

## МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА *Alu* (I/D) ГЕНА *ACE*

**Н.В. Голета, С.М. Зельман, 3 курс,**  
**Научный руководитель – И.Н. Гейчук**  
**Полесский государственный университет**

Результаты практически любой деятельности человека зависят от соотношения врожденных и средовых факторов. В настоящее время все большее внимание уделяется генотипированию однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). К другим типам генных мутаций относят делеции (отсутствие фрагментов ДНК разной протяжённости). Часть таких мутаций вызывает генетический дисбаланс и приводит к серьезным нарушениям синтеза белка. Другие мутации обычно не сопровождаются утратой или приобретением генетического материала, либо его разрывами, и могут не проявляться в фенотипе, то есть вести себя как нейтральные мутации [1, 2].

Ген ангиотензин I – конвертирующего фермента ACE (Angiotensin-I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A)), локализован в 17 хромосоме в положении 17q23.3, содержит 26 экзонов и 25 инtronов [3, 4]. Для данного гена известны не менее 12 полиморфизмов, три из которых находятся в кодирующей части. Наиболее изучен полиморфизм типа инсерция/делеция (I/D), который расположен в инtronе 16 гена *ACE* rs4646994 (*NM\_000789.3:c.2306-105\_2306-104ins, NM\_152830.2:c.584-105\_584-104ins*). Вставка размером 287 п.н. состоит из *Alu*-повторов. *Alu*-последовательности – это вставки цепочек ДНК в геном человека, длиной около 300 пар оснований, названные так в связи с тем, что были впервые обнаружены у бактерий *Arthrobacter luteus*. Наличие *Alu*-вставок в различных генах может служить маркерами заболеваний. Полиморфизм не является структурным, но влияет на уровень экспрессии данного гена. Этот ген кодирует фермент, катализирующий превращение неактивного ангиотензина I в физиологически активный пептид ангиотензин II. Делеционный вариант (D) ассоциирован со снижением до 30% концентрации ангиотензин-конвертирующего фермента в плазме крови [4].

Ген *ACE* кодирует аминокислотную последовательность цинксодержащей протеазы – ангиотензин I – конвертирующего фермента (ACE). Ангиотензин I – конвертирующий фермент (ACE) – ключевой фермент ренин–ангиотензиновой и калликреин – кининовой систем – важнейших гуморальных регуляторов артериального давления. Под действием фермента ACE происходит образование ангиотензина II – наиболее активного сосудосуживающего вещества и деградация брадикинина – важного сосудорасширяющего фактора. Ангиотензин II является важнейшим регулятором гемодинамики и влияет на процессы синтеза структурных белков в клетках. [5, 6]. У лиц – носителей гомозиготного генотипа D/D в гене *ACE* уровень ангиотензина I – превращающего фермента в 2 раза выше, чем у носителей гомозиготного генотипа I/I. У носителей гетерозиготного генотипа I/D промежуточный уровень фермента [7, 8].

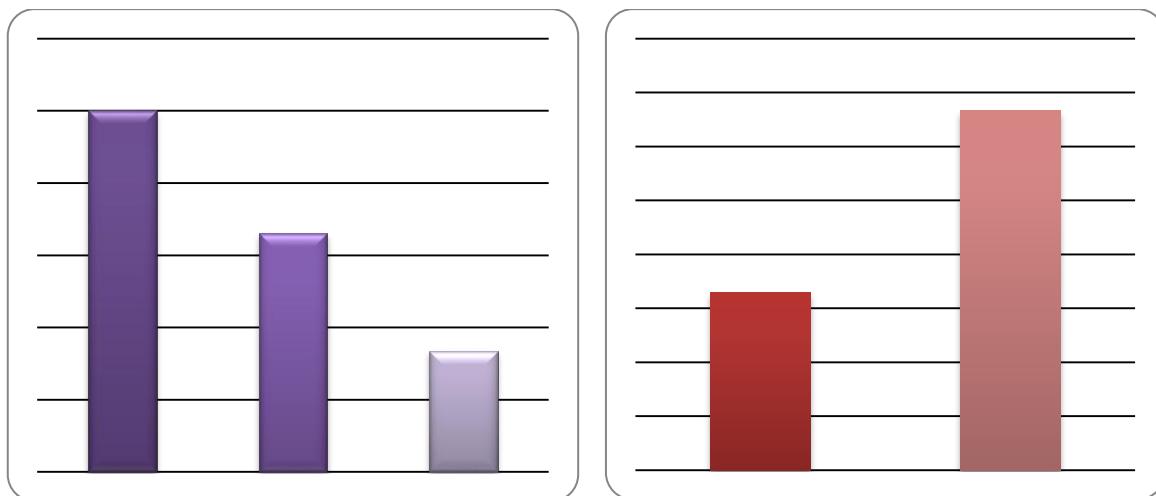
Цель наших исследований – анализ полиморфизма *Alu* (I/D) гена (ACE) и используемого метода диагностики в группе студентов.

