

И. А. ЕФРЕМОВ, М. В. ЗАЯЦ, П. Л. ИВАНОВ

**ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНДИВИДУАЛИЗИРУЮЩИХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ТЕТРАНУКЛЕОТИДНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ HUMvWFII И D6S366**

Государственный научный центр "ГосНИИ генетика" (дир. — член-корр. РАН В. Г. Дебабов);  
Республиканский центр судебно-медицинской экспертизы (дир. — проф. В. В. Томилин) Минздрава РФ;  
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта (дир. — акад. А. Д. Мирзабеков) РАН, Москва

*В Государственном научном центре "ГосНИИ генетика" разработан ряд амплификационных систем на основе высокополиморфных тетрануклеотидных микросателлитов из семейства повторов гена фактора фон Виллебранда (von Willebrand factor gene, vWF) и локуса D6S366. В настоящей работе представлены результаты комплексной экспертной оценки двух таких молекулярно-генетических индивидуализирующих систем — на основе локусов HUMvWFII и D6S366 — в плане их использования в судебно-медицинской идентификационной экспертизе.*

**EXPERT EVALUATION OF MOLECULAR GENETIC INDIVIDUALIZING SYSTEMS ON THE BASE OF TETRANUCLEOTIDE TANDEM REPEATS HUMvWFII AND D6S366**

I. A. Yefremov, M. V. Zayats, P. L. Ivanov

*Amplification systems based on highly polymorphic tetranucleotide microsatellites from the family of von Willebrand factor gene (vWF) and locus D6S366 repeats are developed at the State Research Center GosNII GENETIKA. A complex expert evaluation of two such molecular genetic individualizing systems based on locuses HUMvWFII and D6S366 is performed in order to investigate their probable use in forensic medical personality identification.*

В арсенале судебно-экспертного молекулярно-генетического идентификационного анализа ведущее место занимают методы, основанные на энзиматической амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) гипервариабельных мультяллельных генетических локусов. Эти локусы в геноме человека представлены главным образом так называемыми тандемными повторами с вариабельным числом копий (англ. — variable number of tandem repeats, VNTR) [20]. Класс тандемных полиморфных локусов условно разбит на два подкласса: минисателлитов — с длиной повтора семь и более пар нуклеотидов (п. н.) (часто именно их имеют в виду под наименованием VNTR) и микросателлитов, у которых длина повторяющейся единицы составляет от одного до десяти п. н. и которые еще называют короткими тандемными повторами (англ. — short tandem repeats, STR) [24].

Благодаря высокому аллельному полиморфизму, локусы как VNTR-, так и STR-типа находят широкое применение в качестве молекулярно-генетических маркеров при производстве судебно-медицинских экспертиз (идентификация личности, определение отцовства и материнства и др.) и в прикладных медико-криминалистических исследованиях. Однако следует отметить, что эти две группы маркеров не вполне эквивалентны по своим прикладным свойствам. Так, существенные ограничения накладываются на ПЦР-анализ минисателлитных VNTR-локусов при исследовании деградированных препаратов ДНК (например, выделенных из пятен крови, спермы, слюны, а также частей волосяного покрова и трупного материала, подвергшихся разложению под действием разрушающих биологических или физико-химических факторов). При анализе подобных препаратов часто наблюдается полное отсутствие электрофо-

рования. Если же при анализе деградированного образца ДНК обнаруживается только один низкомолекулярный аллель, то в этом случае существует опасность ложной гомозиготности: возможно, анализируемый образец на самом деле является гетерозиготным, но имеющийся высокомолекулярный аллель не выявляется в ходе исследования, поскольку степень его деградации в "плохих" образцах существенно выше степени деградации низкомолекулярного [2].

С этой точки зрения ПЦР-типирование микросателлитных STR-локусов оказывается предпочтительнее. Благодаря более коротким, по сравнению с минисателлитными VNTR, размерам аллелей, во-первых, выше вероятность сохранения их в деградированной ДНК, а во-вторых, не столь велика вероятность искажения генотипа из-за потери высокомолекулярного аллеля вследствие его преимущественной деградации. На практике это означает ощутимый выигрыш в чувствительности анализа. Кроме того, вероятность ложной гомозиготности, обусловленной предпочтительной амплификацией [26] низкомолекулярных аллелей, крайне низка для микросателлитных локусов вследствие узости спектра аллельных длин.

