

**ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ДНК ЖИТЕЛЕЙ УКРАИНЫ,
ВЫЯВЛЯЕМОГО ЗОНДОМ НА ОСНОВЕ ФАГА M13**

Проведен анализ VspRI- и HinfI-полиморфизма ДНК жителей Украины, выявляемого зондом, на основе фага M13. Вероятность совпадения двух маркерных полос в регионе от 3 до 8 т.п.н. составила 0,22 для Vsp-полиморфизма и 0,34 для HinfI-полиморфизма. Показатель сходства по Ли между родителями, равен 0,44 для VspRI-полиморфизма . 0,45 для HinfI-полиморфизма. Полученные характеристики, могут, быть использованы для корректного описания геномных профилей жителей. Украины.

Введение. Геномная дактилоскопия, т. е. метод выявления и анализа гипервариабельных участков генома (ГУГ), находит все более широкое применение. ГУГ, или как их еще называют «минисателлиты», описанные Джефрисом и соавт. в середине 80-х годов [1], характеризуются высокой ге-терозиготностью, кодоминантным характером наследования аллелей. Ге-номные профили, т. е. картины, выявляемые при геномной дактилоскопии, характеризуются соматической и онтогенетической стабильностью. По приблизительным оценкам, в геноме человека насчитывается около 1500 диспергированных локусов данного типа. Все это создает хорошие предпосылки для использования метода геномной дактилоскопии при решении как генетических (генетическое маркирование различных групп организмов и, в частности, линейных объектов; оценка генетической стабильности организмов при действии различных возмущающих факторов; популяционные исследования и др.), так и прикладных задач (достоверное установление родства и идентификация личности в судебной медицине; создание «генетических паспортов» линейных объектов и контроль их чистоты и т. п.). Зонд на основе фага M13, описанный Вассартом и др. [2], а также Рысковым и др. [3], является одним из наиболее распространенных зондов, применяемых для выявления гипервариабельных участков генома организмов, принадлежащих к различным таксономическим группам [2]. Зонд на основе фага M13, как и зонды 33-6 и 33-15, созданные Джефрисом и соавт. [1], является полилокусным, т. е. выявляет определенное семейство «минисателлитов». Как было неоднократно показано [2, 4, 5], данное семейство гипервариабельных участков генома характеризуется схожими свойствами как с семейством «минисателлитов», выявляемых зондами 33-6 и 33-15, так и рядом других известных на сегодняшний день ГУГ. Основным препятствием на пути широкого применения метода геномной дактилоскопии является проблема однозначной идентификации конкретных локусов при анализе нескольких геномных профилей. Это связано как с низкой точностью определения размера фрагмента в агарозном геле, так и с невозможностью индивидуальной идентификации комигрирующих полос, принадлежащих к разным локусам, при применении полилокусных зондов. Однако при решении многих задач данные ограничения можно обойти.

Для решения как научных, так и прикладных задач необходимо учитывать такие статистические характеристики, как средняя частота встречаемости маркерных фрагментов в популяции, вероятность случайного совпадения маркерных полос, вероятность идентификации личности и др. В ряде работ [4, 5, 8] были опубликованы данные, полученные при изучении VspRI-полиморфизма нескольких популяций России. В настоящей работе приводятся результаты анализа VspRI и HinfI ДНК-полиморфизма геномных профилей жителей Украины, выявляемого при помощи зонда на основе фага M13.

Материалы и методы. В работе были исследованы образцы крови семей, проживающих в различных областях Украины (36 родителей и 20 детей при анализе Vsp-полиморфизма и 28 родителей и 16 детей при анализе HinfI-полиморфизма).

Выделение ДНК. К 5 мл крови добавляли равный объем дистиллированной воды, гемолизировали на льду 5 мин и осаждали лейкоциты центрифугированием при 4 °С и 10000 g в течение 15 мин. К осадку добавляли 10 мл сахарозного лизирующего буфера (330 мМ сахароза, 0,2% Triton X100, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 7,6) и растирали на льду гомогенизаторе Поттера 3 — 5 мин. Полученную суспензию центрифугировали при 4500 g и температуре 4°С 20 мин. К осадку, содержащему ядра и клеточный дебрис, добавляли 3 мл раствора для лизиса ядер

(10 мМ трис-НСI, 100 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, рН 8,0), 300 мкл 10 % SDS и протеиназу К до конечной концентрации 50 мкг/мл. Тщательно перемешивали инкубировали полученную смесь 18 ч при 37 °С. Затем добавляли 1 мл 5М NaCl и, тщательно перемешав, центрифугировали при комнатной температуре 4500 g в течение 20 мин. К супернатанту добавляли 0,7 объема изопропанола, наматывали ДНК на стеклянную палочку, промывали в 70 этаноле и, подсушив на воздухе, растворяли в 500 мкл ТЕ-буфера. Полученные образцы хранили при 4 °С.

