

УДК 575.1:577.1

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДВУХ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНЫХ РАЙОНОВ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА В РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ МОСКВЫ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 1996 г.

И.А. ЕФРЕМОВ, Д.А. ЧИСТЯКОВ, В.В. НОСИКОВ

Государственный научный центр Российской Федерации «ГосНИИгенетика», Москва, 113545

На основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведен анализ аллельного полиморфизма двух гипервариабельных локусов (D1S111 и RB1-VNTR) среди 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве. Обнаружено 14 аллелей локуса D1S111 размером от 381 до 862 п.н. и 9 аллелей локуса RB1-VNTR длиной от 1200 до 1650 п.н. Определена нуклеотидная последовательность одного из аллелей локуса D1S111, что позволило классифицировать аллели по числу содержащихся в них тандемных повторов. Показано соответствие экспериментальных значений частот встречаемости генотипов равновесному распределению Харди-Вайнберга в исследованной выборке для обоих локусов. Проведен сравнительный анализ распределения аллельных частот локуса RB1-VNTR в русской и американских популяциях. Предложено использовать данные полиморфные локусы при идентификации личности и определении спорного отцовства.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция, аллельный полиморфизм, минисателлит р33.6, RB1-VNTR, русская популяция.

Класс полиморфных локусов, известных как тандемные повторы с изменяющимся числом копий (variable number of tandem repeats, VNTR), характеризуется высокой степенью индивидуального полиморфизма в геноме человека [1], что обуславливает их широкое использование в качестве генетических маркеров при картировании генома, идентификации личности и при определении родства между индивидуумами.

Веллер и соавт. [2] обнаружили внутри интрона 1 гена миоглобина человека последовательность, состоящую из четырех тандемных повторов длиной по 33 п.н. 33-членный повторяющийся элемент выделили из генома, клонировали и использовали в качестве зонда для гибридизации с геномной ДНК человека [3]. В результате показали наличие в геноме целого семейства повторов, нуклеотидная последовательность которых была частично комплементарна последовательности данного зонда [3, 4]. К их числу принадлежит и минисателлит р33.6, расположенный в локусе D1S111 (хромосомная локализация 1cen-q24) и состоящий из тандемно повторяющихся последовательностей со средней длиной 37 п.н. [3]. Джеффрис и соавт. [3] показали высокий уровень полиморфизма этого локуса: 8 аллелей было обнаружено при гибридизационном анализе образцов ДНК 14 неродственных британцев.

Гипервариабельный локус RB1-VNTR расположен внутри интрона 16 гена ретинобластомы (RB1), являющегося геном-супрессором, вовлеченным в процесс образования злокачественных опухолей глаз у детей. Ген, связанный с предрасположенностью к ретинобластоме, расположен на хромосоме 13q14 и имеет длину около 200 т.п.н. [5-7]. Хорштемке и соавт. [8] показали отчетливую корреляцию

между соматической потерей гетерозиготности в гене RB1 и риском развития ретинобластомы. Уровень полиморфизма, выявленного для RB1-VNTR, позволяет считать его информативным маркером в исследованиях сцепленности генов с заболеваниями, а также для идентификации личности [7, 9].

Длины tandemных повторов RB1-VNTR, как и DIS111, зависят от наличия внутренних нуклеотидных вставок и делеций. Шарф и соавт. [9] при анализе аллельного полиморфизма локуса RB1-VNTR использовали средний размер повторяющейся единицы в 50 п.н. Непостоянство длины tandemного повтора показано для многих VNTR, например, для COL2A1 и ApoB 3' VNTR [10, 11].

Использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) [12] в отличие от анализа полиморфизма длин рестриктазных фрагментов (RFLP-анализ) [13] при изучении переменных локусов позволяет идентифицировать аллели, различающиеся между собой лишь на длину одного повтора и точно определять их размеры. Возможность точного генотипирования исследуемых образцов, в том числе при анализе малых количеств (5–10 нг) и/или деградированной ДНК, делает AMP-FLP анализ (PCR-amplified fragment length polymorphisms) [14, 15] эффективным методом в популяционных исследованиях и при идентификации личности.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Рестриктаза *HincII*, ДНК-лигаза фага T4, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и ДНК-полимераза Taq^R были получены от НПК «Биотех» (Москва), [α -³²P]dATP (6000 Ки/ммоль) – производства ИЯФ (Обнинск). Синтез олигонуклеотидных праймеров выполнен в Институте биоорганической химии РАН (Москва).

Выделение плазмидной ДНК, обработку ее ферментами и электрофоретическое разделение в агарозных гелях проводили согласно методам, описанным у Маниатиса и соавт. [16]. Геномную ДНК из венозной крови выделяли по методике, описанной Гиллом и соавт. [17]. Популяционная выборка, включающая 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве (по паспортным данным), была сформирована на основе образцов, полученных в травматологических пунктах, институте ревматологии, бюро судебно-медицинской экспертизы и среди сотрудников ГНИЦ «ГосНИИгенетика» (г. Москва).

