

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 электрофоретических полос в аллельном диапазоне, что, как правило, свидетельствует о полной деградации в образце аллелей анализируемого локуса и, следовательно, о невозможности проведения генотипи-

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 исследования по созданию новых высокоинформативных панелей STR-локусов для целей судебно-экспертного использования проводятся и в нашей стране. В частности, в Государственном науч-

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)_n/(AGAT)_n. 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, пятен крови, смешанных образцов из влагалища, костного материала, спермы и пятен спермы, волос, слюны, окурков сигарет ДНК выделяли по описанным ранее методикам с использованием фенол-хлороформной экстракции и(или) хелатирующего полимера Chelex^R-100 ("Bio-Rad Laboratories", США) [7]. Для некоторых образцов проводили дополнительную очистку и концентрирование с использованием колонок для ультрафильтрации CentriconTM-100 или MicroconTM-30 ("Amicon", США). Концентрацию ДНК в образцах определяли электрофоретически (сравнивая с известными разведениями ДНК λ-фага) или использованием минифлуориметра DuNA Quant 200 ("Pharmacia", Швеция).

АМР-FLP-анализ. Исследования выполняли на амплификационных наборах, разработанных в лаборатории молекулярной диагностики и геномной дактилоскопии "ГосНИИгенетика" (Москва). ПЦР проводили на амплификаторах PHS-2 ("Techn", Великобритания), PolyChain ("Polygen", Австрия), PTC-100 ("MJ Research Inc.", Великобритания), Omn-E, TouchDown ("Hybaid", Великобритания), 9600 GenAmp System ("Perkin-Elmer", США), Циклотемп-2, -4, -5 (СТМ, Россия).

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 (аллельных "лестниц") 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 (типа Perkin-Elmer#801—0537) и приборов с нагреваемой крышкой позволило вдвое (в среднем) сократить общее время реакции без снижения ее эффективности. Так, для локуса HUMvWFII стандартная программа амплификации — 94°C/1 мин, 55°C/1 мин, 72°C/1 мин — была редуцирована до 94°C/30 с, 55°C/30 с, 72°C/30 с, в том числе первая денатурация — 4 мин, последний синтез цепи — 10 мин.

Условия электрофоретического анализа продуктов реакции, описанные в экспериментальной части, обеспечивают позиционное разделение соседних аллелей (различающихся на 4 п. н.) не менее чем на 2 мм, что является достаточным для уверенного генотипирования с использованием аллельных "лестниц". Отметим, что для обоих локусов в ходе реакции амплификации помимо ожидаемых продуктов происходит также наработка неаллельных (неспецифических) более высокомолекулярных фрагментов в диапазоне длин 210—270 п. н., которые по этой причине присутствуют в аллельных "лестницах". Поэтому для облегчения интерпретации результатов целесообразно использование одной дорожки в геле для высокомолекулярного стандарта ДНК с набором фрагментов известной длины (в настоящей работе использова-

лись ДНК фага ϕ 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^R 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 CentriconTM-100 или MicroconTM-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 CentriconTM-100 или MicroconTM-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 ¹	Длина аллеля, п. н.	Число наблюдений	Частота встречаемости ^{2,3}	"Потолочная" частота встречаемости ³
HUMvWFII				
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
D6S366				
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

¹ Нумерация аллелей отражает число содержащихся в них тандемных повторов.

² ± стандартная ошибка.

³ 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., Одинокова 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.

