

На правах рукописи

Кравцова Ольга Александровна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДРЕВНИХ И
СОВРЕМЕННЫХ ОБРАЗЦОВ ДНК**

03.00.04 – биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2006

Работа выполнена на кафедре биохимии ГОУВПО «Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина»

Научный руководитель: Кандидат биологических наук, доцент

АскарOVA Альфия Наримановна

Официальные оппоненты: Доктор медицинских наук, профессор
Зубаиров Дилявер Мирзабдуллоевич

Доктор биологических наук, профессор
Хаертдинов Равиль Анварович

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и
биофизики КНЦ РАН

Защита состоится «_8_» __июня__ 2006 г. в _13_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд.209.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан «_6_» __мая__ 2006 г.

И.о. ученого секретаря диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

Абрамова З.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Вопросы происхождения любого этноса в силу многогранности процесса являются в науке достаточно трудной проблемой. К числу наиболее перспективных подходов для изучения генетической истории народов относится анализ изменчивости высокополиморфных генетических систем (Алтухов Ю.П., 1996). Огромное количество полиморфных маркеров, выявленное при расшифровке генома человека, является мощным инструментом для анализа генофонда, его основных характеристик, динамики, истории и географии. Многочисленные исследования полиморфных систем ядерного и митохондриального геномов привели к развитию нового раздела геномики – этногеномики (Лимборская С.А., Хуснутдинова Э.К., Балановская Е.В., 2002). На сегодняшний день накоплен большой объем данных по полиморфизму аутосомных микросателлитных локусов, микросателлитов Y-хромосомы и вариабельности митохондриального генома в различных популяциях мира.

Развитие методов молекулярно-генетического анализа позволило обратиться к новому источнику информации – древней ДНК. Высокий полиморфизм генетических маркеров, известная скорость мутаций, а также их селективная нейтральность, позволяют воссоздать процессы заселения территорий, оценить время дивергенции субпопуляций, установить степень метисации и определить вклад отдельных компонентов в структуру генофонда изучаемой популяции.

В России на сегодняшний день, с помощью полиморфных генетических маркеров, охарактеризованы генофонды народов Волго-Уральского региона (Хуснутдинова Э.К. и др., 1995, 1997, 1999, 2003); народов Сибири (Деренко М.В. и др., 2001; Голубенко М.В. и др., 2001; Петрищев В.Н. и др., 1993), популяций русских (Лункина А.В. и др., 2004; Малярчук В.А. и др., 2002; Морозова И.Ю. и др., 2005). Несмотря на это, татары, второй по численности народ РФ, являются малоизученной группой в генетико-популяционном

отношении, и вопрос о происхождении этой этнической группы остается открытым (Халиков А.Х., 1994).

Итоги более чем столетнего изучения антропологического типа татар отмечают их расовую неоднородность как внутри основных территориальных групп, так и между ними, что, вероятно, отражает специфику их расогенеза и этногенетической связи. С другой стороны, все исследованные группы татар довольно близки между собой, и по выраженной европеоидности и наличию сублапоноидности татары стоят ближе к народам Поволжья и Приуралья, чем к другим тюркоязычным народам (Газимзянов И.Р., 2001).

В связи с вышесказанным, представляется актуальным исследование полиморфизма локусов ядерной и митохондриальной ДНК в древних и современных популяциях татар для выявления их местоположения в системе мирового генофонда.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является молекулярно-генетическая характеристика образцов древней и современной ДНК населения Республики Татарстан (РТ).

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

- изучить характер распределения частот аллелей микросателлитных локусов ядерного генома и частот гаплогрупп мтДНК в популяциях татар, определить уровни их аллельного и генотипического разнообразия;
- оптимизировать процедуру выделения древней ДНК из костных останков, обнаруженных в захоронениях на территории РТ;
- определить половую принадлежность, родственные отношения внутри могильников и этногенетическую принадлежность костных останков по данным о полиморфизме ядерного и митохондриального геномов
- рассчитать генетические расстояния по каждой группе полиморфных маркеров в современных популяциях татар, и на их основе провести филогенетический анализ.

Научная новизна

Впервые по маркерам ядерного и митохондриального генома охарактеризован генофонд двух субэтнических групп татар, представляющих коренное население РТ: казанские татары и татары-мишары.

Получены данные о распределении частот аллелей и генотипов в двух изученных группах по 11 аутосомным STR локусам и 8 микросателлитным маркерам Y-хромосомы, входящим в международную систему по генотипированию человека. Дана индивидуализирующая оценка систем на основе микросателлитных локусов ядерного генома.

Рестрикционный анализ мтДНК выявил наличие основных митотипов, распространенных в странах Восточной и Западной Европы с преобладанием западно-евразийских гаплогрупп.

Впервые на территории РТ проведен молекулярно-генетический анализ ДНК, выделенной из костных останков, обнаруженных в захоронениях на территории РТ. Установлена половая принадлежность костных останков, определены группы близких кровных родственников внутри каждого из захоронений. ПДРФ-анализ молекул мтДНК из костных останков позволил выявить основные митотипы и определить вклад европеоидного и монголоидного компонентов в генофонд древней популяции татар.

Впервые по данным о полиморфизме маркеров ядерного и митохондриального генома рассчитаны генетические расстояния между современной популяцией татар и некоторыми популяциями мира, тем самым было определено положение татар в системе мировых генофондов.

Практическая значимость

Молекулярно-генетическая характеристика древней и современной популяции татар является важным вкладом в изучение особенностей генофондов России. Полученные данные будут представлять интерес для популяционных генетиков, историков, археологов и антропологов.

Оптимизированный метод выделения деградированной ДНК может быть применен в судебно-медицинской экспертизе. Частоты аллелей и генотипов по

аутосомным STR локусам, частоты гаплотипов Y-хромосомы, полученные на основе данных по Y-STR локусов, могут быть применены для вероятностных расчетов при определении родства (отцовства/материнства) и проведении генетических экспертиз по уголовным делам. Данные, полученные в ходе генотипирования, представляют собой важную информацию при составлении генетического паспорта и при создании банков данных ДНК.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Республики Татарстан (Казань, 2001); XL международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2002); 6-8 школах - конференциях «Биология-наука XXI века» (Пушино, 2002-2004), Вторых и Третьих Халиковских Чтениях (Казань, 2002-2003); XXXV Урало-Поволжской археологической студенческой конференции «Археология Урала и Поволжья: Итоги и перспективы участия молодых исследователей в решении фундаментальных проблем ранней истории народов региона» (Йошкар-Ола, 2003); Международной научной конференции «Новая геометрия природы» (Казань, 2003); научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2004); международной конференции «Human Genome Meeting HGM2005» (Kyoto, Japan, 2005), а также на ежегодных итоговых научных конференциях Казанского государственного университета в 2002-2005 гг.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 160 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка и 35 таблиц. Список использованной литературы включает 212 источников, из них 162 иностранных.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИСЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использованы образцы ДНК современного населения, представляющие две этнографические группы татар: казанские татары и татары–мишары. Выборка казанских татар набрана в Азнакаевском районе Республики Татарстан (N=135), татары-мишары представлены дисперсной выборкой из Буинского района РТ (N=141). Для проведения анализа по микросателлитам Y-хромосомы дополнительно были использованы образцы ДНК мужчин, представляющих русское население г. Казани (N=69). Материал собран в ходе экспедиционных выездов в 2004-2005 гг. Этническую принадлежность выясняли путем индивидуального анкетирования, учитывая данные до третьего поколения. Материалами для выделения древней ДНК служили костные останки, обнаруженные при археологических раскопках 1977-2003 гг. на территории Республики Татарстан.

