

Протокол для ПЦР был следующим: 94 °С — 10 мин; затем 35 циклов, включающих в себя денатурацию при 94 °С, — 1 мин, отжиг при 55 °С — 1 мин, элонгация при 72 °С — 1 мин и заключительная элонгация при 72 °С — 7 мин. Продукты ПЦР детектировались в 1,5 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Нуклеотидная последовательность продуктов определялась на генетическом анализаторе ABI 3730xl с тем же набором праймеров (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности сравнивались с последовательностью NM_020469.2 (transferase A, alpha-1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase; transferase B, alpha-1-3-galactosyltransferase). Для обнаружения полиморфизмов использовался программный пакет SeqScape V 2.6 (Applied Biosystems, США).

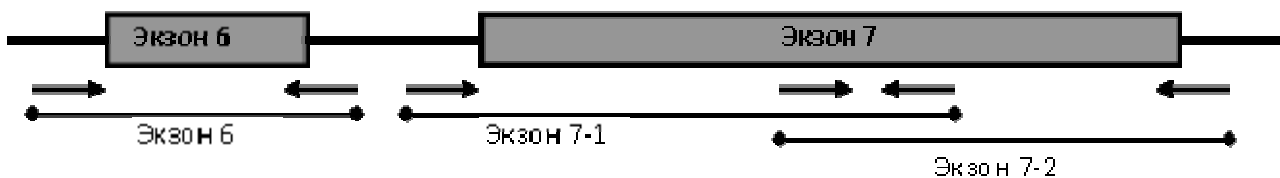
Т а б л и ц а

Структура олигонуклеотидных праймеров, использованных для проведения амплификации и секвенирования 6 и 7 экзонов гена ABO

| Ген ABO | Прямой праймер | Обратный праймер |
|-----------|------------------------|--------------------------|
| Экзон 6 | ATGTTACCGCACGCCTCTCTCC | TGACCTTCCCATCTACCCTC |
| Экзон 7-1 | CCTTGCAGATACGTGGCTTTCC | TGAACCGCTGCACCTCTTG |
| Экзон 7-2 | CTTCTTCAGCGAGGTGGATTAC | GCTTCAGATACTCACAACAGGACG |

Результаты и выводы

В общей сложности в исследовании приняли участие 500 добровольцев, из них 369 казахов. Изначально групповая принадлежность определялась с помощью обычного серологического метода в центре переливания крови. Фенотипы 369 образцов выглядели следующим образом: группа крови А (n=99), В (n=93), 0 (n=132) и АВ (n=45). Далее выделяли ДНК методом высаливания. В связи с тем, что подавляющее большинство нуклеотидных замен, приводящих к изменению ABO-фенотипа, локализованы в 6 и 7 экзонах гена ABO, было принято решение ограничиться секвенированием данных экзонов (см. рис.). Определение нуклеотидной последовательности проводилось методом прямого секвенирования с использованием сиквенс-специфичных праймеров. Так как в случае экзона 7 при использовании фланкирующих праймеров получался фрагмент более 600 п.н. (оптимальный для проведения реакции секвенирования), дополнительно были выбраны внутренние праймеры, которые использовались для амплификации двух перекрывающихся фрагментов, соответствующих 7-му экзону гена ABO. Детекция продуктов ПЦР перед секвенированием проводилась электрофоретически. По результатам сравнения полученных нуклеотидных последовательностей гена ABO с референтной последовательностью NM_020469.2 (transferase A, alpha-1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase; transferase B, alpha-1-3-galactosyltransferase), находящейся в открытом доступе Национального центра биотехнологической информации США (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_020469.2), отбирались наиболее информативные полиморфизмы для данной выборки. В результате было отобрано три полиморфизма гена ABO (261, 796 и 803), на которые были подобраны праймеры и конкурирующие зонды для проведения ПЦР в реальном времени.



Стрелками показаны олигонуклеотидные праймеры, отрезками — получаемые амплификационные фрагменты

Рисунок. Схема амплификационных фрагментов для секвенирования 6 и 7 экзонов гена ABO

Далее, используя метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, нами была определена групповая принадлежность по системе ABO у 369 человек с известной группой крови. Группа крови определялась следующим образом. Наличие делеции гуанина в 261 положении гена ABO (261 del) в гомозиготном состоянии приводит к однозначному определению группы крови 0. Среди гетерозигот по 261 del носители аллеля 796А как в гетеро-, так и в гомозиготной форме относятся к группе крови В, а носители аллеля 796С — к группе крови А, группа крови АВ в данном слу-

чае невозможна. При отсутствии делеции в 261 положении в гомозиготном состоянии группы крови определяются по наличию мутации C796A: генотип C/C — группа крови A и 0, генотип C/A и генотип A/A — группа крови B и AB. В позиции 796 дикий тип (C) в показывает 0 либо A и на 100 % исключает AB. Замена C на A на 100 % исключает группы 0 и A и показывает группу B. Гетерозигота C/A также на 100 % исключает 0 и A. В позиции 803 замена G на C на 100 % исключает 0 и A и показывает группу B.