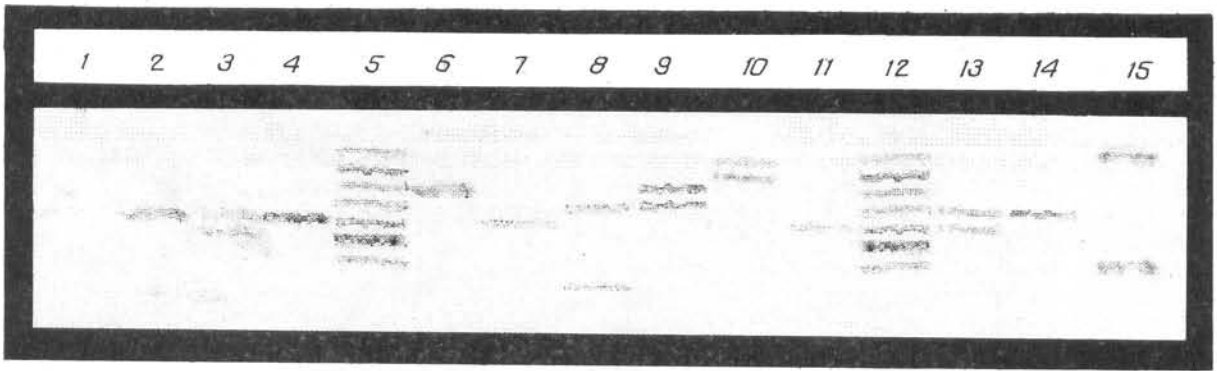


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации локуса HUMvWFII в образцах ДНК, выделенных из жидкой крови.

1 — отрицательный контроль; 2 — ДНК фага ϕ 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.

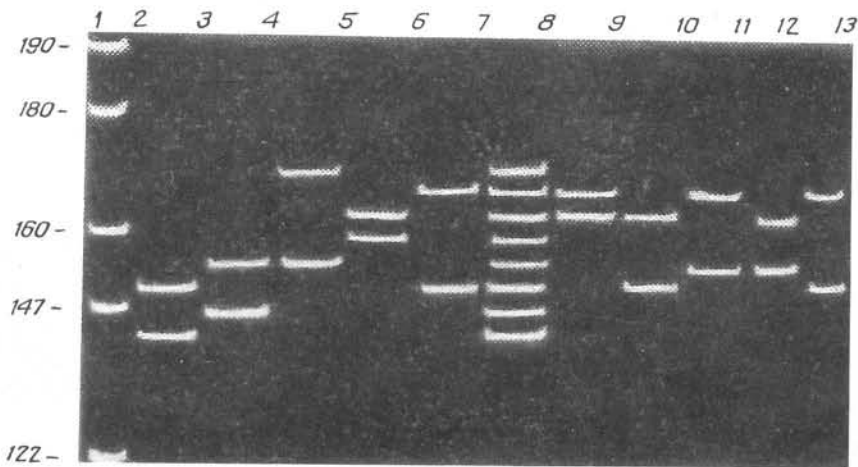


Рис. 2. Разделение в 12% полиакриламидном геле амплифицированных аллелей локуса D6S366.

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).

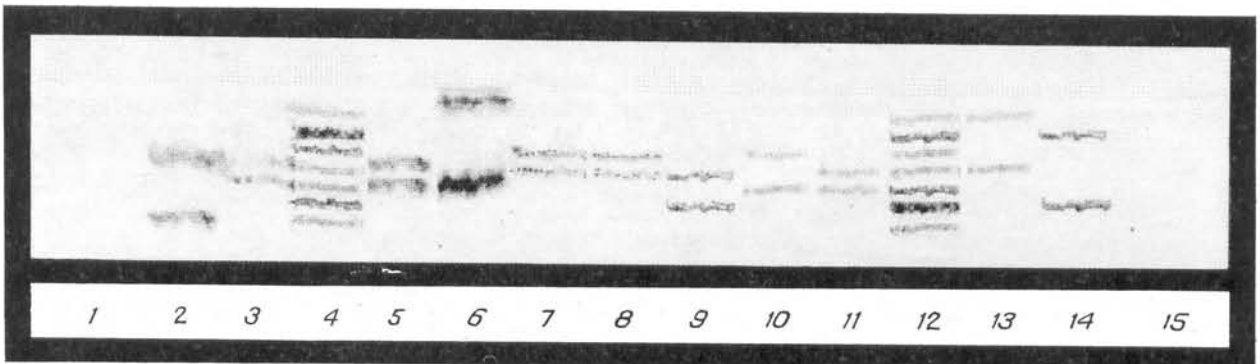


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации локуса HUMvWFII в образцах ДНК различного происхождения, полученных с использованием Chelex^R-100.

1 — отрицательный контроль; 2, 12 — аллельная "лестница"; 2, 3, 5–11, 13–15 — генотипирование образцов ДНК, выделенных из: 2 — слизня (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 — спермы (10/12, отец), 9 — жидкой крови (11/13, мать), 10 — слизня (11/12, ребенок), 11 — пятна спермы (12/15), 12 — старого окурка сигареты (10/14, дополнительная ультрафильтрация через MicroconTM-30), 13 — старого окурка сигареты (ND, общее происхождение с образцом 14, без дополнительной ультрафильтрации).