

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 577.29

СОЗДАНИЕ БИОЧИПА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНЫХ ГАПЛОГРУПП
Y-ХРОМОСОМЫ, ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЯХ

© 2012 г. Д. О. Фесенко^{1,2*}, О. В. Каленник², В. Е. Барский²,
А. С. Заседателев¹, Т. В. Наседкина¹

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²ООО “Биочип-ИМБ”, Москва, 119991

Поступила в редакцию 02.11.2011 г.

Принята к печати 14.02.2012 г.

Разработан биочип для установления принадлежности образца ДНК к одной из следующих гаплогрупп Y-хромосомы: C, DE, G, H, I, J, L, N, O, R. В качестве маркеров выбраны однонуклеотидные полиморфизмы – M130, M145, P257, M69, U179, M304, M185, M231, M175, P224 соответственно. Методика генотипирования включает двухстадийную ПЦР с включением флуоресцентной метки в продукт и последующую гибридизацию с иммобилизованными зондами на биочипе. Анализ соотношений флуоресцентных сигналов в парах “зонд исходного типа” – “группоспецифичный зонд” для каждого из выбранных полиморфных маркеров показал достаточную надежность определения гаплогрупп Y-хромосомы с использованием биочипа. Достоверность генотипирования подтверждена прямым секвенированием.

Ключевые слова: генотипирование, биочип, гаплогруппа Y-хромосомы, однонуклеотидный полиморфизм, гнездовая ПЦР.

DEVELOPMENT OF BIOCHIP FOR DETERMINATION OF Y-HAPLOGROUPS OCCURRING IN RUSSIAN POPULATIONS, by D. O. Fesenko^{1,2*}, O. V. Kalennik², V. E. Barsky², A. S. Zasedatelev¹, T. V. Nasedkina¹ (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: biochip@nm.ru; ²ООО Biochip-IMB, Moscow, 119991 Russia). Biochip has been developed which allowed to determine the following Y-chromosome haplogroups: C, DE, G, H, I, J, L, N, O, R in a DNA sample. The following SNPs were chosen as haplogroup markers: M130, M145, P257, M69, U179, M304, M185, M231, M175, P224, correspondingly. The genotyping included two-round PCR with fluorescent label incorporation into PCR product followed by hybridization with immobilized probes on biochip. The analysis of fluorescent signal ratios in pairs of immobilized probes “wild-type probe” – “group specific probe” for each of chosen polymorphic markers showed high accuracy of Y-haplogroup genotyping using biochip. The reliability of genotyping was confirmed by direct sequencing.

Keywords: genotyping, biochip, Y-chromosome haplogroup, SNP, nested PCR.

Исследование ДНК – основной метод идентификации личности. Новые знания об устройстве генома человека стимулируют развитие новых методов в судебной медицине и криминалистике, одним из которых является определение гаплогрупп Y-хромосомы. В связи с тем, что 95% ДНК Y-хромосомы не вступает в рекомбинацию, она передается практически неизменной по мужской линии, вместе с возникающими в ней мутациями. Таким образом, отцовские линии представляют собой последовательную “запись” мутационных событий в продолжительном ряду поколений, что позволяет точно реконструировать молекулярную эволюцию мужского генного пула человечества.

Каждая этническая группа человечества имеет свою генетическую историю, одним из характерных ее компонентов является статус Y-хромосомы по спектру и частотам гаплогрупп. Используя данные о распределении гаплогрупп в различных этносах, можно с определенной вероятностью указать этническое происхождение носителя ДНК, если известна его гаплогруппа, что особенно важно для генеалогии, антропогенетики, а также криминалистики и судебной медицины. Ценность генетического профиля Y-хромосомы определяется также традицией передачи фамилии по мужской линии, т.к. даже при значительном нивелировании в смешанных браках характерных антропологических признаков предка по мужской линии, его фамилия (чаще всего имеющая этническую

* Эл. почта: biochip@nm.ru

специфику) будет передана искомому носителю ДНК.

