

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 982**

21 Número de solicitud: 201500899

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.12.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.04.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.0%)**

**Sección de Contratos y Patentes, OTRI-UCM,
C/Donoso Cortés, 65
28015 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**DUNNER BOXBERGER, Helene Susana;
CAÑÓN FERRERAS, Javier y
SEVANE FERNÁNDEZ, Natalia**

54 Título: **Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo**

57 Resumen:

Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo.

La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar a los individuos de la especie equina portadores del alelo ¹pearl (C¹_{rl}) para la selección de la coloración de la capa en caballo de acuerdo a las demandas del mercado, preferencias personales o los requisitos para la inclusión en el libro genealógico de las distintas razas, así como para verificar la segregación de este alelo en pedigrees particulares. Dicho método comprende la detección de una mutación puntual identificada en el gen MATP (membrane-associated transporter protein), la sustitución no sinónima de una G por una A en la posición c.100G>A en el exón 4 del gen MATP, lo cual da lugar al cambio del aminoácido alanina por treonina en la posición 329 de la proteína MATP del individuo.

DESCRIPCIÓN

Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo.

Sector de la técnica

La presente invención pertenece al sector de la genética animal y más concretamente a la aplicación de técnicas diagnósticas de biología molecular para la identificación y la selección de patrones específicos de coloración de la capa en caballo.

Antecedentes de la invención

Las preferencias humanas sobre las distintas coloraciones de la capa de los animales han jugado un papel fundamental en el desarrollo de la gran variedad de patrones de coloración de la capa que exhiben las especies domésticas, como es el caso del caballo, favoreciendo alelas raras mediante la cría selectiva. La mayoría de los colores de capa y piel siguen modelos de herencia mendeliana relativamente simples, con unos pocos genes implicados en fenotipos particulares actuando sobre la síntesis de pigmentos o sobre la función de los melanocitos, las células que producen los pigmentos (Sponenberg, D.P. (2009) *Equine Color Genetics*, 3rd edn. Iowa State University Press. Ames, IA). En caballos se han descrito cuatro loci como responsables de la dilución de las coloraciones básicas de la capa (revisado en Rieder, S. (2009) Molecular tests for coat colours in horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 126, 415-24): Dun o pardo (D), Silver Dapple o moteado plateado (Z), Champagne o champán (CH) y Cream o crema (C). Tanto los loci pardo como moteado plateado producen un patrón de dilución de la capa fácilmente distinguible de los fenotipos champán o crema. Los loci champán y crema pueden dar lugar a fenotipos diluidos afectando tanto a la feomelanina como a la eumelanina, los dos tipos de melanina más abundantes. La coloración de la capa producida por el alelo CH^{CH} puede ser difícil de distinguir del efecto producido por la dilución del locus crema. Las principales diferencias son: i) el heterocigoto CH^{CH} diluye tanto la feomelanina como la eumelanina; ii) los efectos del homocigoto CH^{CH} y del heterocigoto CH^{CH} son difíciles de distinguir fenotípicamente; y iii) el fenotipo champán normalmente presenta un brillo metálico. El alelo C^{Cr} del locus C actúa de forma codominante, diluyendo una capa alazana a palomina y una capa castaña a baya en heterocigosis, pero con efecto fenotípico escaso sobre el pigmento negro (dando en ocasiones la capa negro cenizo). El homocigoto C^{Cr} diluye todos los colores básicos a los fenotipos cremello, perla o crema cenizo, caracterizados por piel rosada, capas de color crema que pueden parecer casi blancas y ojos azul claro. Mariat *et al.* (2003) (Mariat, D., Taourit, S. & Guérin, G. (2003) A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection and Evolution* 35, 119-33) localizaron una sustitución de una sola base en el exón 2 del gen *membrane-associated transposon protein (MATP)*, también conocido como *solute carrier family 45, member 2 (SLC45A2)*, totalmente asociada con los fenotipos que segregaban con el alelo C^{Cr}.

Aparte de esas variaciones, se ha descrito otro patrón de dilución de la capa en el caballo, el *pearl*. Hasta la fecha, esta capa parece segregar solamente en las razas ibéricas Pura Raza Española (P.R.E.) y Lusitano, y también ha sido descrita en razas de origen ibérico como el Quarter Horse, donde se denomina "Barlink Factor", o en caballos Paint. Este fenotipo segrega de forma autosómica recesiva y se parece a algunos de los patrones de capa producidos por el alelo champán CH^{CH} y el crema C^{Cr}, siendo a veces

difícil distinguir entre ellos. Los animales portadores de dos copias del alelo *pearl* exhiben una dilución de la eumelanina y la feomelanina similar a la que produce el alelo champagne CH^{CH} y el genotipo heterocigoto del alelo C^{Cr} del crema. El efecto del alelo pearl en heterocigosis no se puede apreciar a menos que se combine con el alelo C^{Cr} del crema, produciendo un fenotipo pseudo-doble-diluido difícil de distinguir del homocigoto C^{Cr}C^{Cr}. Sin embargo, el mecanismo genético causante de los fenotipos perlino e isabelo todavía no se conoce.

Explicación de la invención

Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar un individuo de la especie equina con capa perlino o isabelo o un individuo de la especie equina portador del alelo causante de las capas perlino e isabelo pero que no muestra dichos fenotipos. Para ello, el método se sirve de una mutación puntual identificada en el gen MATP (*membrane-associated transponer protein*) que conlleva una modificación en la proteína MATP del individuo. Se trata de la mutación c.100>A localizada en el exón 4, caracterizado por SEQ ID N°: 17, y que implica el cambio en la secuencia aminoacídica, caracterizada por SEQ ID N°: 18, localizado en p.Ala329Thr en la proteína MATP, caracterizada por SEQ ID N°: 19.

