

## IgH-VNTR

**Хромосомная локализация:** 14q32.33 (позиции 105 867 200 – 105 868 200)



По данным BLAT: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (версия Dec. 2013, GRCh38/hg38).

**Тандемные повторы:** 50 нуклеотидов, усреднённого мотива  
{aaaggccgcg tcctaaacag tgcgtgggcc acgtgagcgg agcaggctct}

**Другие названия:** IgH-5'VNTR, IGH, IGHJ, HVR-Ig, HVR-IgH, Ig-J<sub>H</sub>, Ig-JH.

**Референтные генотипы различных контрольных ДНК**

K562	L-68	007	2800M	CO	CP	Tap1
8 / 8	12 / 12	10 / 16	10 / 16	12 / 16	8 / 16	8 / 10

Подчёркнуты аллели, визуально более интенсивные в гелях.

### Общие сведения и диагностическая значимость

Полиморфный минисателлит *IgH-VNTR* впервые был описан в работе *Silva et al., 1987*. На тот момент он был локализован авторами в области 5' от гена, кодирующего тяжёлую цепь иммуноглобулина человека: *Human Ig heavy chain J (H)-5'-region* (нуклеотидная последовательность Y00130). По уточнённым современным данным, этот минисателлит расположен в локусе IGH (кластер генов, immunoglobulin heavy locus, Gene ID: [3492](#)), между участками, кодирующими IGHJ1, IGHD7-27 (immunoglobulin heavy diversity 7-27) и IGHD1-26 (immunoglobulin heavy diversity 1-26). Сам локус IGH (другие названия IGD1; IGH@; IGHJ; IGHV; IGHD@; IGHJ@; IGHV@; IGH.1@; IGHDY1) имеет общий размер 1 293 408 нуклеотидов (по данным GRCh38.p7, release 108) и включает V (variable), D (diversity), J (joining) и C (constant) сегменты.

Минисателлит *IgH-VNTR* состоит из тандемно повторяющихся последовательностей со средней длиной 50 п.н., внутренне гетерогенных из-за делеций и замен отдельных нуклеотидов. Этот маркер может быть использован для картирования делеций и транслокаций на длинном плече хромосомы 14 при ряде патологий (например, ОММ: [613457](#), синдром Темпла, синдром Кагами-Огата, предрасположенность к коронарной болезни сердца 4, *Bonthron et al., 1993*).

С 1990 г. этот локус начал использоваться для идентификации личности и установления спорного родства (*Чистяков и др., 1993; Decorte et al., 1990; Pai et al., 1996*). В 2002 г. были опубликованы результаты исследования аллельного полиморфизма *IgH-VNTR* на выборке из 462 неродственных человек, проживающих на территории Урала, Сибири и Северного Казахстана (*Бинько и др., 2002*). В этой же работе была установлена нуклеотидная последовательность одного из «новых» аллелей этого маркера.

Необходимо отметить, что в различных литературных источниках была использована разная нумерация аллелей для этого локуса. При этом число тандемных повторов для одного и того же аллеля, исходя из разных обозначений, может различаться как минимум на один повтор. В различных популяциях показано существование аллелей 7 (420 п.н.) – ~30 (>1500 п.н.).

Исходя из хромосомной локализации, локус *IgH-VNTR* может быть сцеплен со следующими маркерами, используемыми в приложениях по идентификации личности: *D14S1434*.

### Условия ПЦР

ПЦР следует проводить только с использованием Смарт Таq-полимеразы или Смарт 10X ПЦР-буфера во избежание эффекта «ложной гомозиготности» и/или наработки неспецифических продуктов реакции.

Смарт 10X ПЦР-буфер и 12,5X смесь праймеров перед каждым использованием следует полностью разморозить при комнатной температуре и перемешать, встряхнув пробирки на Вортексе в течение нескольких секунд. Затем следует осадить все используемые компоненты на дно пробирок.

Для проведения анализа одного образца в каждую амплификационную пробирку вносят следующие компоненты в указанных количествах:

Деионизованная вода ( <i>Deionized water</i> )	19,5 мкл
Смарт 10X ПЦР-буфер ( <i>Universal Smart 10X PCR Buffer</i> )	2,5 мкл
12,5X Смесь праймеров ( <i>12,5X Set of primers IgH-VNTR</i> )	2 мкл
Исследуемый образец ДНК в концентрации 10-100 нг/мкл ( <i>Sample DNA</i> )	1 мкл
<b>Суммарный объём ПЦР</b>	<b>25 мкл</b>

В каждом раунде ПЦР осуществляется также постановка «положительного» (образец К+) и «отрицательного контроля амплификации» (образец К-). В пробирку отрицательного контроля вместо исследуемого образца ДНК добавляют такой же объем деионизованной воды. В пробирку положительного контроля добавляют **1,0 мкл** поставляемой контрольной ДНК.