Согласно принятой Консорциумом по Y-хромосоме номенклатуре, в современной человеческой популяции выделяют 20 основных ветвей филогенетического древа Y-хромосомных гаплогрупп – A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T. Большая часть из них характерна для народов, проживающих в России и близлежащих странах. Опираясь на опубликованные данные по частотам встречаемости каждой из гаплогрупп среди народов России [http://genofond.ru], мы отобрали 10 гаплогрупп, представляющих наибольший интерес, а именно – C, DE, G, H, I, J, L, N, O, R.

В качестве маркеров гаплогрупп могут выступать тандемные повторы (STR) [1], делеции, инсерции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) [2]. Преимущество SNP-маркеров – в низкой частоте спонтанных мутаций: 10^{-8} [3] по сравнению с STR, частота которых – 10^{-2} – 10^{-3} [4, 5]. Кроме того, небольшая длина SNP-маркеров (так же как и коротких инсерций и делеций) позволяет им лучше сохраняться в деградировавшей, фрагментированной ДНК, чем более протяженным STR-маркерам. Для большинства выбранных гаплогрупп характерны несколько различных SNP-маркеров. Они, по-видимому, неравнозначны, так как расположены в разных точках филогенетического древа, но опубликованных в настоящее время данных недостаточно, чтобы отдать предпочтение какому-то определенному маркеру из известных. В связи с этим, из них мы выбирали те, нуклеотидный состав которых более удобен для дизайна ДНК-зондов и ПЦР-праймеров. В итоге, на основании опубликованных данных [2] и банка Y-DNA SNP Index 2012 мы выбрали следующие SNP (соответствующие им гаплогруппы указаны в скобках): M130 (C), M145 (DE), P257 (G), M69 (H), U179 (I), M304 (J), M185 (L), M231 (N), M175 (O), P224 (R) соответственно. В качестве методической платформы для SNP-генотипирования по Y-хромосоме использовали технологию гидрогелевых биочипов. На основе этой технологии ранее разработаны биочипы для определения группы крови и определения пола, которые уже используются в криминалистических лабораториях [6, 7].

Исследовали 17 образцов биологического материала (кровь или слюна) мужчин. ДНК выделяли при помощи набора Oragene (“DNA Genotek”, Canada). Концентрацию измеряли на флуориметре Qubit® с использованием набора Quant-iT™ (“Invitrogen”, USA). Кроме того, в качестве контрольных, использовали 10 образцов ДНК (по одному для каждой гаплогруппы), любезно предоставленных Лабораторией популяционной генетики МГНЦ РАМН. Контрольные

образцы секвенировали в прямом и обратном направлении.

Для наработки десяти фрагментов синтезировали по две пары праймеров для каждого из двух этапов классической “гнездовой” ПЦР. Свойства праймеров оценивали с помощью программы Oligo 6.31 (“MBI Inc.”, США). Длины ПЦР-продуктов I- и II-го этапов составили 131–235 п.н. и 68–133 п.н. соответственно.

ПЦР проводили на приборе MiniCycler (“MJ Research”, США) в объеме 25 мкл реакционной смеси (67 мМ буфер Трис-НСl, рН 8.6, 166 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Тритон X-100), содержащий 1.5 мМ MgCl_2 , 0.2 мМ каждого из dNTP (“Силекс”, Россия), по 5 пкмоль праймеров, 5 нг геномной ДНК и 1.5 ед. акт. HotTaq-полимеразы (“Силекс”). HotTaq-полимеразу активировали 12 мин при 94°C и проводили в первом этапе 45 циклов амплификации (94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 30 с), затем 2 мин при 72°C. В смесь второго этапа ПЦР (состав тот же, праймеры второго этапа) в качестве ДНК-матрицы добавляли 2 мкл продукта из первого этапа. Для флуоресцентного маркирования ПЦР-продукта на втором этапе вносили 0.2 нмоль dUTP-Cy5. Режим амплификации такой же, как на первом этапе, только число циклов уменьшали до 30.