Además, se han detectado otras dos mutaciones puntuales asociadas al fenotipo Pearl y localizadas en el gen MATP: una es la mutación c.48T>C en el intrón 1 del gen, caracterizado por SEQ ID N°: 15 y la otra es la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen MATP, caracterizado por SEQ ID N°: 16, que da lugar a un cambio en la secuencia aminoacídica, localizado en p.Asp153Asn en la proteína MATP, caracterizada por SEQ ID N°: 19, es decir, da lugar a la sustitución del aminoácido polar ácido aspártico por el aminoácido polar neutral asparagina.

Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar un individuo de la especie equina con capa perlino o isabelo (C^{pl}) o portador del alelo causante de las capas perlino e isabelo, tanto si muestra como si no muestra dichos fenotipos, el cual comprende detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP del individuo. El método, además, puede incluir la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4, especialmente la mutación c.48T>C en el intrón 1, caracterizado por SEQ ID N°: 15, y la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen MATP, caracterizado por SEQ ID N°: 16. Otras mutaciones puntuales en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4 pueden ser las descritas anteriormente, como la mutación A>C que da lugar al cambio p.His11Pro, la mutación T>A localizada en p.Ile249Ile, o la mutación A>C que da lugar al cambio Lys291Thr, y que se han reflejado en SEQ ID N°: 19 y señalado con texto libre en dicha secuencia.

Este método de detección se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica del individuo, macho o hembra, de la especie equina y, especialmente, del grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.

Por otro lado, las muestras biológicas pueden proceder de cualquier tipo de tejido o células, por ejemplo: sangre, folículos pilosos, frotis bucal.

- La detección de la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* se puede realizar mediante cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica. Entre ellas, se pueden citar: la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmc) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*), la técnica del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP, *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism*), la secuenciación directa, la pirosecuenciación, la reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), la técnica de *high resolution melting* (HRM), el ensayo de discriminación alélica por TaqMan, la hibridación en microarray, o la extensión del cebador o *primer extension* (PE).
- Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ADN aislada que comprende la secuencia nucleotídica caracterizada por SE ID N°: 17. La invención también se refiere a una molécula polipeptídica que comprende la secuencia aminoacídica caracterizada por SEQ ID N°: 18.
- La identificación de los animales portadores del alelo causante de las capas perlino e isabelo (C^{prl}) se puede utilizar para seleccionar patrones de coloración de la capa en caballo de acuerdo con las demandas del mercado, preferencias personales o los requisitos para la inclusión en el Libro Genealógico de las distintas razas equinas, así como para verificar la segregación de este alelo en pedigríes particulares, proporcionando información acerca del posible cruce entre razas portadoras de dicho alelo y razas en las que está ausente, o sirviendo para la verificación del parentesco entre algunos individuos (por ejemplo, padres $C^{prl}C^{prl}$ no pueden tener un descendiente portador del alelo C^{prl}).
- Otro aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a un método *in vitro* para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina que incluye detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP*, caracterizado por SEQ ID N°: 17, y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP de dos o más individuos. Este método, además, puede incluir la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4, especialmente la mutación c.48T>C en el intrón 1, caracterizado por SEQ ID N°:15 y la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen *MATP*, caracterizado por SEQ ID N°: 16. Otras mutaciones puntuales en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4 pueden ser las descritas anteriormente, como la mutación A>C que da lugar al cambio p.His11Pro, la mutación T>A localizada en p.Ile249Ile, o la mutación A>C que da lugar al cambio Lys291Thr, cambios que se han reflejado en SEQ ID N°: 19 y señalado con texto libre en dicha secuencia.
- El método de verificación del parentesco se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica de los individuos, machos o hembras, de la especie equina y, especialmente, del grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.
- Por otro lado, las muestras biológicas pueden proceder de cualquier tipo de tejido o células, por ejemplo: sangre, folículos pilosos, frotis bucal.

La detección de la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* se puede realizar mediante cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica. Entre ellas, se pueden citar: PCR-SSCP, PCR-RFLP, secuenciación directa, pirosecuenciación, reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), HRM, ensayo de discriminación alélica por TaqMan, hibridación en microarray, o extensión del cebador o *primer extension* (PE).

También es importante resaltar que la mutación que define el alelo de la capa *pearl* (C^{prl}) es un cambio de una G por una A, y es prácticamente nula la probabilidad de que se haya producido por azar en dos individuos de la misma raza. Está descrito que la probabilidad de que una mutación ocurra por gen, generación y base es entre 10^{-7} y 10^{-9} , por lo tanto, la probabilidad de que haya habido un cambio de una G por una A en esa misma posición del gen es muy baja, y que haya ocurrido en dos animales diferentes es prácticamente imposible.

El desequilibrio de ligamiento es la propiedad de algunos genes de no segregarse de forma independiente, es decir, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50% esperado entre dos *loci* no sinténicos. La tendencia que tienen dos genes situados en el mismo cromosoma a segregarse juntos se incrementa cuando los dos *loci* están muy próximos entre sí, ya que disminuye la probabilidad de recombinación. De esta forma, la probabilidad de heredar en bloque los alelos provenientes de los gametos paterno y materno aumenta. Como resultado medible hay un desequilibrio en las frecuencias alélicas respecto a lo esperado por la ley de Hardy-Weinberg. De esta manera, un alelo selectivamente neutro puede transmitirse de generación en generación debido a que está ligado a un alelo que presenta una ventaja selectiva.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un dibujo en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1.- Muestra el gel de acrilamida resultado de la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmc) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*) que permite la identificación de los individuos portadores del alelo *pearl* (C^{prl}), como se muestra en el Ejemplo 2.