Методы исследования. Современную ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенол/хлороформной экстракции (Mathew C.G.P., 1984). Древнюю ДНК выделяли с помощью оптимизированного метода очистки органическими растворителями с последующей очисткой на сорбенте (коммерческий препарат производства «Литех», г. Москва). Изучение полиморфных локусов ядерного и митохондриального геномов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, предложенных в работах Ricci U. (2000), Butler J.M. (2003, 2004), Izagirre N. (1999), Kolman C. (2000), Quintans B. (2004), Петрищева В.Н. (1993), Наумовой О.Ю. (1997). ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», г.Москва). Рестрикционный анализ проводили с использованием ферментов производства ООО «СибЭнзим» согласно инструкции производителя. Продукты амплификации и рестрикции анализировались электрофоретически в ПААГ с последующей окраской гелей нитратом серебра (Budowle B., 1991) и высушиванием в 10% глицерине.

Статистическая обработка полученных данных. Частоты аллелей и генотипов рассчитывали путем прямого подсчета с использованием макроса

VBA к Microsoft Excel, разработанного Тарасовым Д.С. (каф. генетики, КГУ, г.Казань).

Распределение частот аллелей и генотипов исследованных STR локусов проверяли на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга с использованием двустороннего теста методом Guo и Thompson (Guo S.W., 1992), и одностороннего теста на наличие избытка и дефицита гетерозигот (Rousset F., 1995), ожидаемые и наблюдаемые значения гетерозиготности, уровни аллельной и генотипической дифференциации вычисляли общепринятыми методами, реализованными в программе Genepop v.3.4 (Raymond M., Rousset F., 1995). Показатели генного и генотипического разнообразия по полиморфным ядерным микросателлитным локусам и рестриционным сайтам мтДНК рассчитывали по формуле Нея и Таджима (Nei M., 1981). Для определения внутривидовой гетерогенности были рассчитаны расстояния между индивидуумами с помощью программы POPULATIONS (v.1.2.28). Консенсусные дендрограммы строили с помощью пакета программ Phylip (v.3.61) и Treeview (v.1.6.6). Для расчета генетических расстояний по маркерам ядерного генома между популяциями использовали стандартное генетическое расстояние D_S по Нею (Nei M., 1972), генетические расстояния по частотам гаплогрупп мтДНК D_a были рассчитаны по модифицированной формуле Cavalli-Sforza (Takezaki N, 1996). На основе полученных данных по генетическим расстояниям был проведен кластерный анализ методом объединения ближайших соседей (neighbour joining) с помощью программы POPTREE (модифицированной версии NJBAFD v.1.1), статистическая значимость полученных кластеров определялась методом bootstrap-анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полиморфизм ядерного и митохондриального геномов современного населения татар

Для оценки индивидуализирующих свойств микросателлитных маркеров и изучения характера распределения частота аллелей и генотипов в популяции,

был проведен анализ 11 аутосомных STR-локусов (D3S1358, D5S818, D7S820, D16S539, TH01, FGA (FIBRA), LPL (LIPOL), CD4, D21S11, TPOX, vWA31A) и 8 Y-STR локусов (DYS19, DYS392, DYS391, DYS393, DYS389I, DYS385, DYS448, DYS464) в двух популяциях татар. Митотипическое разнообразие современного генофонда оценивали с помощью ПДРФ-анализа D-петли ГВС1 и рестрикционного анализа кодирующей части молекулы мтДНК.

Анализ аутосомных микросателлитных локусов показал, что распределение частот аллелей в исследованных популяциях не отличается от таковых в мировых популяциях, и носит уни- или бимодальный характер распределения (рис. 1).

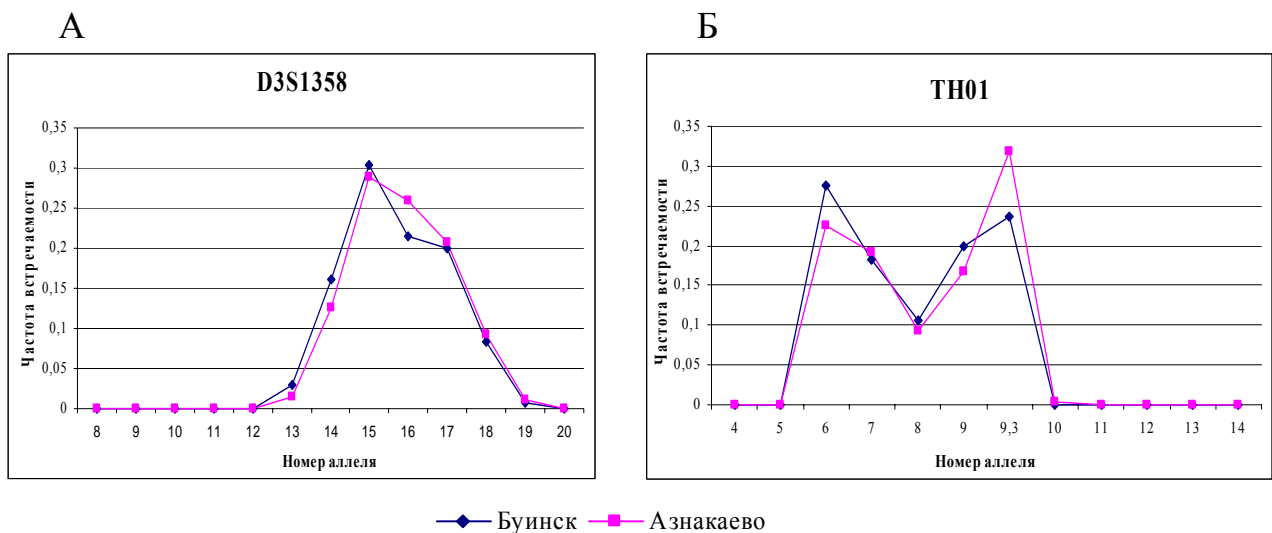


Рис. 1. Унимодальный (А) и бимодальный (Б) характер распределения аллелей по аутосомным микросателлитным локусам D3S1358 и HumTH01.