Процедура изготовления биочипов описана ранее [8]. Гибридизационную камеру биочипа заполняли смесью следующего состава: 25% формид, 5×SSPE, 50 об% ПЦР-продукта. После инкубации (18 ч, 37°C) и отмывки (45 мин в 1×SSPE при комнатной температуре) биочипы промывали дистиллированной водой, высушивали сжатым воздухом, помещали в портативный анализатор (ООО “Биочип-ИМБ”, Москва) и регистрировали сигнал с экспозицией 350–1000 мс. Изображение анализировали с использованием программы ImageGel 2.0 (ИМБ РАН).

Биочип позволяет определять принадлежность образца ДНК к одной из гаплогрупп (приведенных выше), наиболее распространенных в России среди населения и мигрантов из ближнего зарубежья. На рис. 1 представлена схема нанесения ДНК-зондов на биочип и картины гибридизации. Перечень иммобилизованных ДНК-зондов приведен в таблице. В двух верхних рядах биочипа расположены зонды исходного типа, комплементарные ДНК так называемого “Y-хромосомного Адама”. В двух нижних рядах нанесены группоспецифичные зонды, комплементарные последовательности соответствующей гаплогруппы, каждый ДНК-зонд нанесен в двух повторностях (рис. 1). При анализе ДНК Y-хромосомы, принадлежащей к одной из определяемых гаплогрупп, например, к гаплогруппе I (рис. 1), происходит комплементарное связывание I-специфичного зонда, расположенного в двух нижних рядах биочипа в соответст-