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Detección del alelo C^{prl} .

Se analizó la secuencia nucleotídica del gen *membrane-associated transponer protein* (*MATP*). Para ello, se utilizó ADN genómico aislado a partir de muestras de sangre de caballo estabilizadas en el conservante *Magic Buffer* (ES225130782), y se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de los siete exones del gen *MATP* utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia públicamente disponible en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la

herramienta primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Los cebadores utilizados fueron: exón 1 directo 5'-ATCATCTCTGTTGGCTGCT-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 1), exón 1 inverso 5'-TTCGCACTCTCCTICTATGG-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 2), exón 2 directo 5'-CTTTGATTGCTGACCGAAGG-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 3), exón 2 inverso 5'-CCCTACCTGTGAAGAGAGC-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 4), exón 3 directo 5'-TGATGAAAGGGAGAGAGTCC-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 5), exón 3 inverso 5'-AAGAAGAAAGGGTAAGAACAAGAA-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 6), exón 4 directo 5'-GTAACATGGCTGTGTGCTCT-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 7), exón 4 inverso 5'-CTTGACAGGTGCTGAATGAG-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 8), exón 5 directo 5'-CAACAACCCCAAATCTCTCT-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 9), exón 5 inverso 5'-TCCAACACTTCACCATCTTG-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 10), exón 6 directo 5'-CACAGATAGGGAAGTTCTTTTG-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 11), exón 6 inverso 5'-CAGATGTTACCCAGCACAGA-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 12), exón 7 directo 5'-TCAAATGCTGTICCTGTGTT-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 13), exón 7 inverso 5'-TACCGCCCCTAAATCATAA-3' (caracterizado por SEQ ID N°: 14).

Las muestras utilizadas incluyeron un total de 16 caballos P.R.E.: 4 caballos con fenotipos compatibles con los genotipos $C^{Cr}C^{Cr}$ o $C^{Pr}C^{Pr}$ pero que no eran portadores del alelo C^{Cr} ; 6 muestras de caballos con capa cremella o perla pero que no eran portadores de dos copias del alelo ce' ; 5 muestras de caballos que no mostraron un fenotipo diluido como controles. Todas las muestras incluidas en el estudio fueron genotipadas para la mutación crema (Tabla 1). Las secuencias del gen *MATP* fueron analizadas utilizando el software *Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems)* y alineadas con el genoma equino EquCab2 como secuencia de referencia.

Tabla 1. Fenotipos y genotipos de las muestras de Pura Raza Española (P.R.E.) incluidas en el estudio de detección de la mutación causal de las capas perlino e isabelo (C^{Pr}) del Ejemplo 1.

ID	Fenotipo	<i>MC1R</i> ¹ c.901C>T (castaño/ alazán)	<i>ASIP</i> ² 11del (negro)	<i>STX17</i> ³ duplicación intrón 6 (gris)	<i>MATP</i> ⁴ c.457G>A (crema)	<i>MATP</i> c.100G>A (pearl)
1	perla	E ^E E ^E	A ^A A ^A	-	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
2	isabelo	E ^E E ^E	A ^A A ^a	-	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
3	isabelo	E ^E E ^e	A ^a A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
4	isabelo	E ^E E ^E	A ^A A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
5	perlino	E ^e E ^e	A ^A A ^A	-	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
6	tordo* perlino	E ^E E ^E	A ^A A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
7	perlino	E ^E E ^E	A ^A A ^A	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
8	tordo* perlino	E ^E E ^E	A ^A A ^A	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
9	perlino	E ^E E ^E	A ^A A ^A	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
10	tordo* perlino	E ^E E ^E	A ^A A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
11	negro	E ^E E ^E	A ^a A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
12	Alazán	E ^e E ^e	A ^A A ^a	-	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
13	Alazán	E ^e E ^e	A ^A A ^a	-	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
14	Castaño	E ^E E ^E	A ^A A ^A	-	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
15	Castaño	E ^E E ^E	A ^A A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}
16	Alazán	E ^e E ^e	A ^A A ^a	G ^g G ^g	C ^{Cr} C ^{Cr}	C ^{Pr} C ^{Pr}

*Encanecimiento progresivo con la edad

¹Gen *melanocortin 1 receptor*. Alelos: E^E (alelo salvaje); E^a (alelo alazan)

²Gen *agouti signaling protein*. Alelos: A^A (alelo salvaje); A^a (alelo negro)

³Gen *synfaxin* 17. Alelos: G^s (alelo salvaje); G^G (alelo tordo)

⁴Gen *membrane-associated transporter protein*. Alelos: C^{Cr} (alelo salvaje); C^{Cr} (alelo crema); C^{Prl} (alelo salvaje); C^{Prl} (alelo *pearl*)