Анализ результатов генотипирования полиморфизмов в образцах с известной группой крови показал, что точность определения группы крови человека методом ПЦР в реальном времени достигает 99,5 % (367 из 369 человек). В двух оставшихся случаях можно предположить наличие редких аллелей, которые маскируют группу крови. В одном случае гетерозиготный носитель делеции в 261 положении (261G/del-796C/C-803G/G), определенный нами как имеющий группу крови A, по результатам серологического исследования имел группу крови O. В данном случае ошибка может происходить из-за наличия нуклеотидной замены G802A. Во втором случае гетерозиготный носитель нуклеотидной замены C796A (261G/G-796C/A-803G/G) определялся нами как имеющий группу крови AB, хотя по стандартной методике он имел группу крови A. В то же время встречаемость таких образцов составила менее 1 % от общего количества правильно определенных групп крови. Таким образом, генотипирование трех полиморфизмов гена ABO (261, 796 и 803) является достаточным для идентификации основных генотипов ABO, встречающихся у населения Казахстана.

Таким образом, нами был разработан метод для генотипирования групп крови ABO, основанный на ПЦР в реальном времени. Метод может быть использован в качестве дополнения к классическому серологическому способу определения группы крови. Данный способ определения группы крови человека, включающий генотипирование трех полиморфизмов гена ABO (261, 796 и 803), отличается в первую очередь тем, что генотипирование проводится методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и позволяет определять группу крови ABO у населения Казахстана с точностью до 99,5 %.

В перспективе применение данной технологии определения группы крови позволит предотвратить развитие гемолитических осложнений при гемотрансфузионной терапии, что особенно актуально для больных анемией и другими аутоиммунными заболеваниями. Кроме того, разработанный метод позволит уменьшить риск неправильного подбора донора и последующего несоответствия групп крови при переливании.

Таким образом, изучение молекулярного полиморфизма генов человека дает возможность определять генетические детерминанты физиологических особенностей человека. В частности, способ определения группы крови человека методом ПЦР в реальном времени может быть использован в здравоохранении, в медицинских учреждениях различного профиля, в центрах переливания крови и диагностических центрах Республики Казахстан.

Список литературы

- 1 Dunbar N.M., Ornstein D.L., Dumont L.J. ABO incompatible platelets: risks versus benefit // *Current opinion in hematology*. — 2012. — Vol. 19, № 6. — P. 475–479.
- 2 Berseus O., Boman K., Nessen S.C., Westerberg L.A. Risks of hemolysis due to anti-A and anti-B caused by the transfusion of blood or blood components containing ABO-incompatible plasma // *Transfusion*. — 2013. — Vol. 53, Suppl. 1. — P. 114–123.
- 3 Izetbegovic S. Occurrence of ABO and RhD Incompatibility with Rh Negative Mothers // *Materia socio-medica*. — 2013. — Vol. 25, № 4. — P. 255–258.
- 4 Колосков А. Как повысить иммунологическую безопасность гемотрансфузионной терапии? // *Медицинская газета. Наука и практика*. — 2006. — № 82. — 27 окт. — С. 12–15.
- 5 Daniels G.L., Fletcher A., Garratty G. et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens // *Vox Sang*. — 2004. — Vol. 87. — P. 304–316.
- 6 Daniels G.L., Flegel W.A., Fletcher A. et al. International Society of Blood Transfusion Committee on Terminology for Red Cell Surface Antigens: Cape Town report // *Vox Sang*. — 2007. — Vol. 92. — P. 250–253.
- 7 Lin M. Taiwan experience suggests that RhD typing for blood transfusion is unnecessary in southeast Asian populations // *Transfusion*. — 2006. — Vol. 46, № 1. — P. 95–98.
- 8 Yamamoto F., Clausen H., White T. et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system // *Nature*. — 1990. — Vol. 345. — P. 229–233.
- 9 Patenaude S.I., Seto N.O.L., Borisova S.N. et al. The structural basis for specificity in human ABO(H) blood group biosynthesis // *Nat. Struct. Biol*. — 2002. — Vol. 9. — P. 685–690.