Рестрикция и фракционирование ДНК. По 10 мкг каждого образца ДНК обрабатывали трехкратным избытком рI стриктаз BspRI и (отдельно) HinfI ("МВI Fermentas", Литва) в течение 4 ч. Полученные рестрикты переосаждали с ацетатом аммония и растворяли дистиллированной воде. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 0,9 % агарозном геле 36 ч при 2 В/см. После разделения фрагментов ДНК проводили электроперенос на капроновые мембраны «Хи Каллур» (Таллинн) в аппарате «НFI» США в 25 мМ фосфатном буфере (рН 6,5) 2,5 ч с принудительным охлаждением.

Гибридизация. Зонд с высокой удельной активностью получали достройкой на одонитевой форме фага М13 при помощи специфического праймера, отжигающегося вблизи гипервариабельного участка фагового гена III [6]. Для этого к 1 мкг SS формы фага М13 добавляли 8 нг праймера. Смесь инкубировали 30 мин при 60 °С, после чего добавлял дАТФ, дТТФ, дГТФ и 100 мкКи [α -P-³²]дЦТФ (Ташкент) и 2 ед фрагмента Кленова. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до 25 мМ. Очистку синтезированного зонда проводили, как описано нами в [6]. Для прегибридации помещали по 2 фильтра в герметичный полиэтиленовый пакет проводили гибридизацию, как описано в [7], в течение 2 сут при 58,5° С. Фильтры три раза по 10 мин отмывали в растворе 3xSSPE 0,1 % SDS при комнатной температуре и экспонировали 7 — 15 сут с пленкой РМ-1 в рентгеновских кассетах с усиливающими экранами.

Результаты исследований и их обсуждение. На полученных геномных профилях выявляются маркерные полосы в регионе от 15 до 2 т. п. н. Однако в связи с неудовлетворительным разрешением низкомолекулярных фрагментов, а также с невозможностью точной локализации высокомолекулярных полос нами был проанализирован регион от 8 до 3 т. п. н. Для этого указанная зона электрофореграммы была разбита на 33 участка с учетом возможных погрешностей при определении размера фрагментов различной молекулярной массы. Размер фрагментов на геномных профилях определяли по маркерам молекулярной массы λ /HindIII, λ /EcoRI, M13/ClaI и контрольному образцу ДНК. Для этого измеряли расстояние от старта до центра маркерной полосы на геномном профиле и, рассчитав молекулярную массу фрагмента, относили его к одному из дискретных участков. Дальнейший анализ проводили, исходя из предположения, что фрагменты, отнесенные к определенному участку, представляют собой один и тот же аллель некоторого гипервариабельного локуса. Следует, однако, заметить что при данном подходе возможны ошибки, поскольку частоты проявления фрагментов в каждом из дискретных участков могут представлять собой суммарные частоты аллелей разных локусов. Полностью устранить данную ошибку можно лишь при использовании локуспецифических зондов.

Анализ Bsp-полиморфизма. В регионе от 3 до т. п. н. в среднем выявляется $14,8 \pm 1,4$ маркерных полос (от 8 до 20). Не было обнаружено достоверных отличий количества маркерных полос между мужчинами и женщинами, родителями и детьми. Как и ожидалось, ребенок наследует маркеры от матери и отца примерно в соотношении 1 : 1. При этом авторами не было отмечено каких-либо фактов, противоречащих гипотезе кодоминантного, не сцепленного с полом, наследования маркерных полос. В проанализированном регионе вероятность совпадения двух маркерных полос p_i (где i — условный номер дискретного участка) колеблется от 0,02 до 0,52 (рис. 1).

Значения вероятности для фрагментов различных молекулярных масс составили (\pm среднее квадратическое отклонение): для региона 8,0 — 6,0 т. п. н. — $p_{0,9} = 0,15 \pm 0,11$; 6,0 — 4,0 т. п. н. — $p_{10-22} = 0,22 \pm 0,12$; 4,0 — 3,0 т. п. н. — $p_{23-32} = 0,30 \pm 0,14$. Вероятность совпадения двух маркерных полос p_{0-32} в регионе от 3 до 8 т.п.н. составила $0,22 \pm 0,13$. Данная величина сопоставима с оценками, полученными при изучении российских популяций [8]. Как неоднократно было показано ранее [8, 9], вероятность совпадения маркерных полос растет с уменьшением размера анализируемых фрагментов. Средняя вероятность идентификации личности рассчитывалась по формуле $P=1 - p^d$ (где p — вероятность совпадения двух маркерных полос в популяции, d — среднее число полос у одного индивида) и составила $1 - 1,8 \cdot 10^{-10}$. Данная величина не