Se localizaron tres nuevos polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphism, SNP) en el gen MATP: i) c.48T>C en el intrón 1 ii) c.266C>T en el exón 3; y ii) c.100G>A en el exón 4. El SNP en el exón 3 es sinónimo, mientras el SNP en el exón 4 causa la sustitución del aminoácido hidrofóbico Alanina por el aminoácido polar Treonina en la posición 329 de la proteína (p.Ala329Thr), localizada en la hélice 7 transmembrana (TM). La variante mutada probablemente afecta la especificidad del sustrato y/o la actividad de transporte de la proteína MATP (Ward R.J. & Milligan G. (2002) Reciprocal mutations of highly conserved residues in transmembrane helices 2 and 7 of the alpha(2A)-adrenoceptor restore agonist activation of G(i1)alpha. *Cellular Signalling* 14, 139-44; Haimeur A., Conseil G., Deeley R.G. & Cole S.P. (2004) Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Molecular Pharmacology* 65, 1375-85). El reemplazo producido por la mutación p.Asp153Asn en el exón 3 del gen MATP (alelo C^{Cr}), da lugar a la sustitución del aminoácido polar ácido aspártico por el aminoácido polar neutral asparagina en la hélice 4 TM. Teniendo en cuenta el modo de herencia codominante comparado con el modo de herencia recesivo y el fenotipo diluido más extremo causado por el alelo C^{Cr} cuando se compara con el alelo C^{Prl}, la mutación causal del crema debe tener un efecto más severo en la funcionalidad de esta proteína de transporte implicada en la síntesis de melanina. La combinación de los alelos C^{Cr} y C^{Prl} puede causar también una disrupción severa del producto génico, lo que lleva a la manifestación de una capa muy similar a la producida por el homocigoto C^{Cr}C^{Cr}.

El SNP c.100G>A en el exón 4 del gen MATP segrega de forma perfecta con los fenotipos perlino e isabelo (Tabla 1). Entre las muestras analizadas, uno de los caballos que exhibía una capa negra resultó ser portador de un alelo C^{Prl}. Este nuevo alelo puede explicar también la capa palomino muy claro de uno de los caballos portadores de una sola copia del alelo C^{Cr} del artículo de Mariat *et al.* (Mariat, D., Taourit, S. & Guerin, G. (2003) A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection and Evolution* 35, 119-33).

Por lo tanto, la mutación c.100G>A (p.Ala329Thr) en el exón 4 del gen MATP, caracterizada por SEQ ID N°: 17, es la mutación causal de las coloraciones de capa perlino e isabelo y de los fenotipos parecidos al cremello, perla y crema cenizo asociados con el genotipo doble heterocigoto C^{Cr} y C^{Prl}. Este patrón de capa puede ser difícil de diferenciar de los efectos de los alelos crema C^{Cr} y champán CH^{CH}, y puede también ser enmascarado por el locus gris (G), cuyo alelo G^G dominante produce un encanecimiento progresivo con la edad independientemente de la base de color que tenga el animal. Por lo tanto, la caracterización de la mutación *pearl* permite a los criadores identificar a los portadores del alelo C^{Prl} y seleccionar este color de capa específico de acuerdo con las demandas del mercado, las preferencias personales o los requerimientos del libro Genealógico de la raza, así como verificar su segregación dentro de pedigrís particulares.

La aplicación comercial de esta técnica se puede llevar a cabo en cualquier laboratorio con equipos de biología molecular y con personal técnico formado en este tipo de técnicas. La detección del alelo *pearl* (C^{Prl}) se puede llevar a cabo en cualquier raza equina, pero esta especialmente indicado en las razas ibéricas P.R.E. y Lusitano, y en razas de origen ibérico como el Quarter Horse o Paint. El objetivo de su aplicación es

permitir a los criadores interesados identificar a los portadores del alelo C^{prl} y seleccionar este color de capa específico de acuerdo a las demandas del mercado, las preferencias personales o los requerimientos del Libro Genealógico de la raza, así como verificar su segregación dentro de pedigrís particulares.

5

Ejemplo 2. Detección de animales portadores del alelo causante de las capas perlino e isabelo (C^{prl}).

La detección del alelo causante de las capas perlino e isabelo (C^{prl}) puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los procedimientos comúnmente conocidos y utilizados de biología molecular; se incluye un ejemplo de realización, sin estar limitado a éste los métodos diagnósticos que se pueden emplear en la detección del alelo *pearl*.

Se utilizó la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmc) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*). El cambio de un único nucleótido en una secuencia no se puede distinguir en una electroforesis normal porque las propiedades físicas de las dos hebras son casi idénticas para ambos alelos. Sin embargo, la técnica de PCR-SSCP permite detectar ese cambio al basarse en la relación entre la movilidad electroforética de una hebra de ADNmc y su conformación, que es un reflejo de su secuencia nucleotídica (Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989a) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 2776-2770). En esta técnica, el ADN bicatenario (ADNbc) se desnatura para obtener las dos hebras de ADNmc que, a continuación, se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturizantes. Cada hebra de ADNmc asume una configuración tridimensional única basada en su secuencia de ADN (conformero), de manera que cualquier diferencia en la secuencia da lugar a un cambio en la movilidad de las moléculas de ADNmc, con lo que migran de forma diferente al someterlas a electroforesis a pesar de que el número de nucleótidos sea el mismo.

Se extrajo el ADN de muestras de sangre aisladas utilizando un método estándar fenol-cloroformo (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York). La cuantificación de la concentración y calidad del ADN obtenido se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio 1% en buffer TBE1X (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH = 8). Para determinar la concentración se comparó visualmente la intensidad de la banda de ADN problema con bandas de patrones de concentración conocida, en este caso con el patrón de concentración de ADN HyperLadder II (Bioline). La concentración final de las muestras de ADN se llevó a 5-10 ng/μl para ser utilizadas en la PCR.

Las reacciones PCR se prepararon con 0,75 mM $MgCl_2$, 0,25 U de Taq Polimerasa (Biotools), 0,3 mM dNTPs, 0,5 μM de cada cebador y 10 ng de ADN en un volumen final de 10 μl. Las reacciones de amplificación comenzaron a 94°C durante 4 minutos, seguidos de 30 ciclos compuestos por 50 segundos a 94°C, 50 segundos a 57°C y 40 segundos a 72°C, y finalizaron con una extensión a 72°C durante 10 minutos.