Нуклеотидную последовательность минисателлитного повтора p33.6 определяли по методу Энгера и соавт. [18] с использованием набора для секвенирования производства «Ферментас» (Вильнюс). В качестве матрицы использовали однопочечную ДНК рекомбинантной плазмиды pUC19 [19], содержащую клонированный фрагмент минисателлита размером 566 п.н. (по результатам разделения в 6%-ном полиакриламидном геле). Перед клонированием у амплифицированного фрагмента ДНК заполняли концы с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии смеси четырех dNTP. Затем этот фрагмент встраивали в плазмиду, расщепленную рестриктазой *HincII*, с использованием ДНК-лигазы фага T4. Продуктами лигирования трансформировали клетки штамма JM109 *E. coli* (F'*traD36*, *lacI*^Q, *lacZ*ΔM15, *proAB/recA1*, *endA1*, *gyrA96* (NaI^r), *thi*, *hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺), *supE44*, *relA1*, Δ(*lac-proAB*)). Рекомбинантные клоны отбирали, анализируя выделенные препараты плазмидной ДНК на наличие вставки с помощью ПЦР. Для отбора клонов использовали LB-агар с ампициллином (50 мкг/мл).

ПЦР проводили на амплификаторе PNC-2 («Techne», Великобритания) и/или PolyChain («Poly_gen», Австрия) в 50 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ Трис-HCl, pH 8,8, 16,6 мМ сульфат аммония, 0,01%-ный твин-20, 1,0 или 2,0 мМ MgCl₂ в случае DIS111 и RB1-VNTR, соответственно, 0,2 мМ каждого dNTP, 2,5 мкг полимеразы Taq^R, 0,01–0,5 мкг геномной ДНК, 66 нг каждого из

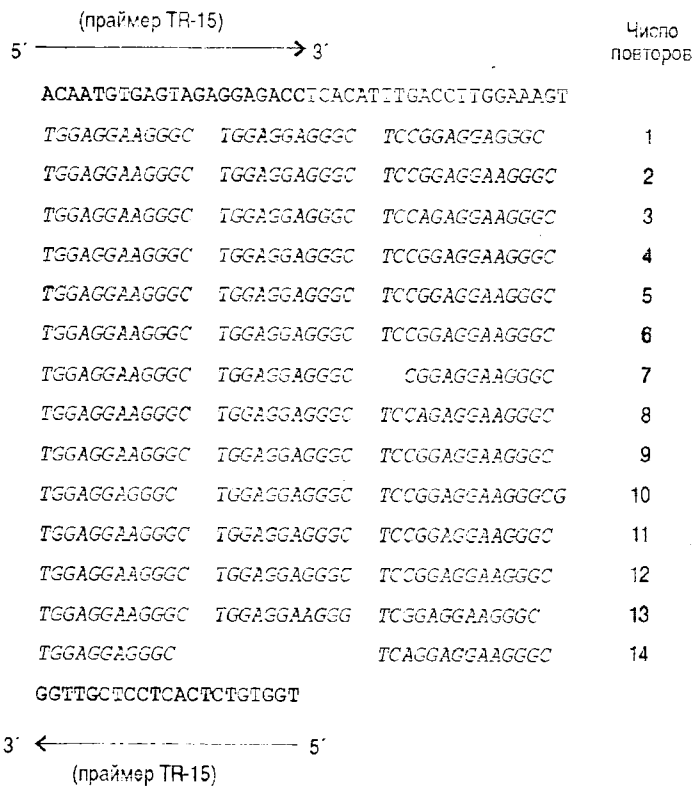


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность амплифицированного аллеля DIS111 длиной 566 п.н. Повторяющиеся последовательности выделены курсивом. Жирным шрифтом выделены участки, комплементарные последовательностям праймеров TR-15 и TR-16

ликованных ранее [3]. Для амплификации аллелей RB1-VNTR использовали по 99 нг праймеров RB21 (5'-CGTTAATAATTACCTAACGTATGGCCAAGTTTCC-3') и RB24 (5'-CGAGCCTCGGTCTCATCACCAAGGGGGTGG-3') [9]. 30 циклов ПЦР проводили по следующей программе: 94°C/1 мин, 55°C/1 мин, 72°C/2 мин, в первом цикле стадия денатурации составляла 3 мин, в последнем цикле стадия синтеза цепи - 7 мин.

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 6%-ном полиакриламидном геле (ПААГ), нанося в лунки геля 10-15 мкл реакционной смеси. Полиакриламидный гель окрашивали серебром [20].