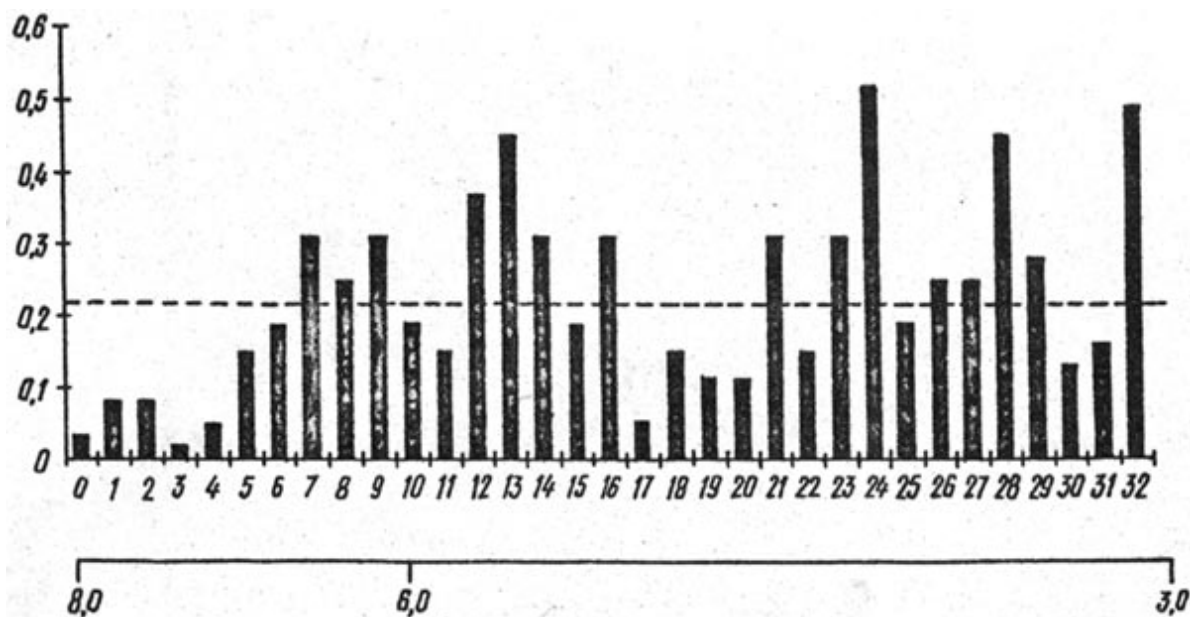


Рис. 1 Гистограмма распределения вероятности совпадения двух маркерных полос в зависимости от их электрофоретической подвижности для BspRI-полиморфизма: по горизонтали — номера маркерных полос, по вертикали — вероятность совпадения; внизу указан размер фрагментов в т.п.н.

отличается как от величины, показанной для выборки населения России [10], так и значений, полученных при оценках применения зондов Джеффриса [9].

Однако полученная нами характеристика распределения вероятностей совпадения маркерных полос в зависимости от их молекулярной массы может быть использована для более корректного определения данной величины, исходя из конкретного набора маркерных полос. Был также проведен анализ сходства между индивидами в данной выборке жителей Украины по формуле, предложенной Ли и соавт. [11]: $S = (n_{xy}/2) - (1/n_x + 1/n_y)$, где n_{xy} — число совпадающих полос у индивидов А и Б, n_x — общее число полос у индивида А, n_y — число полос у индивида Б. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Значения показателей сходства (S) по Ли, полученные при анализе BspRI-полиморфизма

Анализируемая пара	S	Анализируемая пара	S
Мать — отец	0,48 ± 0,16	Родитель — родитель	0,44 ± 0,02
Мать — ребенок	0,62 ± 0,05	Дети из разных семей	0,45 ± 0,03
Отец — ребенок	0,70 ± 0,08	Родители — дети из	0,45 ± 0,02
Родитель — ребенок	0,65 ± 0,05	разных семей	

Примечание. Доверительные границы для S определены по Стьюденту (P=0,05).

Нами не было выявлено каких-либо отличий показателей сходства внутри родительских пар, родителей из разных пар, родителей и детей. Аналогичные результаты были получены при изучении выборки жителей России [4].