За последние годы за рубежом было разработано большое число молекулярно-генетических индивидуализирующих систем на основе микросателлитных полиморфных локусов [6, 18, 25]. Из наиболее известных можно упомянуть такие панели для идентификации личности, как 7-STR Forensic Science Service (Великобритания, 1995), 9-STR GenePrint™ ("Promega Corporation", США, 1996), 3-STR AmpF/STR™ Blue ("PE Applied Biosystems", США, 1996), 13-STR Baylor College of Medicine (США). Между тем в последнее время

ном центре "ГосНИИ генетика" были разработаны оригинальные амплификационные системы на основе высокополиморфных тетра-нуклеотидных микросателлитов из семейства повторов гена фактора фон Виллебрандта (von Willebrand factor gene, vWF) и локуса D6S366 [3, 5].

С помощью ПЦР в 40-м интроне гена vWF, имеющего хромосомную локализацию 12p13.3 — p13.2 [12, 19, 22], выявляется 3 дистанцированных друг от друга полиморфных микросателлита мотива (ATCT)<sub>n</sub>/(AGAT)<sub>n</sub>. Для микросателлита HUMvWFI, расположенного в 5'-концевой части 40-го интрона, в европейских популяциях обнаружено 11 аллелей [1, 4, 10]. Для микросателлита HUMvWFII, находящегося в 3'-концевой части полиморфного участка (позиции 2215 ÷ 2380 п. н.), показано существование 7 аллелей длиной от 154 до 178 п.н. [5, 10]. Для микросателлита HUMvWFIII, который также обозначается как HUMvWFA31/A (позиции 1640 ÷ 1794 п. н.), было показано существование 7—12 аллелей при анализе различных расовых групп [18, 25]. Для микросателлита D6S366 (обозначение по Genome Database), расположенного на хромосоме 6q21-qter, известно 10 аллелей размером от 138 до 174 п. н. [5, 16].

В настоящей работе проведена комплексная экспертная оценка молекулярно-генетических индивидуализирующих систем на основе локусов HUMvWFII и D6S366.

#### Экспериментальная часть

Исследовали препараты ДНК, выделенной из объектов, представляющих потенциальный судебно-медицинский интерес (образцы жидкой крови и пятна крови различного происхождения и степени сохранности; содержащие сперму образцы выделений из влагалища; кости; жидкая сперма и пятна спермы; волосы, содержащие луковичную часть; слюна, окурки сигарет).

Выделение ДНК из препаратов жидкой крови

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) (8-12%Т, 5%С, толщина 0,6 мм); электрофорез проводили в трис-боратном буфере в течение 4 ч при напряженности поля 25 В/см, длина пробега амплифицированных аллелей составляла 10 см. По окончании электрофореза гель окрашивали серебром [9].

Идентификацию амплифицированных аллелей осуществляли с помощью наборов специфических аллельных маркеров (аллельная "лестница") для обоих локусов [5]. Аллельная "лестница" для HUMvWFII включала в себя 7 известных аллелей данного локуса: № 9 (154 п. н.), № 10 (158 п. н.), № 11 (162 п. н.), № 12 (166 п. н.), № 13 (170 п. н.), № 14 (174 п. н.), № 15 (178 п. н.); для D6S366 — 8 известных аллелей данного локуса: № 10 (142 п. н.), № 11 (146 п. н.), № 12 (150 п. н.), № 13 (154 п. н.), № 14 (158 п. н.), № 15 (162 п. н.), № 16 (166 п. н.), № 17 (170 п. н.). В обоих случаях нумерация аллелей отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

#### Результаты и обсуждение

Для образцов ДНК, выделенных из жидкой крови (всего было исследовано 150 образцов), на различных моделях амплификаторов устойчивые воспроизводимые результаты наблюдали при концентрациях ДНК-матрицы в реакционной смеси в диапазоне 40 пг/мкл — 3 нг/мкл. В этом случае для получения электрофоретических полос удовлетворительной интенсивности достаточным было нанесение 20% общего объема реакционной смеси на дорожку геля после проведения 32 циклов амплификации. Воспроизводимость результатов не зависела от общего объема реакционной смеси (25, 30 или 50 мкл) и модели использовавшегося прибора, в том числе и от такого параметра, как наличие/отсутствие нагреваемой крышки. Тем не менее комбинированное использование тонкостенных пробирок (тип: Beckman, Eppendorf, 0527)

лись ДНК фага  $\phi$ X174/HincII и плазмидная ДНК pBR322/MspI).

