с высокой скоростью, поскольку он обнаруживается с высокой частотой у лошадей, используемых для рысистых бегов. Кроме того, авторы изобретения предполагают, что лошади по меньшей мере с одной аллелью дикого типа лучше проявляют себя в конкуре, традиционной выездке и состязании по бегу галопом.

Стиль передвижения определяет способность лошади использовать альтернативные аллюры, а также способность лошади к рыси или иноходи с высокой скоростью и ее способность к выездке. Альтернативные аллюры включают иноходь и медленную иноходь, примерами которых являются тёлт, трусца, рэк, классический фино, пасо корто, пасо ларго, пасо илано, собреандандо, фокстрот.

Можно прогнозировать, что лошадь, гомозиготная или гетерозиготная по аллели *gaît*, обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью с высокой скоростью. Можно прогнозировать, что лошадь, гомозиготная или гетерозиготная по аллели дикого типа, обладает лучшей способностью к конкуре, выездке и состязаниям по бегу галопом.

Польза от данного изобретения в индустрии коневодства включает определение генотипа потенциальных племенных животных для максимизации возможности получения потомства, обладающего благоприятным стилем передвижения. Информация о генотипе по локусу *DMRT3* также может быть использована лицами, продающими и покупающими лошадей, для предсказания способности лошади осуществлять различные аллюры. Кроме того, способы по изобретению могут быть использованы для эффективной интрогрессии аллели *gaît* породам, не дрессируемым на аллюры.

В соответствии с одним из аспектов изобретения способы по настоящему изобретению могут быть использованы для отбора лошадей для разведения.

Соответственно, в одном из аспектов изобретения предложены способы отбора лошади для разведения, где указанные способы включают определение в образце ДНК, полученном у указанной лошади, аллели по меньшей мере одного генетического маркера, который расположен в области между фланкирующими SNP по нуклеотидным положениям 22628976 на 23 хромосоме лошади. Генетический маркер может быть выбран из однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) и вставок/делеций (INDEL).

Предпочтительно генетический маркер выбран из генетических маркеров, перечисленных в табл. 4, 5, 7 и 8.

Предпочтительно генетический маркер расположен в области между фланкирующими SNP по нуклеотидным положениям 22919878 и 23011289 на 23 хромосоме лошади.

Предпочтительно генетический маркер выбран из генетических маркеров, перечисленных в табл. 8.

Наиболее предпочтительно генетический маркер расположен в положении 22999655 на 23 хромосоме лошади, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1.

Наиболее надежный тест для определения генотипа по локусу *Gait* заключается в определении наличия и/или отсутствия нонсенс-мутации в экзоне 2 *DMRT3* (нуклеотидное положение 22999655 на хромосоме 23, соответствующее нуклеотидному положению 939 в SEQ ID NO: 3). Тем не менее, генетические маркеры, расположенные в интервале между фланкирующими маркерами по нуклеотидным положениям 22628976 и 23315071, и конкретнее, генетические маркеры, расположенные в интервале между положениями 22919878 и 23011289, примерами которых являются маркеры, перечисленные в табл. 8, демонстрируют более или менее сильную ассоциацию с генотипом для причинного SNP в нуклеотидном положении 22999655 вследствие наличия дисбаланса связи в этой области. Соответственно, один или более чем один из этих маркеров, сам по себе или в комбинации, может быть использован для определения генотипа по локусу *Gait*, и, следовательно, также могут быть использованы в способах по настоящему изобретению.

Термин "образец" или "биологический образец" в соответствии с настоящим изобретением относится к любому материалу, включающему ядродержащие клетки указанной тестируемой лошади. В предпочтительном воплощении биологический образец, используемый в способах по настоящему изобретению, выбран из группы, состоящей из крови, спермы, корней волос, молока, жидкостей организма, а также тканей, включающих ядродержащие клетки.

Способы экстракции, выделения и очистки ДНК хорошо известны в области техники и могут быть применены в настоящем изобретении. Стандартные протоколы выделения геномной ДНК среди прочего приведены в Sambrook, J., Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1.31-1.38, 2001 и Sharma, R.C., et al. "A rapid procedure for isolation of RNA-free genomic DNA from mammalian cells", *BioTechniques*, 14. 176-178. 1993.

В соответствии с настоящим изобретением термин "SNP" относится к однонуклеотидному полиморфизму в конкретном положении в геноме лошади, которое варьирует в популяции индивидов. SNP могут быть идентифицированы по их расположению в раскрытой конкретной последовательности, т.е. в интервале от 22628976 до 23315071 п.о. на 23 хромосоме лошади или их названию, представленному в табл. 4, 5, 7 и 8. SNP, идентифицированные как полезные для прогнозирования способности лошади использовать различные аллюры в соответствии с настоящим изобретением, представлены в табл. 4, 5, 7 и 8. Например, SNP_BIEC2_620109 в табл. 5 указывает на то, что нуклеотидное основание (или аллель) в нуклеотидном положении 22967656 на 23 хромосоме референсной последовательности, на которую здесь ссылаются, может представлять собой цитозин (C) или тимидин (T). Аллель, ассоциированная с или ука-

звующая на способность лошади использовать пять аллуров в случае SNP_BIEC2_620109 в табл. 5 представляет собой тимидин (Т).

Термин "определение в указанной ДНК аллели по меньшей мере одного генетического маркера" в соответствии с настоящим изобретением относится к способу определения или идентификации того, представлена ли конкретная нуклеотидная последовательность в образце ДНК.

Термин "идентификация в указанной ДНК нуклеотида в одном или более чем одном конкретном положении на 23 хромосоме лошади" относится к способу определения идентичности нуклеотида в указанном конкретном положении на 23 хромосоме лошади, т.е. определения того, представляет ли собой нуклеотид в указанном конкретном положении аденозин (А), цитозин (С), гуанозин (G) или тимидин (Т).

Существуют несколько способов, известных специалистам в данной области техники для определения того, представлена ли конкретная нуклеотидная последовательность в образце ДНК, и идентификации нуклеотида в конкретном положении в последовательности ДНК. Эти способы включают амплификацию сегмента ДНК, содержащего генетический маркер, при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) или любого другого способа амплификации, интеррогации генетического маркера при помощи аллель-специфической гибридизации, 3'-экзонуклеазного анализа (анализа Taqman), флуоресцентного красителя и анализа путем ПЦР, основанного на агенте-гасителе, путем использования аллель-специфических ферментов рестрикции (способы, основанные на RFLP), путем прямого секвенирования, оценки олигонуклеотидного лигирования (OLA), пиросеквенирования, анализа путем внедрения, мини-секвенирования, способов, основанных на DHPLC (денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография), одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP), аллель-специфической ПЦР, электрофореза в геле с градиентом денатурирующего агента (DGGE), электрофореза в геле с градиентом температуры (TGGE), химического расщепления по некоплементарным участкам (СМС), системы, основанной на гетеродуплексном анализе, способов, основанных на масс-спектрометрии, анализа путем инвазивного расщепления, путем секвенирования с учетом индекса полиморфизма (PRS), микрочипов, анализа удлинения по механизму катящегося кольца, способов, основанных на HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), анализов, основанных на удлинении, ARMS (амплификационная система для идентификации мутаций), ALEX (амплификационная система для идентификации мутаций с линейным удлинением), SBCE (однонуклеотидное удлинение цепи), анализов при помощи молекулярного маяка, проникновения (способов на основе трети волны), анализов путем реакции лигирования цепи, способов, основанных на 5'-нуклеазном анализе, электрофореза в капиллярном блоке с гибридизацией (CAE), анализов путем усечения белка (РТТ), иммуноанализов и твердофазной гибридизации (дот-блот, обратный дот-блот, чипы). Подразумевается, что указанный перечень способов не является исключительным, а всего лишь иллюстрирует разнообразие доступных способов. Некоторые из этих способов могут быть осуществлены в соответствии со способами в настоящем изобретении в микрочиповом формате или на шариках.

Таким образом, изобретение также относится к применению праймеров или пар праймеров, где праймеры или пары праймеров гибридизуются в строгих условиях с ДНК, содержащей промежуток между нуклеотидными положениями 22628976 и 23315071, предпочтительно между положениями 22919878 и 23011289 п.о. на 23 хромосоме лошади, или с ее комплементарной цепью.

Предпочтительно праймеры или пары праймеров гибридизуются в строгих условиях с последовательностями SEQ ID NO: 1, 3 и 5-25.

Предпочтительно праймеры по изобретению имеют длину по меньшей мере 14 нуклеотидов, такую как 17 или 21 нуклеотид.

Конкретнее, праймеры могут быть выбраны из SEQ NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30 и SEQ ID NO: 31.

В одном из воплощений праймеры фактически связываются с положением SNP, как указано в табл. 4, 5, 7 и 8. Такой аллель-специфический олигонуклеотид по настоящему изобретению, как правило, представляет собой олигонуклеотид, имеющий длину по меньшей мере от 14 до 21 пары нуклеотидов, сконструированный для обнаружения различия в одном основании в генетической последовательности мишени тестируемой лошади. В соответствии с настоящим изобретением один или более чем один специфический праймер может быть применен для идентификации более чем одного упомянутого здесь SNP. Как следствие этого, когда связывание проводится в строгих условиях, тогда такой праймер или такие праймеры полезны для различия между отличающимися полиморфными вариантами, поскольку связывание происходит только тогда, когда последовательности праймера и мишени полностью комплементарны. Кроме того, дополнительно предпочтительно, чтобы праймеры имели максимальную длину 24 нуклеотида. Такие праймеры могут сопровождаться с подходящим способом обнаружения, таким как реакция удлинения или реакция амплификации, которые могут быть использованы для того, чтобы различать полиморфные варианты и затем делать выводы в отношении способности лошади использовать различные аллуровы.

Гибридизацию предпочтительно осуществляют в строгих или очень строгих условиях. "Строгие или очень строгие условия" гибридизации хорошо известны специалистам в данной области техники или могут быть определены специалистами в данной области техники в соответствии с обычными протоко-

лами. Подходящие строгие условия для каждой последовательности могут быть установлены на основе хорошо известных параметров, таких как температура, состав молекул нуклеиновой кислоты, солевые условия и т.д.; см., например, Sambrook et al. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1989 или Higgins and Hames (eds.), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford 1985, см., в частности, раздел "Hybridization Strategy" by Britten & Davidson. Стандартные (очень строгие) условия включают гибридизацию при 65°C в 0,5×SSC и 0,1% SDS (додецилсульфат натрия) или гибридизацию при 42°C в 50% формамиде, 4×SSC и 0,1% SDS. За гибридизацией обычно следует отмывание для удаления неспецифических сигналов. Условия отмывания включают условия, такие как 65°C, 0,2×SSC и 0,1% SDS, или 2×SSC и 0,1% SDS, или 0,3×SSC и 0,1% SDS при 25-65°C.