Наблюдаемые частоты встречаемости генотипов исследованных локусов проверяли на отклонение от равновесного распределения Харди-Вайнберга с помощью компьютерной программы RxC (Rows x Columns), любезно предоставленной Дж. Кармоди (Карлетонский университет, Оттава). С использованием данной программы также сравнивали распределения аллельных частот RB1-VNTR в различных популяциях.

Ожидаемую гетерозиготность (H_{exp}) и следующие параметры информативности полиморфизма исследованных локусов: вероятность случайного совпадения генотипов двух неродственных индивидуумов (probability of random match, pM), вероятность различения генотипов двух неродственных индивидуумов (power of discrimination, PD), среднюю вероятность исключения типизируемого образца (mean exclusion chance, W), информативность полиморфизма данного локуса (poly-

morphism information content, PIC) рассчитывали с помощью компьютерной программы на основе следующих алгоритмов [21-24]:

$$H_{exp} = (1 - Ex_i^2) \times n / (n - 1),$$

$$pM = EP_i^2,$$

$$PD = 1 - pM,$$

$$W = \sum_i x_i^3 (1 - x_i)^2 + \sum_i Ex_i (1 - x_i)^3 + \sum_{i < j} Ex_i x_j (x_i + x_j) (1 - x_i - x_j)^2,$$

$$PIC = 1 - \frac{\sum_i x_i^2}{n} - \frac{n-1}{n} \sum_{j=i+1}^n 2x_i^2 x_j^2,$$

где x_i , x_j - аллельные частоты; n - число аллелей; P_i - частоты встречаемости генотипов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При клонировании амплифицированного аллеля минисателлита р33.6 получено 7 рекомбинантных клонов. Нуклеотидная последовательность вставки одного из клонов приведена на рис. 1. Данная последовательность содержала 14 повторов, в основном, длиной по 37 п.н. В свою очередь, эти повторы состояли из трех субповторов. У последних размер мог изредка различаться на 1-2 п.н. из-за внутренних делеций и вставок. Повтор 14, в отличие от остальных, включал только 2 субповтора. Таким образом, было показано, что аллель размером 566 п.н. содержит 14 tandemных повторов, и дальнейшая нумерация аллелей осуществлялась, исходя из числа содержащихся в них повторяющихся единиц.

Таблица 1

Частоты встречаемости аллелей локусов DIS111 и RB1-VNTR среди 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве

Локус DIS111				Локус RB1-VNTR			
Номер аллеля	Длина, п.н.	Число наблюдений	Частота встречаемости	Номер аллеля	Длина, п.н.	Число наблюдений	Частота встречаемости
9	381	1	0,004	21	1200	1	0,004
10	418	8	0,033	22	1250	34	0,142
11	455	4	0,017	23	1300	-	-
12	492	37	0,154	24	1350	9	0,038
13	529	7	0,029	25	1400	2	0,008
14	566	101	0,421	26	1450	3	0,013
15	603	9	0,038	27	1500	135	0,562
16	640	23	0,096	28	1550	5	0,021
17	677	37	0,154	29	1600	49	0,204
18	714	4	0,017	30	1650	2	0,008
19	751	3	0,013				
20	788	2	0,008				
21	825	2	0,008				
22	862	2	0,008				

Наблюдаемые и ожидаемые частоты встречаемости генотипов локуса *DIS111* среди 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве

№ п/п	Генотип	Ожидаемые значения		Наблюдаемые значения	
		Частота встречаемости	Число наблюдений	Частота встречаемости	Число наблюдений
1	9-15	0,000	0,038	0,008	1
2	10-10	0,001	0,133	0,017	2
3	10-14	0,028	3,367	0,017	2
4	10-16	0,006	0,767	0,017	2
5	11-11	0,000	0,033	0,008	1
6	11-12	0,005	0,617	0,008	1
7	11-15	0,001	0,150	0,008	1
8	12-12	0,024	2,852	0,075	9
9	12-14	0,130	15,571	0,100	12
10	12-15	0,012	1,388	0,008	1
11	12-16	0,030	3,546	0,017	2
12	12-17	0,048	5,704	0,025	3
13	13-13	0,001	0,102	0,008	1
14	13-14	0,025	2,946	0,033	4
15	13-15	0,002	0,262	0,008	1
16	14-14	0,177	21,252	0,183	22
17	14-15	0,032	3,787	0,033	4
18	14-16	0,081	9,679	0,100	12
19	14-17	0,130	15,571	0,142	17
20	14-18	0,014	1,683	0,017	2
21	14-19	0,011	1,263	0,008	1
22	14-20	0,007	0,842	0,017	2
23	14-22	0,007	0,842	0,008	1
24	15-17	0,012	1,388	0,008	1
25	16-16	0,009	1,102	0,017	2
26	16-17	0,030	3,546	0,008	1
27	16-19	0,002	0,287	0,017	2
28	17-17	0,024	2,852	0,042	5
29	17-18	0,005	0,617	0,017	2
30	17-21	0,003	0,308	0,017	2
31	17-22	0,003	0,308	0,008	1