Различие в распределении аллелей и генотипов между двумя исследованными популяциями татар по микросателлитам было обнаружено только по 3 локусам (FGA, TPOX, D21S11). Однако, эти различия могут объясняться эффектом выборочности, так как эти локусы являются наиболее полиморфными системами (по локусу D21S11 обнаружено 69 генотипов из возможных 289). В целом, в исследованных популяциях обнаружен высокий «запас» генетического разнообразия по аутосомным микросателлитным локусам. Уровни гетерозиготности, также как и основные индивидуализирующие показатели, значимо не различаются (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика STR локусов

Азнакаевский р-н	TH01	TPOX	LPL	CD4	D7S820	D16S539	D3S1358	D5S818	vWA31A	FGA	D21S11
P_{EXACT}	0,0221	0,9898	0,0279	0,4596	0,0004	0,0163	0,3994	0,2624	0,9334	0,0170	0,0000
N_{OBS}	115	83	74	89	94	97	94	93	112	115	94
N_{EXP}	105,11	80,58	87,06	92,87	107,43	105,23	105,89	96,59	106,38	115,32	118,78
PM	0,1061	0,2080	0,1727	0,1606	0,0756	0,0879	0,0783	0,1322	0,0825	0,0491	0,0346
PD	0,8939	0,7920	0,8273	0,8394	0,9243	0,9121	0,9217	0,8678	0,9175	0,9509	0,9654
PE	0,6985	0,3093	0,2374	0,3681	0,4306	0,4662	0,4226	0,4113	0,6551	0,6985	0,4306
Буйский р-н	TH01	TPOX	LPL	CD4	D7S820	D16S539	D3S1358	D5S818	vWA31A	FGA	D21S11
P_{EXACT}	0,0704	0,7195	0,5210	0,0012	0,0461	0,0029	0,0344	0,0567	0,8650	0,0155	0,0000
N_{OBS}	83	81	95	96	111	96	106	98	115	110	112
N_{EXP}	96,78	79,72	97,04	96,45	114,24	108,97	108,33	99,08	115,11	110,16	121,01
PM	0,0802	0,2632	0,1451	0,1978	0,0675	0,0877	0,0901	0,1397	0,0656	0,0469	0,0460
PD	0,9198	0,7368	0,8549	0,8022	0,9324	0,9123	0,9099	0,8603	0,9344	0,9561	0,954
PE	0,3904	0,2614	0,3888	0,3883	0,5963	0,4065	0,5512	0,4524	0,6283	0,7134	0,5886

P_{EXACT} – точный тест на соответствие равновесию Харди-Вайнберга

N_{OBS} – наблюдаемые показатели гетерозиготности

N_{EXP} – ожидаемые показатели гетерозиготности

PM – вероятность случайного совпадения

PD – дискриминирующий потенциал

PE – индекс исключения

популяционные характеристики

индивидуализирующие характеристики

Общая вероятность совпадения составляет 5.9×10^{-12} – 6.3×10^{-12} или 1 человек на 169 млрд. людей

Показано, что по некоторым локусам обе популяции отклоняются от равновесия Харди-Вайнберга, причем отклонение обусловлено недостатком гетерозиготных индивидуумов (табл.2).

Таблица 2. Результаты точного теста на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, наличие избытка или дефицита гетерозигот

Локус	Равновесие Харди-Вайнберга				Дефицит гетерозигот				Избыток гетерозигот			
	Азнакаево		Буинск		Азнакаево		Буинск		Азнакаево		Буинск	
	P-value	S.E.	P-value	S.E.	P-value	S.E.	P-value	S.E.	P-value	S.E.	P-value	S.E.
D3S1358	0,399	0,015	0,034	0,006	0,432	0,005	0,215	0,015	0,957	0,004	0,792	0,016
FGA	0,017	0,004	0,015	0,004	0,322	0,026	0,017	0,006	0,687	0,023	0,987	0,005
D5S818	0,262	0,015	0,056	0,007	0,387	0,020	0,342	0,022	0,600	0,023	0,697	0,023
TH01	0,022	0,005	0,070	0,004	0,980	0,005	0,368	0,000	0,009	0,002	0,999	0,000
TPOX	0,989	0,002	0,719	0,014	0,680	0,019	0,305	0,019	0,287	0,019	0,624	0,020
vWA31	0,933	0,006	0,865	0,012	0,935	0,007	0,434	0,026	0,382	0,006	0,472	0,028
D7S820	0,000	0,000	0,046	0,007	0,000	0,000	0,011	0,003	0,998	0,000	0,982	0,004
D21S11	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	0,010	1,000	0,000	0,967	0,012
D16S539	0,016	0,003	0,002	0,001	0,003	0,001	0,003	0,001	0,099	0,000	0,995	0,001
LPL	0,027	0,004	0,521	0,014	0,003	0,001	0,557	0,020	0,996	0,001	0,453	0,022
CD4	0,459	0,024	0,001	0,000	0,194	0,020	0,000	0,029	0,773	0,024	0,657	0,026

Отклонение от равновесия Харди-Вайнберга за счет дефицита гетерозигот, может наблюдаться в нескольких случаях. Во-первых, исследованные локусы подвержены селективному отбору; во-вторых, в популяциях происходят процессы инбридинга; в-третьих, имеет место так называемый эффект Валенда, выраженный в генетической подразделенности исследованной популяции на несколько, более мелких, субпопуляций; в-четвертых, не последнюю роль может играть дрейф генов (Солбриг О., 1982).

По данным ряда авторов, микросателлитные STR-локусы являются селективно нейтральными (Степанов В.А., 2004). Для того, чтобы подвергаться

отбору, они должны находится в непосредственной близости от функционального гена. В нашем случае, такими локусам являются vWA31A, FGA, TH01, TPOX и LPL (табл.3). Возможно, данные локусы находятся под действием отбора, но подтверждение этого предположения является отдельным исследованием.

Таблица 3. Хромосомная локализация аутомсомных STR локусов

Локус	Хромосомная локализация
D3S1358	3p21.3
FGA	4q28, 3-й интрон гена α -фибриногена
D5S818	5q23.3-32
TH01	11p15.5, 1-й интрон гена тирозингидроксилазы
TPOX	2p23-pter, 10-й интрон гена пероксидазы
vWA31A	12p-12-pter, 40-й интрон гена фактора фон Виллебрандта
D7S820	7q
D21S11	21q
D16S539	16q22-24
LPL	8p22, 6-й интрон гена липопротеинлипазы
CD4	12p

Что касается возможного эффекта инбридинга, то для изучаемых нами популяций не существует прямых доказательств высокого уровня инбредности.

Таким образом, дефицит гетерозигот в данном случае можно объяснить случайным дрейфом генов и генетической неоднородностью (делением на субпопуляции, или эффектом Валенда) исследуемых популяций.