Анализ HinFI-полиморфизма. В проанализированном регионе в среднем выявляется $15,7 \pm 13$ маркерных полос (от 8 до 20). Как и при анализе BspRI-полиморфизма, не было обнаружено фактов, противоречащих гипотезе кодоминантного наследования маркерных полос. Вероятность совпадения двух фрагментов на геномном профиле изменяется в зависимости от размера фрагмента от 0,02 до 0,81 (рис. 2).

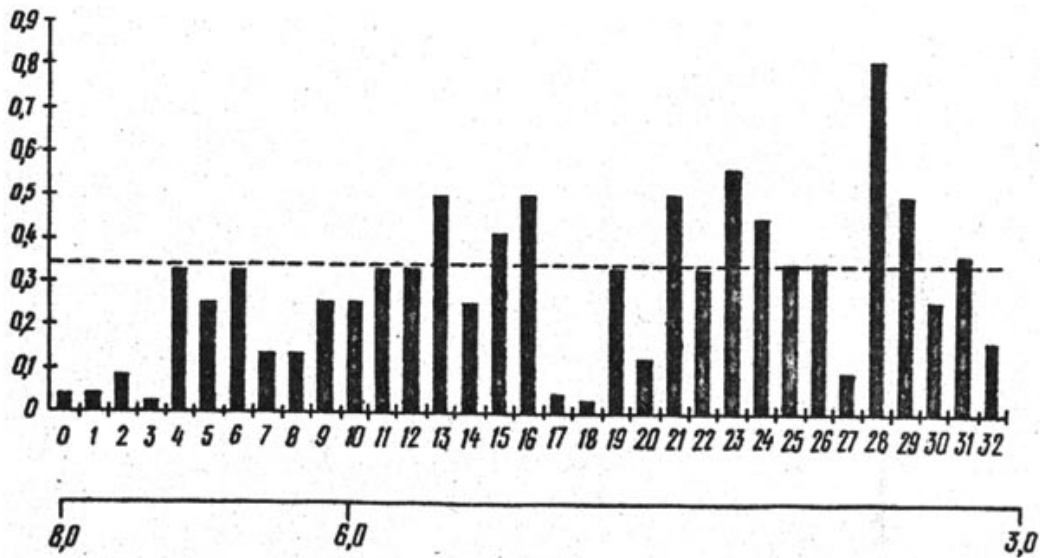


Рис. 2. Гистограмма распределения вероятности совпадения двух маркерных полос в зависимости от их электрофоретической подвижности для *HinfI*-полиморфизма. Обозначения см. в подписи к рис. 1

Вероятности совпадения маркеров составили: для региона от 8,0 до 6,0 т. п. н. — $p_{0-9} = 0,16 \pm 0,12$; 6,0 — 4,0 т. п. н. — $p_{10-22} = 0,30 \pm 0,14$; 4,0 — 3,0 т. п. н. — $p_{23-32} = 0,39 \pm 0,21$. Вероятность совпадения маркерных полос для всего анализируемого участка геномного профиля p_{Hinf} составила $0,34 \pm 0,18$. Авторам не известны данные по изучению *HinfI*-полиморфизма в комбинации с зондом на основе M13. Полученное значение несколько выше, чем при использовании фермента *BspRI* и зондов Джеффриса в комбинации с ферментом *HinfI* [9]. Как и при анализе *BspRI* полиморфизма, отмечено повышение вероятности совпадения маркерных полос при уменьшении молекулярной массы и для данной пары зонд/фермент. Средняя вероятность идентификации личности составила $1 - 4,4^{-8}$. Однако корректная оценка, как и в предыдущем случае, возможна лишь при анализе конкретного набора маркерных фрагментов.

Результаты определения показателей сходства по Ли приведены в табл. 2

Легко заметить, что полученные значения сходны с величинами, полученными при анализе *BspRI*-полиморфизма.

Таблица 2

Значения показателей сходства (S) по Ли, полученные при анализе <i>HinfI</i> -полиморфизма			
Анализируемая пара	S	Анализируемая пара	S
Мать — отец	$0,49 \pm 0,11$	Родитель — родитель	$0,45 \pm 0,02$
Мать — ребенок	$0,72 \pm 0,12$	Дети из разных семей	$0,48 \pm 0,04$
Отец — ребенок	$0,71 \pm 0,09$	Родители — дети из разных семей	$0,45 \pm 0,01$
Родитель — ребенок	$0,72 \pm 0,07$		

Примечание. Доверительные границы для S определены по Стьюденту ($P=0,05$).