A cada uno de los productos amplificados se le añadieron 10 μl de tampón de carga (EDTA 5,5 mM, xilen-cianol 0,05%, azul de bromofenol 0,005%, pH = 8) y se

desnaturalizaron a 96°C durante 5 minutos. Posteriormente, se enfriaron colocándolos en hielo durante otros 5 minutos y se sometieron a electroforesis en geles al 12% de acrilamida-bisacrilamida 29:1, TBE 0,5X, persulfato amónico 0,5% y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina) 0,05%, de acuerdo con la técnica descrita por Barroso y col (1999) (Barroso A, Dunner S, Cañón J. (1999) Technical note: Use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine beta-casein variants A1, A2, A3, and B. *Journal of Animal Science* 77, 2629-2632). El tampón de electroforesis es TBE 1X y los productos PCR se sometieron a electroforesis a 300 V durante 5 horas, manteniendo una temperatura constante de 15°C a lo largo de todo el proceso.

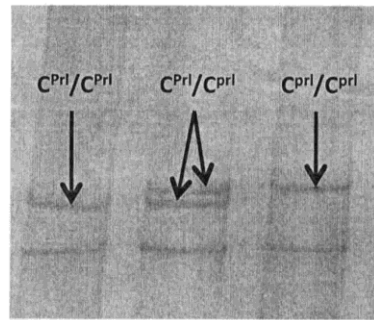
Finalmente, los geles se tiñeron con nitrato de plata siguiendo el procedimiento modificado por Barroso y col. (1999). Los patrones de bandas de ADN obtenidos se analizaron visualmente. En la Figura 1 se puede ver un gel de acrilamida en el que se visualiza el patrón electroforético característico del alelo salvaje (C^{PrI}) y el alelo mutado *pearl* (C^{PrI}).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo, que comprende detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen MATP y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP del individuo.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 en el que la secuencia del exón 4 mutado del gen MATP está **caracterizada** por SEQ ID N°: 17 y la secuencia de la proteína MATP esta **caracterizada** por SEQ ID N°: 19.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4.
- 20 4. Método según la reivindicación 3 que incluye la detección de la mutación c.48T>C en el intrón 1 y/o de la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen MATP.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el individuo de la especie equina es macho o hembra y pertenece al grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica de un individuo de la especie equina.
- 35 7. Método según la reivindicación 6 en el que la muestra biológica es de sangre, folículos pilosos, frotis bucal, o cualquier tejido que contenga ADN viable.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la mutación c.100G>A del exón 4 del gen MATP se detecta mediante la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmc) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, PCR *Single Strand Conformational Polymorphism*), la técnica del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP, *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism*), la secuenciación directa, la pirosecuenciación, la reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), la técnica de *high resolution melting* (HRM), el ensayo de discriminación alélica por TaqMan, la hibridación en microarray, la extensión del cebador o *primer extension* (PE), o cualquier otra técnica.
- 45 9. Método *in vitro* para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina que incluye detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen MATP y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP de dos o mas individuos.
10. Método según la reivindicación 9 en el que la secuencia del exón 4 del gen MATP mutado está **caracterizada** por SEQ ID N°: 17 y la secuencia de la proteína MATP mutada está **caracterizada** por SEQ ID N°: 19.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 que incluye la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4.
- 5 12. Método según la reivindicación 11 que incluye la detección de la mutación c.48T>C en el intrón 1 y/o de la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen *MATP*.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-12 en el que cada individuo de la especie equina es macho o hembra y pertenece al grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza
10 que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13 que se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica de un individuo
15 de la especie equina.
15. Método según la reivindicación 14 en el que la muestra biológica es de sangre, folículos pilosos, frotis bucal, o cualquier tejido que contenga ADN viable.
- 20 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-15 en el que la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* se detecta mediante la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmc) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*), la técnica del análisis de los polimorfismos en la longitud
25 de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP, *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism*), la secuenciación directa, la pirosecuenciación, la reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), la técnica de *high resolution melting* (HRM), el ensayo de discriminación alélica por TaqMan, la hibridación en microarray, la extensión del cebador o *primer extension* (PE), o cualquier otra técnica.
- 30 17. Molécula de ADN aislado que comprende la secuencia nucleotídica **caracterizada** por SEQ ID N°: 17.
- 35 18. Molécula polipeptídica que comprende la secuencia aminoacídica **caracterizada** por SEQ ID N°: 18.

Figura 1



Listado de Secuencias

```

<110> universidad Complutense de Madrid
<120> Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la
causa genética responsable de las capas perlino e isabelo
<160> 19
<170> BISSAP 1.0
<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Equus caballus
<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"
<400> 1
atcatctctg ttggctgct
19

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus
<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"
<400> 2
ttcgactct ccttctatgg
20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus
<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"
<400> 3
ctttgattgc tgaccgaagg
20

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Equus caballus
<220>
<221> source
<222> 1..19
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"
<400> 4
ccctacctgt gaagagagc
19

```

```

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 5
tgatgaaagg gagagagtcc                                     20

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 6
aagaagaaag ggtaagaaca agaa                               24

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 7
gtaacatggc tgtgtgctct                                     20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 8
cttgacaggt gctgaatgag                                     20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source

```

```

<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 9
caacaacccc aaatctctct
20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 10
tccaacactt caccatcttg
20

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 11
cacagatagg gaagttcttt tg
22

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 12
cagatgttac ccagcacaga
20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

<400> 13
tcaaattgctg ttctgtgtt
20

<210> 14

```

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> source
 <222> 1..20
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Equus caballus"

