

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДВУХ VNTR-ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ СРЕДИ ПОПУЛЯЦИЙ ЮГА ЦЕНТРАЛЬНОЙ РОССИИ

В.Ю. Песик¹, Н.А. Рудых¹, М.И. Чурносов¹, Е.В. Балановская²

Белгородский государственный университет¹

ГУ Медико-генетический научный центр РАМН²

В последние годы все большее число исследователей в области популяционной генетики отдают предпочтение молекулярно-генетическим маркерам. Это связано с тем, что информационное содержание ДНК значительно выше белкового, кроме того техника исследований маркеров ДНК сводится практически к одному методу – полимеразной цепной реакции. Но самым важным преимуществом маркеров ДНК является наличие неограниченного числа генетических маркеров с полиморфизмом разного типа и значимости.

За последние 15-20 лет получены молекулярно-генетические характеристики для многих популяций мира по различным ДНК маркерам ядерного генома человека [3,4,5]. В результате этих исследований показано, что гипервариабельные локусы ДНК являются более информативными полиморфными маркерами. В качестве гипервариабельных ДНК-маркеров можно использовать VNTR-полиморфный участок гена фенилаланингидроксилазы (VNTR-PAH) и минисателлит гена аполипопротеина В (ApoB).

Ген фенилаланингидроксилазы (ФАГ) расположен на 12 хромосоме в области q22-q24.1. Минисателлитный регион расположен между двумя постоянными HindIII сайтами на 3 т.п.о. ниже тринадцатого экзона гена ФАГ. Этот регион содержит непостоянное число tandemных повторов с длиной одной копии 30 п.н. [6].

Ген аполипопротеина В расположен в коротком плече хромосомы 2 в регионе 2p23-p24. Гипервариабельный участок расположен вблизи 3'-конца на расстоянии 100 п.н. от сигнала полиаденилирования. В состав этого вариабельного участка входят богатые аденином и тиминном 14 и 16 членные tandemные повторы [7].

Цель настоящей работы – провести молекулярно-генетический анализ вариабельности аллелей VNTR-полиморфных участков генов фенилаланингидроксилазы и аполипопротеина В среди коренного русского населения юга Центральной России.

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 785 коренных русских жителей юга Центральной России. Из которых 433 человека из Яковлевского (140 человек), Прохоровского (146 человек) и Красненского районов (147 человек) Белгородской области, 108 человек из Пристенского (46 человек) и Черемисиновского районов (62 человека) Курской области, 127 человек из Ливенского района Орловской области и 117 человек из Репьевского района Воронежской области. ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [8]. Анализ локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК с использованием стандартных олигонуклеотидных праймеров. Условия амплификации и электрофореза для полиморфных локусов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Условия амплификации и электрофореза для исследованных локусов

локус	Условия амплификации	Условия электрофореза
VNTR-PAH [6]	Начальная денатурация 4 мин при 95°C. 29 циклов: 45 сек при 95°C; 45 сек при 55°C; 1 мин при 72°C. Элонгация 10 мин при 72°C [6].	Разделяли в 7%-ном полиакриламидном геле в течение 5-ти часов при 250V.
ApoB [2]	Начальная денатурация 10 мин при 95°C. 31 цикл: 1 мин при 95°C; 1 мин при 60°C; 2 мин при 72°C. Элонгация 10 мин при 72°C [2].	Разделяли в 6%-ном полиакриламидном геле в течение 7-ми часов при 200V.

По окончании электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,1мкг/мл) в течение 15 минут и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Размеры аллелей VNTR-PAH определяли относительно двух частых аллелей с длиной амплифицируемого фрагмента 380 п.н. и 530 п.н. (рис.1).

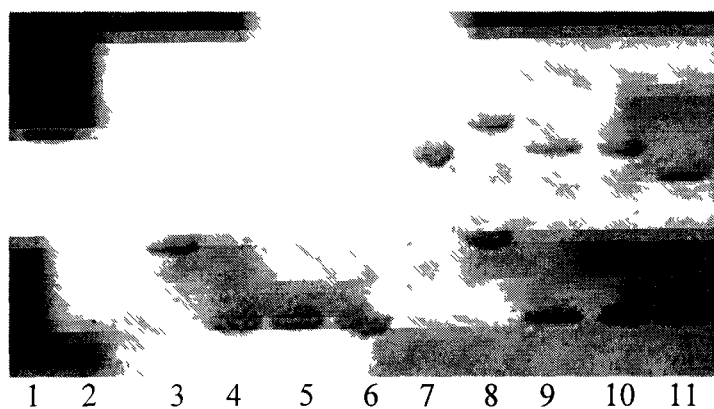


Рисунок 1. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации локуса VNTR-PAH. 1-560/650; 2-500/530; 3-440/530; 4-380/650; 5, 11-380/500; 6-380/380; 7-530/530; 8-440/560; 9, 10-380/530.

Размеры аллелей VNTR-ApoB определяли путем одновременного электрофореза с маркером молекулярной массы DNA LadderMix1000 («Fermentas»), содержащий фрагменты длиной 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1030 п.н. и т.д. (рис. 2). При анализе использовалась номенклатура аллелей VNTR-ApoB по Ludwig [5,7].

