

УДК 575.1: 577.1

© 1993 г.

Д.А. ЧИСТЯКОВ, Д.К. ГАВРИЛОВ,
И.В. ОВЧИННИКОВ, В.В. НОСИКОВ

**АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ЧЕТЫРЕХ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫХ
ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ СРЕДИ НЕРОДСТВЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РУССКОЙ НАЦИИ, ПРОЖИВАЮЩИХ В МОСКВЕ, С ПОМОЩЬЮ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

*Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов,
Москва, 113545*

Определены частоты встречаемости аллелей в четырех гипервариабельных локусах генома человека, содержащих тандемные повторы с изменяющимся числом копий (локусы D1S80, D17S30, APOB и IGHJ) среди 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве. Выявлен высокий уровень полиморфизма данных гипервариабельных районов, характеризующийся наличием аллелей разных размеров. На основании полученных данных установлено распределение генотипов по вышеперечисленным локусам. Сравнительный анализ показал, что характер распределения аллелей исследованных гипервариабельных районов среди русских Москвы практически не отличается от такового у прочих групп европеоидов, проживающих в Европе и Северной Америке.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, аллельный полиморфизм, гипервариабельные районы.

Гипервариабельные районы генома (HVR), которые часто называют также тандемными повторами с изменяющимся числом копий (VNTR), находят все большее применение в качестве генетических маркеров при изучении генома человека. Высокий уровень полиморфизма этих минисателлитных последовательностей часто бывает крайне полезен при решении задач, связанных с картированием генов и идентификацией локусов, ответственных за злокачественное перерождение клеток и развитие многих наследственных заболеваний. Все более широкое применение находят полиморфные мини-сателлитные последовательности и при определении отцовства-материнства, идентификации личности и ряде других задач, относящихся к ведению судебно-медицинской экспертизы [1-4].

Число копий в тандемных повторах может изменяться от одного до нескольких десятков. Обычно в популяции обнаруживается определенный набор аллелей, отличающихся друг от друга по числу повторяющихся единиц и, следовательно, по длине. Ранее было показано, что аллельный полиморфизм VNTR может быть эффективно использован при идентификации личности, поскольку набор повторяющихся последовательностей определенной длины является уникальным для каждого индивидуума [5].

До недавнего времени типирование гипервариабельных районов было основано на использовании гибридизации по методу Саузерна [6] или анализе полиморфизма длин фрагментов (RLFP), образующихся при расщеплении геномной ДНК рестриктазами [7]. Однако данные экспериментальные подходы обладали недостаточной разрешающей способностью в тех случаях, когда VNTR входили в состав относительно крупных фрагментов ДНК, так как аллели мало отличались друг от друга по длине. В таких случаях было практически невозможно различить аллели VNTR, отличающиеся друг от друга на 11-70 п.н. (в этот интервал укладываются длины повторяющихся единиц среди известных VNTR). Кроме того, вышеупомя-

нудные методы требовали для успешного анализа значительных количеств высокомолекулярной ДНК, которые практически невозможно получить из небольших пятен спермы, крови или из корней волос [8]. Важное значение имело также качество используемой ДНК – деградированная или загрязненная посторонними примесями ДНК из «старых» пятен оказывалась малопродуктивной.

Быстрое развитие метода амплификации ДНК, основанного на полимеразной цепной реакции (ПЦР), коренным образом изменило ситуацию с типированием гипервариабельных районов и позволило убрать многие ограничения, снижавшие эффективность использования вышеупомянутых методических подходов [9]. Применяя соответствующие фланкирующие олигонуклеотидные праймеры и термостабильную ДНК-полимеразу, можно амплифицировать любой фрагмент геномной ДНК. Амплификация ДНК находит применение при анализе полиморфизма VNTR. Получены принципиально важные результаты, в том числе по идентификации индивидов, даже если исследователь располагает геномной ДНК, выделенной из одной единственной клетки [10, 11].

К настоящему времени в геноме человека обнаружено несколько сотен VNTR. Некоторые сведения о VNTR, наиболее часто используемых в геномной дактилоскопии, приведены в табл. 1. В данной работе мы провели анализ распределения аллелей для четырех VNTR: рYNZ22 и рМСТ118, не имеющих рядом известных генов, и tandemных повторов, расположенных в генах аполипопротеида В (в 3'-концевом нетранслируемом участке) и тяжелой цепи иммуноглобулина (в 5'-концевом сегменте J) среди 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

ДНК-полимераза Taq^R получена из НПК «Биотех» (Москва). Меченый [α -³²P]dATP был получен из ИЯФ РАН (Обнинск). Нейлоновые фильтры «Hybond N» – фирмы «Amersham».

Синтез олигонуклеотидных праймеров был выполнен в Институте прикладной энзимологии (Вильнюс).

Выделение геномной ДНК из крови человека проводили по известным методам [4, 21].

Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе РНС-2 фирмы «Techne». Состав реакционной смеси: реакционный буфер, 0,1–1,0 мкг геномной ДНК, 1 мкМ праймеров, 2 ед. полимеразы Taq^R. Для амплификации tandemного

Таблица 1

Тандемные повторы с изменяющимся числом копий, наиболее часто используемые в геномной дактилоскопии, основанной на методе ПЦР

Область VNTR	Лocus по IGM	Хромосомная локализация	Число аллелей	Длина повтора, п.н.	Размер ампл. фрагмента, т.п.н.	Гетерозиготности индекс, %	Ссылки
Ген apoB	APOB	2p23 – p24	12	30	0,54 – 0,87 0,56 – 0,97	75	[13–15]
рYNZ22	D17S30	17p13	10	70	0,17 – 0,87	86	[16]
рМСТ118	D1S80	Хромосома 1	21	16	0,39 – 0,72	78	[20]
HVR-IgH	IGJH	14q32	6	50	0,5 – 1,7	67	[15]
p33.4	–	Не установ.	7	64	0,8 – 1,3	70	[12]
p33.6	D1S111	1q23	8	37	0,5 – 1,0	67	[12]
Ген IL-6	IL6	7p21 – p14	4	30–80	0,60 – 0,76	55	[17]
Ген коллагена	COL2A1	12q14.3	6	31–34	0,58 – 0,72	81	[18]
c-Ha-ras	HRAS	11p15.5	18	28	0,86 – 2,65	58	[14]
p602	DXYS17	Xp22/Yp11	10	70	0,52 – 1,24	87	[19]

повтора рYNZ22 использовали праймеры TR-1 и TR-2, рMCT118 – праймеры TR-5 и TR-6, гипервариабельных районов генов аполипопротеида В (ароВ) и иммуноглобулина Н (HVR-Ig_{II}) – праймеры TR-7 и TR-8 и TR-13 и TR-14 соответственно. Состав реакционного буфера: 67 мМ Трис-НСl, рН 8,8; 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01%-ный твин-20, 0,15 мг/мл БСА, 0,5 мМ немеченные трифосфаты. Для амплификации рYNZ22 и HVR-Ig_{II} использовали 1,0 мМ MgCl₂; для рMCT118 и ароВ – 1,5 и 4,0 мМ MgCl₂ соответственно. Объем реакционной смеси составлял 50 или 100 мкл.

Программа реакции в первом цикле: денатурация – 94°C, 4 мин; в реакционную смесь вносили ДНК-полимеразу Taq^q и продолжали реакцию: а) рYNZ22 и ароВ – 94°C, 1 мин; 57°C, 6 мин; 30 циклов; б) рMCT118 – 94°C, 1 мин; 65°C, 1 мин; 70°C, 8 мин; 30 циклов; в) HVR-Ig_{II} – 94°C, 1 мин; 68°C, 6 мин; 30 циклов.

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 6%-ном полиакриламидном или в 2%-ном агарозном геле, нанося в лунки геля 10-20% объема реакционной смеси. Полиакриламидный гель окрашивали серебром [20]. ДНК переносили по методу Саузерна на нейлоновые фильтры, как описано у Маниатиса и соавт. [22].

Смесь амплифицированных фрагментов ДНК, содержащих различные аллели VNTR, метили с использованием [α -³²P]dATP и ДНК-полимеразы Taq^q. Состав реакционной смеси (объем 20 мкл): реакционный буфер для амплификации соответствующего VNTR, 0,5 мкг ДНК аллелей, по 0,05 мМ немеченных dCTP, dGTP и dTTP, 50 мкКи [α -³²P]dATP, по 10 нг соответствующих праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq^q. ДНК предварительно денатурировали, выдерживая реакционную смесь при 95°C в течение 4 мин, после чего вносили фермент и проводили три цикла реакции по программе: 94°C, 1 мин; 65°C (рMCT118), 57°C (рYNZ22 и ароВ) или 68°C (HVR-Ig_{II}), 1 мин; 70°C, 1 мин. На заключительном цикле реакцию вели при 70°C 3 мин.

Предгибридизацию проводили в течение 2 ч при температуре 65°C в смеси следующего состава: 5 × SSPE (SSPE: 180 мМ NaCl, 10 мМ NaH₂PO₄, рН 7,4; 1 мМ EDTA), 5-кратный раствор Денхардта, 0,1%-ный додецилсульфат натрия. Гибридизацию с радиоактивными зондами проводили в течение ночи при температуре 65°C в той же смеси, что и предгибридизацию, добавляя ДНК спермы лосося, предварительно денатурированную инкубацией при 100°C в течение 1 ч в присутствии 0,5 N NaOH, в конечной концентрации 50 мкг/мл. Нейлоновые фильтры отмывали от неспецифически связавшихся зондов следующим образом: а) 2×SSPE, комнатная температура, 15 мин – 1 раз; б) 2 × SSPE, 0,1%-ный додецилсульфат натрия, комнатная температура, 15 мин – 1 раз; в) 2 × SSPE, 0,1%-ный додецилсульфат натрия, 65°C, 15 мин – 6 раз; г) 1 × SSPE, 65°C, 15 мин – 2 раза.

Экспонировали с рентгеновской пленкой РМ-В в присутствии усиливающих экранов ЭУИ-1 в течение ночи при –70°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для амплификации мини-сателлитных повторов, расположенных в четырех локусах генома человека на различных хромосомах, мы использовали синтетические олигонуклеотидные праймеры (табл. 2). Амплифицировали четыре VNTR на ДНК, выделенной из крови 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве.