На рис. 1 (см. вклейку) приведен пример генотипирования по локусу HUMvWFII образцов ДНК, выделенной из жидкой крови одиннадцати неродственных человек. Разная интенсивность электрофоретических аллельных полос отражает зависимость эффективности наработки продукта от исходной концентрации ДНК-матрицы в реакционной смеси. При внесении в реакцию образца ДНК в количестве менее 40 пг в расчете на 1 мкл объема реакционной смеси в ряде случаев после 32 циклов продукт не визуализировался. При увеличении исходного количества матрицы более 3 нг в 1 мкл объема реакционной смеси в ряде случаев наблюдалась интенсивная наработка нежелательных дополнительных фрагментов. В оптимизированном же количественном диапазоне ДНК-матрицы (40 пг—3 нг/мкл общего объема) концентрационно-зависимый эффект предпочтительной амплификации низкомолекулярного аллеля в гетерозиготных образцах не проявлялся: во всех случаях интенсивность обеих аллельных полос была одинакова.

В результате генотипирования указанной выборки образцов крови нами были выявлены все основные аллели, присутствующие в аллельных "лестницах" (7 — для HUMvWFII и 8 — для D6S366). "Мутантных" фрагментов (имеющих промежуточную длину по сравнению с фрагментами аллельных "лестниц") обнаружено не было. С одной стороны, это свидетельствует о высокой специфичности и устойчивости исследованных индивидуализирующих систем в оптимизированных условиях (концентрации реагентов и параметры термоциклирования); с другой стороны, можно с уверенностью предполагать относительную редкость атипичных аллельных вариантов, что в принципе облегчает межлабораторное сравнение результатов генотипирования по данным локусам.

В исследованной популяционной выборке для локуса HUMvWFII нами впервые продемонстрировано существование нового редкого аллеля № 8 длиной 150 п. н. (см. рис. 1), не обнаруженного другими исследователями. Отметим, что этот единственный случай зарегистрирован у этнического перса. Для локуса D6S366 новых аллелей отмечено не было. Однако данные литературы [13] свидетельствуют о существовании для этого локуса в других расовых группах (латиноамериканцы, негры и выходцы из Азии, проживающие в США) аллелей № 9 (138 п. н.) и № 18 (174 п. н.), которые не обнаружены в исследованных российских популяциях [3, 5]. Таким образом, нельзя исключить возможность выявления новых аллелей при увеличении объема популяционного материала.

С использованием обеих рассматриваемых индивидуализирующих систем был проведен семейный анализ (рис. 2, см вклейку) ряда родительских пар и их детей (всего 30 мейозов). Во всех случаях материнство рассматривали как бесспорное, а отцовство подтверждали типированием четырех—шести VNTR-локусов: DIS80, DIS111, APOB, IGH, D17S5, RB1 [8, 11, 14, 16, 17, 23].

Вероятность отцовства в обследованных парах для указанной панели локусов составляла не менее 99,98%, чему соответствует словесная формулировка "практически доказано" [цит. по 15] (расчеты вели на основе алгоритма Байеса с использованием "потолочных" частот встречаемости аллелей в русской популяции [3]). На этом материале нами был показан менделевский характер наследования аллелей в исследованных локусах; мутантные аллели не были выявлены.

На рис. 3 (см. вклейку) приведены примеры генотипирования по локусу HUMvWFII препаратов ДНК, полученных из различных объектов, типичных для судебно-медицинского экспертного исследования вещественных доказательств. Во всех случаях при сравнительном анализе результатов амплификации нативных и в разной степени деградированных образцов ДНК из одного источника эффект ложной гомозиготности обнаружен не был: в гетерозиготных образцах аллельные полосы либо не выявлялись (полная деградация), либо нарабатывались с одинаковой интенсивностью (при исследовании образцов ДНК, выделенных из биологических следов, в каждом раунде амплификации осуществляли постановку в отдельной пробирке негативного контроля, содержащего все компоненты реакционной смеси с добавлением вместо образца ДНК такого же объема деионизованной воды).

Для образцов ДНК, выделенных с использованием хелатного полимера Chelex<sup>R</sup> из таких объектов, как пятна крови различного происхождения и степени сохранности, образцы содержимого влагиалища с присутствием спермы, жидкая сперма и пятна спермы, слюна, при концентрации матрицы ДНК в реакционной смеси в диапазоне 0,2—3 нг/мкл, результаты амплификации были удовлетворительными примерно в 90% случаев без дополнительной ультрафильтрации через Centricon<sup>TM</sup>-100 или Microcon<sup>TM</sup>-30.