Помещают пробирки в амплификатор и проводят ПЦР по следующей программе:

Первая денатурация	30-35 циклов	Последний синтез цепи
95°C, 2 мин	94°C, 30 сек 65-68°C, 30 сек 72°C, 30 сек	72°C, 5 мин

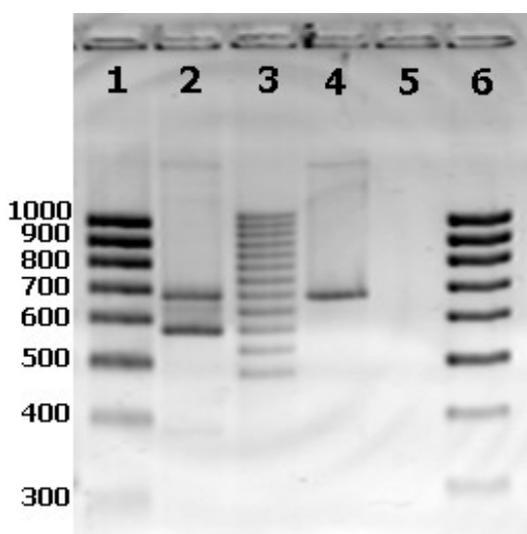
### Регистрация результатов

Разделение продуктов реакции и генотипирование можно проводить как в неденатурирующих полиакриламидных гелях (ПАГ, 6-10%Т, 3,3%С, длина гелей 20-30 см), так и в 1,5-2% агарозных гелях (длина гелей 10-15 см).

Идентификация аллелей по этому маркеру может осуществляться по различным нелокусным высокомолекулярным стандартам ДНК (например, **100 bp DNA Ladder**), в сочетании с компьютерными программами, позволяющими рассчитывать размер фрагментов ДНК по сравнительным длинам пробегов в гелях.

Для наиболее простой и удобной идентификации аллелей по данному локусу рекомендуется использовать соответствующую **псевдоаллельную лестницу**, которая содержит **12** фрагментов ДНК размером от **470** до **1020** п.н. и соответствует аллелям **8 ... 19**. Эти аллели также выделены **цветом** в таблице аллельных частот. Шаг между соседними фрагментами ДНК в псевдоаллельной лестнице на локус *IgH-VNTR* составляет **50 п.н.**: 470, 520, 570 и т.д. п.н.

Пример генотипирования исследуемых образцов по локусу *IgH-VNTR* в агарозном геле с использованием нелокусного высокомолекулярного стандарта ДНК и псевдоаллельной лестницы. Фрагмент окрашенного бромистым этидием 2%-го агарозного геля.



Электрофорез проводился в горизонтальной мини-камере *Wide Mini-Sub Cell GT* (#170-4468, Bio-Rad Laboratories, США) с *IX* «быстрым» *SB*-буфером (*Brody & Kern, 2004*).

Условия электрофореза: длина геля **5 см**, расстояние между электродами камеры 15 см, напряжение 200В, общее время электрофореза 30 мин.

**Дорожки 1 и 6** – нелокусный высокомолекулярный стандарт *100 bp DNA Ladder* (размеры фрагментов ДНК от 1000 до 300 п.н. указаны слева на полях).

**Дорожка 3** – псевдоаллельная лестница для локуса *IgH-VNTR*, которая соответствует аллелям **8 ... 19**.

**Дорожки 2 и 4** – исследуемые образцы ДНК. Генотипы **10/12** и **12/12** соответственно.

**Дорожка 5** – отрицательный контроль ПЦР.

В связи с различиями нуклеотидных последовательностей истинных аллелей локуса *IgH-VNTR* и фрагментов ДНК в псевдоаллельной лестнице, возможно определенное несоответствие амплифицированных аллелей фрагментам ДНК в лестнице: «сдвиг» фрагментов (в основном – при использовании ПАГ). Это не является критичным для уверенного генотипирования, но интенсивность такого сдвига сложным образом зависит от конкретных условий проведения электрофореза (вольтаж, температура, степень свежести электрофорезного буфера).