Мы вносили в реакционную смесь ДНК-полимеразу Taq^q после предварительной денатурации ДНК при 94°C в течение 4 мин. Это позволяет предотвратить неспецифическую реакцию синтеза второй цепи, происходящую на первом цикле ПЦР при раннем внесении ДНК-полимеразы в период повышения температуры в пробах до 94°C. Несоблюдение этого условия приводит к так называемой дискриминации аллелей, при которой синтез коротких по длине аллелей VNTR в случае гетерозиготных генотипов более вероятен [23].

Нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации фрагментов генома человека, содержащих блоки тандемных повторов с изменяющимся числом копий

Шифр	Последовательность 5' → 3'	Длина, п.н.	Обозначение	Ссылки
TR-1	CGAAGAGTGAAGTGCACAGG	20	pYNZ22	[16]
TR-2	CACAGTCTTTATTCTTCAGCC	21		
TR-5	GAAACTGGCCCTCCAAAACACTGCCCGCCG	28	pMCT118	[20]
TR-6	GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTGG	29		
TR-7	ATGGAAACGGAGAAATTATG	20	Ген аroB	[13]
TR-8	CCTTCTCACTTGGCAAATAC	20		
TR-13	GGGCCCTGTCTCAGCTGGGGA	21	HVR-IgH	[14]
TR-14	TGGCCITGGCTGCCCTGAGCAG	21		

Важное значение также имеет число циклов ПЦР. Оптимальное число лежит в пределах 25-30 (при условии, что реакционная смесь содержит не менее 10 нг геномной ДНК) [14]. Увеличение числа циклов ведет к появлению фрагментов ДНК «ненормального» размера, возникающих из-за присутствия некоторого количества молекул частично транскрибированных ДНК-матриц в конце стадии синтеза второй цепи. Эти молекулы могут выступать в роли праймеров на последующей стадии отжига и взаимодействовать с несколькими участками гипервариабельного района вследствие своей комплементарности тандемным повторам, что в итоге приводит к возникновению фрагментов ДНК «ненормальной» длины.

Реакция элонгации должна проходить в течение длительного времени (6-10 мин), достаточного для полного синтеза аллелей максимального размера. Решающее значение для селективности реакции имеют температура отжига праймеров и концентрация Mg^{2+} . При амплификации VNTR мы использовали пары праймеров с близкими значениями температуры отжига, а реакцию отжига проводили при максимальной температуре, характерной для одного из праймеров данной пары. Кроме того, в случае некоторых VNTR мы проводили ПЦР по двухступенчатой программе, соединяя вместе стадии отжига праймеров и синтеза второй цепи. Данный экспериментальный подход также облегчает получение полноразмерных аллелей максимальной длины.

Оптимальную концентрацию Mg^{2+} определяли опытным путем, отдавая предпочтение тому значению концентрации, при котором в амплификационной смеси после проведения ПЦР отсутствовали фрагменты ДНК «неправильной» длины, а число нужных фрагментов было наибольшим. Значения оптимальной концентрации Mg^{2+} для амплификации различных VNTR отличались друг от друга: так, амплификацию pMCT118 мы проводили при 1,5 мМ Mg^{2+} , pYNZ22 и HVR-IgH - при 2,0 мМ Mg^{2+} , а аroB - при 4,0 мМ Mg^{2+} .

В результате анализа ДНК, выделенной из 120 препаратов крови неродственных представителей русской популяции Москвы по локусу D17S30 (тандемный повтор pYNZ22), обнаружено 11 аллелей длиной от 170 до 940 п.н., отличающихся друг от друга на 70 п.н. (рис. 1, табл. 3). Степень гетерозиготности для данного локуса составила 78%, что достаточно близко к величине, приведенной в работе Хорна и соавт. (86%) для европеоидов США [16].

Среди обнаруженных аллелей pYNZ22 наибольшее представительство имели аллели № 3 (частота встречаемости 0,171) и № 4 (0,371) (табл. 3). Остальные аллели имели частоту встречаемости в пределах 0,004-0,092. Среди наблюдаемых вариантов генотипов наиболее часто встречающимися были комбинации аллелей 3-4 (0,158) и 4-4 (0,116) (табл. 4).

Нами было показано наличие 7 аллелей локуса IGHI размером от 470 до 920 п.н. (табл. 3) (длина повторяющейся единицы 50 п.н.). Мы обнаружили новый аллель под № 6 длиной 720 п.н., не упоминавшийся ранее [14]. Индекс гетерозиготности