Сравнительная оценка частот аллельных вариантов микросателлитных локусов Y-хромосомы выявила различия между популяциями татар Азнакаевского р-на и русскими г. Казани. При этом основной вклад в дифференциацию определяется локусами DYS392, DYS393, DYS389 I и DYS448: рассчитанные для этих локусов индексы аллельного разнообразия были более чем в 1.2 - 1.7 раза выше в популяции из Азнакаевского р-на. В свою очередь, индексы аллельного разнообразия Y-микросателлитов популяции из Буинского р-на в большинстве случаев оказались близкими к таковым для популяции русских из г. Казани. В целом, показатели

гаплотипического разнообразия и дискриминирующего потенциала не различаются для двух исследованных субпопуляций татар (табл.4).

Таблица 4. Характеристики Y-STR локусов

Локус	Аллельное разнообразие h		
	Казанские татары	Татары-мишары	Русские г.Казани
DYS392	0,8083	0,6067	0,4728
DYS19	0,7491	0,7745	0,7592
DYS393	0,6469	0,5418	0,4842
DYS389I	0,6329	0,5827	0,5401
DYS391	0,5018	0,5342	0,5354
DYS385	0,8702	0,865	0,8439
	0,9628*	0,9332*	0,9476*
DYS448	0,7339	0,7284	0,5797
DYS464	0,8676	0,8397	0,8396
	0,9775*	0,9846*	0,9808*
Гаплотипическое разнообразие h** и дискриминирующий потенциал PD			
Минимальный гаплотип	0,9988	0,9990	0,9962
	0,9762	0,9385	0,7826
Минимальный гаплотип + DYS448	0,9988	1,0000	0,9966
	1,0000	1,0000	0,8116
Объединенная система из 8 локусов	1,0000	1,0000	1,0000
	1,0000	1,0000	1,0000

* - индексы генотипического разнообразия для мультикопийных локусов

Результаты анализа полиморфизма мтДНК указывают на наличие в популяциях татар как европеоидного, так и монголоидного компонентов в митохондриальном генофонде. Индексы генного разнообразия, рассчитанные для каждой из популяций по сайтам рестрикции D-петли ГВС 1, имеют сходные значения как с монголоидными, так и с европеоидными популяциями (табл.5). В целом по уровню гаплотипического разнообразия по ПДРФ-анализу D-петли, исследованные популяции стоят ближе к европейским, чем к монголоидным. Данные о преобладании европеоидного компонента в митохондриальном генофонде татар подтверждаются наличием основных европеоидных гаплогрупп (H, U, K, W, V, I, J) в исследованных популяциях, которые составляют 77.8-80% от общего числа выявленных митотипов. Однако в популяциях присутствует и монголоидный компонент, представленный митотипами, входящими в макрогруппы M* (C,D), N* (A) и R* (B), распространенных у населения Восточной Европы и Азии (табл.6).

Таблица 5. Показатели генного и гаплотипического h^* разнообразия по полиморфным сайтам D-петли ГВС1 мтДНК

Рестриктаза	Локализация сайта	Азнакаевский р-н	Буинский р-н	Русские России	Народы Европы	Монголы	Японцы	Народы Юго-Восточной Азии	Народы Африки
Ava II	(-)16390	0,0438	0,1381	0,1236	0,0596	0,0528	0,0573	0,0403	0,4549
Bam HI	(+)16389	0,0991	0,0148	0,0640	0,0728	0,0108	0,0000	0,0000	0,0000
EcoR V	(+)16274	0,0991	0,0718	0,1642	-*	0,1404	0,0958	-	-
Kpn I	(-)16129	0,2647	0,1631	0,2537	0,2124	0,2795	0,2914	0,3999	0,4610
Hae III	(+)16517	0,4139	0,4989	0,4957	0,4806	0,4915	0,4480	0,4991	0,3368
Rsa I	(-)16303	0,0991	0,0099	0,1941	0,0434	0,1846	0,1709	0,3384	0,2574
Rsa I	(-)16310	0,1508	0,0294	0,0000	0,3947	0,0296	0,0000	0,2280	0,0000
h^*		0,7372	0,6862	0,7320	0,6791	0,5682	0,7544	0,6378	0,9563

Таблица 6. Распределение митотипов в современных популяциях татар

Митотип	Локализация	Диагностические сайты	Частота митотипа % (число наблюдений)	
			Азнакаево (N=135)	Буинск (N=140)
H	06958-07049	<i>Alu I</i> 7025 (-)	39,26 (53)	37,14 (52)
HV	14716-14798	<i>Mse I</i> 14766 (-)	0	0
V	04519-04620	<i>Nla III</i> 4577 (-)	3,7 (5)	2,14 (3)
I	08196-08316	<i>Ava II</i> 8429 (+)	1,48 (1)	2,85 (4)
	16345-16545	BamHI 16389(+)		
J	13626-13729	<i>Bst NI</i> 13704 (-)	10,37 (14)	5 (7)
U	12216-12338	<i>Hinf I</i> 12308 (+)	13,33 (18)	26,43 (37)
K		<i>Hinf I</i> 12308 (+)	0	0,71 (1)
	09003-09105	<i>Hae II</i> 9052 (-)		
W		<i>Ava II</i> 8429 (+)	9,62 (13)	5,7 (8)
	08908-09033	<i>Hae III</i> 8994 (-)		
M	10308-10459	<i>Dde I</i> 10394 (+)	5,18 (7)	5 (7)
		<i>Alu I</i> 10397 (+)		
A	00602-00725	<i>Hae III</i> 663 (+)	5,18 (7)	10 (14)
B	08196-08316	Делеция 9 пн. V-области	1,48 (1)	0
C	13232-13393	<i>Alu I</i> 13262 (+)	6,67 (9)	0
D	05170-05261	<i>Alu I</i> 5176 (-)	5,18 (7)	5 (7)
h^{**}			0.8009	0.7756

Молекулярно-генетический анализ древней ДНК, выделенной из костных останков, обнаруженных на территории РТ

Оптимизация методов выделения древней ДНК. Генотипирование ДНК из древних образцов усложняется деградацией молекул ДНК, присутствием различных примесей в полученных препаратах и возможностью контаминации современными образцами ДНК.

После выделения и очистки стандартным методом фенол/хлороформенной экстракции, качественную оценку полученных препаратов проводили в агарозном геле с последующим окрашиванием EtBr и детекцией в УФ-излучении (рис.2).

