

МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ
"ЗДРАВООХРАНЕНИЕ СИБИРИ"
УПРАВЛЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ТОМСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НИИ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

МЕДИЦИНСКАЯ ГЕНЕТИКА:
ПРОБЛЕМЫ ДИАГНОСТИКИ,
ПРОФИЛАКТИКИ
И ДИСПАНСЕРИЗАЦИИ БОЛЬНЫХ
С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

(материалы научно–практической конференции)

Томск 9–10 июня 1998 г.

Под редакцией
члена–корреспондента РАМН, профессора В. П. ПУЗЫРЕВА

Томск 1998

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА HUMPLA2A В ПОПУЛЯЦИИ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

О. Н. Одинокова, В. П. Пузырев, И. А. Ефремов, Д. А. Чистяков

НИИ медицинской генетики Томского научного центра СО РАМН, Томск
Государственный научный центр ГосНИИ генетика, Москва

Работа выполняется в рамках сравнительно-популяционного исследования в сибирском регионе аллельного полиморфизма отдельных локусов генома, связанных с формированием наследственной патологии и используемых для решения различных генетических задач. Задача исследования — изучение STR-полиморфного микросателлитного локуса гена HUMPLA2A (панкреатической фосфолипазы A2, хромосомная локализация 12q23-q24.1 [Polymeropoulos M.H. et al., 1990; Gispert S. Et al., 1993; Hammond H.A. et al., 1994; McKusick V. A., 1997]) у жителей западно-сибирской популяции. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) исследовали STR-варианты гена HUMPLA2A, содержащие повторяющийся элемент (AAT)_n, в выборке городского населения популяции Западной Сибири. Обнаружено 6 вариантов аллелей, содержащих от 10 до 16 AAT-повторов, размером от 118 п.н. до 136 п.н. Определены параметры информативности изученного полиморфизма локуса HUMPLA2A и проведен сравнительно-популяционный анализ частот выявленных генотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ДНК выделяли из крови с применением набора "WizardTM Genomic DNA Purification Kit" фирмы "Promega" (США). Методом ПЦР [Saiki R. K. et al., 1988] исследовали область гена HUMPLA2A, содержащую AAT-повторы [Hammond H. A. et al., 1994]. ПЦР проводили на программируемом амплификаторе

75

Таблица 1

Частоты аллелей для локуса HUMPLA2A
в западно-сибирской выборке и других популяционных группах

Настоящее исследование		Литературные данные (Hammond H. A. et al., 1994)					
Аллель (по кол-ву AAT-повторов)	Размер аллеля (п. н.)	Западная Сибирь		Частота аллелей по другим популяциям			
		Кол-во наблюдений	Частота аллеля	Европеоиды США	Латино- американцы	Монголоиды	Негры
10	118	1	0,005±0,004	0,019±0,007	0,011±0,005	—	0,005±0,004
11	121	84	0,378±0,033	0,462±0,026	0,362±0,025	0,295±0,037	0,106±0,016
12	124	37	0,167±0,025	0,130±0,017	0,073±0,014	0,032±0,014	0,132±0,018
13	127	18	0,081±0,018	0,019±0,007	0,092±0,015	0,179±0,031	0,128±0,017
14	130	32	0,144±0,024	0,132±0,018	0,132±0,018	0,218±0,039	0,242±0,022
15	133	31	0,140±0,023	0,146±0,018	0,238±0,022	0,128±0,027	0,221±0,021
16	136	19	0,086±0,019	0,091±0,015	0,089±0,015	0,147±0,028	0,157±0,019
17	139	0	—	—	0,003±0,003	—	0,008±0,004
Количество хромосом		222		370	366	126	376

“MiniCycler™” фирмы Research, Inc. (США). Смесь для амплификации (объемом 25 мкл) включала: по 0,02—0,1 мкг геномной ДНК, 12 пмоль каждого из локус-специфичных праймеров, 67 mM трис-НСl, рН 8,8 при 20°C, 16,6 mM сульфат аммония, 4 mM MgCl₂, 10 mM 2-меркаптоэтанол, по 0,2 mM каждого dNTP и 0,7 ед. DNA-Taq-полимеразы (ООО “СибЭнзим”, Новосибирск). ПЦР осуществляли в режиме: 94°C — 45 сек.; 60°C — 30 сек.; 70°C — 45 сек.; 32 цикла. Продукты амплификации анализировали в 12 % ПА-АГ длиной 20 см. На дорожку геля вносили 5—7 мкл реакционной смеси. Гели окрашивали бромистым этидием (0,5 мкг/мл). Для идентификации аллелей использовали соответствующие для данного локуса аллельные лэддеры и ДНК с известными генотипами. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли в ультрафиолетовом свете с применением системы компьютерной видеосъемки гелей на приборе “UV-VIS Imager II” (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследовании проанализирована случайная выборка из 111 неродственных жителей Западной Сибири европеоидной расы. Методом ПЦР нами обнаружено 6 вариантов аллелей гена HUMPLA2A, содержащих от 10 до 16 ААТ-повторов, размером от 118 п.н. до 136 п.н.: 118 п.н. (аллель 10), 121 п.н. (аллель 11), 124 п.н. (аллель 12), 127 п.н. (аллель 13), 130 п.н. (аллель 14), 133 п.н. (аллель 15), 136 п.н. (аллель 16). Спектр наблюдаемых аллелей и их относительные частоты приведены на рис.1 и в табл.1. Частоты аллелей проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга по критериям χ^2 и G-статистики с помощью компьютерной программы R x C (Rows x Columns) на основе описанного алгоритма [Roff D., A., Bentzen P., 1989]. Показано, что наблюдаемое в западно-сибирском регионе распределение частот генотипов значительно соответствовало равновесию Харди-Вайнберга: $\chi^2 = 11,1783$ $p = 0,9720$, Gстатистика = 13,5490 ($p = 0,9610$), что указывает на однородность исследованной выборки.

