

УДК 575.:616_007_07

МАРКЕР *DYS14* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ОБРАЗЦАМ

© 2010 г. Е. Г. Благодатских*, А. Г. Никитин, Ю. А. Серёгин,
К. А. Благодатских, В. В. Носиков

Государственный научный центр “ГосНИИгенетика”, Москва, 117545

Поступила в редакцию 09.02.2010 г.

Принята к печати 02.03.2010 г.

Изучена возможность определения пола с использованием маркера *DYS14*, расположенного на хромосоме Y. С этой целью методом ПЦР в реальном времени амплифицировали участок ДНК, содержащий маркер *DYS14* (находится внутри гена, кодирующего белок TSPY), из 60 образцов плазмы крови (30 мужских образцов и 30 женских). В 30 случаях установлена принадлежность образцов мужчинам и в 30 — женщинам. Эти результаты подтверждены контрольным определением с широко используемым в судебно-медицинской экспертизе маркером *SRY*. Определен нижний предел обнаружения мужской ДНК, содержащей маркер *DYS14*, в реакционной смеси — 6.7 пг ДНК (две копии генома), что соответствует 6.7 нг ДНК (2000 копий генома) в 1 мл плазмы крови. Такая чувствительность метода позволяет определять половую принадлежность образца при доступности малого количества генетического материала. Метод может применяться в неинвазивной пренатальной диагностике наследственных заболеваний, сцепленных с полом, а также в судебно-медицинской экспертизе.

Ключевые слова: маркер *DYS14*, ПЦР в реальном времени, определение пола, неинвазивная пренатальная диагностика.

THE USE OF *DYS14* MARKER FOR SEX DETERMINATION, by E. G. Blagodatskikh*, A. G. Nikitin, Yu. A. Seryogin, K. A. Blagodatskikh, V. V. Nosikov (State Research Center “GosNII genetika”, Moscow, 117545 Russia; *e-mail: ekat.blag@gmail.com). The possibilities of real-time PCR amplification of *DYS14* marker located on Y chromosome for sex determination were studied. Samples of plasma of 30 men and 30 women were investigated for this aim. Real-time PCR amplification of *DYS14* marker (located inside gene coding TSPY1 protein) was used for sex determination. According to the obtained results, 30 samples belonged to men and 30 — to women. In all our experiments the results were confirmed by use of marker *SRY*, widely used in forensic examination. Detection limit of DNA region containing *DYS14* in reaction mixture was established after experiment with dilution of male DNA and is equal to 6.7 pg of DNA (two copies of genome), which corresponds to 6.7 ng of DNA (2000 copies of genome) in 1 ml of blood. Sex determination with small amounts of genetic material in investigated sample becomes possible with such characteristics. Method can be used for noninvasive prenatal diagnostics for the timely detection of congenital diseases associated with sex and in forensic medical examination.

Key words: *DYS14* marker, real-time PCR, sex determination, noninvasive prenatal diagnostics.

За последние годы показано, что только треть всех наследственных заболеваний имеет традиционный моногенный аутосомный тип наследования [1]. Характер наследования остальных не согласуется с законами Менделя, предполагающими одинаковое действие генов, полученных от обоих родителей. К таким заболеваниям относятся сцепленные с полом заболевания, при которых мутантный ген находится на хромосомах X и Y.

Эти заболевания зачастую неизлечимы и приводят к смерти в раннем возрасте, а большинство из них влияет на качество жизни. Поэтому выяснение пола плода на ранних сроках беременности поможет предотвратить повторные случаи рождения больных детей в семьях с отягощенной наследственностью. В настоящее время известно более 300 заболеваний и признаков, передающихся сцепленно с полом: гемофилии А и В, различные формы X-сцепленной умственной отсталости, например синдром Мартина-Белл,

* Эл. почта: ekat.blag@gmail.com

прогрессирующие мышечные дистрофии Дюшенна и Беккера, нефрогенный несахарный диабет, некоторые формы гидроцефалии, X-сцепленная глухота и др. [2–4]. В большинстве случаев это заболевания, сцепленные с хромосомой X, так как хромосома Y содержит относительно небольшое число генов. Мутации в этих генах приводят к развитию заболеваний, при которых наблюдается нарушение функционирования мужских половых желез. Такие мутации возникают, как правило, *de novo*. Как и менделирующие моногенные заболевания, гены которых локализованы на аутосомах, X-сцепленные заболевания могут наследоваться и рецессивно, и доминантно [1].