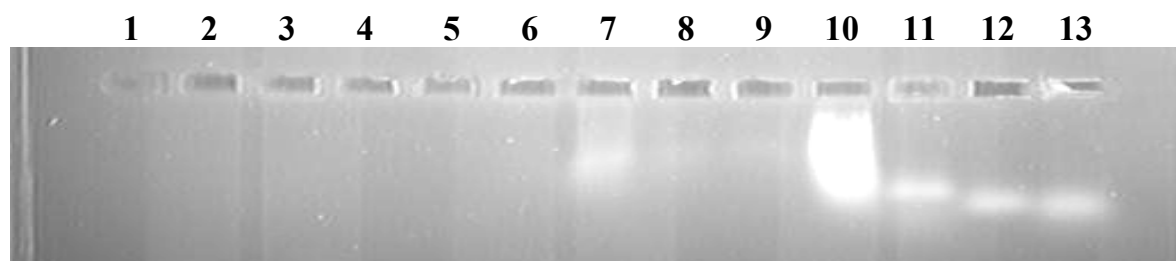


Рис.6. Электрофореграмма препаратов древней ДНК в 1.2% агарозном геле. Окрашивание EtBr с последующей визуализацией в УФ-свете. 1-9 – препараты древней ДНК, 10 – препарат современной ДНК, 11-13 – маркеры молекулярного веса (11- 300 п.н., 12 – 190 п.н., 13 – 160 п.н.).

Отсутствие видимых полос в лунках 1-6 и 8-9 на электрофореграмме свидетельствует о низкой концентрации препаратов ДНК (<1 нг, т.к. чувствительность EtBr при окраске нативной ДНК составляет 1-5 нг) и их высокой деградации (препарат ДНК в лунке 7 соответствует ~ 500 п.н.).

В препаратах ДНК также было обнаружено наличие примесей, способных ингибировать ПЦР. После растворения ДНК во всех пробах наблюдалась коричневая окраска различной интенсивности, обусловленная присутствием гумусовых кислот - соединений фенольной природы, обнаруживающихся в почвах, наличие которых приводило к полному ингибированию ПЦР (рис.3). Для освобождения от ингибирующих веществ была предпринята попытка переосаждения ДНК 96% этанолом. Но при дальнейшем исследовании также наблюдалось частичное ингибирование ПЦР (рис.4). В качестве контрольной

ДНК была использована ДНК современного человека. Реакция проводилась в 10 мкл, содержащей 20 нг современной ДНК и 1 мкл препарата древней ДНК.

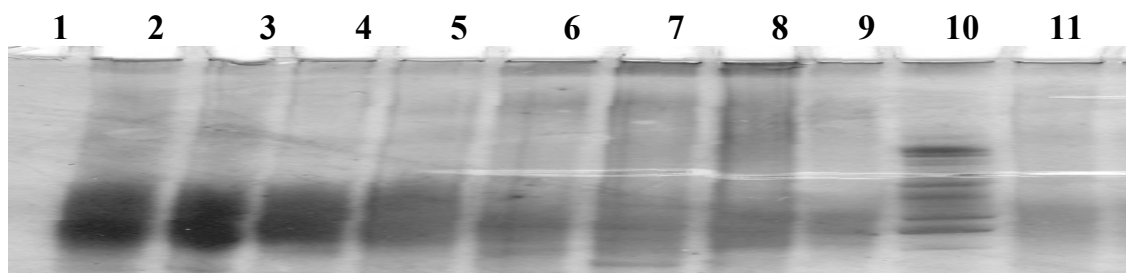


Рис.3. Электрофореграмма продуктов ПЦР в 8% ПААГ по локусу D3S1358. А. 1-9 – продукты ПЦР, 10 – контроль работы анализируемой тест-системы, K_{COBP} , 11- контроль чистоты реактивов, использованных при постановке ПЦР – $K_{ПЦР}$. На электрофореграмме наблюдается отсутствие продуктов амплификации, что свидетельствует об ингибировании ПЦР.

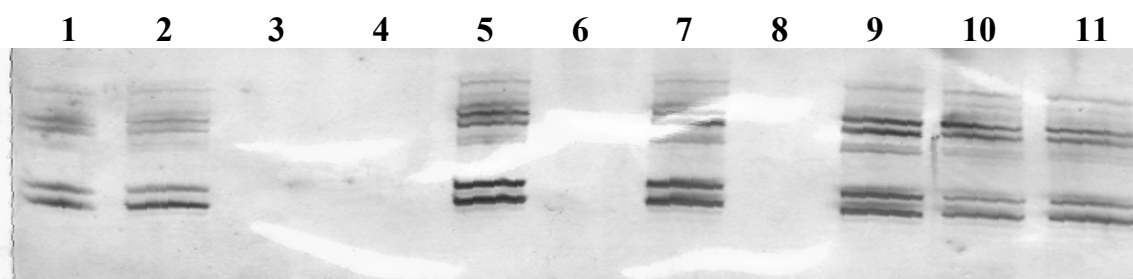


Рис.4. Электрофореграмма продуктов ПЦР по локусу D5S818. Постановка реакции амплификации на наличие ингибирования ПЦР препаратами ДНК, выделенными из костных останков. Дорожки 1-10 – амплификаты препаратов древней ДНК, 11 – K_{COBP} .

Дополнительная очистка от примесей ингибиторов была проведена с помощью коммерческого набора производства “Литех”, основанного на селективной сорбции нуклеиновых кислот на диатомите в присутствии солей гуанидинизотиоцианата. ДНК, очищенная таким способом, показала 100% воспроизводимость результатов: продукты амплификации были получены со всеми образцами, подвергшимися дополнительной очистке на сорбенте (рис.5).