Для таких объектов, как кости, волосы (содержащие луковичную часть), окурки сигарет, результативность амплификации составляла около 50% без ультрафильтрации и повышалась до 90% после очистки через Centricon<sup>TM</sup>-100 или Microcon<sup>TM</sup>-30.

В предыдущих исследованиях, касающихся данных локусов [3, 5], было продемонстрировано соответствие распределения частот встречаемости генотипов в российских городских популяционных выборках равновесию Харди-Вайнберга, определены параметры информативности и "потолочные" частоты встречаемости аллелей в русской популяции. С учетом этих данных результаты настоящей работы позволяют считать весьма перспективными молекулярно-генетические индивидуализирующие системы, на основе тетра- и пентануклеотидных tandemных повторов HUMvWFII и D6S366 для применения в судебно-экспертной практике. В таблице приведены объединенные данные по частотам встречаемости аллелей дан-

ных локусов, которые следует использовать для соответствующих вероятностных расчетов.

**Частоты встречаемости аллелей в локусах HUMvWFII и D6S366 в русской популяции**

Алель <sup>1</sup>	Длина аллеля, п. н.	Число наблюдений	Частота встречаемости <sup>2,3</sup>	"Потолочная" частота встречаемости <sup>3</sup>
<b>HUMvWFII</b>				
9	154	37	0,082 ± 0,013	0,107
10	158	40	0,088 ± 0,013	0,115
11	162	177	0,392 ± 0,023	0,437
12	166	134	0,296 ± 0,021	0,339
13	170	31	0,069 ± 0,012	0,092
14	174	26	0,058 ± 0,011	0,079
15	178	7	0,015 ± 0,006	0,027
Всего...		452	1,000 ± 0,099	1,195
<b>D6S366</b>				
10	142	3	0,008 ± 0,005	0,018
11	146	21	0,059 ± 0,013	0,084
12	150	112	0,316 ± 0,025	0,365
13	154	89	0,251 ± 0,023	0,297
14	158	30	0,085 ± 0,015	0,114
15	162	33	0,093 ± 0,015	0,124
16	166	62	0,175 ± 0,020	0,215
17	170	4	0,011 ± 0,006	0,022
Всего...		354	1,000 ± 0,121	1,238

<sup>1</sup> Нумерация аллелей отражает число содержащихся в них tandemных повторов.

<sup>2</sup> ± стандартная ошибка.

<sup>3</sup> Значения частот встречаемости аллелей рассчитаны на основе объединенных данных для городских популяций Москвы и Томска.

Работа частично выполнялась на средства грантов от Государственной научно-технической программы РФ "Геном человека" (№ 5/97) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 96-04-49856).

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Асеев М. В., Скакун В. Н., Баранов В. С. // Генетика. — 1995. — Т. 31. — С. 839—845.

2. Гысэ Л. И., Иванов П. Л. // Суд.-мед. эксперт. — 1995. — № 3. — С. 36—40.

3. Ефремов И. А. Исследование аллельного полиморфизма микро- и минисателлитных локусов генома человека методом амплификаций ДНК. Дис. ... канд. биол. наук. — М., 1996.

4. Мисюрин А. В., Сурин В. Л., Соловьев Г. Я. // Генетика. — 1994. — Т. 30. — С. 713—717.

5. Чистяков Д. А., Ефремов И. А., Одинокоева О. Н., Носиков В. В. // Молекул. биол. — 1996. — Т. 30, № 6. — С. 1274—1283.

6. Alford R. L., Hammond H. A., Coto I., Caskey C. T. // Amer. J. hum. Genet. — 1994. — Vol. 55. — P. 190—195.

7. AmpliType User Guide, Version 2: The Perkin-Elmer Corporation. — Norwalk, 1993.

8. Boerwinkle E., Xiong W., Fourest E., Chan L. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86. — P. 212—216.

9. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M. et al. // Amer. J. hum. Genet. — 1991. — Vol. 48. — P. 137—144.