- 10 Lee H.J., Barry C.H., Borisova S.N. et al. Structural basis for the inactivity of human blood group O² glycosyltransferase // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — P. 525–529.
- 11 Storry J.R., Carter V., Helberg A. et al. Pre-transplantation confirmatory ABO genotyping reveals a novel non-deletional O allele // *Vox Sang.* — 2008. — Vol. 95, Suppl. 1. — P. 178.
- 12 Vichinsky E.P., Earles A., Johnson R.A. et al. Alloimmunization in sickle-cell anemia and transfusion of racially unmatched blood // *N. Engl. J. Med.* — 1990. — Vol. 322. — P. 1617–1621.
- 13 Josephson C.D., Su L.L., Hillyer K.L. et al. Transfusion in the patient with sickle cell disease. A critical review of the literature and transfusion guidelines // *Transfus. Med. Rev.* — 2007. — Vol. 21. — P. 118–133.
- 14 Chapman J.F., Milkins C., Voak D. The computer crossmatch: a safe alternative to the serological crossmatch // *Transfus. Med.* — 2000. — Vol. 10. — P. 251–256.

П.В.Тарлықов, Д.Р.Райымбек, Е.В.Жолдыбаева, Е.М.Раманқұлов

ПТР әдісі арқылы Қазақстан тұрғындарының қан топтарын анықтау

Мақалада дәл осы уақыт тәртібіндегі ПТР негізделген қан топтарын генотиптеу әдісі жасалып шығарылды. Бұл әдісті классикалық серологиялық тәсілге қосымша ретінде қолдануға болады. АВО геніндегі үш полиморфизмді (261, 796 және 803) генотиптеуден тұратын адамның қан топтаны анықтаудың бұл әдісі генотиптеудің дәл осы уақыт тәртібіндегі полимеразалық тізбектік реакция әдісімен жүргізілетіндігі мен Қазақстан тұрғындарының АВО қан тобын 99,5 % дейінгі дәлдікпен анықтауға мүмкіндік беретіндігімен ерекшеленеді. АВО генінің аллельдеріне генетикалық тестілеу жүргізу қан тобын стандартты әдіспен анықтау кезіндегі даулы жағдайлары туындағанда қан құю орталықтарында талап етілетін болады.

P.V.Tarlykov, D.R.Rayymbek, E.V.Zholdybaeva, E.M.Ramankulov

Determination of human blood group by real-time PCR in the indigenous population of Kazakhstan

Real-time PCR-based method for blood group genotyping was developed. This assay may be used as a complement to classical serological blood typing. The method includes genotyping of three SNPs (261, 796 и 803) of ABO gene. Genotyping is performed by polymerase chain reaction in real time and allows one to determine the blood group ABO with accuracy up to 99.5 % in the population of Kazakhstan. The use of the genetic testing will be in demand in blood transfusion centers when correct typing of a blood group with the use of agglutination method is under question.

References

- Dunbar N.M., Ornstein D.L., Dumont L.J. *Current opinion in hematology*, 2012, 19, 6, p. 475–479.
- Bersee O., Boman K., Nessen S.C., Westerberg L.A. *Transfusion*, 2013, 53, 1, p. 114S–123S.
- Izetbegovic S. *Materia socio-medica*, 2013, 25, 4, p. 255–258.
- Koloskov A. *Medical newspaper. Science and Practice*, 2006, Oct., 27, 82, p. 12–15.
- Daniels G.L., Fletcher A., Garratty G. et al. *Vox Sang.*, 2004, 87, p. 304–316.
- Daniels G.L., Flegel W.A., Fletcher A. et al. *Vox Sang.*, 2007, 92, p. 250–253.
- Lin M. *Transfusion*, 2006, 46, 1, p. 95–98.
- Yamamoto F., Clausen H., White T. et al. *Nature*, 1990, 345, p. 229–233.
- Patenaude S.I., Seto N.O.L., Borisova S.N. et al. *Nat. Struct. Biol.*, 2002, 9, p. 685–690.
- Lee H.J., Barry C.H., Borisova S.N. et al. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, p. 525–529.
- Storry J.R., Carter V., Helberg A. et al. *Vox Sang.*, 2008, 95, 1, p. 178.
- Vichinsky E.P., Earles A., Johnson R.A. et al. *N. Engl. J. Med.*, 1990, 322, p. 1617–1621.
- Josephson C.D., Su L.L., Hillyer K.L. et al. *Transfus. Med. Rev.*, 2007, 21, p. 118–133.
- Chapman J.F., Milkins C., Voak D. *Transfus. Med.*, 2000, 10, p. 251–256.