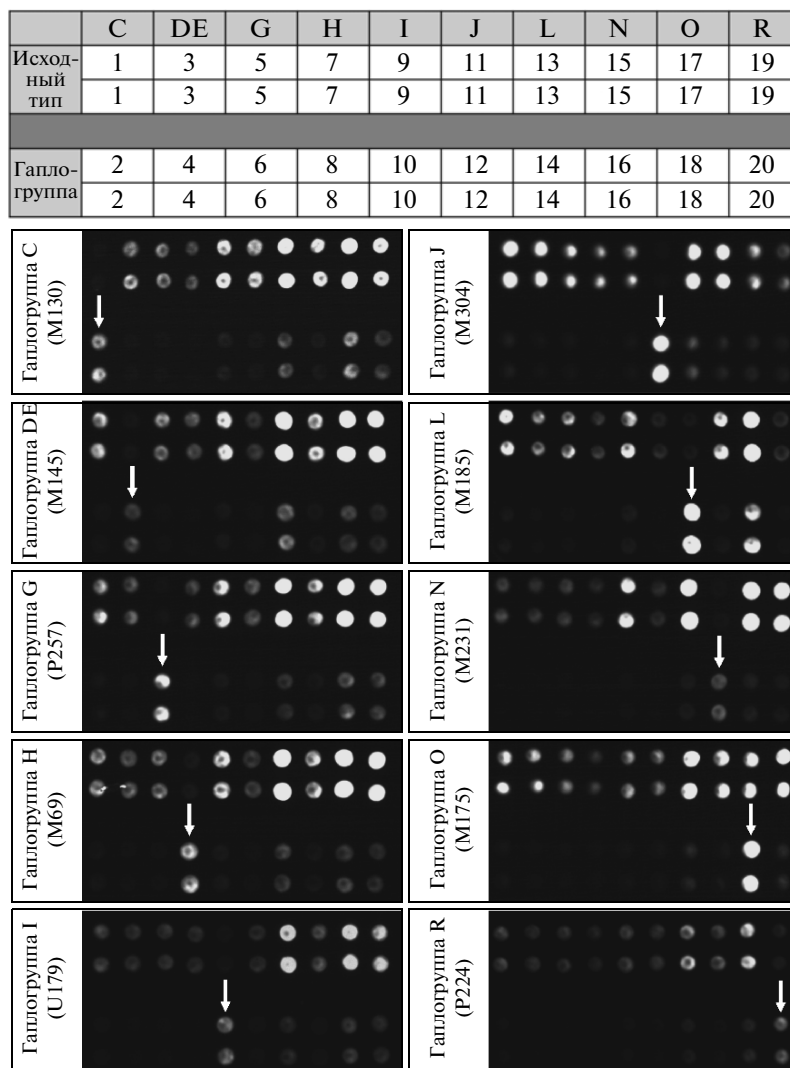


Рис. 1. Схема нанесения ДНК-зондов на биочип (верхняя часть рисунка). Номерами обозначены ДНК-зонды из таблицы. В верхних двух рядах иммобилизованы зонды, комплементарные ДНК исходного типа, в нижних двух рядах — комплементарные измененной ДНК, характерной для соответствующей гаплогруппы. Для каждого столбца указаны ДНК-зонды, дифференцирующие одну из десяти анализируемых гаплогрупп. В нижней части рисунка приведены гибридационные картины контрольных образцов ДНК для каждой гаплогруппы. Стрелками обозначены ячейки с группоспецифичными ДНК-зондами, в которых произошла характерная для них гибридация.

ющем для этой группы столбце, и зондов исходного типа для всех остальных гаплогрупп. Присутствие зондов исходного типа обеспечивает положительный внутренний контроль успешного прохождения ПЦР для всех фрагментов ДНК, содержащих полиморфные маркеры для определения гаплогрупп. На гибридационной картине образца, несущего гаплогруппу, не входящую в перечень анализируемых, а именно — А, В, М, L, Q, S, T, флуоресцируют только ячейки с зондами исходного типа (два верхних ряда биочипа).

В ходе исследования получены гибридационные картины контрольных образцов, генотипы которых верифицированы прямым секвенирова-

нием. В результате цифровой обработки этих картин подтверждено полное совпадение результатов генотипирования.

На рис. 1 приведена схема расположения ДНК-зондов на биочипе. В столбцах биочипа расположены ДНК-зонды, ответственные за генотипирование каждого из маркеров: верхняя пара комплементарна ДНК исходного типа, нижняя — группоспецифичной ДНК. Как видно из примеров, приведенных в нижней части рис. 1, в большинстве случаев оценить результаты можно визуально, однако более надежным и доступным для программной обработки способом является определение интенсивности флуорес-

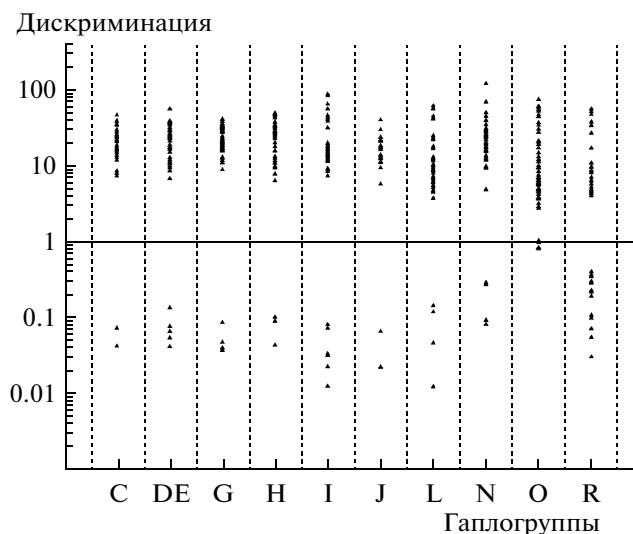


Рис. 2. Дискриминационные соотношения сигналов для гаплогрупп в логарифмической шкале. В каждой гаплогруппе дискриминационные соотношения разделились на два пула значений. В интервале между пулами устанавливается дискриминационный порог, необходимый для принятия решения – к какому генотипу относится образец. Если дискриминация исследуемого образца выше порога, то генотип имеет исходный тип; если ниже, то генотип характерен для соответствующей гаплогруппы. Чем шире интервал между пулами, тем меньше вероятность неверного генотипирования гаплогруппы.

центного сигнала. Для каждой пары зондов определяли так называемое дискриминационное отношение D , которое представляет собой отношение среднего значения верхней пары ячеек (с зондами исходного типа) к среднему значению пары нижних (с группоспецифичными зондами). Величину D определяет как яркость специфического сигнала, так и неспецифическая “подсветка” парного зонда. Для надежной интерпретации результатов и правильной характеристики генотипа определяли значения D для каждой гаплогруппы, используя контрольные образцы с известным генотипом. Как видно на рис. 2, значения D каждой гаплогруппы разделились на два пула, соответствующих генотипам исходного и измененного типа, характерным для данной гаплогруппы. Значения D для генотипов исходного типа выше единицы, а для группоспецифичных “мутантных” генотипов – ниже этого значения. Таким образом, определение значения D позволяет точно генотипировать исследуемый образец по каждому полиморфному маркеру.