Заболевания с X-сцепленным рецессивным типом наследования возникают у лиц мужского пола, мутантный ген у которых находится в гемизиготном состоянии. У женщин, носительниц мутантного гена, этот ген находится, как правило, в гетерозиготном состоянии на одной из хромосом X [1]. Поэтому в семьях с такими заболеваниями крайне важно определять пол плода на раннем сроке беременности.

Доминантный X-сцепленный тип наследования встречается крайне редко и точно доказан лишь для нескольких заболеваний. В этом случае мутантный ген локализован на хромосоме X, он может проявляться как в гетерозиготном, так и в гемизиготном состоянии. Особенность заболеваний с этим типом наследования состоит в различной тяжести клинической картины у больных женского и мужского пола. У женщин с гетерозиготной мутацией часто наблюдается неполная пенетрантность и умеренно выраженная экспрессивность патологического гена. Среди них довольно распространено бессимптомное носительство, что можно объяснить преимущественной инактивацией X-хромосомы с патологической мутацией. Таким образом, разное фенотипическое проявление X-сцепленных заболеваний у лиц мужского и женского пола делает необходимым пренатальное определение пола плода на раннем сроке беременности [1].

Оптимальный срок проведения дородовой диагностики с минимальным риском для матери — 7–12 недель беременности. В настоящее время основным методом определения пола плода считается ультразвуковая диагностика, однако на ранних сроках беременности этот метод позволяет судить о наличии заболевания только по косвенным ультразвуковым маркерам.

Более точной и информативной представляется инвазивная пренатальная диагностика, прово-

димая при подозрении на заболевание, сцепленное с полом. Однако, несмотря на очевидные преимущества ранней пренатальной диагностики, этот метод имеет и недостатки, связанные, в первую очередь, с возникновением угрозы выкидыша — от 0.2 до 2%, в зависимости от методики и сроков беременности [5–9].

Крайне важна разработка достоверного и безопасного метода неинвазивной диагностики сцепленных с полом заболеваний.

Половую принадлежность образцов ДНК принято определять с использованием маркера *SRY* (расположенный на хромосоме Y однокопийный ген фактора транскрипции, синтезируемого в семенниках) [10]. Однако в последнее время все большее внимание привлекает маркер *DYS14*, который находится в интроне 1 многокопийного гена, кодирующего белок TSPY [11]. Среднее число копий данного гена на хромосоме Y превышает 50, и каждая копия содержит маркер *DYS14*. Это позволяет существенно повысить чувствительность обнаружения маркера при подборе оптимальных условий амплификации. Цель нашей работы состояла в разработке системы, позволяющей надежно выявлять маркер *DYS14*, при доступности малых количеств генетического материала.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали образцы геномной ДНК 30 мужчин и 30 женщин. Образцы крови инкубировали с протеиназой K в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия, а затем из плазмы крови с помощью смеси фенол–хлороформ выделяли геномную ДНК. РНК из образцов удаляли РНКазой T1 (“Fermentas”, Литва). ДНК повторно обрабатывали фенолом и переосаждали этанолом. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoVue (“HealthCare Bio-Sciences AB”, Швеция).

Половую принадлежность образцов определяли с помощью амплификации маркера *DYS14*, расположенного на хромосоме Y, методом ПЦР в реальном времени. Амплификацию проводили на термоциклере ABI 7500 Fast (“Applied Biosystems”) в 20 мкл реакционной смеси следующего состава: 70 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 16.6 мМ сульфат аммония, 0.01%-ный Твин-20, 2 мМ хлорид магния, 200 нМ каждого dNTP, 500 нМ праймеров (*DYS14-F*, 5'-catccagagcgtcctcg-3' и *DYS14-R*, 5'-ttccccttggttcccaaa-3'), 200 нМ зонда (*DYS14-FAM*, FAM-5'-agcacctctccactagaaggc-3'-BHQ1), 1.5 ед. Taq-ДНК-полимеразы, до 50 нг геномной ДНК. Условия амплификации фрагмента ДНК: 95°C/2 мин — первый цикл; 94°C/10 с, 60°C/90 с — 60 циклов. Размер продукта амплификации — 147 п.н. Регистрируемое