10. Cumming A. M., Armstrong J. G., Pendry K. et al. // Hum. Genet. — 1992. — Vol. 89. — P. 194—198.

11. Decorte R., Cuppens H., Marynen P., Cassiman J.-J. // DNA Cell. Biol. — 1990. — Vol. 9. — P. 461—469.

12. Ginsburg D., Handin R. I., Bonthron D. et al. // Science. — 1985. — Vol. 228. — P. 1401—1406.

13. Hammond H. A., Jin Li, Zhong Y. et al. // Amer. J. hum. Genet. — 1994. — Vol. 55. — P. 175—189.

14. Horn G. T., Richards B., Klinger K. W. // Nucl. Acids Res. — 1989. — Vol. 17. — P. 6855—6864.

15. Hummel K., Ihm P., Schmidt V. Biostatistische Abstammungsbeurteilung mit Blutgruppenbefunden. — Stuttgart, 1971.

16. Jeffreys A. J., Wilson V., Neumann R., Keyte J. // Nucl. Acids Res. — 1988. — Vol. 16. — P. 10953—10971.

17. Kasai K., Nakamura Y., White R. // J. Forens. Sci. — 1990. — Vol. 35. — P. 1196—1200.

18. Kimpton C., Walton A., Gill P. // Hum. Mol. Genet. — 1992. — Vol. 1. — P. 287.

19. Mancuso D. J., Tuley E. A., Westfield L. A. et al. // J. biol. Chem. — 1989. — Vol. 264. — P. 19514—19527.

20. Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P. et al. // Science. — 1987. — Vol. 235. — P. 1616—1622.

21. Ploos van Amstel H. K., Reitsma P. H. // Nucl. Acids Res. — 1990. — Vol. 18. — P. 4957.

22. Peake I. R., Liddell M. B., Moodie P. et al. // Blood. — 1990. — Vol. 75. — P. 654—661.

23. Scharf S. J., Bowcock A. M., McClure G. et al. // Amer. J. hum. Genet. — 1992. — Vol. 50. — P. 371—381.

24. Tautz D., Renz M. // Nucl. Acids Res. — 1984. — Vol. 12. — P. 4127—4138.

25. Urquhart A., Oldroyd N. J., Kimpton C. P., Gill P. // BioTechniques. — 1995. — Vol. 18. — P. 116—121.

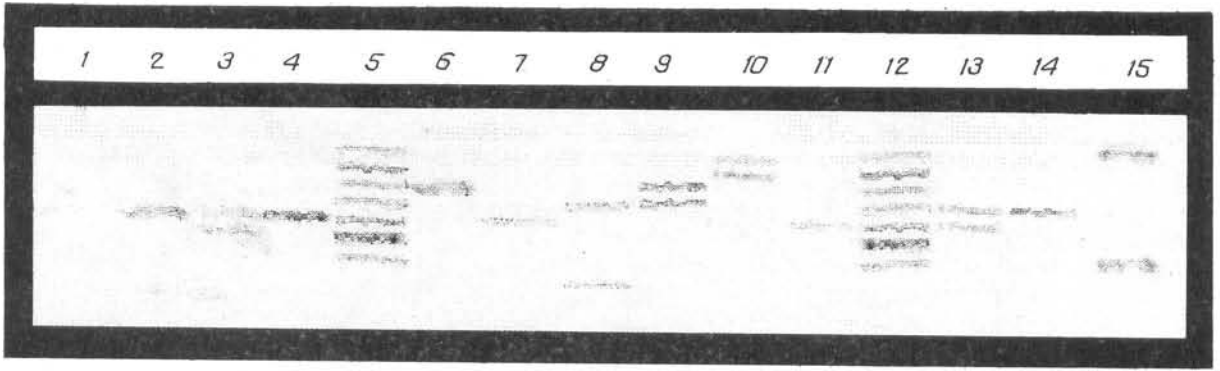


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации локуса HUMvWFII в образцах ДНК, выделенных из жидкой крови.

1 — отрицательный контроль; 2 — ДНК фага  $\phi$ X174/HincII (фрагмент длиной 162 п. н.); 3, 4, 6–11, 13–15 — генотипические аллельные комбинации одиннадцати неродственных человек; 5 — 10/11, 4 — 11/11, 6 — 13/13, 7 — 11/11, 8 — 8/12, 9 — 12/13, 10 — 14/15, 11 — 11/11, 13 — 11/12, 14 — 12/12, 15 — 9/15.