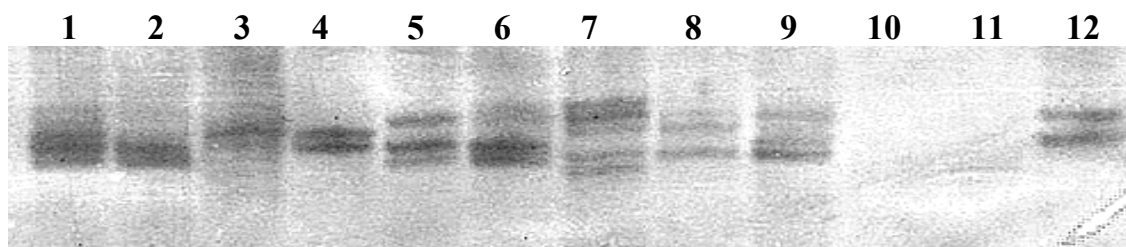
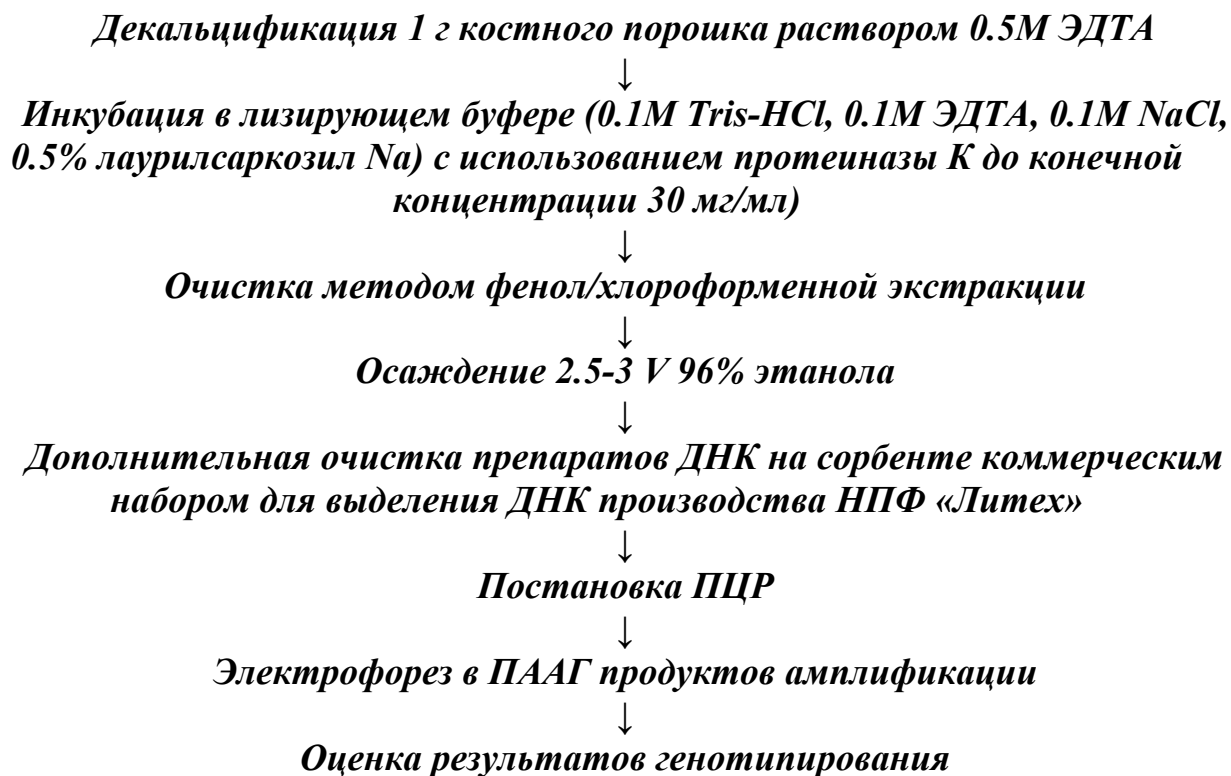


Рис. 5. Продукты разделения амплификатов по локусу D3S1358 в 8% ПААГ. Дорожки 1-9 – препараты древней ДНК, 10 – K_{H_2O} , 11 – $K_{Ж}$, 12- K_{COBP} , в качестве контроля взята ДНК исследователя.

Приведенные выше данные позволили оптимизировать процесс выделения ДНК, который в дальнейшем проводили по следующей схеме:



Важным вопросом в изучении структуры древних популяций является определение их поло-возрастных характеристик. Определение половой принадлежности в данном исследовании проводили с помощью тест-системы на основе амелогенина. В результате амплификации по данному локусу образуется 2 аллеля, размером 106 и 112 п.н. Амплификат размером 106 п.н. соответствует X-хромосоме, амплификат размером 112 п.н. – Y-хромосоме (рис.6). В ходе анализа была установлена половая принадлежность всех образцов, результаты генотипирования которых представлены в таблице 7.

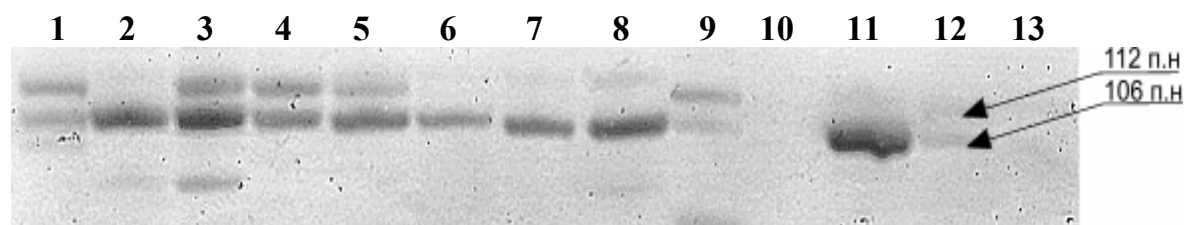


Рис.6. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР по локусу амелогенина в 8% нативном ПААГе. Дорожки 1-9 – образцы древней ДНК, 10 – контроль выделения K_{H_2O} , 11, 12 – K_{COBp} (11- ДНК женщины, 12 – ДНК мужчины), 13 – $K_{ПЦР}$.

Таблица 7. Результаты генотипирования костных останков по локусу амелогенина

№образца	Антр.*	Амел.**	№образца	Антр.	Амел.
Больше-Тиганский могильник			Старокуйбышевский некрополь (домонгольский период)		
I	Муж?	Муж	Погр.1	Муж	Муж
II	Муж??	Муж	Погр.3	Жен	Жен
III	Детское	Муж	Погр.4	Муж	Муж
IV	?	Муж	БМ №1***	Жен	Жен
V	?	Муж	БМ №2***	Муж	Муж
VI	?	Жен			
VII	?	Муж			
Мавзолей Казанского Кремля			Старокуйбышевский некрополь (золотоордынский период)		
131	Муж??	Муж	Погр.1	Муж	Муж
132	Муж?	Жен	Погр.3	Жен	Жен
136	Муж??	Муж	Погр.6	Жен	Жен
			Погр.7	Муж	Муж
			Погр.10	Жен	Жен
Усть-Иерусалимский могильник			Мавзолей средневекового Болгара		
248	Муж	Муж	Погр.1	?	Муж
274	Муж	Муж	Погр.2	?	Жен
287	Муж	Муж	Погр.5	?	Жен
288	Муж	Муж	Погр.8	?	Муж
291	?****	Жен	Погр.9	Муж?	Муж
296	?	Муж	Погр.10	Муж	Муж
297	?	Жен	Погр.11	?	Жен
298	?	Муж	Погр.12	?	Муж
299	?	Муж	Погр.X	?	Жен
300	?	Муж			
Танкеевский могильник					
816	?	Жен	986	?	Муж
878	?	Муж	1016	Муж	Муж
921	Жен	Жен	1030	?	Муж
961	Муж	Муж	1034	Муж	Муж
962	Жен	Жен	1104	Муж	Муж

* - половая принадлежность установлена антропологическими методами

** - половая принадлежность определена молекулярно-генетическим анализом

*** - БМ – «братская могила», №1, №2 – номера костных останков

**** - антропологическими методами пол не определяется

Антропологическими методами половая принадлежность костных останков была определена в 42,85% случаев, тогда как определение пола молекулярно-генетическим методом дало 100% результат, даже в случае сильно деградированного материала.

В ходе исследования аутосомных STR-локусов было выявлено несколько родственных групп, для которых были рассчитаны индексы родственных связей РМ, представленных в таблице 8.

