

ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФОРМАТИВНОСТИ STR-ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА РАН ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИДЕНТИФИКАЦИОННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

О.Н.Одинокова, Л.М.Демуров*, О.Г.Карташова**,
И.А.Ефремов*, А.И.Кутмин, В.П.Пузырев

*НИИ медицинской генетики ТНЦ СО РАМН; *Государственный научный центр
ГосНИИ генетика, Москва; **Экспертно-криминалистическое управление УВД
Томской области*

Изучен полиморфизм тандемного ТСТА-повтора гена РАН у жителей Москвы и Западной Сибири. Выявлены 8 вариантов аллелей размером 228-256 п. н. Показано соответствие распределения частот встречаемости генотипов в обоих выборках равновесию Харди—Вайнберга и отсутствие статистически значимых межпопуляционных различий. Определены параметры информативности изученного локуса для использования в идентификационных исследованиях.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм, микросателлитные повторы, ген РАН, полимеразная цепная реакция

В настоящее время в идентификационных исследованиях в практике криминалистики и судебно-медицинских исследованиях применяются молекулярно-генетические методы, основанные на генотипировании. Наиболее интенсивно изучаются полиморфные локусы генома, известные как тандемные повторы с изменяющимся числом копий, в частности микросателлитов или STR (short tandem repeats) — с размером повторяющегося фрагмента 2-7 п. н. Такие локусы часто высокополиморфны, что и обуславливает их применение в медико-генетических целях. У американских европеоидов описан микросателлитный повтор в гене фенилаланингидроксилазы (РАН, хромосомная локализация — 12q22-q22.4 [3]), расположенный в 3-м интроне гена [3]. Данный STR-локус содержит различное число копий (повторов) последовательности 4 нуклеотидов — ТСТА.

Задача настоящего исследования — изучить полиморфизм тандемного ТСТА-повтора гена РАН у жителей двух различных регионов России (Москвы и Западной Сибири) и оценить параметры информативности локуса для идентификационных исследований в российских популяциях.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на образцах ДНК, выделенных из крови неродственных представителей смешанной русскоязычной популяции Западной Сибири (Томск, Новосибирск) и популяции Москвы [4].

Методом ПЦР [7] исследовали область гена РАН, содержащую микросателлитные (ТСТА)_n-повторы. Олигонуклеотидные праймеры синтезировали фосфитамидным методом на ДНК-синтезаторе ASM-102U (“Biosset”) согласно описанной структуре [3]: пр. F: 5'-GCC-AGA-ACA-ATA-CTG-GTT-C-3', пр. R: 5'-AAT-CAT-AAG-TGT-TCC-CAG-AC-3'. ПЦР проводили на амплификаторе “MiniCycler™” (“MJ Research Inc.”). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 0.1-0.2 мкг геномной ДНК, 40 пМ каждого праймера, 67 мМ трис-HCl pH 8.8 при 20°C, 16.6 мМ сульфата аммония, 4 мМ хлористого магния, 10 мМ 2-меркаптоэтанола, смесь 4 основных dNTP (по 0.2 мМ каждого) и 2 ед. Taq-полимеразы (“СибЭнзим”). После начальной денатурации (94°C, 4 мин) 33 цикла ПЦР проводили в режиме: 93°C — 40 с; 55°C — 30 с; 72°C — 1 мин. На последнем цикле стадию синтеза (при 72°C) продлевали до 5 мин.

Продукты амплификации анализировали в 8% ПААГ длиной 20 см. На дорожку геля вносили 3-5 мкл реакционной смеси. Гели окрашивали бромистым этидием (0.5 мкг/мл). Для идентификации аллелей использовали соответствующие

для данного локуса аллельные лэддеры и ДНК с известными генотипами. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли в УФ-свете с применением системы компьютерной видеосъемки гелей на приборе "UV-VIS Imager II".

Таблица 1. Частота встречаемости генотипов локуса PАН в двух популяционных выборках России

Генотип	Западная Сибирь		Москва	
	количество наблюдений	частота встречаемости	количество наблюдений	частота встречаемости
1 — 1	0	0	0	0
1 — 2	0	0	0	0
1 — 3	1	9	0	0
1 — 4	0	0	1	14
1 — 5	1	9	0	0
1 — 6	1	9	0	0
1 — 7	1	9	0	0
1 — 8	0	0	0	0
2 — 2	0	0	0	0
2 — 3	1	9	1	14
2 — 4	2	17	0	0
2 — 5	2	17	3	42
2 — 6	2	17	3	42
2 — 7	0	0	1	14
2 — 8	0	0	0	0
3 — 3	1	9	2	28
3 — 4	5	43	5	69
3 — 5	10	87	4	56
3 — 6	4	35	2	28
3 — 7	2	17	0	0
3 — 8	0	0	0	0
4 — 4	7	61	5	69
4 — 5	23	20	11	153
4 — 6	12	104	10	139
4 — 7	1	9	2	28
4 — 8	0	0	0	0
5 — 5	16	139	9	125
5 — 6	13	113	7	97
5 — 7	3	26	1	14
5 — 8	2	17	1	14
6 — 6	5	43	1	14
6 — 7	0	0	3	42
6 — 8	0	0	0	0
7 — 7	0	0	0	0
7 — 8	0	0	0	0
8 - 8	0	0	0	0
Всего...	115	1000	72	1000