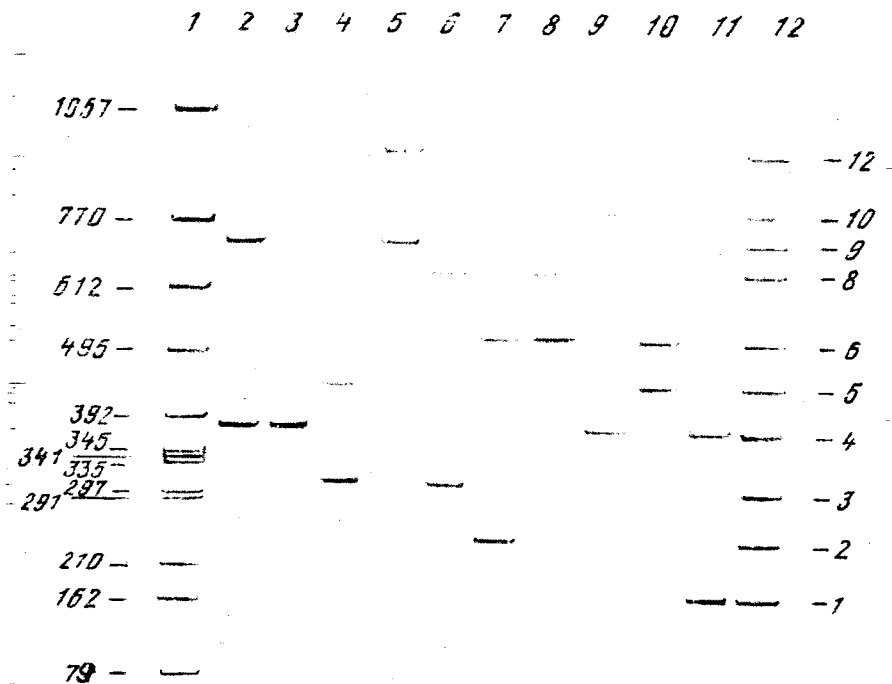


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 6%-ном полиакриламидном геле продуктов амплификации tandemного повтора rYNZ22 (окраска серебром). 1 – фрагменты ДНК фага ϕ X174, расщепленной рестриктазой *HincII* (цифрами указан размер фрагментов в п.н.; 2–11 – продукты амплификации tandemного повтора rYNZ22 геномной ДНК 10 неродственных индивидов; 12 – маркеры, содержащие смесь аллелей rYNZ22 (цифрами указаны порядковые номера аллелей)

для данного гипервариабельного района составил 68%, что близко к результатам Декорта и соавт. по европеоидам Бельгии (73%) [14].

Среди обнаруженных аллелей HVR-Ig₁ наиболее часто встречались аллели № 3 (частота встречаемости 0,387) и № 5 (0,304) (табл. 3). У европеоидов, проживающих в Бельгии, также наиболее широко были представлены аллели под № 3 (0,402) и № 5 (0,229) [14]. У русских Москвы более распространены генотипы, содержащие комбинации аллелей 3–3 (0,158), 3–5 (0,217) и 5–5 (0,125) (табл. 5).

Длина повторяющейся единицы локуса D1S80 (tandемный повтор pMCT118) составляет всего лишь 16 п.н. [24]. Уровень полиморфизма данного локуса высок, поэтому использовать метод электрофореза в агарозных гелях с последующей окраской бромистым этидием практически невозможно. Для повышения разрешающей способности Будовль и соавт. [24] предложили использовать метод электрофореза в полиакриламидных гелях с последующим окрашиванием серебром, а также специальную смесь регулярных маркеров молекулярной массы. Она представляет собой набор фрагментов ДНК, размер которых кратен определенной величине. Например, Будовль и соавт. использовали смесь фрагментов ДНК, отличающихся друг от друга на 123 и 1000 п.н., т. е. длиной 123, 246, 369 п.н. и так далее и длиной 1000, 2000, 3000 п.н. и так далее [20].

Мы использовали в качестве маркеров набор аллелей pMCT118, содержащий аллели 1, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 14. Объединяли амплификационные смеси, содержащие данные аллели, разбавляли полученный раствор в 1 000 000 раз бидистиллированной водой и проводили ПЦР, соблюдая условия, при которых амплифицировали аллели pMCT118.

Согласно старой номенклатуре самый низкомолекулярный аллель размером 430 п.н. имел порядковый номер 18, поскольку содержал 18 tandemных повторов

Значения частот встречаемости аллелей четырех VNTR среди 120 исследованных неродственных представителей русской популяции

Номер аллели	Длина, п.н.	Частота встречаемости	Номер аллели	Длина, п.н.	Частота встречаемости
pYNZ22					
1	170	7/0,029	7	590	3/0,012
2	240	22/0,092	8	670	8/0,033
3	310	35/0,147	9	730	19/0,079
4	380	94/0,387	10	800	19/0,079
5	450	16/0,067	12	940	1/0,004
6	520	16/0,067			
HVR-IgH					
1	470	29/0,121	6	720	11/0,046
2	520	17/0,071	9	870	15/0,062
3	570	93/0,387	10	920	2/0,008
5	670	73/0,304			
pMCT118					
1(18)	430	72/0,300	8(25)	542	12/0,050
2(19)	446	5/0,021	9(26)	568	7/0,029
3(20)	462	6/0,025	10(27)	584	5/0,021
4(21)	478	10/0,042	11(28)	600	10/0,042
5(22)	494	8/0,033	12(29)	616	8/0,033
6(23)	510	9/0,037	13(30)	632	1/0,004
7(24)	526	72/0,300	14(31)	648	15/0,062
apOB					
1(29)	541	7/0,029	7(41)	721	21/0,088
2(31)	571	8/0,033	8(43)	751	1/0,004
3(33)	601	7/0,029	9(45)	781	8/0,033
4(35)	631	49/0,204	10(47)	811	12/0,050
5(37)	661	86/0,358	11(49)	841	11/0,046
6(39)	691	18/0,075	12(51)	871	12/0,050

Примечание. Нумерация аллелей локуса D1S80 (тандемный повтор pMCT118) предложена Будовлем и соавт. [24], а локуса APOB (в скобках) – Боервинклем и соавт. [13].