Таблица 8. Показатели РМ для костных останков, состоящих в предполагаемом кровном родстве

Родственная группа	Q	MI	PM (%)
Мавзолей Казанского Кремля Погр. III – погр. V	0,001275	784	99,87
Старокуйбышевский некрополь Погр. 1 – погр. 2 (из братской могилы)	0,001714	583	99,83
Танкеевский могильник Погр. 816 – погр. 1016	$8,63963 \times 10^{-5}$	11574	99,99
Усть-Иерусалимский могильник Погр. 288 – погр. 291	0,000265	3762	99,97
Погр. 288 – погр. 296	$6,76758 \times 10^{-5}$	14776	99,99
Погр. 291 – погр. 296	0,001575	634	99,84
Некрополь средневекового г. Болгары Погр. 10 - погр. 11	0,003315	301	99,67

Следует отметить, что в случае неисключения родственных отношений для обоснованного вывода вероятность материнства/отцовства (РМ) должна составлять не менее 99.75%.

Исследование полиморфизма мтДНК из костных останков проводили по тем же полиморфным системам, что и современное население РТ. Практически все исследованные образцы древней ДНК оказались мономорфны по сайтам рестрикции D-петли ГВС1, при этом преобладающим митотипом является митотип 1, соответствующих кембриджской референтной последовательности. Рестрикционный анализ кодирующей части мтДНК выявил присутствие 4 митотип с преобладанием гаплогрупп H (22.22 – 60%) и U (20 – 77.78%), которые являются наиболее распространенными в Западной Европе. В тоже время было отмечено присутствие макрогруппы M* (0 – 20%), характерной для народов Восточной Европы и Азии. Несмотря на относительно внутреннюю гомогенность древних популяций по сайтам рестрикции D-петли, расчет показателей митотипического разнообразия по данным кодирующей части мтДНК показал сходное значения индексов разнообразия в древних

образцах (от 0,6444 до 0,8) с современными популяциями татар (0,7759 и 0,8009), что характеризует наличие близкородственных линий мтДНК у древних и современных популяций татар.

Для оценки межпопуляционного разнообразия в современных популяциях татар, по частотам аллелей аутосомных и Y-STR локусов были рассчитаны стандартные генетические расстояния по Нею, кластерный анализ по которым показал близость изученных популяций к основным европеоидным представителям. В то же время, расчет генетических расстояний по частотам митотипов указывает на присутствие монголоидного компонента в генофонде татар, при этом по соотношению монголоидного и европеоидного компонентов современные татары занимают промежуточное положение (рис.7).

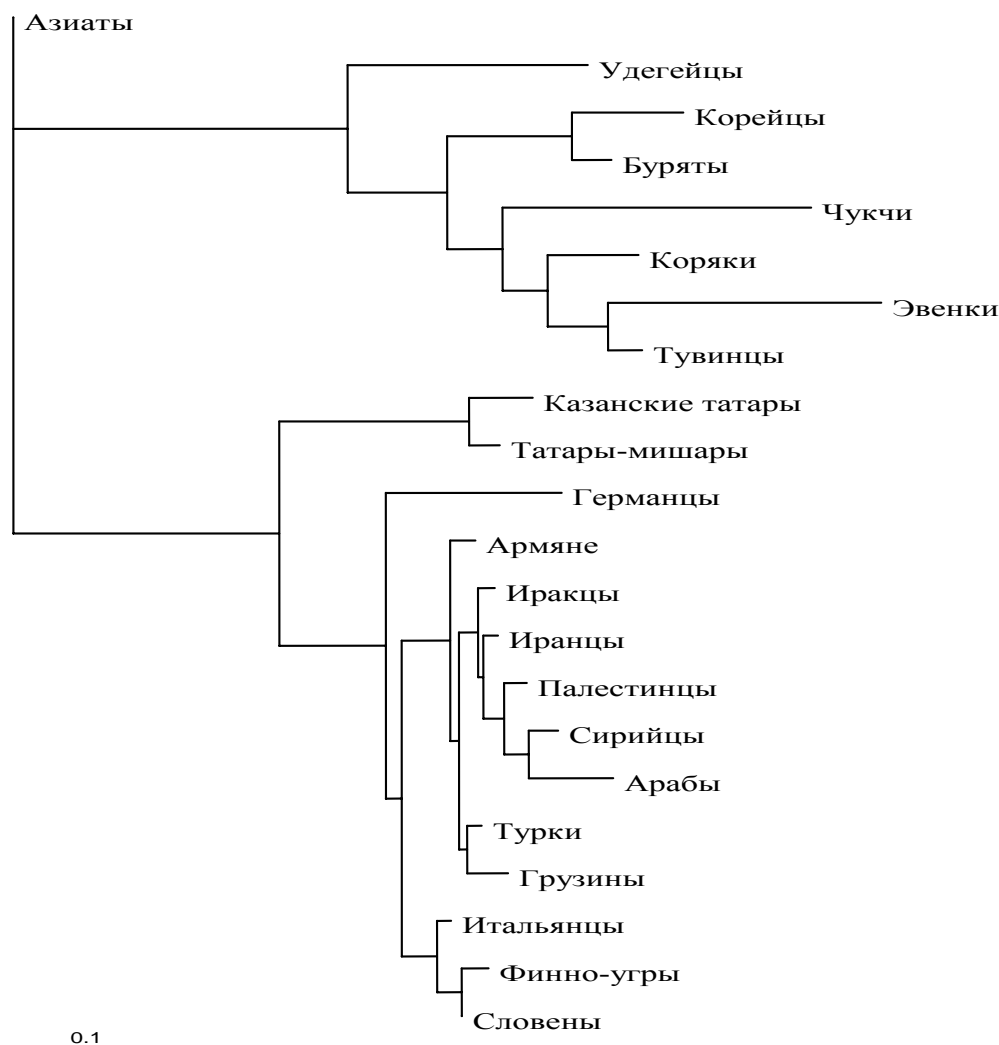


Рис.7. Филогенетическая консенсусная дендрограмма по данным о полиморфизме мтДНК. Значения бутстрепа > 99%.

Татарский народ, как и любая этническая общность, является продуктом сложного исторического развития. Данные, полученные при анализе трех групп полиморфных систем, указывают на большой запас генетической неоднородности, что объясняется интенсивными процессами метисации, происходившими в древности и имеющими место в настоящее время. Выявлено преобладание европеоидного компонента в генофонде современных татар, при этом отмечено присутствие монголоидных черт, особенно в митохондриальном генофонде, что согласуется с антропологическими данными. Однако, для более полного понимания процессов формирования этноса, необходимо изучение и древних популяций, проживавших на данной территории. В данном исследовании были созданы предпосылки для массового изучения древнего генофонда: были оптимизированы методы выделения древней ДНК и продемонстрировано использование полиморфных генетических маркеров при анализе древней ДНК.

ВЫВОДЫ

1. Методом молекулярно-генетического анализа охарактеризован генофонд современной популяции татар, представленной двумя субэтническими группами, по полиморфным системам ядерного и митохондриального генома. Выявлен высокий уровень гетерогенности внутри каждой из популяций.