Количество хромосом 222 370 366 126 376

При самой высокой частоте аллеля 11 (121 п.н.) наиболее распространенными были аллели 12 (124 п.н.), 14 (130 п.н.) и 15 (133 п.н.). Следующими по частоте были аллели 16 (136 п.н.) и 13 (127 п.н.), последний из которых редко отмечается у американских европеоидов.

Рис. 1. Спектр STR-аллелей в локусе HUMPLA2A у населения Западной Сибири.

Определены параметры информативности изученного полиморфизма локуса HUMPLA2A и проведен сравнительно-популяционный анализ частот выявленных генотипов. Ожидаемую гете-

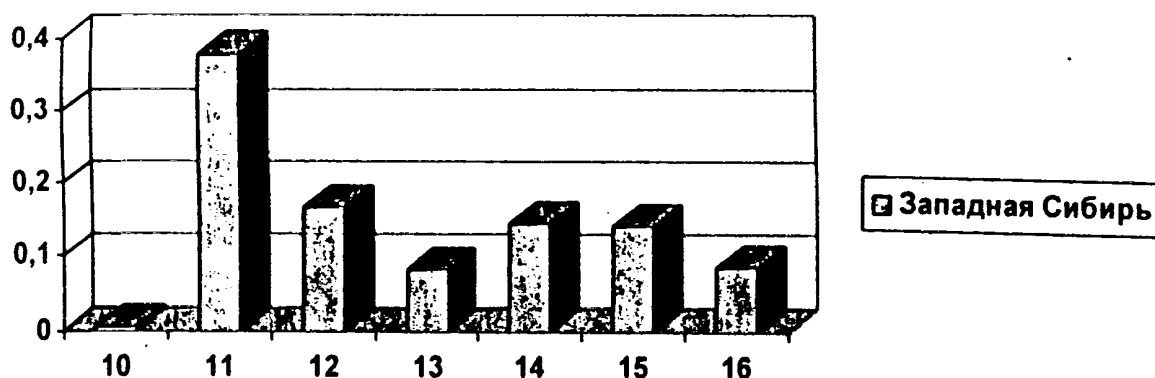


Рис. 1. Спектр STR-аллелей в локусе HUMPLA2A у населения Западной Сибири.

розиготность (H_{ex}) и параметры информативности (pM — probability of random match, W — mean exclusion chance, информационное содержание полиморфизма $PIС$ — polymorphism information content) изученного локуса рассчитывали с помощью компьютерной программы на основе ранее опубликованных алгоритмов [Ефремов И. А., Чистяков Д. А., Носиков В. В., 1996].

Значения критериев полиморфизма для локуса HUMPLA2A в западно-сибирской популяции:

$H_{obs} = 0,766$
 $H_{ex} = 0,775$
 $H_{ex} (N_{ei}) = 0,778$
 $pM = 0,079$
 $W = 0,740$
 $PIС = 0,641$

Таблица 2.
Сравнительно-популяционный анализ частот выявленных аллелей гена HUMPLA2A у населения западно-сибирского региона с другими выборками

Параметры	Американские европеоиды	Латино-американцы	Монголоиды США	Негры США
Объем выборки, чел.	185	183	63	188
RxC массив	7x2	7x2	7x2	7x2
χ^2	18,6481	19,6193	30,8947	72,1866
Вероятность ($\pm S.E.$)	0,0030 \pm 0,0017	0,0050 \pm 0,0022	0,0010 \pm 0,0010	0,0000 \pm 0,0000
G-статистика	18,5914	19,9293	33,6616	72,0890
Вероятность ($\pm S.E.$)	0,0060 \pm 0,0024	0,0060 \pm 0,0024	0,0010 \pm 0,0010	0,0000 \pm 0,0000

При межпопуляционном сравнении мы обнаружили достоверные отличия частот аллелей гена HUMPLA2A у жителей Западной Сибири от европеоидов США (табл. 2) (при уровне вероятности не

менее 0,0060) и от наблюдаемого для латиноамериканцев ($p = 0,0060$) и представителей других рас: монголоидов ($p = 0,0010$) и негров США ($p = 0,0000$).

Параметры аллельного полиморфизма свидетельствуют, что изученный микросателлитный локус гена HUMPLA2A у европейского населения западно-сибирского региона является высокоинформативным для генетических исследований и решения прикладных идентификационных задач.

Данная работа частично финансируется в рамках ГНТП Здоровье населения России (грант № 13).