Оперируя средней длиной tandemного повтора в 37 п.н., легко подсчитать, что наименьший по размеру аллель, обнаруженный в данном исследовании, имеет длину 381 п.н. и состоит из 9 повторяющихся единиц. Эти данные полностью согласуются с результатами электрофоретического разделения аллелей в 6%-ном полиакриламидном геле. При указании длин аллелей с точностью до 1 п.н. мы учитываем, однако, возможность их дивергенции в пределах нескольких пар нуклеотидов внутри одной аллельной группы из-за нуклеотидных вставок и делеций в повторяющихся единицах.

По нашему мнению, классификация аллелей VNTR по числу повторов наиболее правильна, поскольку дает возможность однозначного межлабораторного сравнения данных без путаницы в нумерации аллелей. Например, при исследовании европеоидных популяций по локусу *DIS80* аллель наименьшей длины содержал 18 повторов [20, 25, 26]. Будовль и соавт. [20] присвоили ему порядковый номер 1.

1057

770

612

495

392

345

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Рис. 2. Результаты компьютерного сканирования окрашенного серебром 6%-ного полиакриламидного геля после электрофоретического разделения амплифицированных аллелей минисателлита р33.6. 1 и 12 – молекулярный маркер ДНК: фрагменты ДНК фага ϕ X174, расщепленной рестриктазой *HincII*. 2–11 – полный набор аллелей локуса D1S11, полученный в результате генотипирования 10 неродственных индивидов. Генотипы по дорожкам: 2 – 9/15; 3 – 10/16; 4 – 11/12; 5 – 12/14; 6 – 13/13; 7 – 16/19; 8 – 14/18; 9 – 17/22; 10 – 17/21; 11 – 14/20

Однако в других исследованиях [27, 28] были обнаружены аллели, включающие меньшее число (13, 16, 17) повторов.

При генотипировании 120 неродственных индивидуумов обнаружены 14 аллелей локуса D1S11 длиной от 381 до 862 п.н. (рис. 2, табл. 1). Наиболее часто встречались аллели 14, 12 и 17 (частоты встречаемости 0,421, 0,154 и 0,154 соответственно) (табл. 1). Среди наблюдавшихся генотипов (29% от общего числа возможных) наиболее распространенными являлись 14–14 и 14–17 (частоты встречаемости 0,183 и 0,142 соответственно) (табл. 2).

Для амплификации аллелей RB1-VNTR мы использовали более длинную пару праймеров из предложенных Шарфом и соавт. двух пар [9]. Вследствие этого длины аллелей, определенные нами, увеличены на 50 п.н. по сравнению с данными Шарфа и соавт. [9]. Например, амплифицированный нами аллель длиной 1250 п.н. соответствовал аллелю размером 1200 п.н. в упомянутом исследовании и содержал, исходя из анализа последовательности, приведенной Шарфом и соавт. [9], 22 повторяющихся единицы. Таким образом, согласно оговоренным выше правилам нумерации аллелей VNTR, мы обозначили этот аллель порядковым номером 22.

Мы показали существование в русской популяции девяти аллелей RB1-VNTR размером от 1200 до 1650 п.н. (рис. 3, табл. 1; аллель 23 длиной 1300 п.н. не был

Наблюдаемые и ожидаемые частоты встречаемости генотипов локуса RB1-VNTR среди 120 неродственных представителей русской нации, проживающих в Москве

№ п/п	Генотип	Ожидаемые значения		Наблюдаемые значения	
		Частота встречаемости	Число наблюдений	Частота встречаемости	Число наблюдений
1	21-27	0,005	0,562	0,008	1
2	22-22	0,020	2,408	0,017	2
3	22-27	0,159	19,125	0,150	18
4	22-28	0,006	0,708	0,008	1
5	22-29	0,058	6,942	0,092	11
6	24-26	0,001	0,113	0,017	2
7	24-27	0,042	5,062	0,050	6
8	24-29	0,015	1,838	0,008	1
9	25-29	0,003	0,408	0,017	2
10	26-27	0,014	1,688	0,008	1
11	27-27	0,316	37,969	0,350	42
12	27-28	0,023	2,812	0,025	3
13	27-29	0,230	27,562	0,175	21
14	27-30	0,009	1,125	0,008	1
15	28-29	0,009	1,021	0,008	1
16	29-29	0,042	5,002	0,050	6
17	29-30	0,003	0,408	0,008	1

обнаружен). Наиболее распространенными оказались аллели 27 и 29 с частотами встречаемости 0,562 и 0,204 соответственно. Среди наблюдавшихся генотипов (30% от общего числа возможных) наиболее частыми оказались 27-27 (0,350), 27-29 (0,175) и 22-27 (0,150) (табл. 3).