длиной по 16 п.н. Следующий аллель содержал 19 повторов и имел порядковый номер 19 и так далее. Будовль и соавт. ввели новую номенклатуру, присвоив аллелю № 18 порядковый номер 1, аллелю № 19 – номер 2 и так далее [24]. Мы решили придерживаться обоих способов нумерации, поместив в скобки порядковые номера аллелей pMCT118, обозначенные согласно старой номенклатуре (табл. 3 и 6).

Мы обнаружили 14 аллелей pMCT118 длиной от 430 до 648 п.н. (рис. 2, табл. 3). Будовль и соавт. обнаружили у финнов кроме 14 данных аллелей еще и аллель под № 20 (37); у европеоидов США – 13 аллелей, но отсутствовали аллели № 10 (27) и № 20 (37) [20]. Степень гетерозиготности локуса D1S80 составила 72%. Полученное значение близко к величине индекса гетерозиготности данного локуса у финнов (77%) [20].

Так же как у финнов и северо-американских европеоидов, у русских наиболее представлены аллели № 1 (18) и № 7 (24). Величины частот встречаемости данных аллелей были близки и составляли, соответственно 0,300 и 0,300 (русские) (табл. 3); 0,307 и 0,311 (финны) [20]; 0,293 и 0,335 (европеоиды США) [20]. Среди исследованных нами генотипов русских Москвы наибольшее распространение имели комбинации аллелей 1-1 (частота встречаемости 0,092), 1-7 (0,208) и 7-7 (0,117) (табл. 6). Сходные результаты получены при анализе распределения

Распределение генотипов по локусу D17S30 (таделмный повтор pYNZ22) среди 120 исследованных неродственных представителей русской популяции

№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости	№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости
1	1-1	1/0,008	19	4-7	2/0,016
2	1-4	4/0,033	20	4-8	1/0,008
3	1-6	1/0,008	21	4-9	3/0,025
4	2-2	3/0,025	22	4-10	2/0,016
5	2-3	2/0,016	23	5-5	3/0,025
6	2-4	9/0,075	24	5-6	1/0,008
7	2-6	1/0,008	25	5-8	1/0,008
8	2-9	3/0,025	26	5-9	2/0,016
9	2-10	1/0,008	27	6-6	2/0,016
10	3-3	6/0,050	28	6-8	2/0,016
11	3-4	10/0,083	29	6-9	1/0,008
12	3-5	4/0,033	30	7-8	1/0,008
13	3-6	1/0,016	31	8-9	1/0,008
14	3-9	3/0,025	32	8-10	1/0,008
15	3-10	3/0,025	33	9-9	2/0,008
16	4-4	28/0,233	34	9-10	1/0,008
17	4-5	2/0,016	35	9-12	1/0,008
18	4-6	5/0,042	36	10-10	5/0,042

Таблица 5

Распределение генотипов по локусу IGJH среди 120 исследованных неродственных представителей русской популяции

№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости	№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости
1	1-1	2/0,016	11	3-5	26/0,217
2	1-2	5/0,042	12	3-6	5/0,042
3	1-3	13/0,108	13	3-9	9/0,075
4	1-5	6/0,050	14	3-10	1/0,008
5	1-6	1/0,008	15	5-5	15/0,125
6	2-2	2/0,016	16	5-6	1/0,008
7	2-3	1/0,008	17	5-9	5/0,042
8	2-5	5/0,042	18	6-6	1/0,008
9	2-6	2/0,016	19	9-10	1/0,008
10	3-3	19/0,158			

аллелей среди финской популяции, причем значения частот встречаемости у наиболее распространенных вариантов генотипа были очень близки к нашим данным: 0,086, 0,207 и 0,107 соответственно [20].

Макклур и Шарф [25], проводя анализ распределения аллелей pMCT118 у европеоидов США и испанцев методом ПЦР, обнаружили в некоторых пробах фрагменты ДНК, размер которых значительно превосходил длину максимальной из обычно встречающихся аллелей pMCT118. Решив, что данные фрагменты – это новые, ранее не обнаруженные высокомолекулярные аллели pMCT118, исследователи присвоили им, согласно старой номенклатуре, порядковые номера 51 и 58. Другие исследователи при анализе амплифицированных фрагментов ДНК также обнаруживали в некоторых пробах данные фрагменты, однако не относили их к

Распределение генотипов по локусу D1S80 (тандемный повтор рМСТ118) среди 120 исследованных неродственных представителей русской популяции