Термин "нуклеотидные положения 22628976 и 23315071 п.о. на 23 хромосоме лошади" и другие похожие обозначенные нуклеотидные положения относятся к референсной последовательности лошади в соответствии с Sep. 2007 Equus caballus draft assembly EquCab2 (UCSC version equCab2). EquCab2 получен в The Broad Institute. EquCab2 доступен в геномном браузере www.genome.ucsc.edu.

Примеры

Осуществляли полногеномный скрининг генов, влияющих на стиль передвижения, с использованием чипа SNP лошади, включая анализ 54602 однонуклеотидных полиморфизмов в геноме лошади (Illumina EquineSNP50 BeadChip; http://www.illumina.com/products/equine_snp50_whole_genome_genotyping_kits.ilmn). В анализе использовали популяционный материал, включающий 70 исландских лошадей, среди которых 30 классифицировали как четырехаллельные и 40 классифицировали как пятиаллельные, т.е. только последние обладали документированной возможностью шагать.

Животный материал. Образцы крови отбирали у 70 исландских лошадей из Швеции. Геномную ДНК получали для всех лошадей с использованием QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen). Владельцев лошадей просили классифицировать своих лошадей как четырехаллельных или пятиаллельных. Образцы волос собирали у 61 шведской стандартбред лошади и 2 шведских северных рысаков. ДНК из шести корней волос экстрагировали путем добавления 97 мкл раствора Chelex и 7 мкл протеиназы К и инкубировали при 56°C в течение 60 мин с последующей инкубацией при 95°C в течение 10 мин.

Полногеномный анализ (GWA). GWA осуществляли с использованием Illumina EquineSNP50 BeadChip (http://www.illumina.com/products/equine_snp50_whole_genome_genotyping_kits.ilmn). Статистический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения PLINK (Purcell et al. 2007. PUNK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81:559-575).

Секвенирование ДНК. Множество кодирующих и не кодирующих областей, расположенных между фланкирующими SNP по нуклеотидным положениям 22628976 и 23315071 п.о. на 23 хромосоме лошади, амплифицировали при помощи ПЦР и секвенировали для идентификации полиморфизмов последовательностей. Все праймеры, используемые для этих экспериментов, перечислены в табл. 2. Ампликоны амплифицировали в стандартных условиях ПЦР и (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA). Стандартное секвенирование по Сэнгеру осуществляли с использованием капиллярного секвенатора AB3730 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Праймеры, используемые для амплификации путем ПЦР и секвенирования выбранных областей у лошадей

Ампликон	Амплифицируемая область Нуклеотидные положения	Прямой праймер	Обратный праймер
ANKRD15exon1.1	chr23:22792627-22793280	TCATACCAGCTTGCCACACT	GAGGAGAGAGAGCTC GTGGA
ANKRD15exon1.2	chr23:22793162-22793792	CTAATGGAGACCCGCAGAA G	GCCGGAACTCCTTTA TCCTC
ANKRD15exon1.3	chr23:22793704-22794386	GAGAAGTGGCGGGAATTA T	GCCCCACGACTTTAT TCTCA
ANKRD15exon1.4	chr23:22794261-22794946	TGCAGACGAGAGACCAAT G	AAACCCAGAAGTGCC TGAGA
ANKRD15exon1.5	chr23:22794844-22795453	GCGGACAGTGGCTATAGGA G	AATACATTGTCCCCAC CCTTC
ANKRD15exon2	chr23:22807940-22808575	ATGGGATTTGAGCTGAGTGG	AAGCCTGATGCTGAG AAGGA
ANKRD15exon3	chr23:22809005-22809616	TTGCATGCACACAATTTTCC	CTGGGGTTTCTGAG TTCTG
ANKRD15exon4	chr23:22810246-22810904	GCAACCCAGGTTATCCCTTT	TCACCTTCTGCACTTG CATT
ANKRD15exon5	chr23:22812005-22812621	AAGTCGACTGAGGGGCTCT	ACCTTGCCCAAGATA GGTTT
ANKRD15exon6	chr23:22815102-22815741	TCCCCAGGAACATACAGCTC	GATTTGAGGATGC
ANKRD15exon7	chr23:22817755-22818429	GCTTCTGGCCTCACGAAATA	TGGCATGAAGACAC CACAAT
ANKRD15exon8	chr23:22818653-22819254	AGCCCCAGTACAGACCACA C	GGGAAGTCGCCTACA CTGAA
ANKRD15exon9	chr23:22820739-22821346	GAGGATCCGTGGGATACAG A	AGCAAGTCTCCTGAG CAAGC
ANKRD15exon10	chr23:22821626-22822233	CAGAGGACACATCTGCCTGA	CAAAACCATCCTGGA AATGG
ANKRD GAP	chr23:22836558-22837273	GTCCATCCCCTTCTCTCCTC	TGTCAGCTGCAGAAT GGAAG
PRIMER DS7	chr23:22851938-22852292	AGACTGGCCCTGAGCTAACA	CTGAAGGTGCCCTCT ACAGC
PRIMER DS5	chr23:22868140-22868803	TTACCTGCCCTTTGTTTTG	CATCTTTGCCCTCA GACTC
PRIMER DS2	chr23:22869516-22870124	TTACGTGGCACCCCTACTTC	AGCCTGGACTCTGTC CTTGA
PRIMER DS1	chr23:22872699-22873368	TGCTGCCCTCTGTCTATGTG	AAAGTAACGATGCGG TGGAC
PRIMER DS4	chr23:22874773-22875445	AAATGGCTGTGCCGTTTTAC	CTGTGTGACCAAGCT CTCCA
PRIMER DS3	chr23:22876084-22876784	GAAAATGCTGACGTGCTGAA	CTTGCTGCCTTTTGC CTATC
PRIMER DS6	chr23:22876563-22877255	GCAGAGCGACCTG GAGATAG	GGCCTTAGAGGGACA CATGA
BIETOP-620109B 3	chr23:22967269-22967902	CCTCTCACCCAGACACCATT	AGTTGGCAACAACA GGACA
BIETQP-620109D 2	chr23:22967525-22968019	AAGTCCTTTCTTGGGGGCTA	GGTCCATCGTTGACC AAAAAT
BIETOP-620109C 2	chr23:22967526-22968041	AGTCCTTTCTTGGGGGCTAA	ACGGCACCACCATCA TCTAT
DMRT3exonO	chr23:22985884-22986463	GCCCCAACTTAAGACCCTCT	CCGCGCTGCTTAGGA GTC
DMRT3exonOB	chr23:22985884-22987295	GCCCCAACTTAAGACCCTCT	TACCTGGCTTGTGCA GCTG
DMRT3GAP	chr23:22986413-22987358	GAGCACGCTCAGACCCTATC	AAAGAGCTCCGAAGT TTTTGC
DMRT3exon2.1	chr23:22999117-22999797	CTCCTTCCAAGAAGCCTGTG	AGAGTCTGCGGAAAA CCTCA

DMRT3exon2.2	chr23:22999709-23000396	CCTTGAGCTCATACCCCATC	ACTAAAG CCGCAGAGCAGAG
DMRT3exon2.3	chr23:23000251-23001049	GAGAGGCCTCGTCTGTGT A	TCCCACTCACATTTCC CAAT
PRIMER 1	chr23:23009567-23010210	CAAGGGCATGAGGAGTGT	ACTCCATGATTGCAC AACGA
PRIMER 2	chr23:23027620-23028300	TCATTCCACCAGCAATGTGT	GGCCACTG CAGAAGAAAAGAG
PRIMER 3	chr23:23048139-23048767	CTGTTGTCCCAGCCCTGTAT	AGGTGAGTCCAGGCT AGCAA
DMRT2exon1	chr23:23055803-23056469	GAGCCCGAGCG G ATAATACT	ATTAGGACCCGACAG GACAC
DMRT2exon2	chr23:23056584-23057237	GCGGCTAGGGTGGTACTTC T	CTCGTCTCGTCTCCTC GTC
DMRT2 GAP	chr23:23057214-23057971	GAGGACGACGAGGACGAG	CCACTTTCAAGGCCT CTCTG
DMRT2exon2GAP	chr23:23057214-23057971	GAGGACGACGAGGACGAG	CCACTTTCAAGGCCT CTCTG
DMRT2exon3	chr23:23059113-23059736	CTGGGGTGACTCTAGCAAG G	TCACACCAAGGCAAA TTTCA
DMRT2exon4.1	chr23:23061639-23062293	C C C C C AAAG G G AACTATTTT	GAAGTGGTGGTGG CATTT
DMRT2exon4.2	chr23:23062130-23062788	TTCAGGGTCTGGGAATATGG ACGA	TCCAACCTGTTTGGCT ACGA
DMRT2exon4.3	chr23:23062886-23063285	GGCCCCAAGAAACACAGA G	CCTGTAGACCCGAGA GACCA
PRIMER 4	chr23:23067103-23067766	GGTCCAAATTGTAGGGCTGA	TTCCCAGGAGGTTTC TCTTT
PRIMER 5	chr23:23069404-23070095	CCAGATCAAGGGGAATGCTA	CAAGGCAGACCAATC CATTT
PRIMER 6	chr23:23076510-23077194	CAAAGTAAGCATCCCCAGGA	GCAGCACCTCTTTCC TCATC
PRIMER 7	chr23:23080154-23080820	TGGAAATTTTGGGCTGTTTC	TTTCTCCAGGGAATTT GTGC
PRIMER 8	chr23:23085336-23086005	GCTGCTGGAGACCAGAAAA G	CGAAGGCCACCTATT CAAAA

Глубокое геномное ресеквенирование. Образцы ДНК двух исландских лошадей, одной самки, представляющей собой мутантную гомозиготу по DMRT3, и одного самца в качестве контроля (гомозигота дикого типа) готовили для секвенирования. Библиотеки "парных концов" Illumina готовили из этих образцов ДНК (средний размер вставки приблизительно 220 оснований). Секвенировали две библиотеки (2×100 п.о.) на семи и пяти каналах соответственно, с использованием аппарата Illumina HiSeq. Прочтения картировали на геноме лошади (референсная сборка EquCab2) с использованием программы BWA и дубликаты ПЦР удаляли с использованием программы Picard (<http://picard.sourceforge.net>). Среднее покрытие прочтения, полученное для каждого образца, составляло приблизительно 30×. SNP и небольшие вставки/делеции определяли на основе данных картирования после проведения повторного выравнивания для реконструкции вокруг вставок/делеций и затем варианты определяли с использованием Genome Analysis Toolkit (GATK). Варианты подвергали фильтрации через рекомендуемые фильтры VariantFilterWalker в отношении SNP, перечисленных в GATK wiki page (http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit), и выравнивания прочтений перекрывающихся SNP и вставки/делеции, определенные в 438 п.о. локуса Gait, затем вручную просматривали для удаления очевидных артефактов. Покрытия прочтений, обнаруженные для окон в одну тысячу п.о., использовали для определения кандидатов дубликаций в минимальной области IBD (идентичность по происхождению), и картирующие расстояния и ориентации между парными прочтениями использовали для обнаружения структурных вариаций по сравнению с референсной сборкой. Программное обеспечение ANNOVAR использовали для аннотирования SNP в отношении к генам Ensembl.