Полученные экспериментальные частоты генотипов обоих локусов проверяли на соответствие равновесному распределению Харди-Вайнберга по критериям χ^2 и G -статистики, используя компьютерную программу RxC на основе алгоритма, описанного Роффом и Бенценом [29]. Этот алгоритм позволяет оценить статистическую значимость отклонений от ожидаемого частотного распределения в случае,

Таблица 4

Значения критериев χ^2 , G -статистики и параметров информативности для локусов DIS111 и RB1-VNTR

Параметры	DIS111	RB1-VNTR
χ^2	32,3579	10,9484
P (вероятность)	0,9370 (+/- 0,0077)	0,9880 (+/- 0,0034)
G -статистика	41,5625	14,0621
P (вероятность)	0,9350 (+/- 0,0078)	0,9840 (+/- 0,0040)
H_{obs}	0,650	0,583
H_{exp}	0,765	0,622
pM	0,081	0,187
PD	0,919	0,813
W	0,935	0,503
PIC	0,547	0,417

Частоты встречаемости аллелей, объемы выборок, наблюдаемые гетерозиготности, PD и число мод в аллельном распределении для локуса RB1-VNTR в различных популяциях

Номер аллеля	Частота встречаемости в популяции				
	Русские	Европеоиды США	Афроамериканцы США	Латиноамериканцы США	Латиноамериканцы Мексики
11	0	0	0	0	0,0074
21	0,004	0	0	0	0
22	0,142	0,1016	0,0508	0,0508	0,0508
24	0,038	0,0156	0,0593	0,0169	0,0074
25	0,008	0,0078	0,1271	0,0254	0,0147
26	0,013	0,0703	0	0,0169	0,0074
27	0,562	0,5859	0,2542	0,5932	0,6912
28	0,021	0,0547	0,3983	0,0932	0,0662
29	0,204	0,1406	0,0593	0,0847	0,1397
30	0,008	0,0234	0,0254	0,1186	0,0074
31	0	0	0,0169	0	0
34	0	0	0,0085	0	0
Число индивидов	120	64	59	59	68
H_{obs}	0,583	0,618	0,750	0,613	0,494
PD	0,813	0,79	0,92	0,79	0,68
Число мод	4	4	4	3	4

Примечание. Зарубежные данные взяты из статьи Шарфа и соавт. [9]. Курсивом выделены «модальные» аллели.

когда число наблюдений по значительному числу классов меньше 5, и применение стандартного критерия χ^2 неправомерно. Было показано соответствие распределения наблюдаемых частот встречаемости генотипов обоих локусов равновесному распределению Харди-Вайнберга (табл. 4).

Мы использовали критерий выделения «мод» в частотном распределении, предложенный Шривером и соавт. [30], согласно которому модой является аллель, частота которого в данном распределении больше суммы частот аллелей, отличающихся от него на один тандемный повтор. Таким образом, для локуса D1S11 наблюдалось тетрамодалное аллельное распределение с модами: 14 (0,421), 12 (0,154), 17 (0,154), 10 (0,033). Для локуса RB1-VNTR распределение было также тетрамодалным: 27 (0,562), 29 (0,204), 22 (0,142), 24 (0,038).

Наблюдавшееся нами в русской популяции распределение частот встречаемости аллелей локуса RB1-VNTR сходно с таковым (по степени возрастания различий) в популяционных группах, включающих европеоидов США и латиноамериканцев из США и Мексики [9] (табл. 5). Это выражается в характерном для этих популяций значительном доминировании моды 27. В русской популяции мы обнаружили в гетерозиготном состоянии аллель 21, который не был отмечен в американских популяционных выборках.

У афроамериканцев распределение частот встречаемости аллелей было принципиально иным, чем в остальных популяциях. Наиболее заметное различие выразилось в преобладании у них моды 28. Однако степень ее доминирования над другими аллелями у афроамериканцев не столь высока, что отражается в более однородном распределении аллельных частот и, как следствие, более высоком уровне гетерозиготности по сравнению с другими популяциями (табл. 5).