В ходе исследования были проанализированы образцы ДНК 42 студента ПолесГУ (девушки, средний возраст  $19 \pm 1$  год). В качестве ДНК – содержащего материала служили образцы буккального эпителия, забор которых осуществлялся с соблюдением международных биоэтических требований с помощью специальных одноразовых стерильных зондов путём соскоба клеток с внутренней стороны щеки. ДНК выделяли перхлоратным методом. В основе метода лежит лизис клеток буккального эпителия додецилсульфатом натрия и деградация белков протеиназой K. Клеточный лизат обрабатывали смесью перхлората натрия, хлороформа, изоамилового спирта. Преципитацию ДНК проводили этианолом, а затем растворяли в буфере для хранения. ДНК, выделенная данным методом, пригодна для длительного хранения ДНК и даёт возможность использовать образцы, содержащие деградированную ДНК. Оценку качества выделенной ДНК проводили на основании спектрофотометрического измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения. Полученную ДНК использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции в присутствии праймеров авторского дизайна [9], синтезированных с помощью олигонуклеотидного синтезатора *MerMade4* (Bioautomation, США) на базе НИЛ лонгитудинальных исследований ПолесГУ. Для определения полиморфизма гена использовали двухпраймерную систему. Метод исследования – сайт-специфическая ПЦР. Генотипирование осуществляли с помощью анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на программируемых термоциклях (Biometra, Германия) с исполь-

зованием термофильной ДНК–полимеразы (ОДО «Праймтех», Беларусь). Оптимизация условий ПЦР проводилась путём варьирования временных и температурных параметров реакции, а также использования различных pH буферных растворов, концентраций хлорида магния для обеспечения специфичности реакции. Реакционная смесь для ПЦР содержала деионизированную воду, 10×ПЦР–буфер (10 mM Tris–HCl; 50 mM KCl; 0,01% Tween 20, pH 8,6), раствор MgCl<sub>2</sub>, смесь четырех дезокси–нуклеозид–трифосфатов (дНТФ), прямой и обратный праймеры, Таq–полимеразу. ПЦР продукты полиморфизма, содержащего инсерции/делеции, разделяли в 2% агарозном геле. После проведения электрофореза гели окрашивали в течение 15–20 минут в 0,00001% растворе бромистого этидия и визуализировали в системе гель–документирования Quantum (Vilber Lourmat, Франция) с использованием оригинального программного обеспечения. Размеры продуктов реакции 479 п.о и/или 192 п.о. Генотипу I/I соответствуют фрагменты длиной 479 п.о., генотипу I/D – два фрагмента длиной 479 и 192 п.о., а генотипу D/D – фрагмент длиной 192 п.о.

Данный метод отличается простотой выполнения, не требует специальной аппаратной и реагентной базы. Метод предполагает использование стандартных ПЦР–реагентов, пригодных для других ПЦР: ПЦР–буфер, дезоксинуклеотидилтрифосфаты, хлорид магния, праймеры, ДНК–полимеразу. Таким образом, отсутствует жесткая привязанность к продукции определенных фирм, сохраняется возможность гибкого подхода к выбору реагентов и их заменяемости.

При анализе инсерционно–делеационного полиморфизма гена ACE в выборке студентов были получены результаты, приведенные на рисунке.



**Рисунок – Частотное распределение генотипов (слева) и аллелей (справа)**

По нашим данным частота встречаемости аллельных вариантов полиморфизма *Alu* I/D гена ACE у студентов составляет 50,0% гомозигот DD, гетерозигот ID – 33,0% и 16,7% обследованных являются гомозиготами по II. По данным литературы указанные аллельные варианты в европейской популяции составляют для DD, ID и II – 28, 49 и 23% соответственно [3, 6, 8].

#### Список использованных источников

1. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта: монография [Текст]. – М.: Советский спорт, 2009.– 268с.
2. Геномика–медицине. Научное издание / Под ред. В.И. Иванова и Л.Л. Киселева. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2005. 392 с.
3. Информационная система по медицински–значимым полиморфизмам генома человека [Электронный ресурс]: база данных ФГУ «НИИ Физико–химической медицины» ФМБА России. – М.,– режим доступа: <http://www.genepassport.ru/base?PolymorphismID=33>.– Информационная система по медицински–значимым полиморфизмам генома человека. Дата доступа: 07/03/2012.
4. База OMIM: <http://omim.org/entry/106180>
5. Danser AH, Schunkert H. Renin–angiotensin system gene polymorphisms: potential mechanisms for their association with cardiovascular diseases // Eur. J. Pharmacol. – 2000. – Vol. 410. – P. 303–316.
6. Zhu X, Bouzekri N, Southam L, Cooper RS, Adeyemo A, McKenzie CA, Luke A, Chen G, Elston RC, Ward R. Linkage and association analysis of angiotensin I–converting enzyme (ACE)–gene polymorphisms with ACE concentration and blood pressure // Am. J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 68. P. 1139–1148.

7. Cidl K., Strelcova L., Vasku A. et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE): A review of I/D polymorphism in the world populations // Scr. Med. (Brno). 1997. V. 70. № 2/3. P. 81–87.
8. Wolfarth, B. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes: the 2004 update / B. Wolfarth, M.S. Bray, J.M. Hagberg, L. Perusse, R. Rauramaa, M.A. Rivera, S.M. Roth, T. Rankinen, C. Boucharde. – Med Sci Sports Exerc. –2005. – V. 37(6). – P. 881–903.
9. Лебедь Т.Л. Молекулярно-генетическое типирование полиморфизмов. Сб. метод. рекомендаций / Т.Л. Лебедь, П.М. Лазарев, И.Н. Гейчук.– Пинск: ПолесГУ, 2011.– 72с.