Анализ SNP с использованием анализа TaqMan assays. Анализы TaqMan разработаны для отбора SNP на хромосоме 23, нуклеотидном положении 22967656 (BIEC2 620109; SNP, включенный в панель Illumina SNP, демонстрирующий самую сильную ассоциацию с фенотипом) и в нуклеотидном положении 22999655 (DMRT3.3; SNP, приводящий к появлению преждевременного стоп-кодон в экзоне 2 DMRT3). Специально адаптированные панели для анализов генотипирования TaqMan SNP (Applied Biosystems, Foster City, CA), разработанные для этих двух SNP, обобщены в табл. 3. Конструкции зонда и праймера получены с интернет-страницы Applied Biosystems (<http://www5.appliedbiosystems.com/tools/cadt/>) с использованием возможности заказать специально адаптированные панели для генотипирования. Для анализа использовали систему для обнаружения последовательности ABI PRISM 7900 HT в 384-луночном формате (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Описание анализов TaqMan для SNP по нуклеотидным положениям 22967656 (BIEC2_620109) и 22999655 (DMRT3.3) на 23 хромосоме лошади

BIEC2_620109		SEQ ID NO
Послед. прямого праймера	GCAAAGTGCAGAAATAGTCTTTTGGGA	26
Послед. обратного праймера	CACTCTTTTGGGAATGGTTCACATTAAGG	27
Референсная аллель*	C	
Последовательность-репортер (FAM)	TAGTGCAAACGGTACGTT	28
Нереференсная аллель	T	
Последовательность-репортер (VIC)	AAATAGTGCAAACAGTACGTT	29
DMRT3.3		
Послед. прямого праймера	CCTCTCCAGCCGCTCCT	30
Послед. обратного праймера	TCAAAGATGTGCCCGTTGGA	31
Референсная аллель*	C	
Последовательность-репортер (VIC)	CTGCCGAAGTTCG	32
Нереференсная аллель	A	
Последовательность-репортер (FAM)	CTCTGCCTAAGTTCG	33

*в соответствии со сборкой EquCab2 (доступной в геномном браузере www.genome.ucsc.edu)

Полногеномный анализ выявил локус на 23 хромосоме лошади, контролирующей стиль передвижения. Статистический анализ данных для чипа SNP, полученных для 70 исландских лошадей с фенотипической классификацией как четырехаллюрные или пятиаллюрные, осуществляли с использованием PLINK; 39695 SNP прошли контроль качества. Тест хи-квадрат осуществляли для каждого маркера по отдельности для определения значимого различия в частотах генотипа между четырехаллюрными и пятиаллюрными лошадьми. Использовали генетическую модель, предполагающую рецессивный механизм наследования. Десять тысяч перестановок использовали для корректирования множественного тестирования. Статистический анализ выявил высокозначимую ассоциацию между SNP (BIEC2_620109, SEQ ID NO: 5) в нуклеотидном положении 22967656 п.о. на 23 хромосоме лошади и фенотипом, определяющую способность к аллюру ($P=0,0002$, полногеномная значимость; фиг. 1). Два SNP, непосредственно фланкирующих высокоассоциированные SNP, расположены по нуклеотидным положениям 22628976 (BIEC2_619907, SEQ ID NO: 6) и 23315071 (BIEC2-620244, SEQ ID NO: 7), и они продемонстрировали лишь слабые ассоциации с фенотипом ($P=0,01$ для SNP в положении 22628976 п.о. и $P=0,32$ для SNP в положении 23315071 п.о.). Этот результат продемонстрировал, что один или более чем один полиморфизм последовательности, контролирующей стиль передвижения, расположен по соседству от SNP в положении 22967656 п.о. (в наибольшей степени ассоциированные SNP) и в пределах интервала, определенного фланкирующими маркерами в положениях 22628976 и 23315071 п.о., и демонстрирующих значимо более слабую ассоциацию с фенотипом, определяющим способность к аллюру. Указанная область простирается на 686 тысяч пар оснований и пять генов располагаются в интервале ANKRD15, DMRT1, DMRT3, DMRT2 и GTF2A2 (фиг. 2). Этот локус назван как локус *Gait*, и результаты согласовывались с рецессивным наследованием аллели, ассоциированной со способностью шагать, тогда как аллель дикого типа (Non-race) по этому локусу была доминантной.

Ресеквенирование выбранных областей уточняет локализацию локуса *Gait*. Множество ампликонов (табл. 2) из геномной области, несущей локус *Gait*, определенных при полногеномном обзоре (с нуклеотидного положения 22628976 до положения 23315071 на хромосоме 23), ресеквенировали у небольшой группы четырехаллюрных и пятиаллюрных лошадей для уточнения локализации локуса *Gait*. Все полиморфизмы последовательностей, обнаруженные в этом анализе, обобщены в табл. 4. Результаты демонстрируют, что существует отдельный гаплотип, ассоциированный с рецессивной аллелью *gait*, и что гаплотипный блок, демонстрирующий полную ассоциацию с *gait* в этой породе, прерывается в нуклеотидном положении 22877015 непосредственно выше гена DMRT1. Эти результаты уточняют локализацию локуса *Gait* в интервале от нуклеотидного положения 22877015 п.о. до положения 23315071 п.о.; ANKRD15 расположен за пределами критического для *Gait* интервала.

Полиморфизмы последовательностей, обнаруженные путем ресеквенирования ампликонов из геномной области, несущей локус *Gait* на 23 хромосоме лошади

SNP	Положение	Фенотип										
		Четырехаллюрный				Пятиаллюрный						
		Лошадь 1	Лошадь 2	Лошадь 3	Лошадь 4	Лошадь 5	Лошадь 6	Лошадь 7	Лошадь 8	Лошадь 9	Лошадь 10	Лошадь 11
ANKRD15.1	22793939	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
ANKRD15.2	22810322	GG	GA	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GA
ANKRD15.3	22812345	GG	GT	GT	GG	GT	GG	GT	GG	GG	GG	GT
ANKRD15.4	22812251	TT	TT	TT	TT	TC	TT	TC	TT	TT	TT	TC
ANKRD15.5	22818132	TT	CT	CT	TT	CT	TT	CT	TT	TT	TT	CT
ANKRD15.6	22818158	GG	GA	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GA
ANKRD15.7	22821872	CC	CA	CA	CC	CA	CC	CA	CC	CC	CC	CA
ANKRD15.8	22821884	GG	GG	GG	GG	CG	GG	CG	GG	GG	GG	CG
SNP.1	22868190	н.т.	н.т.	CC	CC	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	CC	CC	CT
SNP.2	22868678	н.т.	н.т.	GA	AA	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	AA	AA	GA
SNP.3	22872820	н.т.	н.т.	GG	GG	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	GG	GG	GC
SNP.4	22876848	н.т.	н.т.	CA	AA	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	AA	AA	AA
SNP.5	22877015	н.т.	н.т.	TT	TT	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	TT	TT	CT
BIEC2_620109	22967656	CC	CC	CC	CT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
DMRT3.1	22986593	TT	TT	TT	CT	CC	CC	н.т.	н.т.	CC	CC	CC
DMRT3.2	22987143	CC	CC	CC	CT	TT	TT	н.т.	н.т.	TT	TT	TT
DMRT3.3	22999655	CC	CC	CC	CA	AA	AA	н.т.	н.т.	AA	AA	AA
DMRT3.4	22999665	GC	GG	GG	GC	CC	CC	н.т.	н.т.	CC	CC	CC
SNP.6	23009648	н.т.	н.т.	AA	AT	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	TT	TT	TT

н.т.=не тестировали

Нонсенс-мутация, располагающаяся в экзоне 2 DMRT3, демонстрирует полную согласованность со способностью к иноходи.

Критический интервал для локуса *Gait* содержит четыре гена DMRT1, DMRT2, DMRT3 и GTF2A2. Гены DMRT относятся к семейству транскрипционных факторов, которые содержат ДНК-связывающий домен DM типа цинковых пальцев (Murphy et al. 2007. Vertebrate DM domain proteins bind similar DNA sequences and can heterodimerize on DNA. BMC Mol. Biol. 8:58). Авторы изобретения секвенировали большую часть экзонов DMRT в этой области и идентифицировали небольшое количество полиморфизмов последовательностей (табл. 4). Один из них (DMRT3.3), расположенный в экзоне 2 DMRT3 в нуклеотидном положении 22999655, вызывал нонсенс-мутацию в аллели, ассоциированной со способностью к иноходи (фиг. 3). Таким образом, предсказали, что аллель *gait* кодирует усеченную форму белка DMRT3 (SEQ ID NO: 4), лишенную последних 174 аминокислот, уменьшающую общий размер белка с 474 до 300 аминокислот. Полноразмерный DMRT3 дикого типа лошади представлен как SEQ ID NO: 2. Выравнивание части белка DMRT3, включающей мутантное аминокислотное положение 301 (серии) у лошадей, демонстрирует, что этот белок является высококонсервативным у позвоночных животных, включая виды рыб, птиц и млекопитающих (фиг. 4).