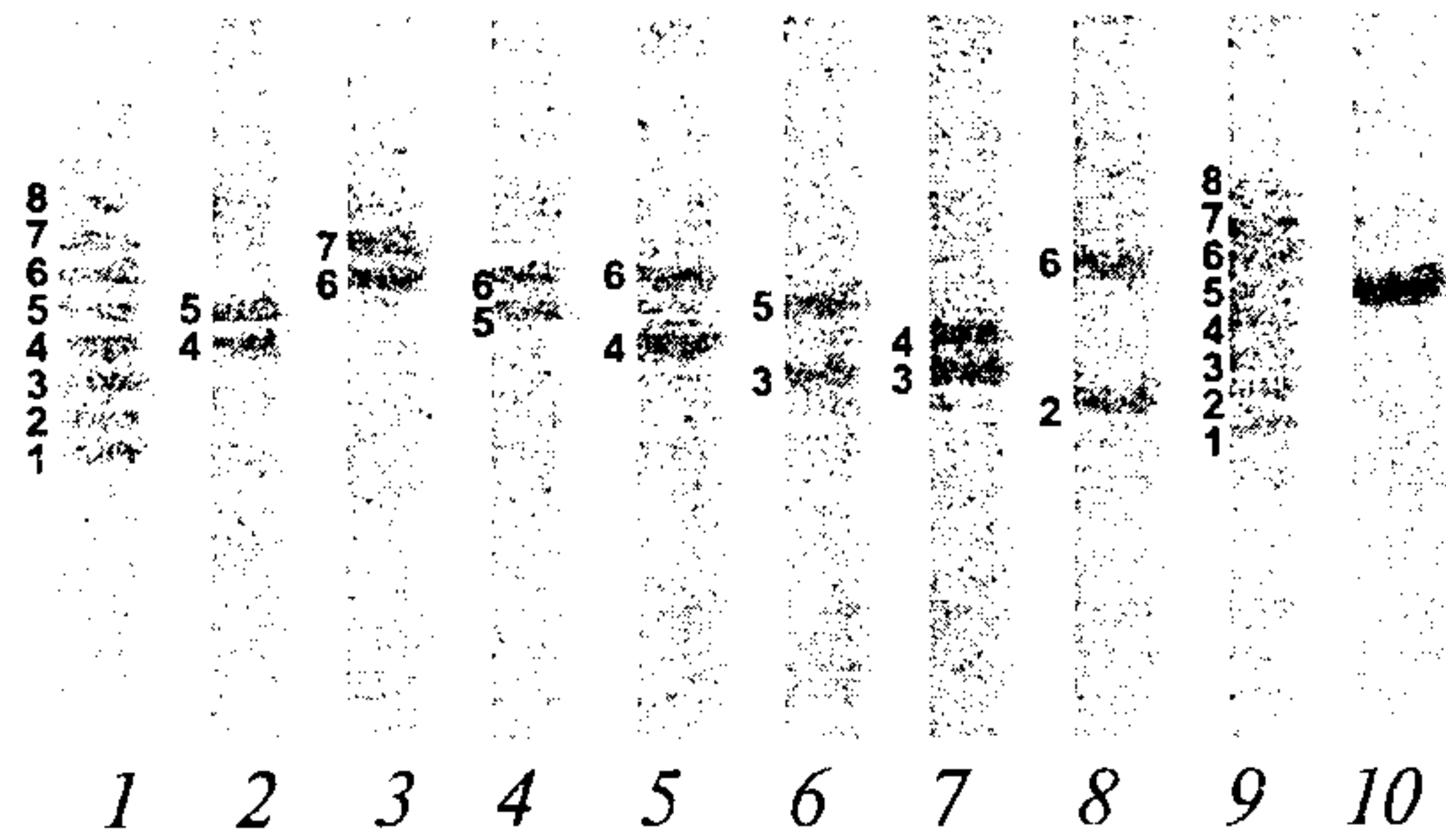


Рис. 1. Электрофореграмма анализа STR-полиморфных аллелей гена RAN в 8% ПААГ.