2. Оптимизирован метод очистки образцов древней ДНК, выделенной из костных останков, путем селективной сорбции на диатомите в присутствии солей гуанидинизотиоцианата.

3. Ввиду высокой степени деградации исследуемого материала, оптимизированы условия генотипирования древней ДНК по аутосомным микросателлитам ядерного генома и полиморфным сайтам рестрикции мтДНК. Показано, что увеличение ионной силы реакционного буфера, снижение концентрации праймеров и увеличение числа циклов амплификации существенно повышает выход специфических продуктов ПЦР.

4. На основании предложенной модификации молекулярно-генетического анализа древней ДНК, выделенной из костных останков (кости свода черепа, тазовые кости, позвонки, трубчатые кости) из захоронений IX-XVI вв., удается установить половую принадлежность костяков и родственные отношения между отдельными погребениями внутри каждого из памятников археологии.

5. Рестрикционным анализом полиморфных сайтов мтДНК в древних образцах выявлено преобладание западно-европейских гаплотипов в митохондриальном генофонде древних популяций татар.

6. На основании данных по частотам аллелей локусов ядерного генома и митотипов мтДНК рассчитаны матрицы генетических расстояний по каждой группе генетических маркеров и выявлено наличие монголоидного и европеоидного компонентов, с преобладанием последнего, в генофонде современных популяций татар.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Кравцова, О.А.** Использование VNTR-локусов в генетической экспертизе / **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова // Республиканский конкурс научных работ среди студентов и аспирантов на соискание премии им. Н.И.Лобачевского. Тез. итог. конф. / Под ред. М. М. Бариева. - Казань: КГУ, 2002. – С.191-192.

2. **Кравцова, О.А.** Использование молекулярно-генетического анализа ДНК для идентификации личности / **О.А.Кравцова**, И.Г.Масаллимов, Р.Г. Мухамадиева, А.Н.Аскарова // IV Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов, Казань. Тез. докл. / Под ред. А.В.Ференца. – Казань, 2002. – С.8.

3. **Кравцова, О.А.** Использование молекулярно-генетического анализа ДНК для идентификации личности / **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова, И.Г.Масаллимов // Биология-наука XXI века: сб. тез / 6-я Пущинская школа-конференция молодых ученых.- Пущино, 2002. – Т.1. – С.266.

4. **Кравцова, О.А.** Использование гипервариабельных локусов в судебной медицине / **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова // Материалы XL международной

студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология / Новосиб. гос. университет. - Новосибирск, 2002. – С.132.

5. Аскарлова, А.Н. Исследование ДНК в антропологии. Итоги и перспективы / А.Н.Аскарлова, **О.А.Кравцова**, И.Р.Газимзянов // Проблемы древней и средневековой истории Среднего Поволжья. Материалы Вторых Халиковских Чтений. – Казань, 2002. – С.18-23.

6. **Кравцова, О.А.** Использование VNTR-локусов в генетической экспертизе / **О.А. Кравцова**, А.Н.Аскарлова // Итог. науч. студ. конф. 2001 года / Тез. докл. Казань: Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, 2003. С.10-11.

7. Ибрагимова, И.И. Молекулярно-генетический анализ древних захоронений Среднего Поволжья / И.И. Ибрагимова, **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарлова // Итог. науч. конф. студ. Казанского государственного университета 2003 года / Тез. докл. Казань: Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина, 2003. – С.11.

8. **Кравцова, О.А.** Молекулярно-генетический анализ древних захоронений Среднего Поволжья / **О.А. Кравцова**, А.Н.Аскарлова, И.Л.Измайлов, И.Р.Газимзянов // Новая Геометрия Природы: сб. науч. тр. / Международная науч. конф.- Казань.- 2003. – Т. II. – С.184-189.

9. Аскарлова, А.Н. Молекулярно-генетический анализ древних захоронений Среднего Поволжья / А.Н.Аскарлова, **О.А.Кравцова**, И.Р.Газимзянов // Археология Урала и Поволжья: итоги и перспективы участия молодых исследователей в решении фундаментальных проблем ранней истории народов региона. Мат. XXXV Урало-Поволжской археолог. студ. конф. Йошкар-Ола, 5-8 февраля 2003 г. / Под ред. В.С. Патрушева. – Йошкар-Ола, 2003. – С. 121-122.

10. Аскарлова, А.Н. Молекулярно-генетический анализ древних захоронений Среднего Поволжья / А.Н.Аскарлова, **О.А.Кравцова**, Р.Г.Мухамадиева, И.И.Ибрагимова, И.Л.Измайлов, И.Р.Газимзянов // Из археологии Поволжья и Приуралья. – Казань, 2003. – С.238-245.

11. Ибрагимова, И.И. Аллельный полиморфизм STR-локусов в популяционно-генетическом исследовании в г.Казани (Республика Татарстан) / И.И.Ибрагимова, **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова // Биология-наука XXI века: сб. тез / 8-я Международная Пуштинская школа-конференция молодых ученых.- Пушино, 2004. – С.56.
12. Аскарова, А.Н. Молекулярно-генетический анализ погребений Усть-Иерусалимского некрополя / А.Н.Аскарова, **О.А.Кравцова**, И.Р.Газимзянов // Древность и средневековые Волго-Камья. Материалы Третьих Халиковских Чтений. – Казань, 2004. – С.3-5.
13. Ибрагимова, И.И. Молекулярно-генетический анализ населения города Казани по микросателлитным локусам / И.И.Ибрагимова, **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Мат. научно-прак. конф. Казань, 17-18 июня 2004 г. Тр. мол. уч. / Под ред. Р.Г.Василова. – М.: «Русская панорама», 2004. – С.96-100.
14. Камалова, Л.Р. Изучение делеционно-инсерционного и рестрикционного полиморфизма мтДНК / Л.Р. Камалова, С.И. Макеева, **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова // Итог. научно-образовательная конф. студ. Казанского Государственного Университета 2005 года: Сб. статей / Казан. гос. ун-т. – Казань, 2005. – С.5-6.
15. **Kravtsova, O.A.** Genetic analysis of human remains found in Middle Volga-river region, Russia / **O.A.Kravtsova**, I.R.Gazimzanov, I.L.Izmaiyllov, A.N.Askarova // abstracts / Human Genome Meeting HGM2005. – Kyoto (Japan), 2005. – P.50.
16. **Кравцова, О.А.** Молекулярно-генетический анализ ДНК из костных останков захоронений Среднего Поволжья / **О.А.Кравцова**, И.Р.Газимзянов, А.Н.Аскарова // Вестник антропологии. Научный альманах. Выпуск.12. – Москва, 2005. – С.106-114.
17. **Кравцова, О.А.** Полиморфизм митохондриальной ДНК в современной популяции Республики Татарстан / **О.А.Кравцова**, А.Н.Аскарова // Ученые записки Казанского государственного университета. – 2005. – Т.147. – №3. – С.117-123.