Анализы TaqMap разработаны для полиморфизмов по нуклеотидному положению 22967656 (наиболее значимо ассоциированных SNP в анализе GWA) и по положению 22999655 (мутация в DMRT3 формирует преждевременный стоп-кодон). Их использовали для скрининга всех 70 исландских лошадей, включенных в данное исследование. Оба SNP демонстрировали полную ассоциацию между гомозиготностью для нереперенсной аллели по обоим локусам и фенотипом (табл. 5), статистическая поддержка для ассоциации преодолена ($P=6,73 \times 10^{-10}$ для обоих SNP, точный критерий Фишера). Результаты свидетельствуют о том, что существует очень сильная несбалансированность связи между этими двумя SNP в исследуемой популяции, причем два SNP расположены друг от друга на расстоянии 32 тысячи пар оснований. Девять животных, которых классифицировали как четырехаллюрные, были гомозиготными по гаплотипу, ассоциированному с аллелью *gait* (табл. 5). Эти животные либо были ошибочно классифицированы своими хозяевами, что вполне возможно, или фенотип *Gait* демонстрирует неполное проявление вследствие взаимодействия с факторами окружающей среды (например, тренировка) или другими неиз-

вестными генетическими факторами.

Авторы изобретения тестировали 2 северошведских рысака и 61 шведскую стандартbred лошадь (обе породы используют для рысистых бегов в Швеции) для изучения того, представлена ли аллель *gai1* у других пород лошадей. Авторы изобретения обнаружили, что 2 северошведских рысака и 59 шведских стандартbred лошадей были гомозиготными в отношении DMRT3 нонсенс-мутации в нуклеотидном положении 22999655 на 23 хромосоме лошади, тогда как оставшиеся 2 стандартbred лошади были гетерозиготными по A/C. Высокая частота указанной аллели у этих пород в значительной степени свидетельствует о том, что мутация обладает благоприятным действием на способность бежать рысью с высокой скоростью. Действительно, две лошади, идентифицированные как гетерозиготные по аллели *gai1*, также рассматривались как плохие рысаки. Авторы изобретения предполагают, что аллель *gai1* присутствует с высокой частотой у большинства, если не всех, дрессируемых на аллюры пород лошадей, а также лошадей, используемых для рысистых бегов.

Таблица 5

Высокосignificанная ассоциация между SNP в нуклеотидных положениях 22967656 (BIEC2-620109) и 22999655 (DMRT3.3) на 23 хромосоме лошади относительно фенотипической классификации исландских лошадей как четырехаллюрных или пятиаллюрных. Статистику рассчитывали с использованием точного критерия Фишера, причем аллель *Gai1* была рецессивной. OR - отношение шансов

МАРКЕР	BIEC2_620109	DMRT3.3	
Аллель 1 (A ₁)	C	C	
Аллель 2 (A ₂)	T	A	
Дикий тип	A ₁ /-	21	21
	A ₂ /A ₂	9	9
Пятиаллюрные	A ₁ /-	1	1
	A ₂ /A ₂	39	39
p	6,73E-10	6,73E-10	
OR	83,18	83,18	

$$A_1/- = A_1/A_1 \text{ или } A_1/A_2$$

Таблица 6

Распределение генотипа для нонсенс-мутации (A) в DMRT3 среди популяций лошадей

Порода	Количество	CC	CA	AA
Исландская лошадь	70	0,01	0,30	0,69
Стандартbred	61	0,00	0,03	0,97
Холоднокровный рысак	2	0,00	0,00	1,00

Последовательности SNP

SEQ ID NO	Последовательность	SNP	Положение
SEQ ID NO: 5	TTGTGGGGCTTATGCAAGTGCAGAAATAGTCT TTTGGAAAAACGTAC[C/T]GTTTGGCACTATTTCTT ATTTCTATTCAACCCTAATGTGAACCAATCCAA	BIEC2_620109	22 967 656
SEQ ID NO: 6	AGAAATGATATATAAAAATTACGAATGCCTCTTAG ACAGAATCCTTATGT[A/G]TGGCACAGAATATTTA GTTTCGCTAACAGATATTGAGTGCTTATATGAG	BIEC2-619907	22 628 976
SEQ ID NO: 7	CTTCTCCTTGCATCCTATCCCCCTAGTGTGCAAG GGAAGTTGTGAGAGA[C/T]GAGCTTGTAGATCTGC TGTAGAAAATAGCCCTGTTTCTTAAGAAACCGT	BIEC2-620244	23 315 071
SEQ ID NO: 8	CAGAGTGCCTGCTGTGGCTGTGGCGCTGACG AGCACATGGACAACATT[G/C]TCGTGTACCACAGG GGCTCCAGTCTGTAAGGATGCTGCTGTGGGG ACA	ANKRD15.1	22 793 939
SEQ ID NO: 9	AGAACTCATTCAAACACCAGGCTTACTAGGCTT TTTTAAATAGACTT[G/A]GCTTGAACCTCTAAGTG CAGGATCAAACCACTGGCCAAATTTCTGGAA	ANKRD15.2	22 810 322
SEQ ID NO: 10	TTACCTGCATGCCTCTCCCCCTAALCCATTCTAG CATGTGTGGGCAGAG[T/G]GGCCTCGTCTGCC CTGCTCACTGGATCACTGCGGAACGTTCTCTCA	ANKRD15.3	22 812 345
SEQ ID NO: 11	AAGGATATGTTGAGTCTGACCTACAGACTGTC CCCCGCTGTACAAAG[T/C]GCCCAAGTGGTACA AAGCATCCCTCGCCTGCCCCCTGAGCTGTTACCT G	ANKRD15.4	22 812 251
SEQ ID NO: 12	AACGCCAAAGCCAGCCAGGTGACTGCGCTTGCTT CCTGGGCTCATGCTCA[C/T]ACTGCTGTACCCGC ACAGGTGCCACGCCACACTTCCACCGCTCGG CA	ANKRD15.5	22 818 132
SEQ ID NO: 13	GCTTGCTTCTGGGCTCATGCTCACACTGCTGTG ACCCGCACAGGTGCC[C/A]GCGCCACACTTCCCA CCGCTCGGCACTCACTCATGGCCAGCCCGAG TCC	ANKRD15.6	22 818 158
SEQ ID NO: 14	ACTGAATGATACATTTTGTGCCTGAACTACCAG CAAACAGAAAGGCAG[A/C]AACCAAGGGTTGAAG GCTGGAGCTGCACAGTAGAAGTTGAGCCAGCAG	ANKRD15.7	22 821 872
	G		
SEQ ID NO: 15	CATTTTGTGCCTGAACTCACCAGCAAACAGAAGG CAGAAAACCAAGGGTT[G/C]AAGGCTGGAGCTGT CACAGTAGAAGTTGAGCCAGCAGGAATTTGCTGG CC	ANKRD15.8	22 821 884
SEQ ID NO: 16	TCACTCTAATCAAGTTGCTATCACCATTCCACAA TTGTCCAGGATAGT[A/C]TGGGACCCCGAGAAAGA TCACGCCGCTCCATTCCATTCCCACTTGTTC	SNP.1	22 868 190
SEQ ID NO: 17	CTGGGCTGAAACAGGTGCTCTGTTTCCCGCC TGCTTGGTCAAGCTGC[G/A]CTCTTCCCGCTCC CAGGCTTAAGTCACTTATGCAAGAACCTTTATAC	SNP.2	22 868 678
SEQ ID NO: 18	CCAGCATTCTCGCTTTCAACTTTCTCCGCTCCT CCAAATCCAACTGG[A/C]TGTAGACTCAGCTACCC ACAATGATCAAGCATTTTCTGTGGCAGGCCTG	SNP.3	22 872 820
SEQ ID NO: 19	AGGCAAGAAAGCGATAGGCAAAAGGCAGCAAGAG CTGGACCTGCAGATTG[C/A]AAGTTCTCTGGAGC CAGTAGGTGAAACCTCATCAGCAATGAACGCA GG	SNP.4	22 876 848
SEQ ID NO: 20	CCACACTGAGAGTCTTATTGCTGATAGAAATGCA GAGACTTCTTTT[G/C]GAGGCTTCAACCTCGT ACTTAATTCTCCTAAGTGAGAAAGAAACCACTC	SNP.5	22 877 015
SEQ ID NO: 21	ACCAGCGGGAGACTGAGGCTGCGAGCGCCGCAA AGCAGCGGGCCCGCGGAGCTGCGGGACCAAG GACCG	DMRT3.1	22 986 593
SEQ ID NO: 22	CGTCTCAGCCGCCCGCCGCGCAGCTCCCGCC GCCGAGTTGGCTGCGG[C/T]GCCGCGCTGCGCT GGGCCACCGAGCCGAGCCCGGGCGCTGCAG GCGCA	DMRT3.2	22 987 143
SEQ ID NO: 23	GGAGGTCTCCTCTCCAGCCGCTCCTCGGCCTC GGCCGCCAGCCGAACCTT[C/A]GGCAGAGCCCGAG AGCCTCGTGTGCCCTCAACGGGCACATCTTTG AAC	DMRT3.3	22 999 655
SEQ ID NO: 24	CTCTCAGCCGCTCCTCGGCTCGGCCGCCGAC CGAACTTCGGCAGAGCC[C/G]GAGAGCCTCGTGT TGCCCTCCAACGGGCACATCTTTGAACACACCTT GAG	DMRT3.4	22 999 665
SEQ ID NO: 25	GGCCTGGCCCTAGGGCATTGAAGGGCTGGGGA GAGTCACATGTACTCCC[A/T]CTGTGGCCTGAAGA CCTACCTGGAGGGAAACCAAGCTTGTAGGGGG CCT	SNP.6	23 009 648

Варианты последовательности на 23 хромосоме лошади, демонстрирующие сильную генетическую ассоциацию с мутацией Gait у лошадей. Мутация Gait возникает на 23 хромосоме лошади в нуклеотидном положении 22999655 п.о. и указана ниже жирным курсивом