<400> 14
 taccgccctt aaaatcataa

20

<210> 15
 <211> 1852
 <212> DNA
 <213> Equus caballus

<220>
 <221> source
 <222> 1..1852
 <223> /mol_type="DNA"
 /organism="Equus caballus"

<220>
 <221> intron
 <222> 1..1852

<400> 15
 gtcagtggac tgcattgaggt gggcagggcg ggaaaaaggt cccatcacgt aactccatag 60
 aaggagagtg cgaatttctt tatgtgactt tgaacttggg ttgaacagat tctctctcct 120
 aggttacaat gaacttcagc tttggaatga ctcaaattct gagactgggg agcctttact 180
 tttagaaca tcagcatgca ttgctttttt attctgagga ttttaagata ggatgaaatt 240
 tttatctctt ttatcaaatt aaatatTTTT acctatttat caattgtggg gttttttgag 300
 ctcatattgc tttctttatt cagtactttg tcaaattaac cagctgccaa atggctccat 360
 aaatatTTT acataaattac ctgtgtgtct aaatcagagt taattctgtt gataggTTT 420
 tgtagagcct tttaatgggt taggcatcaa tgggggtgtc aacctgtcat ctcaagggga 480
 catttttgca ttgcaaattc tgggcaaaaa caaacctgat agtgagcact ttttctagtc 540
 attaatcagc caccaattaa ttggtaatag gtggtagtag ataaaaagtt acatcaaaaa 600
 agggattgtt aaacttaaaa atagcacaca tttttagatc attagctctc aggctagcag 660
 aatggatgat aatgaggcag gataatcagt tatcatttgt atatattgaa aagagggcat 720
 taatacataa atgtaggcta tttctggaag aattcacaaa aaacctgata agaatagtgg 780
 cttctaggaa ggggtactaa aagactggaa gtgaaaaatg gagagtaggc ttatttttca 840
 cttattttta tactataatc ttaaaacatg tgcacatatt acgctttatt cttaagtga 900
 actgaaagca agggaaaact ttttttctc caataggaga ttgggtgaat gagttgtggc 960
 acatccatag aatgagaatt atttgTaaa attgtgaagt cgttcttcct taattggaac 1020
 gcaaagaaat gaagagagtt gggtataaat gagcagggac aacatgatcc cactatcagt 1080
 gtgcctcaa gcgtggctct ctgacctgca gcactggcgt cactgggagc tgttagagat 1140
 gcaaatcccc aggtccact tcagacctag tgaggaatca cgggagaatc ttggagaatc 1200

ES 2 566 982 A1

```

ataggagacg gagcccaaca gtctgtttta acaaatcgtg caagtgatgg ttaagcatgc      1260
taaagtttgc gaagcactgc attggggcgc aaaaatccac ccctatctgg atatgtgcag      1320
gtgcgtgaag ggatgtctga aggatgacca tctctggggc tgggacttga agcatttccc      1380
tcagcttttc tgcttcgttg gaatggtttc caataagcat gcataagttt ttaagtggct      1440
ttttaaaaaa gagagagatg attcacatac cataaaaatc accatttaaa actcagtgcct      1500
ttttagttta ttctcaaggt tgggtcaacca tcaccgctat ctaattccac gacattttca      1560
tcacaccaaa aagaaacca gtgactgtga gtagtcactc ctcacttcct cctcgcgcca      1620
gccctaggta accgctcaat caactttctg tctctctaga tttgcctttt ctggacattc      1680
acaggcgtaa tttttaaaac ctgaaaatat aatgaagcta tttttatttg gaaaaacaaa      1740
gcaaaatgaa agcaaagggg gagagcttga tgacaggaag ttttggtgga aataaaaaac      1800
gtgggtcatt ctaaaccagg attgatgtga ggtatgttta tttctgtttt ag              1852

```

```

<210> 16
<211> 323
<212> DNA
<213> Equus caballus

<220>
<221> source
<222> 1..323
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

```

```

<220>
<221> exon
<222> 1..323

```

```

<400> 16
gtctcggagg tgccctgggc tacatttttg gcgccattga ctgggcgcat ctgaaactgg      60
gaagaatgct gggcacagaa ttccagggtca tgttcttctt ctccgccttg atgcttactt      120
tgtgtgttgt tattcatctg tgcagtattc ctgaagcccc acttagagat gttgcaaagg      180
atatwcccc ccagcaagac tccaagacc ctctcttgtc atcagacaga atgtatgagt      240
atgggtctat cgagaaagtt aaaaatggtt atataaacc agagatgggtg ctgcaggagg      300
agaaaacaam aaatacccaa cag              323

```

```

<210> 17
<211> 144
<212> DNA
<213> Equus caballus

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..144
<223> /mol_type="DNA"
      /organism="Equus caballus"

```

```

<220>
<221> CDS
<222> 1..144
<223> /transl_table=1
      /translation="TRRTMTMKSLLRALVSMPPHYRYLCISHLLGWTTFLSNMLFFDFMGQ"

```

<220>
<221> exon
<222> 1..144

<400> 17
actcggagga caatgaccat gaagtcactg ctgagggcac tggtgagtat gcctccccac 60
taccgctacc ttctgatcag ccacctcctt ggatggacca ccttcctgtc caacatgctc 120
ttcttcacag atttcatggg ccag 144

<210> 18
<211> 48
<212> PRT
<213> Equus caballus

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..48
<223> /mol_type="protein"
/note="[CDS]:1..144 from SEQ ID NO 17"
/organism="Equus caballus"