### Размеры и популяционные частоты аллелей в локусе *IgH-VNTR*

Аллели	Размеры аллелей, п.н.	Консервативная оценка частот аллелей для европейского населения России
7	420	0,01
8	470	0,17
9	520	0,07
10	570	0,38
11	620	0,01
12	670	0,3
13	720	0,05
14	770	0,01
15	820	0,01
16	870	0,15
17	920	0,02
18	970	0,01
19	1020	0,01
20 и больше	>= 1070	0,01

Нумерация аллелей отражает число содержащихся в них тандемных повторов. Эта нумерация предложена в работе *Silva et al., 1987* (референтная последовательность *Y00130*).

### Референтные нуклеотидные последовательности

Доступ к GenBank	Дата публикации	Число тандемных повторов в референтной последовательности	Размер амплифицируемого фрагмента, п.н.
<a href="#">Y00130</a>	07-MAY-1992	13 (позиции повторов 47...696)	720
<a href="#">X97051</a>	26-JUL-2016	11	670
<a href="#">NT_026437</a>	06-JUN-2016	8	520
<a href="#">NG_001019</a>	01-FEB-2017	8	520

**Y00130:** “Human Ig heavy chain J (H)-5'-region. /note="region of 13 50bp repeats”.

**X97051:** “DNA sequence of the human immunoglobulin D segment locus”.

**NT\_026437:** “Homo sapiens chromosome 14 genomic scaffold, GRCh38.p7 Primary Assembly HSCHR14\_CTG1”.

**NG\_001019:** “Homo sapiens immunoglobulin heavy locus (IGH) on chromosome 14”.

**GC-состав** ПЦР-продукта: **64%** (для аллеля с 13 повторами, по последовательности *Y00130*).

### Ссылки

- Бинько И.А., Шорохова Д.А., Шварц Ю.Б., Демаков С.А., Новоселов В.П. (2002) Анализ распределения аллелей гипервариабельного локуса HVR-IgH среди неродственных представителей населения, проживающего на территории Урала, Сибири и северного Казахстана. – Генетика, 38 (4), 529-533, PMID: [12018171](#).
- Чистяков Д.А., Гаврилов Д.К., Овчинников И.В., Носиков В.В. (1993) Анализ распределения аллелей четырех гипервариабельных тандемных повторов среди неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве, с помощью полимеразной цепной реакции. – Молекулярная биология, 27 (6), 1304-1314, PMID: [7904327](#).

- Bonthron D.T., Smith S.J., Fantes J., Gosden C.M. (1993) De novo microdeletion on an inherited Robertsonian translocation chromosome: a cause for dysmorphism in the apparently balanced translocation carrier. – *Am J Hum Genet.*, 53 (3), 629-637. PMID: [8352273](#).
- Brody J.R., Kern S.E. (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. – *Biotechniques*, 36 (2), 214-216. Erratum in: *Biotechniques*, 2005, 38 (1), 60. PMID: [14989083](#).
- Decorte R., Cuppens H., Marynen P., Cassiman J.J. (1990) Rapid detection of hypervariable regions by the polymerase chain reaction technique. – *DNA Cell Biol.*, 9 (6), 461-469, PMID: [2206402](#).
- Matsuda F., Ishii K., Bourvagnet P., Kuma K., Hayashida H., Miyata T., Honjo T. (1998) The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. – *J Exp Med.*, 188 (11), 2151-2162, PMID: [9841928](#).
- Pai C.Y., Chou S.L., Tang T.K., Wei Y.H., Yang C.H. (1996) Prevention of false results from preferential PCR amplification of VNTR alleles. – *J Formos Med Assoc.*, 95 (1), 69-72. PMID: [8640101](#).
- Silva A.J., Johnson J.P., White R.L. (1987) Characterization of a highly polymorphic region 5' to J<sub>H</sub> in the human immunoglobulin heavy chain. – *Nucleic Acids Res.*, 15 (9), 3845-3857, PMID: [2884636](#).
- Smolyanitsky A.G., Smolyanitskaya A.I., Popov V.L., Zaslavsky G.I., Khromov-Borisov N.N. (2003) Polymorphism of LDLR, GYPA, HBGG, D7S8, GC, HLA-DQA1, Ig-J<sub>H</sub>, D17S30, ApoB and D1S80 loci in northwestern Russians. – *Forensic Sci Int.*, 137 (1), 100–103, PMID: [14550622](#).