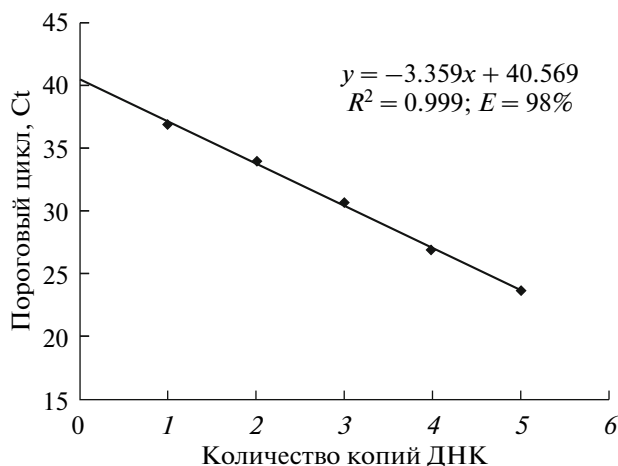


Рис. 1. Оценка эффективности (E) амплификации маркера *DYS14* с помощью ПЦР в реальном времени. Количество копий ДНК в реакционной смеси: 1 – 2×10^4 ; 2 – 2×10^3 ; 3 – 2×10^2 ; 4 – 2×10^1 ; 5 – 2×10^0 .

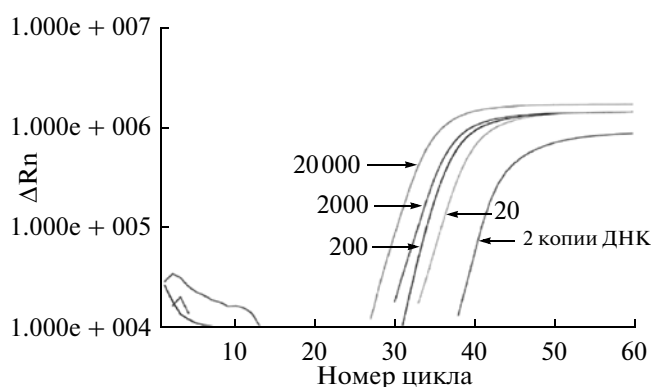


Рис. 2. Определение нижнего предела обнаружения маркера *DYS14* с помощью ПЦР в реальном времени. Уровень сигнала отрицательного контроля прохождения ПЦР расположен ниже установленной базовой линии.

накопление сигнала флуоресценции свидетельствовало о том, что в образце есть ДНК, содержащая маркер *DYS14*.

Специфичность и чувствительность метода контролировали с помощью ПЦР-амплификации фрагмента ДНК, содержащего маркер *SRY*, согласно [11].

Положительным контролем прохождения ПЦР в реальном времени служил фрагмент однокопийного гена “домашнего хозяйства” *GAPDH* [12].

Эффективность ПЦР (E) рассчитывали согласно [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам амплификации гена *GAPDH* все образцы содержали достаточное количество геномной ДНК, качество которой позволяет проводить ПЦР в реальном времени. С использованием различных разведений “мужской” ДНК оценили эффективность амплификации (рис. 1) и установили минимальное количество маркера *DYS14* (рис. 2), выявляемое методом ПЦР в реальном времени: 6.7 пг ДНК, или две копии генома в реакционной пробирке (количество копий ДНК – от 2×10^0 до 2×10^4 , объем реакционной смеси – 20 мкл, объем раствора матричной ДНК – 1 мкл), что соответствует 6.7 нг ДНК, или 2000 копий генома в 1 мл крови. При добавлении в реакционную смесь ДНК в количестве, соответствующем одной копии генома, вероятность прохождения ПЦР соответствовала ожидаемой, исходя из распределения Пуассона. Для сравнения амплифицировали широко используемый в судебно-медицинской экспертизе маркер *SRY*. Продукт амплификации этого маркера появлялся только при использовании не менее 40 копий генома. Таким образом, установленный нами порог чувствительности при использовании маркера *DYS14*, как минимум, в 10 раз ниже.