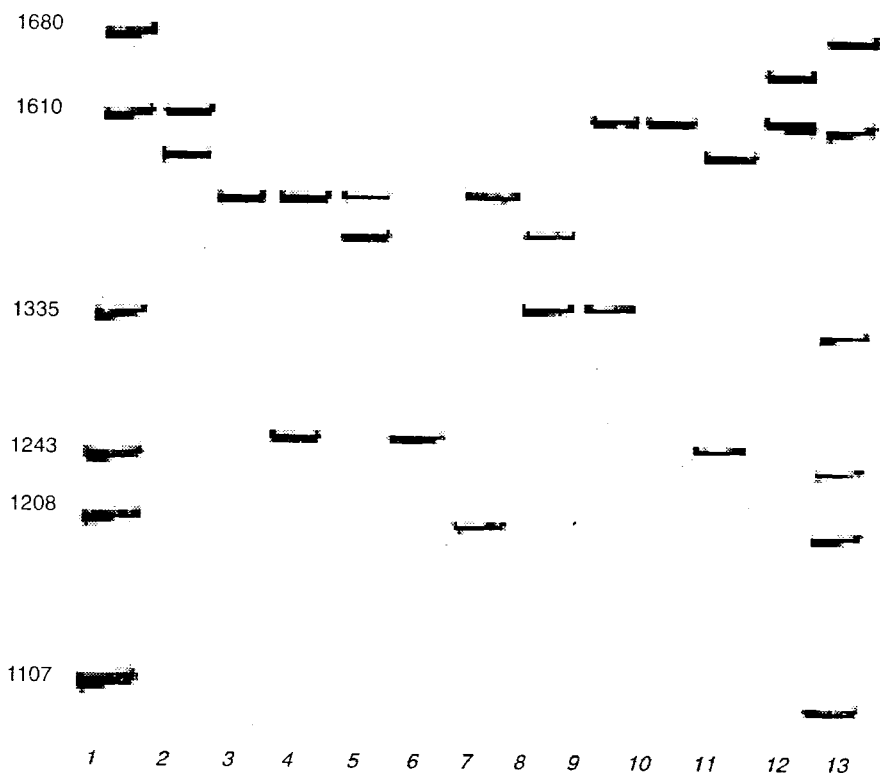


Рис. 3. Результаты компьютерного сканирования окрашенного серебром 6%-ного полиакриламидного геля после электрофоретического разделения амплифицированных аллелей RB1-VNTR. 1 и 13 – молекулярный маркер ДНК: фрагменты ДНК фага λ , расщепленной рестриктазой *HincII*. 2–12 – полный набор аллелей локуса RB1-VNTR, полученный в результате генотипирования 11 неродственных индивидов. Генотипы по дорожкам: 2 – 28/29; 3 – 27/27; 4 – 22/27; 5 – 26/27; 6 – 22/22; 7 – 21/27; 8 – 24/26; 9 – 24/29; 10 – 29/29; 11 – 22/28; 12 – 29/30

Мы использовали программу RxC для сравнения распределений частот встречаемости аллелей RB1-VNTR в разных популяциях. Согласно полученным данным, не наблюдается статистически значимых различий между русскими, европеоидами США и латиноамериканцами Мексики (численные данные не приводятся). При этом русские отличаются от мексиканцев в большей степени, чем европеоиды США. Это различие, по всей видимости, отражает процесс обмена генами между американскими популяциями.

Наблюдаемая гетерозиготность по локусу RB1-VNTR (табл. 5) в русской популяции была меньшей, нежели в других популяциях, за исключением латиноамериканцев Мексики. При этом значения *PD* у русских, европеоидов и латиноамериканцев США были практически одинаковы. В целом, распределение частот встречаемости аллелей и информативность локуса RB1-VNTR для русских и северо-американских европеоидов практически одинаковы. По сравнению с уровнем информативности этого локуса для афроамериканцев в остальных популяциях ценность данного локуса для идентификации личности значительно ниже.