№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости	№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости
1	1-1 (18-18)	11/0,092	25	5-10(22-27)	1/0,008
2	1-2 (18-19)	1/0,008	26	5-12(22-29)	1/0,008
3	1-4 (18-20)	4/0,033	27	6-6 (23-23)	1/0,008
4	1-5 (18-22)	2/0,016	28	6-7 (23-24)	2/0,016
5	1-7 (18-24)	25/0,208	29	6-8 (23-25)	1/0,008
6	1-8 (18-25)	3/0,025	30	6-11 (23-28)	1/0,008
7	1-9 (18-26)	1/0,008	31	7-7 (24-24)	14/0,117
8	1-1 (18-28)	5/0,042	32	7-8 (24-25)	1/0,008
9	1-1 (18-29)	1/0,008	33	7-9 (24-26)	2/0,016
10	1-14(18-31)	8/0,067	34	7-10(24-27)	2/0,016
11	2-3 (19-20)	1/0,008	35	7-11(24-28)	2/0,016
12	2-4 (19-21)	1/0,008	36	7-12(24-29)	1/0,008
13	2-7 (19-24)	1/0,008	37	7-13(24-30)	1/0,008
14	2-1 (19-29)	1/0,008	38	7-14(24-31)	4/0,033
15	3-4 (20-21)	1/0,008	39	8-8 (25-25)	2/0,016
16	3-5 (20-22)	1/0,008	40	8-9 (25-26)	1/0,008
17	3-6 (20-23)	1/0,008	41	8-14(25-31)	1/0,008
18	3-7 (20-24)	1/0,008	42	9-9 (26-26)	1/0,008
19	3-12(20-29)	1/0,008	43	9-12(26-29)	1/0,008
20	4-6 (21-23)	1/0,008	44	10-10(27-27)	1/0,008
21	4-7 (21-24)	2/0,016	45	11-11(28-28)	1/0,008
22	4-8 (21-25)	1/0,008	46	12-12(29-29)	1/0,008
23	5-5 (22-22)	1/0,008	47	14-14(31-31)	1/0,008
24	5-7 (22-24)	1/0,008			

Примечание. Нумерация аллелей – по Будовлю и соавт. [24].

числу аллелей рМСТ118 [24, 26]. Мы тоже иногда получали в результате амплификации подобные фрагменты, но эти фрагменты ДНК не вступали в гибридизацию с радиоактивными зондами, представляющими собой меченные [³²P] аллели № 1 (18) и № 7 (24) рМСТ118 (результаты не показаны), и не могут рассматриваться как аллели данного локуса.

Мы показали существование 12 аллелей локуса АРОВ длиной от 541 до 871 п.н. (табл. 3). Боервинкль и соавт. [13] такое же количество аллелей обнаружили у европеоидов Франции [13]; у финнов было обнаружено только 11 аллелей: отсутствовал аллель № 43 [20].

Гипервариабельный район гена ароВ состоит из повторов размером по 15 п.н., однако длина аллелей данного локуса отличается друг от друга на 30, 60, 90 п.н. и так далее, т. е. на 2, 4, 6 повторяющихся единиц и так далее [13]. По этой причине Боервинкль и соавт. присвоили самому низкомолекулярному амплифицированному аллелю ароВ, содержащему 29 повторяющихся единиц, порядковый № 29; следующий аллель содержал на два повтора больше и имел № 31, и так далее [13]. Мы предлагаем новую классификацию аллелей ароВ, аналогичную той, которую ввели Будовль и соавт. для рМСТ118 [24]. Согласно нашей номенклатуре, самый низкомолекулярный амплифицированный аллель под № 29 (по номенклатуре Боервинкля и соавт. [13]) имеет № 1, аллель № 31 – № 2 и так далее. Предлагаемая нами номенклатура более удобна, чем старая, прежде всего для упорядочивания нумерации тех аллелей ароВ, которые можно амплифицировать с помощью ПЦР.

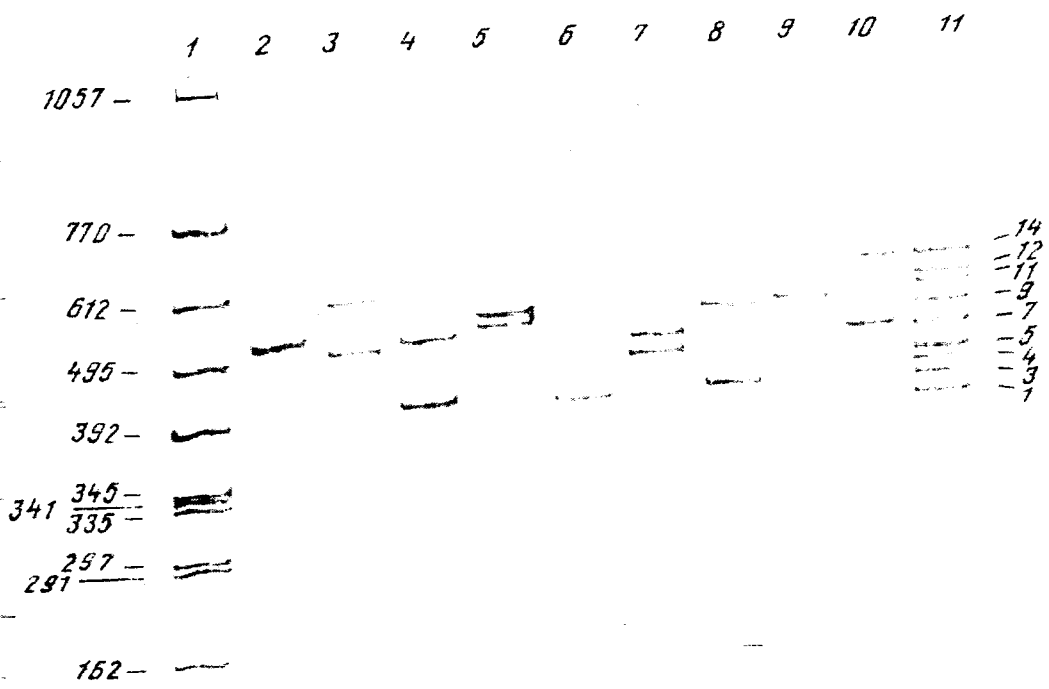


Рис. 2. Электрофоретическое разделение в 6%-ном полиакриламидном геле продуктов амплификации tandemного повтора rMST118 (окраска серебром). 1 - фрагменты ДНК флага ØX174, расщепленной рестриктазой *HincII* (цифрами указан размер фрагментов в п.н.; 2—10 — продукты амплификации tandemного повтора rMST118 геномной ДНК девяти неродственных индивидов; 12 — маркеры, содержащие смесь аллелей rMST118 (цифрами указаны порядковые номера аллелей)