Тип	Расположение/последовательность ¹	Координата (EquCab2)	Реф. аллель ²	Вариант. аллель(и) ³
SNP	интронное	22919878	A	G
SNP	интронное	22920361	C	T
SNP	интронное	22920434	A	T
SNP	интронное	22920646	G	A
SNP	интронное	22920717	C	T
SNP	интронное	22921203	G	T
SNP	интронное	22922079	A	G
SNP	интронное	22922780	C	T
SNP	интронное	22923569	A	G
SNP	интронное	22924120	G	A
INDEL	интронное	22924142	–	A
SNP	интронное	22924299	T	G
SNP	интронное	22924380	A	G
SNP	интронное	22924407	C	T
SNP	интронное	22926098	C	T
SNP	интронное	22926188	T	C
SNP	интронное	22926872	A	C
SNP	интронное	22927387	C	T
SNP	интронное	22927607	T	C
SNP	интронное	22928220	C	T
SNP	интронное	22928537	T	G
SNP	интронное	22928587	A	G
SNP	интронное	22929137	G	A
SNP	интронное	22930011	A	C
SNP	интронное	22932024	G	A
SNP	интронное	22932895	A	G
SNP	интронное	22933218	A	G
SNP	интронное	22936034	A	G
SNP	интронное	22940759	T	G
SNP	интронное	22942423	T	A
SNP	интронное	22945643	G	C
SNP	интронное	22946599	A	T
SNP	интронное	22948774	C	T

SNP	интронное	22949055	A	G
SNP	интронное	22949108	A	G
SNP	интронное	22949240	T	C
SNP	интронное	22949710	A	G
SNP	интронное	22956846	G	T
SNP	интронное	22960132	A	C
SNP	интронное	22960528	T	C
SNP	интронное	22960710	C	T
SNP	интронное	22964042	C	T
INDEL	интронное	22965059	-	GA
SNP	интронное	22967119	C	T
SNP	интронное	22967656	C	T
SNP	интронное	22967915	G	C
SNP	интронное	22968898	G	A
SNP	интронное	22973984	C	T
SNP	интронное	22974589	T	C
SNP	межгенное	22979124	T	C
SNP	межгенное	22980014	C	T
SNP	межгенное	22982879	T	C
INDELs	межгенное	22984588	A	-
INDEL	межгенное	22985746	G	-
SNP	интронное	22988210	C	A
SNP	интронное	22988991	T	G
SNP	интронное	22993092	C	A
SNP	интронное	22994591	C	A
SNP	интронное	22999058	G	A
SNP	<i>stopgain SNP</i>	22999655	C	A
SNP	межгенное	23002606	A	G
INDEL	межгенное	23003956	-	TG
SNP	межгенное	23008772	G	A
SNP	межгенное	23008789	G	A
SNP	межгенное	23009648	A	T
SNP	межгенное	23010164	G	A
SNP	межгенное	23011289	G	C

¹Расположение: указывает на то, где расположен SNP относительно генов Ensembl. В случаях перекрывания кодирующей последовательности указана предсказанная последовательность белка. Вставки гена осуществляли с использованием программного обеспечения ANNOVAR.

²Реф. аллель. Представляет собой референсную аллель в сборке генома лошади (EquCab2).

³Вариантн. аллель(и). Представляет собой вариант аллели в полиморфном положении, демонстрирующем очень сильную ассоциацию с мутацией Gait. Для полиморфизмов вставки по сравнению с референсной сборкой (EquCab2) референсная аллель обозначена "-" и для делеций по сравнению с референсной сборкой вариантная аллель обозначена "-". Лошадь с мутантной последовательностью гомозиготна по вариантной аллели по всем сайтам за исключением одного (см. сноску 4), представленного в этой таблице, если не указано иное в столбце "вариант аллель(и)".

⁴Этот SNP идентифицирован как гетерозиготный (AG) у мутантной лошади и гомозиготный для референсной аллели у контрольной лошади. G-аллель в этом SNP вероятно возникает после нонсенс-мутации DMRT3.

Анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA). Олигонуклеотид 5'-ggatccTCGAGAA CAATGTAACAATTTCGCC-3' и его комплементарную последовательность отжигали в 10 мМ Трис pH 7,5, 1 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 50 мМ KCl сначала путем нагревания до 95°C в течение 2 мин и затем охлаждения до 25°C (2 мин/°). Дуплекс метили ДНК-полимеразой Кленова и [α -³²P]-dCTP и очищали с использованием колонки Bio-Rad Micro Bio-Spin 30. DMRT3 дикого типа и мутантный белок получали путем трансляции *in vitro* с использованием TNT Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). EMSA осуществляли как указано в Culbertson & Leeds, 2003 (Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 207-214) со следующими модификациями. Не добавляли плазмидную ДНК и использовали 1,0 мкл транслированного *in vitro* белка и 150× имеющего более низкую температуру гибридизации конкурента. Реакционную смесь инкубировали на льду в течение 20 мин, а затем добавляли радиоактивно меченый олигонуклеотид и затем инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Анализ на гелях проводили при 150 В при комнатной температуре. Обнаружено, что полноразмерный белок дикого типа и мутантный белок DMRT3 связываются с ранее определенным DMRT-связывающим мотивом (фиг. 6). Таким образом, мутация DMRT3 не приводит к измененной картине экспрессии и, по-видимому, мутантный белок сохраняет свою клеточную локализацию и профиль связывания ДНК. Таким образом, он может представлять

собой доминантную негативную форму с нормальной ДНК-связывающей функцией, но дефектным в отношении взаимодействия с другими белками. Последнее должно согласовываться с ясными фенотипическими проявлениями, обнаруженными у гетерозигот. Тем не менее, мутация не полностью доминантна, поскольку СА гетерозиготы и АА гомозиготы демонстрируют явные фенотипические различия.

Выводы

Авторы изобретения представили исчерпывающее доказательство того, что мутация DMRT3_Ser301 STOP оказывает значительное действие на аллюры у лошадей. Предложенная авторами изобретения интерпретация фенотипических последствий этой мутации заключается в том, что гомозиготность по мутации требуется, но не достаточна для иноходи, поскольку множество стандартбредных рысаков и некоторые исландские лошади, которые являются гомозиготными мутантами, не демонстрируют иноходь. С другой стороны, гетерозиготность или гомозиготность по мутации дает возможность для осуществления различных четырехтактных вариантов аллюров типа медленной иноходи, причем генетические модификаторы могут быть уникальными для каждой дрессируемой на аллюры породы. Мутация дает возможность для аллюров типа медленной иноходь и иноходь и подавляет переход от рыси или иноходи к галопу, что объясняет ее высокую частоту у иноходцев и рысаков, используемых для рысистых бегов. Остается открытым вопрос о том, изменяет ли мутация судьбу нейронов DMRT3 или изменяет ли их транскрипционную регуляцию, но ясно, что эти нейроны должны играть ключевую роль для контрольного центра в спинном мозге, координирующего движения конечностей.

Все раскрытые и заявленные здесь композиции и/или способы могут быть получены и осуществлены без избыточного экспериментирования в свете настоящего описания изобретения. Хотя композиции и способы по изобретению описаны с точки зрения предпочтительных воплощений, специалисту в данной области техники понятно, что изменения могут быть внесены в отношении композиций и/или способов, и в отношении стадий или последовательности стадий описанного здесь способа, не отходя от концепции, сущности и объема изобретения. Конкретней, понятно, что некоторые агенты, которые близки химически и физиологически, могут быть заменены на описанные здесь агенты при достижении таких же или похожих результатов. Предполагается, что все такие похожие замены и модификации, понятные специалистам в данной области техники, находятся в пределах сущности, объема и концепции изобретения, определенных в формуле изобретения.

Перечень последовательностей

<110>	Капилет Динетикс АБ Андерссон Лиса С Андерссон Лейф Линдгрэн Габриэлла	
<120>	Способ прогнозирования стиля передвижения у лошадей	
<130>	Gate	
<150>	SE 1130034-0	
<151>	2011-05-05	
<150>	us 61/514,749	
<151>	2011-08-03	
<160>	33	
<170>	PatentIn версия 3.5	
<210>	1	
<211>	2196	
<212>	ДНК	
<213>	Equus caballus	
<220>	CDS	
<221>	(39)..(1463)	
<400>	1	
	ccgccgcccag cccgccagct cttccgggag ctcagggc atg aac ggc tac ggt tcc	56
	Met Asn Gly Tyr Gly Ser	
	1 5	
	ccc tac ctg tac atg ggc ggc ccg gtg tgg cag ccg ccg cgg gcg ccc	104
	Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser Gln Pro Pro Arg Ala Pro	
	10 15 20	
	ttg cag cgc acg ccc aag tgc gcg cgc tgc cgc aac cac ggg gtg ctg	152
	Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys Arg Asn His Gly Val Leu	
	25 30 35	
	tcc tgg ctc aag ggt cac aag cgc tac tgc cgc ttc aag gac tgc acc	200
	Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys Arg Phe Lys Asp Cys Thr	
	40 45 50	
	tgc gag aag tgc atc ctc atc atc gag cgg cag agg gtc atg gcg gcg	248
	Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg Gln Arg Val Met Ala Ala	
	55 60 65 70	
	cag gtg cgc ctg cgc cgg cag caa gct aac gag agc ctc gag agc ctc	296
	Gln Val Ala Leu Arg Gln Gln Ala Asn Glu Ser Leu Glu Ser Leu	
	75 80 85	
	att ccc gac tgc ctg cgt gct ctg ccc ggc ccc ccg ccg ccg ggg gac	344
	Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly Pro Pro Pro Pro Gly Asp	
	90 95 100	
	gcc gcc gct gcc gcc ccg cag ccg ccg ccc acc tgc cag ccg tct cag	392
	Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro Thr Ser Gln Pro Ser Gln	
	105 110 115	
	ccg ccg ccg ccg cag cgt ccc gcc gcc gag ttg gct gcg gcc gcc gcg	440
	Pro Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu Leu Ala Ala Ala Ala	
	120 125 130	
	ctg cgc tgg gcc acc gag ccg cag ccc ggg gcg ctg cag gcg cag ctc	488
	страница 1	

Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly Ala Leu Gln Ala Gln Leu
 135 140 145 150
 gac aag cca gat ttg act gag gag cga ctt ggg gac ggc agc tcc gca 536
 Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu Gly Asp Gly Ser Ser Ala
 155 160 165
 gac aac aca gag acc ttc agc gac aaa gac acc gac cag agg agc tcc 584
 Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp Thr Asp Gln Arg Ser Ser
 170 175 180
 cca gat gtg gtg aaa agt aag ggc tgc ttc acc ccg gag agc ccc gag 632
 Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe Thr Pro Glu Ser Pro Glu
 185 190 195
 gtc gtg tct gtg gat gaa ggc ggg tat gcg gtc cag aag aac gga ggc 680
 Val Val Ser Val Asp Glu Gly Gly Tyr Ala Val Gln Lys Asn Gly Gly
 200 205 210
 acc tcc gag agc cgc ccc gac agt ccc aag tac cac ggg gaa cag aat 728
 Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys Tyr His Gly Glu Gln Asn
 215 220 225 230
 cac ctc ctg atc gag ggc ccc tcg ggg acc gtt tct ctg ccc ttc agc 776
 His Leu Leu Ile Glu Pro Ser Gly Thr Val Ser Leu Pro Phe Ser
 235 240 245
 ttg aaa gcc aac aga ccg ccc ctg gaa gtg tta aaa aaa atc ttc ccc 824
 Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val Leu Lys Lys Ile Phe Pro
 250 255 260
 aac cag aag ccc acg gtg ctg gag ctc atc ctg aag ggc tgt ggg ggc 872
 Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile Leu Lys Gly Cys Gly Gly
 265 270 275
 gac ctg gtg agc gcc gtg gag gtc ctc ctc tcc agc cgc tcc tcg gcc 920
 Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu Ser Ser Arg Ser Ser Ala
 280 285 290
 tcg gcc gcc gac cga act tcg gca gag ccc gag agc ctc gtg ttg ccc 968
 Ser Ala Ala Asp Arg Thr Ser Ala Glu Pro Glu Ser Leu Val Leu Pro
 295 300 305 310
 tcc aac ggg cac atc ttt gaa cac acc ttg agc tca tac ccc atc tcc 1016
 Ser Asn Gly His Ile Phe Glu His Thr Leu Ser Ser Tyr Pro Ile Ser
 315 320 325
 tct tcc aaa tgg tcc gtg gga tcg gcc ttc agg gtc cca gac acg ttg 1064
 Ser Ser Lys Trp Ser Val Gly Ser Ala Phe Arg Val Pro Asp Thr Leu
 330 335 340
 agg ttt tcc gca gac tct agt aac gtt gtc ccc aac ccc ttg gcc gtg 1112
 Arg Phe Ser Ala Asp Ser Ser Asn Val Val Pro Asn Pro Leu Ala Val
 345 350 355
 ccc ctg cag cat cct ttc ccc cag ccg ccc cgg tac cct ctg atg ctg 1160
 Pro Leu Gln His Pro Phe Pro Gln Pro Pro Arg Tyr Pro Leu Met Leu
 360 365 370
 agg aat act ttg gca aga aac cag tcg agc ccc ttc ctg ccc aat gat 1208
 Arg Asn Thr Leu Ala Arg Asn Gln Ser Ser Pro Phe Leu Pro Asn Asp
 375 380 385 390
 gtc acc ctg tgg aac acc atg acg ctg cag cag cag tac cag ctg agg 1256
 Val Thr Leu Trp Asn Thr Met Thr Leu Gln Gln Tyr Gln Leu Arg
 395 400 405
 tcc cag tac gtc agc cct ttc ccc ggg agc tcg ccc agc gtc ttc aga 1304
 Ser Gln Tyr Val Ser Pro Phe Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Phe Arg
 Страница 2
 410 415 420
 agc tcg cct gtc ctt ccc acg cgc gcc ccc gaa gac cct cgg atc tcc 1352
 Ser Ser Pro Val Leu Pro Thr Arg Ala Pro Glu Asp Pro Arg Ile Ser
 425 430 435
 atc cct gac gat ggg tgt ccg att gtg tca aag cag tct ctt tac acc 1400
 Ile Pro Asp Asp Gly Cys Pro Ile Val Ser Lys Gln Ser Leu Tyr Thr
 440 445 450
 gag gat gac tat gac gag agg tcc gac tcc tca gac tct aga ata ctc 1448
 Glu Asp Asp Tyr Asp Glu Arg Ser Asp Ser Asp Ser Arg Ile Leu
 455 460 465 470
 aac aca tca tct taa agtggtaccg ggtgctggt gaccaggtga cattttctgt 1503
 Asn Thr Ser Ser
 gcatttgaac tctgaccccc tgccctcccc aggagaggcc tcgtcctgtg tatacccttt 1563
 ccttctgttt gacaaagtga ctgtgcttga ttctatacct tagcaataaa aacataactt 1623
 atttaatttc ttgcacttca ctggaaaatg ccaaatagct ctgctctgcg gcttttagtgc 1683
 tgaatgttta ttgtaaaaga gagtctaag ctaagaatag tcttgggaaa gctgggtcca 1743
 cggaagattt atttgggat gaaagctga aggtcagcct tgctcctaaa ctcaacctgg 1803
 aatgttcaat aaaatgat acttgaatgc agttttgtaa aaaaggattc ctcaaggatat 1863
 ttgaaaccta aaggaagtgg ttggttgca aatggaccag aaacagggac attatattct 1923
 taggctaaaa accttgcatt taaaagagag actgcaacta agaatagagt gaactgctca 1983
 catgcttatt taagcttggg cagttttcag agacaaattc cattaagaat tattcttttc 2043
 acatgaccga atcgaaacat gtgtaatgac aatgtaaac caatcacagc tgtgaactgc 2103
 atgaaatgta ttgaaatg aacacaagat taagctttgt caggttaatg tagcatgcta 2163
 aggactctag aaaaaataa actaaggaga tga 2196
 <210> 2
 <211> 474
 <212> ППТ
 <213> Equus caballus
 <400> 2
 Met Asn Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Pro Arg Ala Pro Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys
 20 25 30
 Arg Asn His Gly Val Leu Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys
 35 40 45
 Arg Phe Lys Asp Cys Thr Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg
 50 55 60
 Gln Arg Val Met Ala Ala Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn
 65 70 75 80

Glu Ser Leu Glu Ser Leu Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly
85 90 95

Pro Pro Pro Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro
100 105 110

Thr Ser Gln Pro Ser Gln Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu
115 120 125

Leu Ala Ala Ala Ala Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly
130 135 140

Ala Leu Gln Ala Gln Leu Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu
145 150 155 160

Gly Asp Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp
165 170 175

Thr Asp Gln Arg Ser Ser Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe
180 185 190

Thr Pro Glu Ser Pro Glu Val Val Ser Val Asp Glu Gly Tyr Ala
195 200 205

Val Gln Lys Asn Gly Gly Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys
210 215 220

Tyr His Gly Glu Gln Asn His Leu Leu Ile Glu Gly Pro Ser Gly Thr
225 230 235 240

Val Ser Leu Pro Phe Ser Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val
245 250 255

Leu Lys Lys Ile Phe Pro Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile
260 265 270

Leu Lys Gly Cys Gly Gly Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu
275 280 285

Ser Ser Arg Ser Ser Ala Ser Ala Ala Asp Arg Thr Ser Ala Glu Pro
290 295 300

Glu Ser Leu Val Leu Pro Ser Asn Gly His Ile Phe Glu His Thr Leu
305 310 315 320

Ser Ser Tyr Pro Ile Ser Ser Ser Lys Trp Ser Val Gly Ser Ala Phe
325 330 335

Arg Val Pro Asp Thr Leu Arg Phe Ser Ala Asp Ser Ser Asn Val Val
340 345 350

Страница 4

Pro Asn Pro Leu Ala Val Pro Leu Gln His Pro Phe Pro Gln Pro Pro
355 360 365

Arg Tyr Pro Leu Met Leu Arg Asn Thr Leu Ala Arg Asn Gln Ser Ser
370 375 380

Pro Phe Leu Pro Asn Asp Val Thr Leu Trp Asn Thr Met Thr Leu Gln
385 390 395 400

Gln Gln Tyr Gln Leu Arg Ser Gln Tyr Val Ser Pro Phe Pro Gly Ser
405 410 415

Ser Pro Ser Val Phe Arg Ser Ser Pro Val Leu Pro Thr Arg Ala Pro
420 425 430

Glu Asp Pro Arg Ile Ser Ile Pro Asp Asp Gly Cys Pro Ile Val Ser
435 440 445

Lys Gln Ser Leu Tyr Thr Glu Asp Asp Tyr Asp Glu Arg Ser Asp Ser
450 455 460

Ser Asp Ser Arg Ile Leu Asn Thr Ser Ser
465 470

<210> 3
<211> 2196
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> CDS
<222> (39)..(941)

<400> 3
ccgccgacg cccgccagct cttccgggag ctcagggc atg aac ggc tac ggt tcc 56
Met Asn Gly Tyr Gly Ser
1 5

ccc tac ctg tac atg ggc ggc ccg gtg tgg cag ccg ccg cgg gcg ccc 104
Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser Gln Pro Pro Arg Ala Pro
10 20

tgg cag cgc acg ccc aag tgc gcg cgc tgc cgc aac cac ggg gtg ctg 152
Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys Arg Asn His Gly Val Leu
25 30 35

tcc tgg ctc aag ggt cac aag cgc tac tgc cgc ttc aag gac tgc acc 200
Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys Arg Phe Lys Asp Cys Thr
40 45 50

tgc gag aag tgc atc ctc atc atc gag cgg cag agg gtc atg gcg gcg 248
Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg Gln Arg Val Met Ala Ala
55 60 65 70

cag gtg gcg ctg cgc cgg cag caa gct aac gag agc ctc gag agc ctc 296
Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn Glu Ser Leu Glu Ser Leu
75 80 85

att ccc gac tgg ctg cgt gct ctg ccc ggc ccc ccg ccg ggg gac 344
Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly Pro Pro Pro Gly Asp
Страница 5