1, 9 — аллельные лэддеры; 2-8 — генотипирование неродственных людей.

Частоты генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди—Вайнберга по критериям χ^2 и G-статистики с помощью компьютерной программы R×C (Rows×Columns) на основе описанного алгоритма [5]. Ожидаемую гетерозиготность и параметры информативности изученного

локуса: вероятность случайного совпадения генотипов двух неродственных индивидов (pM), среднюю вероятность исключения исследуемого образца по заданному генотипу (W), информационное содержание полиморфизма (PIC) рассчитывали с помощью компьютерной программы [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании генотипированы варианты микросателлитных TCTA-повторов гена RAN у 187 человек, представляющих 2 выборки из различных популяций России: русские жители Западной Сибири ($n=115$) и Москвы ($n=72$). Методом ПЦР в 3-м интроне гена RAN выявлены 8 вариантов аллелей (рис. 1) длиной 228-256 п. н.

Полученное распределение частот встречаемости генотипов (табл. 1) соответствовало распределению Харди—Вайнберга в обеих популяционных группах (табл. 2). Это указывает на отсутствие внутренней гетерогенности изученных

Таблица 2. Значения критериев полиморфизма, тестов χ^2 и G-статистики для локуса RAN в изученных популяционных выборках ($M \pm m$)

Параметры	Западная Сибирь	Москва	Объединенные данные
Ожидаемая гетерозиготность (H_{obs})	0.748	0.764	0.754
Наблюдаемая гетерозиготность (H_{exp})	0.751±0.040	0.776±0.049	0.762±0.031
pM	0.099	0.084	0.092
W	0.684	0.735	0.706
PIC	0.605	0.640	0.620
χ^2	6.4651	10.1192	7.1238
Вероятность	1	0.9920±0.0028	1
G-статистика	8.0384	12.5450	8.3582
Вероятность	1	0.9880±0.0034	1

Таблица 3. Частоты встречаемости аллелей локуса RAN в русской популяции ($\times 10^3$, $M \pm m$)

Аллель	Длина аллеля, п. н.	Количество наблюдений	Частота встречаемости аллеля	Наибольшая частота аллеля
1	228	5	13±6	25
2	232	15	40±10	60
3	236	41	110±16	141
4	240	96	257±23	301
5	244	131	350±25	399
6	248	69	184±20	224
7	252	14	37±10	57
8	256	3	8±5	17
Всего...		374	1000±114	1223

групп. Самыми распространенными были аллели 4-6. Спектр РАН-аллелей и их относительные частоты встречаемости были сходны в двух изученных выборках и в целом соответствовали описанному для европеоидного (американского) населения (рис. 2) [3].

Параметры аллельного полиморфизма свидетельствуют (табл. 2) о том, что изученный микросателлитный локус гена РАН является высокоинформативным для генетических исследований (молекулярная диагностика) и решения прикладных идентификационных задач. Генотипирование вариантов гена было апробировано в практике криминалистических экспертиз ЭКУ УВД Томской области, где показана их информативность при исследовании различных объектов (кровь, в том числе старые пятна крови и трупная кровь; слюна; окурки сигарет; кости, в том числе частично разложившиеся; образцы вагинального содержимого жертв) и возможность уверенного анализа аллелей как в препаратах высокомолекулярной ДНК, так и в образцах частично деградированной ДНК в количестве от 1 нг (иногда и меньше) до 50 нг, аллелей изученного полиморфного локуса гена РАН [2].

Осуществленный нами сравнительный анализ с применением программы R×C в двух выборках не обнаружил значимых межпопуляционных различий частот выявленных генотипов ($\chi^2=21.0400$ при $p=0.7080\pm 0.0144$; G-статистика=25.4202 при $p=0.7230\pm 0.0142$) и частотного распределения аллелей ($\chi^2=4.0871$ при $p=0.7980\pm 0.0127$; G-статистика=4.1048 при $p=0.8100\pm 0.0124$).

Сходный характер аллельных профилей двух географически удаленных популяций России позволяет экстраполировать аллельные частоты, определенные в суммарной репрезентативной выборке (Москва и Западная Сибирь), на все русское население без риска существенно завысить потенциал индивидуализации. В табл. 3 приведены объединенные данные по частотам