Из изложенного выше видно, что фермент *HinfI* в комбинации с зондом на основе фага M13 позволяет получать геномные профили, сопоставимые по своей информативности с картинами *BspRI*-полиморфизма. Применение двух ферментов часто необходимо для повышения достоверности проводимых экспериментов, поскольку при таком подходе имеет место «перекомбинация полос» [2]. И вследствие этого удается разделять «сомнительные» полосы на геномных профилях.

Выводы. Таким образом нами был проанализирован *BspRI*- и *HinfI*-полиморфизм ДНК жителей Украины с использованием зонда на основе фага M13. Приведены основные характеристики геномных профилей изученной группы, проанализированы показатели сходства по Ли, проведено сравнение с данными, опубликованными для других популяций. Полученные характеристики

могут быть использованы для корректного описания геномных профилей жителей Украины при проведении различных исследований.

S U M M A R U. BspRI and HinfI polymorphism of DNA in the inhabitants of Ukraine was analyzed with probe based on M13 phage. In the region 3 — 8 kb, the mean probabilities of coincidence of to marker bands comprised 0,22 for BspRI polymorphism and 0,34 for HinfI polymorphism. The indexes of similarity by Lee between the parents comprised 0,44 for BspRI polymorphism and 0,45 for HinfI polymorphism. The characteristics obtained may be used for the correct description of DNA fingerprints in the inhabitants of Ukraine.

РЕЗЮМЕ. Проведено аналіз BspRI- та HinfI-поліморфізма ДНК жителів України, що виявляється зондом на основі фагу M13. Вірогідність збігу двох маркерних смуг у регіоні 3 — 8 т. п. н. складає 0,22 для BspRI-поліморфізма та 0,34 для HinfI-поліморфізма. Показник подібності за Лі дорівнює 0,44 для BspRI-поліморфізма та 0,45 для HinfI-поліморфізма. Одержані характеристики можуть бути використані для коректного описування геномних профілів жителів України.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jeffreys A. /, Wilson K, Thein S. L.* Hypervariable «minisatellite» regions // *Nature*. — 1985. — 314, N 7. — P. 67 — 73.
2. *Рысков А. П., Джинчарадае А.Г. Просняк М. И. и др.* Геномная «дактилоскопия» организмов различных таксономических групп: использование в качестве гибридационной пробы ДНК фага M13 // *Генетика*. — 1988. — 24, N Z — С. 227 — 238.
3. *Vassart G., Georges M., Monster R. et al* A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA // *Science*. — 1987. — 235, N 4789. — P. 683 — 684.
4. *Семина (Барышева) Е. Д, Букина А. М, Гинтер Е. К. и др.* Семейный анализ «фингерпринтов» человека, полученных с помощью зонда ДНК фага M13 // *Генетика*. — 1993. — 29, № 10. — С. 1608 — 1611.
5. *Семина (Барышева) Б. В, Букина А. М, Стариева Е. А. и др.* Генетические расстояния между популяциями различной этнической принадлежности, рассчитанные на основе полиморфизма ДНК, выявляемого гипервариабельной пробой фага M13 // *Генетика*. — 1993. — 29, № 10. — С. 1612 — 1619.
6. *Telegeev G. D, Dybkov M. V, Kiyantsa K. N.* Optimization of conditions of obtaining the high-label single strain probe based on the M13 phage // *Биополимеры и клетка*. — 1995. — 11, № 3/4. — С. 104 — 105.
7. *Westneat D. F, Noon W. A, Reeve H. K. et al.* Improved hybridization conditions for DNA «fingerprints» probed with M13 // *Nucl. Acids Res.* — 1988. — 16, N 9. — P. 4161.
8. *Барышева Е. Д, Букина А. М, Петрова Н. В. и др.* Использование полиморфизма ДНК, выявляемого с помощью ДНК фага M13 в популяционных исследованиях // *Генетика*. — 1991 — 27, № 3. — С. 399 — 403.
9. *Jeffreys A. У, Wison V, Thein S. L.* Individual-specific «fingerprints» of human DNA // *Nature*. — 1985. — 316. — P. 76 — 79.
10. *Иванов П. Л, Гуртовая С. В, Вербовая Л. В. и др.* Геномная «дактилоскопия» в экспертизе спорного Отцовства и определении биологического родства // *Суд. экспертиза*. — 1990. — № 2. — С. 36 — 38.
11. *Li. C. C, Weeks D, Я, Ferrell S. E. et al.* A new measure of similarity of DNA fingerprints // *Amer. J. Hum. Genet* - 1991 — 49, N 4. — P. 14.
12. *Анализ генома. Методы / Под. ред. К. Дейвиса.* — М- Мир, 1990. — 246 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики НАН Украины, Киев

Поступила 09. 10. 95