### Состав набора и условия хранения компонентов

Компонент	Условия хранения	Количество
<b>Реакционные компоненты (хранить в зоне для постановки ПЦР)</b>		
Смарт 10X ПЦР-буфер (Smart 10X PCR Buffer)	-20°C	1 пробирка (250 мкл)
12,5X Смесь праймеров (12,5X Set of primers)	-20°C	1 пробирка (200 мкл)
Контрольная ДНК (Control DNA)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (30 мкл)
Деионизованная вода (Deionized water)	При комнатной температуре (также допустимо при - 20°C)	1 пробирка (2,5 мл)
Вазелиновое масло (Paraffinic Oil)	При комнатной температуре	1 флакон (при необходимости, 4 мл)
<b>Пост-реакционные компоненты (хранить в электрофоретической зоне)</b>		
6X Буфер для нанесения на гель (6X Loading Solution)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (500 мкл)
Высокомолекулярный стандарт ДНК (DNA Marker)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (на 30 постановок)
Псевдоаллельная лестница IgH-VNTR (Pseudoallelic Ladder IgH-VNTR) (*)	-20°C (+4°C)	1 пробирка (на 20 постановок)
<b>Дополнительные материалы</b>		
Инструкция по применению	При комнатной температуре	1 (при необходимости)

(\*) Псевдоаллельная лестница для локуса *IgH-VNTR* не содержит продуктов амплификации соответствующих аллелей, поставляется в смеси с буфером для нанесения на гель. Растворы стабильны на протяжении не менее 24 месяцев при хранении при -20°C. Допустимо хранение при +4°C при регулярном использовании. Растворы готовы для использования: после полного размораживания и перемешивания на вортексе следует наносить по **1,5-2,5 мкл** поставляемого раствора в лунку, в зависимости от типа и толщины используемого геля.

### Дополнительная информация

- Наборы ТАПОТИЛИ предназначены для исследовательских работ *in vitro* (то есть в пробирке, вне живого организма).
- Наборы не подлежат обязательной сертификации и декларированию соответствия в Системе сертификации ГОСТ Р.

- Коды продукции [ОКПД2](#) (ОК 034-2014, КПЕС 2008): **20.59.52.190** (Реагенты сложные диагностические или лабораторные, не включенные в другие группировки), **20.59.52.199** (Реагенты сложные диагностические или лабораторные прочие, не включенные в другие группировки).
- Наборы *ТАПОТИЛИ* не являются изделием медицинского назначения, не предназначены для использования в целях медицинской диагностики, для диагностических процедур, для профилактики и лечения заболеваний. По этим причинам наборы *ТАПОТИЛИ* не подлежат государственной регистрации на территории РФ (в том числе в Росздравнадзоре) в качестве медицинского изделия.
- Молекулярно-генетические исследования (МГИ) по установлению генотипов отдельных лиц, в том числе по идентификации личности и установлению спорного родства методом анализа полиморфных локусов генома человека не являются медицинской деятельностью: устанавливаются именно биологические факты (генотипы обследуемых лиц).
- Результаты МГИ мы рекомендуем оформлять в виде Заключения специалиста, отчёта о НИР и аналогичных документов, не являющихся медицинскими документами.
- Интерпретация медицинской значимости полученных данных и принятие клинического решения относится к компетенции врача.
- The *Tapotili* Kit is intended for molecular biology applications, including forensic or paternity usage. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

### *Техническое содействие / информация*

Благодарим Вас за то, что Вы предпочли нашу продукцию и будем рады продолжить сотрудничество. Дополнительная информация о других наборах *Тапотили* (полная инструкция) доступна по ссылке: <https://tapotili.ru/doc/tapotili.pdf>.

Актуальная версия непосредственно этого описания доступна здесь: [https://tapotili.ru/doc/igh\\_vntr.pdf](https://tapotili.ru/doc/igh_vntr.pdf).

Адресуйте все вопросы, предложения, а также возможные рекламации:

Интернет: <https://www.tapotili.ru/>

Электронная почта: [info@tapotili.ru](mailto:info@tapotili.ru)

Моб. тел.: +7-903-786-4-789.

Ефремов Илья Алексеевич, кандидат биологических наук