Величина индекса гетерозиготности для локуса АРОВ составила у русских 77%, что незначительно отличается от величины индекса у финнов (79%) [20].

Наиболее широко представленными в локусе АРОВ оказались аллели № 4 (35) и № 5 (37) — частоты встречаемости 0,208 и 0,375 соответственно (табл. 3). Сходная картина имела место у финнов: частоты встречаемости — 0,220 и 0,368 [20] и у французов — 0,210 и 0,430 [13]. Среди наблюдаемых вариантов генотипа у русских наиболее распространение имели следующие комбинации аллелей: 4-4 и 5-5 (частоты встречаемости 0,166 и 0,125) (табл. 7).

В целом, несмотря на отдельные различия, аллели каждого из исследованных в настоящей работе гипервариабельных районов среди различных групп европеоидов имеют очень сходные картины распределения. Характер распределения аллелей среди представителей разных рас, по-видимому, отличается друг от друга; например, было показано, что аллели rMST118 распределены среди европеоидов США иначе, чем среди негроидов, проживающих в той же стране [25]. Внутри одной расы генетические различия менее выражены; это подтверждается, в частности, однородностью характера распределения аллелей различных VNTR среди европеоидов.

Полученные нами данные о распределении аллелей четырех гипервариабельных районов имеют важное значение, поскольку являются одним из критериев, по которым производится отбор данного VNTR для использования в методе геномной дактилоскопии, основанном на применении ПЦР. Прочими критериями для данного отбора являются высокий уровень полиморфизма, большая величина индекса гетерозиготности; специфичность условий проведения ПЦР, позволяющая идентифицировать полный набор аллелей для данной популяции, а также независимость наследования данного VNTR от наследования других гипервариабельных районов [27].

Распределение генотипов по локусу APOB среди 120 исследованных неродственных представителей русской популяции

Таблица 7

№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости	№ п/п	Генотип (по номерам аллелей)	Частота встречаемости
1	1 - 4 (29-35)	2/0,016	19	5 - 5 (37-37)	21/0,175
2	1 - 5 (29-37)	3/0,025	20	5 - 6 (37-39)	1/0,008
3	1 - 7 (29-41)	1/0,008	21	5 - 7 (37-41)	2/0,016
4	1 - 9 (29-45)	1/0,008	22	5 - 9 (37-45)	5/0,042
5	2 - 2 (31-31)	1/0,008	23	5 - 10 (37-47)	5/0,042
6	2 - 4 (31-35)	1/0,008	24	5 - 11 (37-49)	5/0,042
7	2 - 5 (31-37)	2/0,016	25	5 - 12 (37-51)	2/0,016
8	2 - 7 (31-41)	1/0,008	26	6 - 6 (39-39)	6/0,050
9	2 - 10 (31-47)	2/0,016	27	6 - 8 (39-43)	1/0,008
10	3 - 3 (33-33)	1/0,008	28	6 - 11 (39-49)	2/0,016
11	3 - 5 (33-37)	4/0,033	29	6 - 12 (39-51)	1/0,008
12	3 - 11 (33-49)	1/0,008	30	7 - 7 (41-41)	5/0,042
13	4 - 4 (35-35)	12/0,100	31	7 - 9 (41-45)	1/0,008
14	4 - 5 (35-37)	15/0,125	32	7 - 10 (41-47)	2/0,016
15	4 - 6 (35-39)	1/0,008	33	7 - 11 (41-49)	1/0,008
16	4 - 7 (35-41)	3/0,025	34	10 - 12 (47-51)	1/0,008
17	4 - 9 (35-45)	1/0,008	35	11 - 11 (49-49)	1/0,008
18	4 - 10 (35-47)	2/0,016	36	12 - 12 (51-51)	4/0,033

Примечание. Порядковые номера аллелей в скобках – по Боэрвиклю и соавт. [13].

VNTR, приведенные в табл. 1, в различной степени соответствуют процедуре генетической идентификации личности. Например, гипервариабельный район гена интерлейкина-6 мало пригоден ввиду низкого уровня полиморфизма (известны только четыре аллеля данного VNTR [17]). HVR протонкогена Ha-gas мало пригоден из-за невысокого значения индекса гетерозиготности [14]. Локус COL2A1 мало удобен, так как его повторяющиеся единицы иногда различаются по своей длине всего лишь на 2-3 п.н., что очень усложняет типирование по данному локусу [17].