90 95 100

gcc gcc gct gcc ccg ccg ccg ccc acc tcg cag ccg tct cag 392
Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Thr Ser Gln Pro Ser Gln
105 110 115

ccg ccg ccg ccg cag cgt ccc gcc gcc gag ttg gct ccg gcc gcc ccg 440
Pro Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu Leu Ala Ala Ala Ala
120 125 130

ctg cgc tgg gcc acc gag ccg cag ccc ggg ccg ctg cag ccg cag ctc 488
Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly Ala Leu Gln Ala Gln Leu
135 140 145

gac aag cca gat ttg act gag gag cga ctt ggg gac ggc agc tcc gca 536
Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu Gly Asp Gly Ser Ser Ala
155 160 165

gac aac aca gag acc ttc agc gac aaa gac acc gac cag agg agc tcc 584
Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp Thr Asp Gln Arg Ser Ser
170 175 180

cca gat gtg gtg aaa agt aag gcc tgc ttc acc ccg gag agc ccc gag 632
Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe Thr Pro Glu Ser Pro Glu
185 190 195

gtc gtg tct gtg gat gaa gcc ggg tat ccg gtc cag aag aac gga gcc 680
Val Val Ser Val Asp Glu Gly Tyr Ala Val Gln Lys Asn Gly Gly
200 205 210

acc tcc gag agc cgc ccc gac agt ccc aag tac cac ggg gaa cag aat 728
Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys Tyr His Gly Glu Gln Asn
215 220 225

cac ctc ctg atc gag gcc ccc tcg ggg acc gtt tct ctg ccc ttc agc 776
His Leu Leu Ile Glu Gly Pro Ser Gly Thr Val Ser Leu Pro Phe Ser
235 240 245

ttg aaa gcc aac aga ccg ccc ctg gaa gtg tta aaa aac atc ttc ccc 824
Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val Leu Lys Lys Ile Phe Pro
250 255 260

aac cag aag ccc acg gtg ctg gag ctc atc ctg aag ggc tgt ggg gcc 872
Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile Leu Lys Gly Cys Gly Gly
265 270 275

gac ctg gtg agc gcc gtg gag gtc ctc ctc tcc agc cgc tcc tcg gcc 920
Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu Ser Ser Arg Ser Ser Ala
280 285 290

tcg gcc gcc gac cga act tag gcagagcccg agagcctcgt gttgccctcc 971
Ser Ala Ala Asp Arg Thr
295 300

aacgggcaca tctttgaaca caccttgagc tcatacccca tctcctcttc caaatggtcc 1031

gtgggatcgg ccttcagggt cccagacacg ttgaggtttt ccgagactc tagtaacgtt 1091

gtccccaac ccttgccctt gccctgcag catcctttcc cccagccgcc cgggtaccct 1151

ctgatgctga ggaatacttt ggcaagaaac cagtcgagcc ccttctctcc caatgatgtc 1211

accctgtgga acaccatgac gctgcagcag cagtcaccgc tgaggtccca gtacgtcagc 1271

cctttccccg ggagctcgcg cagcgtcttc agaagctcgc ctgtccttcc cagcgcgccc 1331

cccgaagacc ctcggatctc catcctctgac gatgggtgtc cgattgtgtc aaagcagtct 1391

ctttacaccg aggatgacta tgacgagaggg tcccaactctt cagactctag aatactcaac 1451

Страница 6

acatcatctt aaagtgttac cgggtggctg gtgaccaggt gacattttct gtgcatttga 1511

actctgacct cctgccctcc ccaggagagg cctcgtcctg tgtataacct ttcttctgt 1571

ttgacaagt gactgtgctt gattctatc cttagcaata aaaacataac ttatttaatt 1631

tcttgcaact cactggaaaa tgccaaatag ctctgctctg cggctttagt gctgaatggt 1691

tattgtaaaa gagagtctaa tgctaagaat agtcttggga aagctgggct cagcgaagat 1751

ttatttgggg atggaaaact gaaggtcagc cttgctccta aactcaacct ggaatgttca 1811

ataaaatagt atacttgaat gcagttttgt aaaaaggat tcctcaggat atttgaacc 1871

taaaggaggt ggtttggttg caaatggacc agaaacaggg acattatatt cttaggttaa 1931

aaaccttgca tttaaaagag agactgcact taagaataga gtgaactgct cacatgctta 1991

ttaagcttg gacagttttc agagacaaat tccattaaga attattcttt tcacatgacc 2051

gaatcgaac atgtgtaatg tcaatgtaaa accaatcaca gctgtgaact gcatgaaatg 2111

tattgtgaaa tgaacacaag attaagcttt gtcagggttaa tgtagcatgc taaggactct 2171

agaaaaaaaaa aaactaagga gatga 2196

<210> 4
<211> 300
<212> ППТ
<213> Equus caballus

<400> 4

Met Asn Gly Tyr Gly Ser Pro Tyr Leu Tyr Met Gly Gly Pro Val Ser 1
1 5 10 15

Gln Pro Pro Arg Ala Pro Leu Gln Arg Thr Pro Lys Cys Ala Arg Cys 20
20 25 30

Arg Asn His Gly Val Leu Ser Trp Leu Lys Gly His Lys Arg Tyr Cys 35
35 40 45

Arg Phe Lys Asp Cys Thr Cys Glu Lys Cys Ile Leu Ile Ile Glu Arg 50
50 55 60

Gln Arg Val Met Ala Ala Gln Val Ala Leu Arg Arg Gln Gln Ala Asn 65
65 70 75 80

Glu Ser Leu Glu Ser Leu Ile Pro Asp Ser Leu Arg Ala Leu Pro Gly 85
85 90 95

Pro Pro Pro Pro Gly Asp Ala Ala Ala Ala Pro Gln Pro Pro Pro 100
100 105 110

Thr Ser Gln Pro Ser Gln Pro Pro Pro Gln Arg Pro Ala Ala Glu 115
115 120 125

Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Arg Trp Ala Thr Glu Pro Gln Pro Gly 130
130 135 140

Страница 7

Ala Leu Gln Ala Gln Leu Asp Lys Pro Asp Leu Thr Glu Glu Arg Leu
 145 150 155 160
 Gly Asp Gly Ser Ser Ala Asp Asn Thr Glu Thr Phe Ser Asp Lys Asp
 165 170 175
 Thr Asp Gln Arg Ser Ser Pro Asp Val Val Lys Ser Lys Gly Cys Phe
 180 185 190
 Thr Pro Glu Ser Pro Glu Val Val Ser Val Asp Glu Gly Tyr Ala
 195 200 205
 Val Gln Lys Asn Gly Gly Thr Ser Glu Ser Arg Pro Asp Ser Pro Lys
 210 215 220
 Tyr His Gly Glu Gln Asn His Leu Leu Ile Glu Gly Pro Ser Gly Thr
 225 230 235
 Val Ser Leu Pro Phe Ser Leu Lys Ala Asn Arg Pro Pro Leu Glu Val
 245 250 255
 Leu Lys Lys Ile Phe Pro Asn Gln Lys Pro Thr Val Leu Glu Leu Ile
 260 265 270
 Leu Lys Gly Cys Gly Gly Asp Leu Val Ser Ala Val Glu Val Leu Leu
 275 280 285
 Ser Ser Arg Ser Ser Ala Ser Ala Ala Asp Arg Thr
 290 295 300

<210> 5
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой с или t

<400> 5
 ttgttggggt cttatgcaaa gtgcagaaat agtcttttgg aaaaacgtac ngtttgcact 60
 attttcttat ttctattcac ccttaatgtg aaccattcca a 101

<210> 6
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой а или g
 Страница 8

<400> 6
 agaaatgata tataaaatt acgaatgcct cttagacaga atccttatgt ntggcacaga 60
 agtatttagt tcgcttaaca gatattgagt gcttatatga g 101

<210> 7
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой с или t

<400> 7
 ctcttccttg catcctatcc ccttagtgtc gcaaggaag ttgtgagaga ngagcttgta 60
 gatctgctct agaaaatagg cctgttttct taagaaccg t 101

<210> 8
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой g или с

<400> 8
 cagagtgcsg gtctgtggct gtgggcctg acgagcacat ggacaacatt ntcgtgtacc 60
 acaggggctc caggtcctgt aaggatgctg ctgtggggac a 101

<210> 9
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой а или g

<400> 9
 agaaactcatt caaaaccacc aggccttacta ggctttttta aatagacttg nctttgaact 60
 tctaagtgcā ggatctaaaa ccactggcga aatttctgga a 101

<210> 10
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой t или g

<400> 10
 ttacctgcat gcctctcccc cтааaccatt tctagcatgt gtggcagag ngggcatcgt 60
 gctgcctcgc tcactggatc actctgggaa cgtttccttc a 101

<210> 11
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой t или c

<400> 11
 aaggatattg tgagtctgac ctacagacac tgtccccggc ctgtacaag ngcccaagt 60
 gtgacaagc atccctcgcc tgccccctga gctgttacct g 101

<210> 12
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой c или t

<400> 12
 aagcсаааg cсаgссаggт gactgcgctt gcttctggg ctcatgctca nactgctgtg 60
 acccgсacag gtgсссасgс сасacttссc accgctcgгс a 101

<210> 13
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой a или g

<400> 13
 gcttgcttec tgggctcatg ctсacactgc tgtgaccgc acaggтgссc ngсссacact 60
 tсссacгсct cggсactсac tсatggссса gссссgagtc c 101

<210> 14
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой a или c

<400> 14
 Страница 10
 actgaaгtа tacattttgt gcctgaactc accagсааac агаaggсага naaccaggg 60
 ttgaaggctg gagctgtcac agtagaagtt gagссагсag g 101

<210> 15
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой g или c

<400> 15
 cattttgtgc ctгаactсac саgсааасag аaggсагааа ассаaggгtt naaggctgga 60
 gctgtcacag tagaagttga gсссаgсagga atttgtggc c 101

<210> 16
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой c или t

<400> 16
 tcactctaat саagttgcta tcaccattca сасаattgtc сaggtagta ntgggacccc 60
 агаааgаtа сагссгсtсса ttccatttc ссacttgгtc c 101

<210> 17
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой g или a

<400> 17
 ctgggctgaa асаggгgгtc ctgctttccc cгсctgсctg gtcaggctgc nctcttctcc 60
 cttccccagg cttaagtcac ttcatgсага accctttata c 101

<210> 18
 <211> 101
 <212> ДНК
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n представляет собой g или c

<400> 18
 ссаgсattct сгсгттсаа cttttcccg ctctccaat ссааactgga nttagcatca 60
 Страница 11

gctaccaca atgatcaagc atttctgtg tggcagcct g 101

<210> 19
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой с или а

<400> 19
aggcaagaag c gataggaag aaggcagca gaactggacc tgcagatttg naagtctct 60
ggagccagta ggtggaacc tcatcagca atgaacgcag g 101

<210> 20
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой т или с

<400> 20
ccaaactgag agtcttattt gctgataga atgcagagac ttctctttc ngaggcttc 60
aacctcgtac ttaattctcc taagtgaga aaaaaccact c 101