Исследование Y-хромосомы с помощью разработанного биочипа позволяет в короткие сроки и с минимальными затратами определять гаплогруппу. Преимуществом используемых маркеров гаплогрупп является их малая протяженность (это точечные мутации), что позволяет подобрать ПЦР-праймеры для амплификации коротких фрагментов. Это особенно важно в экспертно-криминологической практике, нередко имеющей дело с деградированными образцами. В практическом плане, полученная информация позволяет делать вероятностные предположения об этниче-

ской принадлежности определяемого лица, либо о принадлежности ископаемого антропологического образца к определенной этнической ветви.

ДНК-зонды, иммобилизованные на биочипе

№	Название	Фрагмент последовательности (5' → 3')	Длина, п.н.
1	C-M130_C	...TTTCCCTGC...	17
2	C-M130_T	...TTTCTCTGC...	16
3	DE-M145_C	...CTCTCGCCT...	17
4	DE-M145_T	...CTCTTGCCT...	16
5	G-M257_G	...TCTGGTGGC...	17
6	G-M257_A	...TCTGATGGC...	17
7	H-M69_T	...GAAATAAA...	22
8	H-M69_C	...GAAACAAA...	18
9	I-U179_G	...GAAAGCCCA...	17
10	I-U179_A	...GAAAACCCA...	18
11	J-M304_A	...GTGAAACAA...	18
12	J-M304_C	...GTGACACAA...	18
13	L-M185_C	...AGGCCGCAT...	17
14	L-M185_T	...AGGCTGCAT...	16
15	N-M231_G	...TTTTCGAATT...	19
16	N-M231_A	...TTTCAAATT...	19
17	O-M175_del-v1	...TCTCAAGAA...	20
18	O-M175_n-v1	...TCTTCTCAA...	23
19	R-P224_C	...TCTTCCCCT...	17
20	R-P224_T	...TCTTTCCCT...	17

Примечание. Полиморфные позиции во фрагментах последовательности зондов выделены жирным шрифтом.

Выражаем благодарность О.П. Балановскому и его сотрудникам, любезно предоставившим контрольные образцы ДНК.

Работа получила финансовую поддержку Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК №16.512.11.2034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rootsi S., Zhivotovsky L.A., Baldovic M., et al. 2007. A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* **15**, 204–211.
2. Karafet T.M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L., Hammer M.F. 2008. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* **18**, 830–838.
3. Reich D.E., Schaffner S.F., Daly M.J., McVean G., Mullikin J.C., Higgins J.M., Richter D.J., Lander E.S., Altshuler D. 2002. Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat. Genet.* **32**, 135–142.
4. Ascioglu F., Oguz-Savran F., Ozbek U. 2004. Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis. Markers.* **20**, 313–315.
5. Hohoff C., Dewa K., Sibbing U., Hoppe K., Forster P., Brinkmann B. 2007. Y-chromosomal microsatellite mutation rates in a population sample from northwestern Germany. *Int. J. Legal Med.* **121**, 359–363.
6. Фесенко Д.О., Иванов П.Л., Корниенко А.Е., Земскова Е.Ю., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. 2011. Оптимизация биологического микрочипа для генотипирования локуса АВ0: аналитические аспекты. *Судебно-медицинская экспертиза.* **2**, 30–33.
7. Иванов П.Л., Фесенко Д.О., Корниенко А.Е., Рой О.В., Земскова Е.Ю., Заседателев А.С., Наседкина Т.В. 2011. Оптимизация биологического микрочипа для генотипирования локуса АВ0: коррекция ДНК-зондов. *Судебно-медицинская экспертиза.* **1**, 32–35.
8. Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. 2004. Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal. Biochem.* **325**, 92–106.