<400> 18
Thr Arg Arg Thr Met Thr Met Lys Ser Leu Leu Arg Ala Leu Val Ser
1 5 10 15
Met Pro Pro His Tyr Arg Tyr Leu Cys Ile Ser His Leu Leu Gly Trp
20 25 30
Thr Thr Phe Leu Ser Asn Met Leu Phe Phe Thr Asp Phe Met Gly Gln
35 40 45

<210> 19
<211> 530
<212> PRT
<213> Equus caballus

<220>
<221> SOURCE
<222> 1..530
<223> /mol_type="protein"
/organism="Equus caballus"

<220>
<221> VARIANT
<222> 291
<223> /
Lys291Thr due to A>C SNP

<220>
<221> VARIANT
<222> 11
<223> His11Pro due to A>C SNP

<400> 19
Met Gly Gly Asn Ser Gly Gln Pro Gly Val Pro Thr Tyr Lys Ser Leu
1 5 10 15
Ala Glu Asp Gly Pro Phe Gly Ser Val Glu Leu Pro Lys Arg Ser Thr
20 25 30
Gly Arg Leu Val Met His Ser Met Ala Met Phe Gly Arg Glu Phe Cys
35 40 45
Tyr Ala Val Glu Ala Ala Tyr Val Thr Pro Val Leu Leu Ser Val Gly
50 55 60
Leu Pro Lys Arg Leu Tyr Ser Val Val Trp Leu Leu Ser Pro Val Leu
65 70 75 80
Gly Phe Leu Leu Gln Pro Val Val Gly Ser Ala Ser Asp His Cys Arg
85 90 95
Ala Arg Trp Gly Arg Arg Arg Pro Tyr Ile Leu Ala Leu Ser Val Ile

ES 2 566 982 A1

Met	Leu	Leu	Gly	Met	Ala	Leu	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala	Val	Ile	Ser
		115					120		105			125			
Ala	Leu	Ile	Ala	Asp	Arg	Arg	Lys	Lys	Leu	Thr	Trp	Ala	Ile	Thr	Ile
	130					135					140				
Thr	Met	Ile	Gly	Val	Val	Leu	Phe	Asp	Phe	Ala	Ala	Asp	Phe	Ile	Asp
145					150					155					160
Gly	Pro	Ile	Lys	Ala	Tyr	Leu	Phe	Asp	Val	Cys	Ser	His	Gln	Asp	Lys
				165					170					175	
Glu	Arg	Gly	Leu	His	His	His	Ala	Leu	Phe	Thr	Gly	Leu	Gly	Gly	Ala
			180					185						190	
Leu	Gly	Tyr	Ile	Leu	Gly	Ala	Ile	Asp	Trp	Ala	His	Leu	Lys	Leu	Gly
		195					200					205			
Arg	Met	Leu	Gly	Thr	Glu	Phe	Gln	Val	Met	Phe	Phe	Phe	Ser	Ala	Leu
	210					215					220				
Met	Leu	Thr	Leu	Cys	Val	Val	Ile	His	Leu	Cys	Ser	Ile	Pro	Glu	Ala
225					230					235					240
Pro	Leu	Arg	Asp	Val	Ala	Lys	Asp	Ile	Pro	Pro	Gln	Gln	Asp	Ser	Gln
				245					250					255	
Asp	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Asp	Arg	Met	Tyr	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ile	Glu
			260					265					270		
Lys	Val	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Glu	Met	Val	Leu	Gln	Gly	Glu
		275					280					285			
Lys	Thr	Thr	Asn	Thr	Gln	Gln	Thr	Arg	Arg	Thr	Met	Thr	Met	Lys	Ser
		290				295					300				
Leu	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Ser	Met	Pro	Pro	His	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Cys
305					310					315					320
Ile	Ser	His	Leu	Leu	Gly	Trp	Thr	Ala	Phe	Leu	Ser	Asn	Met	Leu	Phe
				325					330					335	
Phe	Thr	Asp	Phe	Met	Gly	Gln	Ile	Val	Tyr	His	Gly	Asp	Pro	Tyr	Ser
			340					345					350		
Ala	His	Asn	Ser	Thr	Glu	Phe	Leu	Ile	Tyr	Gln	Arg	Gly	Val	Glu	Val
		355					360					365			
Gly	Cys	Trp	Gly	Leu	Cys	Ile	Asn	Ser	Val	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ser
		370				375					380				
Tyr	Phe	Gln	Lys	Val	Leu	Val	Ser	Tyr	Val	Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Tyr
385					390					395					400
Phe	Met	Gly	Tyr	Leu	Leu	Phe	Gly	Leu	Gly	Thr	Gly	Phe	Ile	Gly	Leu
				405					410					415	
Phe	Pro	Asn	Ile	Tyr	Ser	Thr	Leu	Val	Leu	Cys	Thr	Ser	Phe	Gly	Val
			420					425					430		
Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Tyr	Thr	Val	Pro	Phe	Asn	Leu	Ile	Ala	Glu	Tyr
		435					440					445			
His	Arg	Glu	Glu	Gln	Glu	Lys	Gln	Arg	Arg	Gln	Ala	Gln	Gly	Gly	Asp
		450				455					460				
Val	Asp	Ser</													