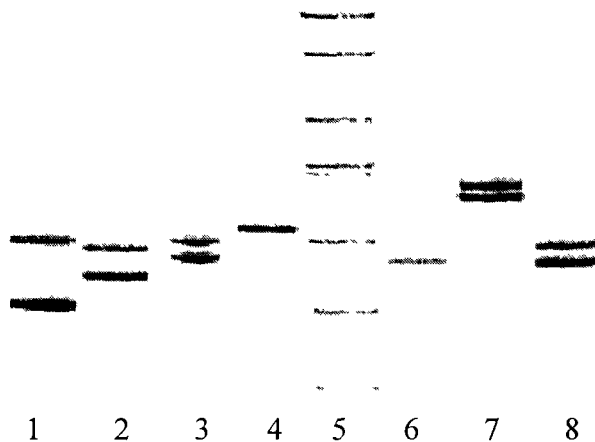


Рисунок 2. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации VNTR-ApoB. 1 – 30/36; 2 – 32/35; 3 – 34/36; 4 – 38/38; 5 – маркер молекулярной массы; 6 – 34/36; 7 – 46/48; 8 – 34/36.

Математическая обработка полученных результатов проводилась общепринятыми статистическими методами.

В таблице 2 представлены результаты распределения частот VNTR аллелей гена FAG у русских жителей Центрального Черноземья.

Таблица 2

Распределение частот VNTR аллелей гена FAG у русских жителей Центрального Черноземья

Популяции	N	VNTR-аллели, п.н.							
		710	650	560	530	500	470	440	380
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Белгородская область									
Красненский р-он	147	0	0.04	0.13	0.34	0.14	0.01	0.01	0.33
Прохоровский р-он	146	0	0.03	0.08	0.36	0.17	0	0	0.36
Яковлевский р-он	140	0	0.03	0.12	0.39	0.1	0	0	0.35
Курская область									
Черемисиновский р	62	0	0.01	0.08	0.37	0.15	0	0.02	0.37

Пристенский р-он	46	0	0.1	0.07	0.34	0.11	0	0	0.38
Воронежская область									
Репьевский р-он	117	0.01	0.03	0.14	0.28	0.14	0	0	0.4
Орловская область									
Ливенский р-он	127	0	0.06	0.11	0.36	0.12	0.01	0	0.34

В целом во всех изученных популяциях было обнаружено 8 различных аллелей данного полиморфного участка, 7 из которых были описаны ранее для народов Волго-Уральского региона [1]. Выявленные ПЦР-фрагменты включали аллели размером 380, 440, 470, 500, 530, 560, 650 и 710 п.н., что соответствует 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12 и 14 копиям повтора. Аллель 710 п.н. ранее в доступной нам литературе не описан и был выявлен впервые у одного индивидуума из Репьевского района Воронежской области. Частота аллеля в данной популяции составила 0.01. Во всех изученных популяциях с наиболее высокой частотой определялись аллель 380 (от 0.33 у русских Красненского района Белгородской области до 0.4 у русских Репьевского района Воронежской области) и аллель 530 (от 0.28 у русских Репьевского района Воронежской области до 0.39 у русских Яковлевского района Белгородской области). Реже всего во всех исследованных популяциях выявлялся аллель 650, частота которого варьировала от 0.01 в популяции Черемисиновского района Курской области до 0.1 в Пристенском районе Курской области. Аллель 440 был выявлен среди русских Красненского района Белгородской области (0.01) и Черемисиновского района Курской области (0.02). Аллель 470 был обнаружен среди жителей Красненского района Белгородской области и Ливенского района Орловской области с частотой 0.01. Распределение во всех исследованных популяциях соответствовало ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга.

Среди всех обследованных индивидов выявлено 23 аллельных варианта минисателлита AroV (от 660 до 1030 п.н.) с различной частотой встречаемости. С наибольшей частотой встречаются два аллельных варианта AroV34 и AroV36 (суммарно 60-80%), причем во всех исследованных популяциях самым частым оказался аллель AroV36 (от 0.32 в Пристенском районе Курской области до 0.42 в Яковлевском районе Белгородской области). Далее с частотой от 0.07 до 0.13 в каждой районной популяции встречаются чаще всего это аллели AroV30, AroV32, AroV38 и AroV40. Остальные аллели встречаются с частотой менее 0.05. Таким образом, распределение аллельных частот у исследованных русских популяций носит бимодальный характер (обнаруживаются 2 пика в области 34 и 36 аллеля), как и в популяциях Восточной Европы [3,4]. На рисунке 3 дано частотное распределение аллелей минисателлита AroV для исследованных популяций юга Центральной России.

Таким образом, результаты анализа полиморфизма гипервариабельных локусов AroV и VNTR-PAH свидетельствуют о высокой информативности данных локусов для популяционно-генетических исследований в силу их мультиаллельности и высокой гетерозиготности в популяциях.