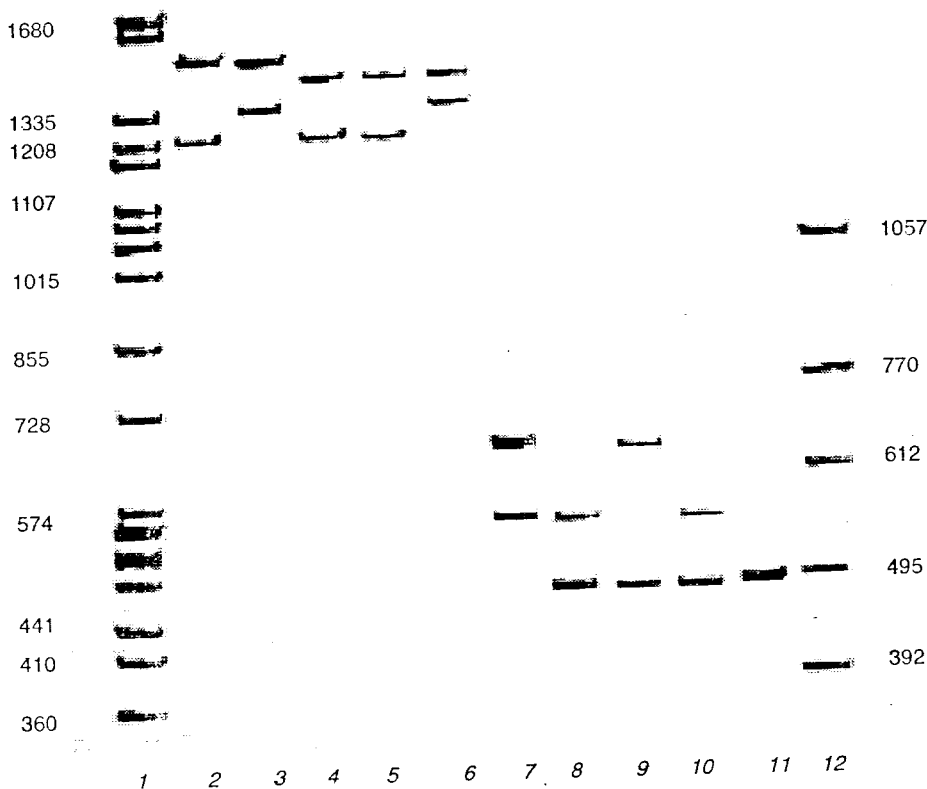


Рис. 4. Результаты компьютерного сканирования окрашенного серебром 6%-ного полиакриламидного геля после электрофоретического разделения амплифицированных аллелей локусов *DIS111* и *RB1-VNTR* в ходе генотипирования семьи из 5 человек. 1 и 12 – молекулярные маркеры ДНК: (ДНК фагов λ и ϕ X174, расщепленные рестриктазой *HincII*, соответственно). 2–6 – продукты амплификации локуса *RB1-VNTR*. Генотипы по дорожкам: 2 (отец) – 22/27; 3 (ребенок 1) – 24/27; 4 (ребенок 2) – 22/26; 5 (ребенок 3) – 22/26; 6 (мать) – 24/26. 7–11 – продукты амплификации локуса *DIS111*. Генотипы по дорожкам: 7 (отец) – 14/17; 8 (ребенок 1) – 12/14; 9 (ребенок 2) – 12/17; 10 (ребенок 3) – 12/14; 11 (мать) – 12/12

Изучение распределения аллелей при семейном анализе (рис. 3) позволяет сделать заключение о независимом характере наследования аллелей локусов *RB1-VNTR* и *DIS111*. С использованием данных локусов проанализировали 17 случаев спорного отцовства (материнство рассматривали как бесспорное, анализировали одного предполагаемого отца, типировали четыре дополнительных локуса: *DIS80*, *ApoB 3'VNTR*, *IgH 5'VNTR*, *D17S5* [26]). Во всех случаях отцовство не исключалось. Не обнаружены мутантные аллели (примерно 40 мейозов). Использование двух данных локусов увеличивало вероятность истинности отцовства в среднем на два десятичных порядка в дополнение к анализу отцовства по четырем *VNTR*. Минимальное значение вероятности отцовства составляло 99,99% (рассчитывалось на основе алгоритма Байеса) для панели из шести локусов.

Поскольку минисателлит *r33.6* и исследованный нами ранее полиморфный локус *DIS80* располагаются на одной хромосоме (хромосома 1), то в отдельном эксперименте исследовали возможность ассоциации аллелей этих локусов. Анализ больших

семей, с 3–4 детьми, позволяет предположить независимый характер наследования аллелей данных локусов. Следует отметить, что изучение ассоциации аллелей разных локусов и мутационного процесса требует статистического анализа значительно большего экспериментального материала, поэтому наши заключения носят предварительный характер.

Сравнение параметров информативности локусов RB1-VNTR и DIS111 (табл. 4) позволяет сделать заключение о значительно большей информативности и, как следствие, большей практической ценности последнего для идентификации личности в русской популяции. Комбинированная величина pM для двух локусов составляет 0,015.

AMP-FLP анализ шести гипервариабельных локусов в русской популяции (настоящее исследование и [26]) по своей разрешающей способности ($pM = 3,68 \cdot 10^{-7}$) сопоставим с типированием личности с использованием 3–5 монолокусных зондов (по данным Рича и Девлина [31]). В то же время, по сравнению с использованием ДНК-зондов, данный метод отличается быстротой, менее зависим от количества и качества анализируемого материала и не требует работы с радиоактивно мечеными соединениями. Немаловажным преимуществом является также дискретность спектра распределения AMP-FLP аллелей, что позволяет оперировать генотипами, а не фенотипами.