<210> 21
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой с или т

<400> 21
accagcggga gactgagct gcgagcggc caaacggg tgccgcatct ntggccagcc 60
cggagcgcac gcggccggc gagctgagg assaaggacc g 101

<210> 22
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой с или т

<400> 22
ccgtctcagc ccggccggc gcagcgtccc gccggcagc tggctgggc gccgcgctg 60
Страница 12

cgctgggcca ccgagccgca gccggggcg ctgcagcgc a 101

<210> 23
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой с или а

<400> 23
ggaggtctc ctctccagcc gctcctggc ctggccggc gaccgaactt nggcagagcc 60
cgagagctc gtgtgacct ccaacgggca catctttgaa c 101

<210> 24
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой с или g

<400> 24
ctctccagcc gctcctggc ctggccggc gaccgaactt ccgagagcc ngagagcctc 60
gtgtgacct ccaacgggca catctttgaa cacaccttga g 101

<210> 25
<211> 101
<212> ДНК
<213> Equus caballus

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n представляет собой а или т

<400> 25
ggcctggccc ctaggccatt gaaggcctgg ggagagtcac atgtactccc nctgtggcct 60
gaagacctac ctggaggaa accagcttgc ttagggggcc t 101

<210> 26
<211> 26
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Праймер

<400> 26
gcaaatgca gaaatagtct ttggga 26

<210> 27
<211> 28
<212> ДНК

<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	27	
	cactcttttg gaatggttca cattaagg	28
<210>	28	
<211>	18	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Репортерный ген	
<400>	28	
	tagtgсааас ggtacggt	18
<210>	29	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Репортерный ген	
<400>	29	
	aaatagtgса аасagtagct t	21
<210>	30	
<211>	17	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	30	
	сctctccaсgс сgctcct	17
<210>	31	
<211>	20	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Праймер	
<400>	31	
	tсаааgаtgгt gcccgттgga	20
<210>	32	
<211>	13	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Репортерный ген	
<400>	32	
	ctgссgаagt tсg	13
Страница 14		
<210>	33	
<211>	15	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Репортерный ген	
<400>	33	
	ctctgсстаа gttcг	15

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ прогнозирования стиля передвижения у лошади, включая способность использовать аль-

тернативные аллюры, бежать рысью или иноходью с высокой скоростью и осуществлять выездку, включающий стадии:

1) экстрагирование фракции ДНК из образца, полученного у лошади,

2) определение в указанной фракции ДНК наличия или отсутствия нонсенс-мутации в экзоне 2 гена DMRT3 (фактор транскрипции 3, связанный с генами doublesex и tab-3) в нуклеотидном положении 22999655 на хромосоме 23 лошади, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1, приводящей к кодированию усеченной формы белка DMRT3, или по меньшей мере одного ассоциированного с указанной нонсенс-мутацией генетического маркера, который расположен в области между фланкирующими однонуклеотидными полиморфизмами SNP по нуклеотидным положениям 22628976 и 23315071 на 23 хромосоме лошади, где генетический маркер выбран из генетических маркеров, перечисленных в табл. 4, 5, 7 и 8,

где наличие или отсутствие указанных нонсенс-мутации или по меньшей мере одного генетического маркера означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью, либо что лошадь обладает способностью осуществлять выездку.

2. Способ по п.1, где указанный по меньшей мере один генетический маркер расположен в области между фланкирующими SNP по нуклеотидным положениям 22919878 и 23011289 на 23 хромосоме лошади.

3. Способ по п.2, где генетический маркер выбран из генетических маркеров, перечисленных в табл. 8.

4. Способ по п.2, включающий идентификацию в указанной фракции ДНК нуклеотида в одном или более чем одном конкретном положении, выбранном из положений 22919878; 22920361; 22920434; 22920646; 22920717; 22921203; 22922079; 22922780; 22923569; 22924120; 22924142; 22924299; 22924380; 22924407; 22926098; 22926188; 22926872; 22927387; 22927607; 22928220; 22928537; 22928587; 22929137; 22930011; 22932024; 22932895; 22933218; 22936034; 22940759; 22942423; 22945643; 22946599; 22948774; 22949055; 22949108; 22949240; 22949710; 22956846; 22960132; 22960528; 22960710; 22964042; 22965059; 22967119; 22967656; 22967915; 22968898; 22973984; 22974589; 22979124; 22980014; 22982879; 22984588; 22985746; 22988210; 22988991; 22993092; 22994591; 22999058; 22999655; 23002606; 23003956; 23008772; 23008789; 23009648; 23010164 и 23011289 на 23 хромосоме лошади.

5. Способ по п.1, включающий определение в указанной фракции ДНК наличия

1) нуклеотида С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1,

где наличие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

и отсутствие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

2) нуклеотида А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 3,

где наличие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

и отсутствие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

3) нуклеотида С или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 5,

где наличие нуклеотида С означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

и наличие нуклеотида Т означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

4) нуклеотида А или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 6,

где наличие нуклеотида А означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

и наличие нуклеотида G означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

5) нуклеотида С или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 7,

где наличие нуклеотида С означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

и наличие нуклеотида Т означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

6) нуклеотида G или С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 8,

где наличие нуклеотида G означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

и наличие нуклеотида С означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

7) нуклеотида А или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 9,

где наличие нуклеотида А означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

и наличие нуклеотида G означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллюры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

8) нуклеотида Т или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 10,

где наличие нуклеотида Т означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

21) нуклеотида С или А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 23,

где наличие нуклеотида С означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку, и наличие нуклеотида А означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллоры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

22) нуклеотида С или G в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 24,

где наличие нуклеотида С означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллоры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

и наличие нуклеотида G означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку, и/или

23) нуклеотида А или Т в нуклеотидном положении, соответствующем положению 51 в SEQ ID NO: 25,

где наличие нуклеотида А означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку, и наличие нуклеотида Т означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллоры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью.

6. Способ по п.4, включающий определение в указанной фракции ДНК наличия или отсутствия

1) нуклеотида С в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 1,

где наличие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку,

и отсутствие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллоры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью, и/или

2) нуклеотида А в нуклеотидном положении, соответствующем положению 939 в SEQ ID NO: 3,

где наличие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллоры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

и отсутствие указанного нуклеотида означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку.

7. Способ прогнозирования стиля передвижения у лошади, включая способность использовать альтернативные аллоры, бежать рысью или иноходью с высокой скоростью и осуществлять выездку, включающий стадии:

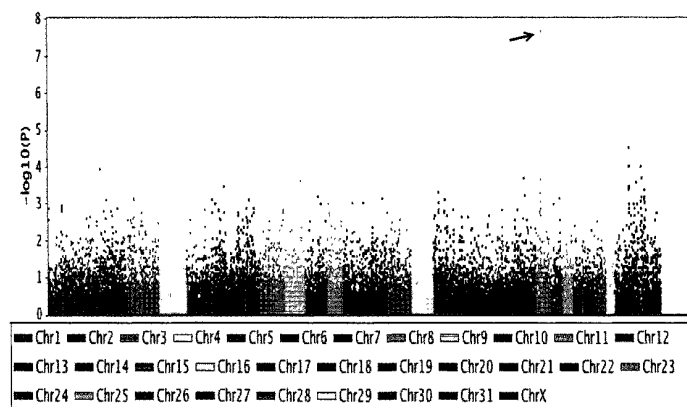
1) экстрагирование фракции белка из образца, полученного у лошади, и

2) определение в указанной фракции белка наличия или отсутствия усеченной формы белка DMRT3,

где наличие указанной усеченной формы белка DMRT3 означает, что лошадь обладает способностью использовать альтернативные аллоры и бежать рысью или иноходью с высокой скоростью,

и отсутствие указанной усеченной формы белка DMRT3 означает, что лошадь обладает способностью осуществлять выездку.

8. Применение способа по любому из пп.1-7 для отбора лошади для разведения.



Фиг. 1



Фиг. 2

301

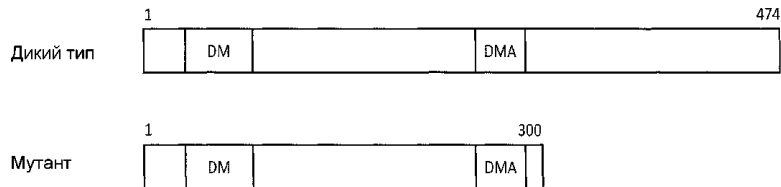
Дикий тип A A D R T S A E P E S
 GCC GCC GAC CGA ACT TCG GCA GAG CCC GAG AGC

Мутант A A D R T Stop
 GCC GCC GAC CGA ACT TAG GCA GAG CCC GAG AGC

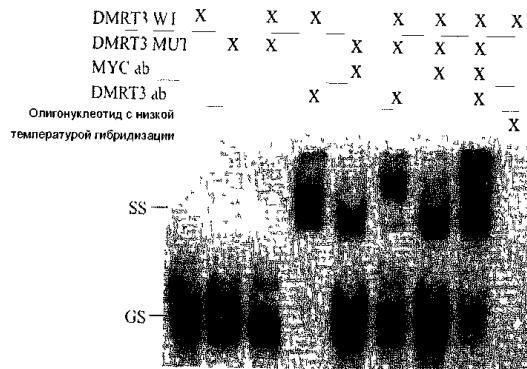
Фиг. 3

Крупный рог. Скот ANRPPLEVLKIKIFPHQKPAVLELILKGGGDLVSAVEVLLSSRSSSSAA.DRTSAGEPEGLVLPNSNGHIFBHTLSSYPVLSKWS
 Лошадь дикий тип -----N--T-----A--S-----I-----I-----
 Лошадь мутант -----N--T-----A--S-----I-----I-----
 Человек -----N--T-----VTG-.E-.S-A-----I-----I-----
 Шимпанзе -----S--T-----Q-----G-----C-VTG-.E-SC-.S-L-PR--I-----I-----
 Собака -----G-----G-----AA-SE-A-.A--P--G-G-----I-----
 Мышь -----N--T-----AAGT.E--AE...S--S--I--G--I-----
 Крыса -----N--T-----AAG-.E--AE...S--S--I--G--I-----
 Курица -----N--T-----G-----VAGG.E--E..SD-----I-----I-----
 Данио-рерио -----AII-----G-I-I-----TMKPE.KIL-E.SSDA-----P--V-----

Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6