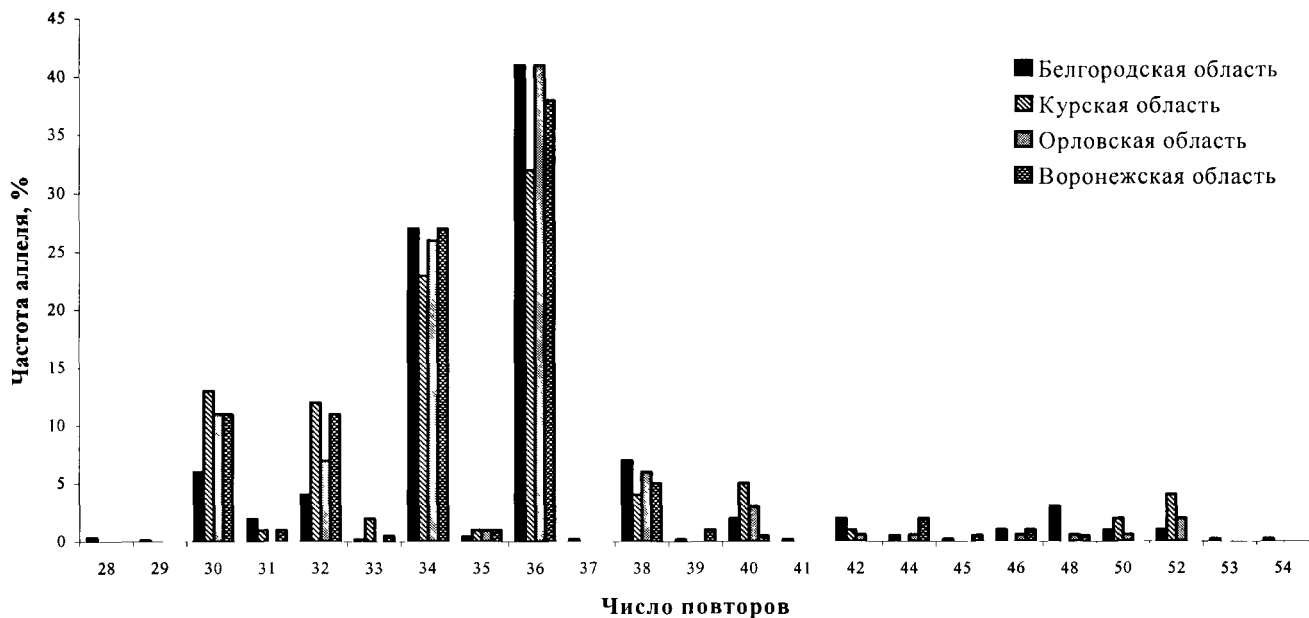


Рис. 3. Распределение аллельных частот минисателлита ApoB в популяциях русских юга Центральной России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахметова В.Л., Викторова Т.В., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетический анализ полиморфизма VNTR аллелей гена фенилаланингидроксилазы у народов Волго-Уральского региона//Генетика. – 2000. – т.36, №8. – С. 1161-1165.
2. Котлярова С.Э., Масленников А.Б., Коваленко С.П. Полиморфизм 3'-фланкирующей области гена аполипопротеина В в популяции Сибирского региона//Генетика. – 1994. – т.30, №5. – С. 709-712.
3. Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В. Этногеомика и геногеография народов Восточной Европы. М.: Наука, 2002. – 261с.
4. Лимборская С.А. Молекулярная генетика человека: исследования в области медицинской и этнической геномики//Молекулярная биология. – 2004. – т.38, №1. – С. 117-128.
5. Хуснутдинова Э.К. Молекулярная этногенетика народов Волго-Уральского региона. – Уфа., 1999, – 238с.
6. Goltsov A.A., Eisensmith R.S., Konecki D.S. et al. Association between mutations and VNTR in the human phenylalanine hydroxylase gene//Am. J. Hum. Genet. – 1992. – V.51, №3. – P. 627-636.
7. Ludwig E.N., Friedl W., McCarthy B.J. High resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene//Amer. J. Human Genet. – 1989. – V.45, №3. – P458-464.
8. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA//Methods in Molecular Biology/Ed. Walker J.M.N.Y.: Human Press. – 1984. – V.2. – P. 31-34.

ФОРМИРОВАНИЕ ГРУПП РИСКА В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ОБСТРУКТИВНОГО БРОНХИТА НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА СРЕДОВЫХ И ЭНДОГЕННЫХ ФАКТОРОВ

О.А. Кузьмина, Ю.И. Афанасьев

БелГУ, медицинский факультет, кафедра внутренних болезней № 1

Хронический бронхит (ХБ) является важнейшей проблемой современной пульмонологии. Распространенность ХБ в последние годы так велика, что это заболевание стало настоящим социально-экономическим злом большинства развитых стран мира, а высокие инвалидность и летальность от его осложнений выдвигают ХБ в число актуальнейших проблем клинической пульмонологии [11]. Социальная значимость и прогноз этой патологии определяется наличием синдрома бронхиальной обструкции, которому свойственна прогредиентность течения и нарастание дыхательной недостаточности.