Исходя из величины pM , использование полиморфизма шести исследованных нами локусов не позволяет различить в среднем лишь четырех человек с одинаковыми генотипами в популяции размером 10 млн. человек. Подключение каждого дополнительного вариабельного геномного локуса в среднем уменьшает величину pM в 5–15 раз, доводя ее до величины порядка 10^{-12} для 10 локусов. Эта величина сопоставима со значениями pM для мультилокусных зондов (например, величина pM для зонда 33.6 $\sim 10^{-10}$ [4]). Предпочтительным видится увеличение числа AMP-FLP-локусов за счет коротких tandemно повторяющихся последовательностей (short tandem repeats, STR). Ввиду более коротких, по сравнению с VNTR, размеров STR-аллелей (120–350 п.н., [32, 33]), вероятность сохранения последних в препаратах деградированной ДНК выше. Узкий дискретный спектр STR-аллелей предопределяет возможность одновременной амплификации в одной пробирке нескольких локусов с последующим точным определением длин амплифицированных аллелей при генотипировании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlín E., White R. // *Science*. 1987. V. 235. P. 1616–1622.
2. Weller P., Jeffreys A.J., Wilson V., Blanchetot A. // *EMBO J*. 1984. V. 3. P. 439–446.
3. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. // *Nature*. 1985. V. 314. P. 67–73.
4. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. // *Nature*. 1985. V. 316. P. 76–79.
5. Sparkes R., Sparkes M., Wilson M. // *Science*. 1980. V. 208. P. 1042–1044.
6. Sparkes R., Murphree A., Lingua R. // *Science*. 1983. V. 219. P. 971–973.
7. Wiggs J., Nordenskjöld M., Yandell D., Rapaport J., Grondon V., Janson B.S., Werelius B. // *N. Engl. J. Med*. 1988. V. 318. P. 151–157.
8. Horsthemke B., Barnett H., Greger V., Passarge E., Hopping W. // *Lancet*. 1987. V. 1. P. 511–512.
9. Scharf S.J., Bowcock A.M., McClure G., Klitz W., Yandell D.W., Erlich A.H. // *Am. J. Hum. Gen.* 1992. V. 50. P. 371–381.
10. Priestley L., Kumar D., Sykes B. // *Hum. Genet*. 1990. V. 85. P. 525–526.
11. Hixson J.E., Powers P.K., McMahan C.A. // *Hum. Genet*. 1993. V. 91. P. 475–479.
12. 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.
13. Southern E.M. // *J. Mol. Biol*. 1975. V. 98. P. 503–517.
14. Decorte R., Cuppens H., Marynen P., Cassiman J.-J. // *DNA Cell Biol*. 1990. V. 9. P. 461–469.
15. Rand S., Puers C., Skowasch K., Wiegand P., Budowle B., Brinkmann B. // *Int. J. Leg. Med*. 1992. V. 104. P. 329–333.

16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 99–352.
17. Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J. // Nature. 1985. V. 318. P. 577–579.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
19. Yanish-Perron C., Viena J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. P. 103–119.
20. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C. // Am. J. Hum. Genet. 1991. V. 48. P. 137–144.
21. Nei M., Roychoudhury A.K. // Genetics. 1974. V. 76. P. 379–390.
22. Sajantila A., Strom M., Budowle B., Ehnholm C., Peltonen L. // Int. J. Leg. Med. 1991. V. 104. P. 181–184.
23. Kruger J., Fuhrman W., Lichte K.H., Steffens S. // Dtsch. Z. Gerichtl. Med. 1968. V. 64. P. 127–146.
24. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
25. Sajantila A., Budowle B., Strom M., Johnsson V., Lukka M., Peltonen L., Ehnholm C. // Am. J. Hum. Genet. 1992. V. 50. P. 816–825.
26. Чистяков Д.А., Гаврилов Д.К., Овчинников И.В., Носиков В.В. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. С. 1304–1314.
27. Skowasch K., Wiegand P., Brinkmann B. // Int. J. Leg. Med. 1992. V. 105. P. 165–168.
28. Deka R., DeCroo S., Jin Li, McGarvey S.T., Rothhammer F., Ferrell R.E., Chakraborty R. // Hum. Genet. 1994. V. 94. P. 252–258.
29. Roff D.A., Bentzen P. // Mol. Biol. Evol. 1989. V. 6. P. 539–545.
30. Shriver M.D., Jin Li, Chakraborty R., Boerwinkle E. // Genetics. 1993. V. 134. P. 983–993.
31. Risch N.J., Devlin B. // Science. 1992. V. 225. P. 717–720.
32. Edwards A., Hammond H.A., Jin L., Caskey C.T., Chakraborty R. // Genomics. 1992. V. 12. P. 241–253.
33. Hammond H.A., Jin Li, Zhong Y., Caskey C.T., Chakraborty R. // Am. J. Hum. Genet. 1994. V. 55. P. 175–189.

Поступила в редакцию
24.IV.1995
Поступила после доработки
2.X.1995