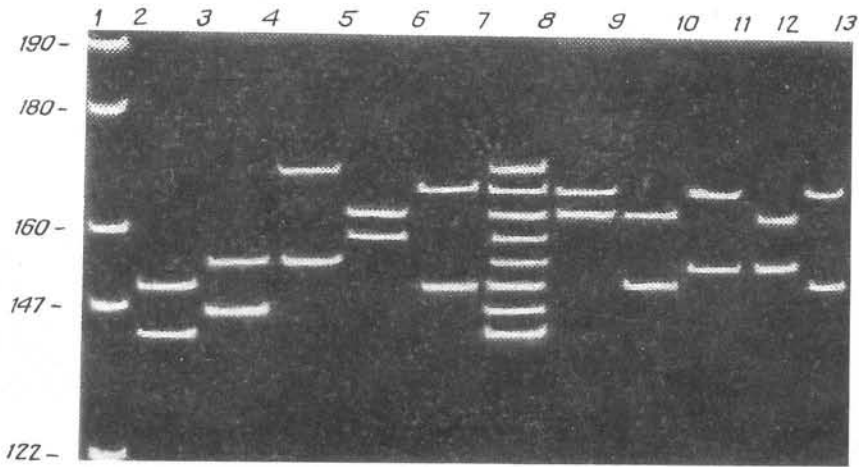


Рис. 2. Разделение в 12% полиакриламидном геле амплифицированных аллелей локуса D6S366.

1 — фрагменты плазмидной ДНК pBR322, расщепленной рестриктазой MspI; 2–6 — генотипические аллельные комбинации пяти неродственных человек; 2 — 10/12, 3 — 11/13, 4 — 13/17, 5 — 14/15, 6 — 12/16; 7 — аллельная "лестница"; 8–13 — семейный анализ, выявляющий следующие генотипы: 8 — 15/16 (отец), 9 — 12/15 (1-й ребенок), 10 — 13/16 (2-й ребенок), 11 — 13/15 (3-й ребенок), 12 — 12/16 (4-й ребенок), 13 — 12/13 (мать).

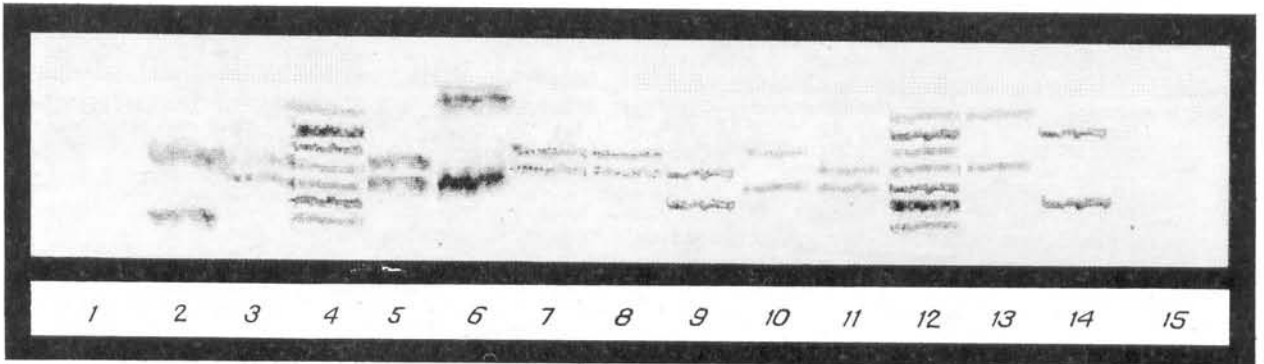


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации локуса HUMvWFII в образцах ДНК различного происхождения, полученных с использованием Chelex<sup>R</sup>-100.

1 — отрицательный контроль; 2, 4, 12 — аллельная "лестница"; 2, 3, 5–11, 13–15 — генотипирование образцов ДНК, выделенных из: 2 — слюны (9/12), 3 — свежего пятна крови (11/12), 4 — жидкой крови (11/12, общее происхождение с образцом 3), 5 — старого пятна крови (11/15), 6 — одиночного волоса (12/13), 7 — свежего окурка сигареты (12/13, общее происхождение с образцом 7), 8 — свежего окурка сигареты (12/13), 9 — спермы (10/12, отец), 10 — жидкой крови (11/13, мать), 11 — слюны (11/12, ребенок), 12 — пятна спермы (12/15), 13 — старого окурка сигареты (10/14, дополнительная ультрафильтрация через Microson<sup>TM</sup>-30), 14 — старого окурка сигареты (ND, общее происхождение с образцом 14, без дополнительной ультрафильтрации), 15 — старого окурка сигареты.