Следовательно, эффективность амплификации маркера *DYS14* с применением праймеров, предложенных ранее [11], на 18% ниже эффективности системы, разработанной нами.

Специфичность и чувствительность метода определения пола с помощью ПЦР в реальном времени мы оценили на 60 образцах крови с известной половой принадлежностью. Все 30 образцов крови мужчин дали положительный результат, а 30 образцов крови женщин – отрицательный. Ложноположительные и ложноотрицательные результаты отсутствовали.

Известно, что концентрация внеклеточной ДНК [13] плода в крови матери составляет около 100–3000 копий/мл [14–17]. В нашей работе минимальное определяемое количество ДНК, содержащей маркер *DYS14*, составило 2000 копий/мл крови, что, в принципе, позволяет применять данный метод для обнаружения ДНК плода, циркулирующей в крови беременной женщины, с целью неинвазивного определения пола плода на ранних сроках беременности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дадали Е.Л., Барышникова Н.В. 2006. Болезни с нетрадиционными типами наследования. *Генетика*. М.: Академкнига, 468–500.

2. Hsu D. T. 2010. Cardiac manifestations of neuromuscular disorders in children. *Paediatr. Respir. Rev.* **11**, 35–38.
3. Dati E., Baldinotti F., Conidi M.E., et al. 2009. A girl with Tomboy behavior: lesson from misdiagnosis in a baby with ambiguous genitalia. *Sex Dev.* In press.
4. Барков И.Ю., Бахарев В.А., Каретникова Н.А. 1999. Пренатальное определение пола (обзор литературы). *Проблемы репродукции.* **1**, 5–14.
5. Evans M.I., Wapner R.J. 2005. Invasive prenatal diagnostic procedures. *Semin. Perinatol.* **29**, 215–218.
6. Ajayi G.O. 2009. Chorionic villus sampling: analysis of the first 350 singleton pregnancies by a single operator. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* **36**, 251–253.
7. Kong C.W., Leung T.N., Leung T.Y., et al. 2006. Risk factors for procedure-related fetal losses after mid-trimester genetic amniocentesis. *Prenatal Diagn.* **26**, 925–930.
8. Willruth A., Vieten J., Berg C., et al. 2010. Decision making and attitudes towards invasive prenatal diagnosis in the early second trimester. *Ultraschall. Med.* In press.
9. Nakata N., Wang Y., Bhatt S. 2010. Trends in prenatal screening and diagnostic testing among women referred for advanced maternal age. *Prenatal Diagn.* **30**, 198–206.
10. Sekido R. 2010. SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 417–420.
11. Zimmermann B.G., Maddocks D.G., Avent N.D. 2008. Quantification of circulatory fetal DNA in the plasma of pregnant women. *Prenatal Diagn.* Totowa, NJ, USA: Humana Press, 219–231.
12. Floriano-Sánchez E., Cárdenas-Rodríguez N., Castro-Marín M., et al. 2009. *DD3(PCA3)* gene expression in cancer and prostatic hyperplasia. *Clin. Invest. Med.* **32**, E258.
13. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. 2008. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике. *Молекуляр. биология.* **42**, 12–23.
14. Farina A., LeShane E.S., Lambert-Messerlian G.M., et al. 2003. Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *Clin. Chem.* **49**, 239–242.
15. Zhong X.Y., Holzgreve W., Tercanli S., et al. 2006. Cell-free foetal DNA in maternal plasma does not appear to be derived from the rich pool of cell-free foetal DNA in amniotic fluid. *Arch. Gynecol. Obstet.* **273**, 221–226.
16. Lo Y.M.D. 2008. Fetal nucleic acids in maternal plasma. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1137**, 140–143.
17. Lo Dennis Y.M., Chiu R.W.K. 2007. Prenatal diagnosis: progress through plasma nucleic acids. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 71–77.