②① N.º solicitud: 201500899

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Equus caballus solute carrier family 45 member 2 (SLC45A2) gene, exon 4 and partial cds", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): EU272794.1	1-18
X	Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Solute carrier family 45 member 2, partial [Equus caballus]", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): ABZ81812.1	1-18
Y	HIROTA, K. et al., 'Construction and validation of parentage testing for thoroughbred horses by 53 single nucleotide polymorphisms', JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE, 2010, Vol. 72, No. 6, Págs 719-726, ISSN: 0916-7250, Materiales y métodos; Resultados.	9-16
A	MARIAT, D. et al., 'A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse', GENETICS SELECTION EVOLUTION, 2003, Vol. 35, No. 1, Págs. 119-133, ISSN: 0999-193X, todo el documento.	1-8,17,18
A	KAKOI, H. et al., 'Development of a method for simultaneously genotyping multiple horse coat colour loci and genetic investigation of basic colour variation in Thoroughbred and Misaki horses in Japan', JOURNAL OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 2009, Vol. 126, No. 6, Págs 425-431, ISSN: 0931-2668, doi: 10.1111/j.1439-0388.2009.00841.x, todo el documento.	1-8,17,18
A	LOCKE, M.M. et al., 'The cream dilution gene, responsible for the palomino and buckskin coat colours, maps to horse chromosome 21', ANIMAL GENETICS, 2001, Vol. 32, No. 6, Págs 340-343, ISSN: 0268-9146, todo el documento.	1-8,17,18
A	PRUVOST, M. et al., 'From genes to phenotypes - evaluation of two methods for the SNP analysis in archaeological remains: pyrosequencing and competitive allele specific PCR (KASPar)', ANNALS OF ANATOMY, 2012, Vol. 194, No. 1, Págs 74-81, ISSN: 0940-9602 (print), ISSN: 1618-0402 (electronic), doi: 10.1016/j.aanat.2011.10.007, todo el documento.	1-8,17,18
A	TOZAKI, T. et al., 'Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci', JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE, 2001, Vol. 63, No. 11, Págs 1191-1197, ISSN: 0916-7250, todo el documento.	9-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
08.04.2016

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.04.2016

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 9-16
Reivindicaciones 1-8, 17, 18

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones
Reivindicaciones 9-16

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Equus caballus solute carrier family 45 member 2 (SLC45A2) gene, exon 4 and partial cds", Código de acceso (ID): EU272794.1	01.09.2008
D02	Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Solute carrier family 45 member 2, partial [Equus caballus]", Código de acceso (ID): ABZ81812.1	01.09.2008
D03	HIROTA, K. et al., <i>J. Vet. Med. Sci.</i> , (2010), 72(6): 719-26.	2010
D04	MARIAT, D. et al., <i>Genet. Sel. Evol.</i> , (2003), 35(1): 119-33.	2003
D05	KAKOI, H. et al., <i>J. Anim. Breed Genet.</i> , (2009), 126(6): 425-31.	2009
D06	LOCKE, M.M. et al., <i>Anim. Genet.</i> , (2001), 32(6): 340-3.	2001
D07	PRUVOST, M. et al., <i>Ann. Anat.</i> , (2012), 194(1): 74-81.	2012
D08	TOZAKI, T. et al., <i>J. Vet. Med. Sci.</i> , (2001), 63(11): 1191-7.	2001

En D01-D02, D04-D07 se describen mutaciones en el gen *MATP* (SLC45A2) de *Equus caballus*.

En D03 y D08 se describen marcadores genéticos empleados en pruebas de parentesco entre caballos pura sangre.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicaciones independientes 1, 17 y 18.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método *in vitro* para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlina o isabelino que comprende detectar la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* y/o el cambio de aminoácido Ala329Thr en la proteína MATP. Según la reivindicación 2, la secuencia del exón 4 mutado del gen *MATP* está caracterizada por SEQ ID No. 17. El objeto de las reivindicaciones 17 y 18 es en una molécula de ADN y una molécula polipeptídica que comprenden respectivamente la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 17 y la de aminoácidos SEQ ID NO: 18.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D02, se ha descrito y secuenciado una mutación en el exón 4 del gen *MATP* de *Equus caballus* asociada con el fenotipo de la capa de color perlino en la especie equina que es idéntica a la reivindicada en la solicitud de patente. En concreto, la mutación divulgada en D01-D02 consiste en la transición 100 G>A en la secuencia del exón 4 del gen *MATP* que se traduce en el cambio del aminoácido Ala329Thr en la proteína MATP. Además, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos divulgadas en D01-D02 son idénticas a las secuencias SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, reivindicadas en la solicitud.

Por consiguiente, se considera que el objeto de las reivindicaciones independientes 1, 17 y 18, y el de las dependientes 2-8 no es nuevo sobre la base de los documentos D01-D02.

1.1.2. La presente solicitud no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 1-8, 17 y 18, pues no es nuevo según el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2.1. Reivindicación independiente 9.

2.1.1. El objeto de la reivindicación 9 consiste en un método *in vitro* para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina que comprende detectar la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* y/o el cambio de aminoácido Ala329Thr en la proteína MATP.

El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 9 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos marcadores genéticos para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina.

En el estado de la técnica se ha descrito la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* (cf. D01-D02). Además, se han divulgado procedimientos para la determinación del parentesco entre caballos pura sangre basados en la detección de SPNs y/o microsatélites como marcadores genéticos (cf. D03 y D08).

Por consiguiente, se puede estimar que, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01-D02 y en D03 llegando como resultado a la solución propuesta en la reivindicación 9 o a una equivalente.

Por otro lado, se estima que la solución propuesta en la solicitud es una mera alternativa no inventiva a la planteada en el estado de la técnica, puesto que en la solicitud no se describe ningún efecto inesperado y/o sorprendente asociado al uso de la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* para la determinación del parentesco entre individuos de la especie equina frente al uso de las mutaciones descritas en D03 para el mismo fin.

Por todo ello, se considera que la reivindicación 9, y las reivindicaciones dependientes 10-16 no son inventivas sobre la base de los documentos D01-D02 y D03.

- 2.1.2. La presente invención no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 9-16, pues no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.