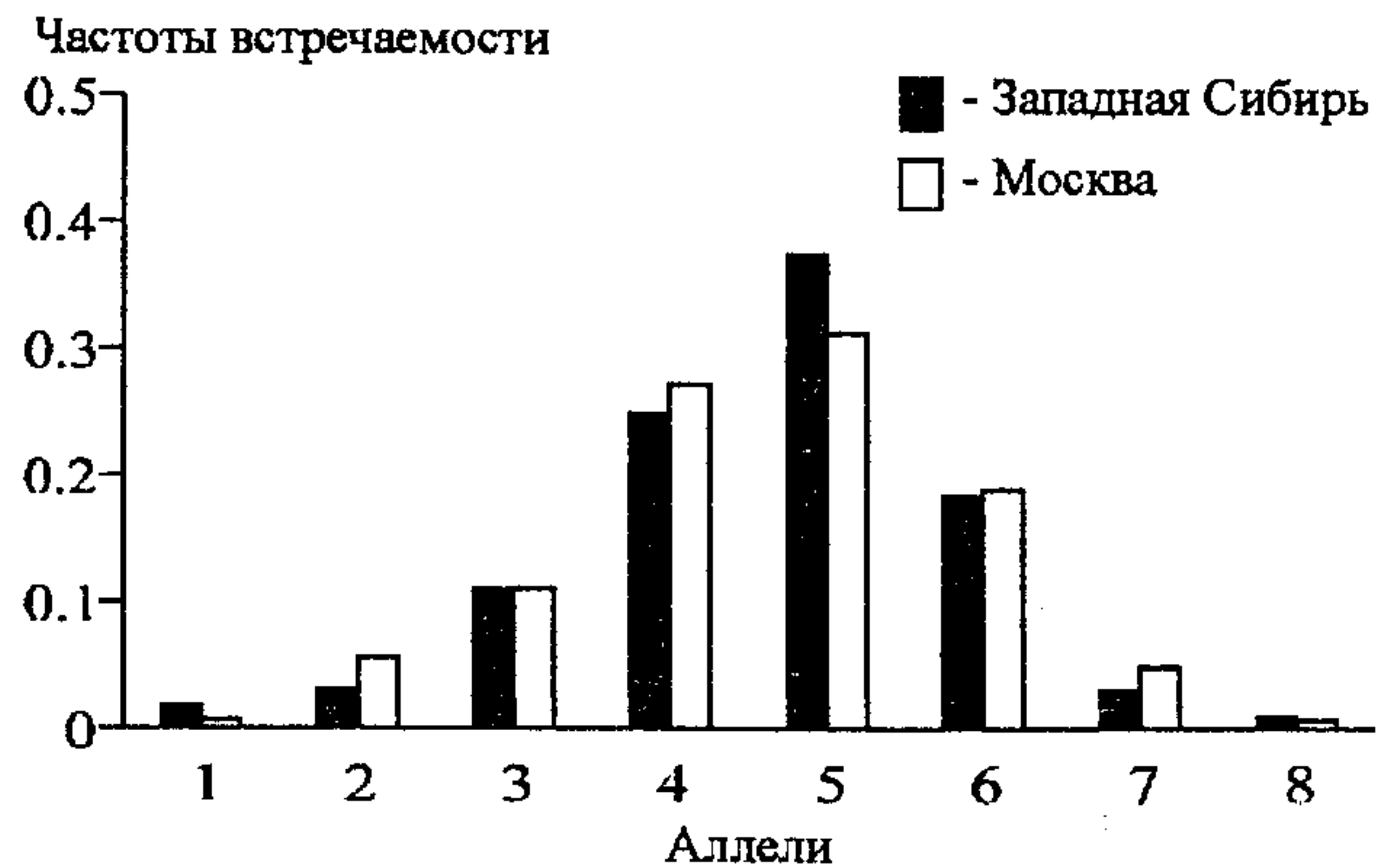


Рис. 2. Частоты встречаемости STR-аллелей в локусе РАН в двух популяционных выборках.

встречаемости аллелей локуса РАН, которые можно рекомендовать для использования в вероятностных расчетах при идентификационных исследованиях.

Параметры аллельного полиморфизма свидетельствуют о том, что исследованный микросателлитный локус гена РАН у русского населения России является высокоинформативным для генетических исследований и решения прикладных идентификационных задач при идентификации личности, спорном отцовстве, криминалистических исследованиях и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ефремов И.А., Чистяков Д.А., Носиков В.В. // Молекул. биол. - 1996. - Т. 30. - С. 310-321.
2. Одинокова О.Н., Кутмин А.И., Карташова О.Г., Пузырев В.П. // В кн.: Генетика человека и патология. - Томск, 1997. - С. 127-135.
3. Goltsov A.A., Eisensmith R.C., Naughton E.R. et al. // Hum. Mol. - 1993. - Vol. 2. - P. 577-581.
4. Johns M.B., Paulus-Thomas J.E. // Anal. Biochem. - 1989. - Vol. 180. - P. 276-278.
5. Roff D.A., Bentzen P. // Mol. Biol. Evol. - 1989. - Vol. 6. - P. 539-545.
6. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. et al. // Science. - 1988. - Vol. 239. - P. 487-491.