Для получения надежных результатов необходимо применять комплексный подход, заключающийся в одновременном использовании для генетического типирования конкретного индивидуума нескольких VNTR. На первой стадии процедуры типирования следует отдавать предпочтение высокополиморфным мини-сателлитным последовательностям с большой степенью гетерозиготности и более равномерным характером распределения аллелей, например pMCT118, pYNZ22 или p602. Те VNTR, например HVR-Ig_H, apoB, p33.6, распределение аллелей которых менее информативно, следует использовать на втором дополнительном этапе исследования.

Для ускорения процесса типирования очень полезен экспериментальный подход, заключающийся в проведении в одной пробе совместной амплификации сразу нескольких VNTR [12]. Для осуществления данных опытов необходимо использовать гипервариабельные районы, способные к амплификации в одних и тех же реакционных условиях и не имеющие перекрывания по размерам аллелей. В тех случаях, когда перекрытие имеет место, последующее проведение гибридизации с использованием зондов, специфичных к конкретному мини-сателлитному повтору, позволит отличить различные аллели друг от друга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Reeders S.T., Breuning M.H., Davies K.E., Nicholls S.D., Jarman A.P., Higgs D.R., Pearson P.L., Weatherall D.J. // Nature. 1985. V. 317. P. 542-544.*
2. *Lothe R.A., Nakamura Y., Woodward S., Gedde Dahl Jr.T., White R. // Cytogenet. Cell Genet. 1988. V. 48. P. 167-169.*

3. Baird M., Balazk I., Giusti A., Miyazaki L., Nicholas L., Wexler K., Kantner E., Glassberg J., Allen F., Rubinstein P., Sussman L. // *Am. J. Genet.* 1986. V. 39. P. 489-501.
4. Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J. // *Nature.* 1985. V. 318. P. 577-579.
5. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. // *Nature.* 1985. V. 314. P. 67-73.
6. Southern E.M. // *Genomics.* 1975. V. 2. P. 273-279.
7. Cooper D.N., Smith B.A., Cooke H.J., Niemann S., Schmidtke J. // *Hum. Genet.* 1985. V. 69. P. 201-205.
8. Wong Z., Wilson N., Patel I., Povey S., Jeffreys A.J. // *Ann. Hum. Genet.* 1987. V. 51. P. 269-288.
9. Saiki P.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. // *Science.* 1988. V. 239. P. 487-491.
10. Li H., Cillensten V.B., Cui X., Saiki P.K., Erlich H.A., Arnheim N. // *Nature.* 1988. V. 335. P. 414-417.
11. Higuchi R., Von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A. // *Nature.* 1988. V. 332. P. 543-546.
12. Jeffreys A.J., Wilson V., Neumann R., Keyte J. // *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. P. 10953-10971.
13. Boerwinkel E., Xiong W., Fourest E., Chan L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. P. 212-216.
14. Decorte R., Cuppens H., Marynen P., Cassiman J.-J. // *DNA Cell Biol.* 1990. V. 91. P. 461-469.
15. Ludwig D.H., Friedl W., McCarthy B.J. // *Am. Hum. Genet.* 1989. V. 45. P. 458-464.
16. Horn G.T., Richards B., Klinger K.W. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 2140.
17. Bowcock A.M., Ray A., Erlich H., Sehgal P.B. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. P. 6855-6864.
18. Wu S., Seino S., Bell G.J. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 3102.
19. Decorte R., Marynen P., Cassiman J.-J. (личное сообщение).
20. Sajantila A., Budowle B., Strom M., Johnsson V., Lukka M., Peltonen L., Ehnholm C. // *Am. J. Hum. Genet.* 1992. V. 50. P. 816-825.
21. Овчинников И.В., Газрилов Д.К., Посиков В.В., Дебабов В.Г. // *Молекуляр. биология.* 1991. Т. 25. С. 1266-1272.
22. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование.* М: Мир, 1984.
23. Ruano G., Brash D.E., Kidd K.K. // *Amplifications.* 1991. V. 7. P. 1-4.
24. Budowle B., Charkraborty R., Giusti A.W., Eisenberg A.J., Allen R.C. // *Am. J. Hum. Genet.* 1991. V. 48. P. 137-144.
25. McClure G., Scharf S. (личное сообщение).
26. Kasal K., Nakamura Y., White R. // *J. Forensic Sci.* 1990. V. 35. P. 1196-1200.
27. Decorte R., Cassiman J.-J. *DNA Fingerprinting Approaches Applications* / Burke T., Doll G., Jeffreys A.J., eds. Basel: Birkhauser Verlag, 1991. P. 371-389.

Поступила в редакцию
28.X.1992

D.A. CHISTYAKOV, D.K. GAVRILOV, I.V. OVCHINNIKOV, V.V. NOSIKOV

THE USE OF PCR TECHNIQUES FOR THE VNTR ALLELE DISTRIBUTION ANALYSIS OF 120 UNRELATED RUSSIAN INDIVIDUALS LIVING IN MOSCOW

National Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, 113545

Allele frequencies of four VNTR regions (loci D1S80, D17S30, APOB and IG11J) were determined in 120 unrelated Russian individuals living in Moscow. The high level of length polymorphism was discovered among alleles of these VNTRs. The genotype distribution of these hypervariable regions was established on the basis of experimental data. The comparative analysis showed the likeness between the allele distributions of these VNTRs among Russians and other groups of Caucasians living in Europe and North America.