

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА G/C В ПОЗИЦИИ **xp20:37352001** В ПРЕПАРАТАХ ДНК ИЗ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ GlaI- И Bst2UI-ПЦР АНАЛИЗА

© 2023 г. А. Г. Акишев¹, Н. А. Нетесова², М. А. Абдурашитов¹, С. Х. Дегтярев^{1, 3, *}

¹Научно-производственное объединение “СибЭнзим”, Новосибирск, 630117 Россия

²ООО “Эпигенлаб”, Новосибирск, 630559 Россия

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: degt@sibenzyme.com

Поступила в редакцию 17.05.2023 г.

После доработки 09.06.2023 г.

Принята к публикации 20.06.2023 г.

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) заключается в замене одного нуклеотида на другой, что часто приводит к возникновению (или исчезновению) сайта узнавания определенной рестриктазы. В результате при амплификации фрагмента ДНК с праймеров, окружающих точку SNP (содержащую либо N1, либо N2-нуклеотид), и последующего гидролиза ампликона данной рестриктазой картины расщепления ДНК будут разные для трех возможных вариантов в диплоидной ДНК (генотипы N1/N1, N1/N2 и N2/N2). Данный метод определения полиморфизма длин фрагментов рестрикции (RFLP) широко используется в практике генетических исследований. Ранее мы разработали методы GlaI- и FatI-ПЦР анализа, в которых проводится ПЦР в реальном времени вместо электрофореза, и показали его применимость для определения SNP T/C. В настоящей работе предложен новый способ определения однонуклеотидного полиморфизма G/C методом Bst2UI-ПЦР анализа. GlaI- и Bst2UI-ПЦР анализ использовали для определения частоты вариантов полиморфизма G/C в положении xp20:37352001 (по геномной сборке GRCh38.p14) в препаратах ДНК, выделенной из клеток крови 161 человека. Исследование включало: 1) выделение лейкоцитарной ДНК из клеток крови; 2) проведение GlaI- и Bst2UI-ПЦР анализа фрагмента ДНК xp20:37351957–37352083; 3) определение цитозина и гуанина в позиции xp20:37352001 в анализируемых препаратах ДНК; 4) сравнительный анализ полученных результатов. Показано, что 68 доноров (42.2%) имеют гетерозиготный набор G/C в положении xp20:37352001, 89 доноров (55.3%) гомозиготны по G, а четыре донора (2.5%) – по C. Таким образом, принимая во внимание, что клетки крови имеют диплоидный набор хромосом, замена G на C встречается в 76 из 322 проанализированных вариантов (23.6%). При этом из полученных результатов следует, что цитозин, комплементарный G в положении xp20:37352001, в большей части молекул ДНК находится в метилированной форме (5-метилцитозин) как у гомо-, так и у гетерозигот. Предложенный метод Bst2UI-ПЦР анализа расширяет возможности определения SNP с помощью ПЦР в реальном времени.

Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм G/C, частоты аллелей, ДНК из крови человека, GlaI-ПЦР анализ, Bst2UI-ПЦР анализ.

DOI: 10.31857/S0016675823110012, **EDN:** NGJDEA

Ранее с помощью GlaI- и FatI-ПЦР анализа нами было проведено изучение частот аллелей для полиморфизмов C/T в положении xp16:75033884 [1] и xp1:245618129 [2] в препаратах ДНК 92 доноров. В данных позициях находится последовательность CACGC, которая превращается в последовательность CATGC с возникновением сайта узнавания рестриктазы FatI (CATG). В настоящей работе мы применили методы GlaI- и Bst2UI-ПЦР анализа для изучения однонуклеотидного полиморфизма G/C в третьем положении последовательности AC(G/C)TGG (rs11697215 по базе данных “dbSNP”

[3]) в положении xp20:37352001 в препаратах ДНК 161 донора. Данный SNP расположен в интроне протоонкогена SRC, кодирующего тирозин-специфичную протеинкиназу и его анализ не может проводиться методом FatI-ПЦР анализа ввиду отсутствия последовательности CATG. На рис. 1 представлена нуклеотидная структура участка геномной ДНК, включающая в себя анализируемый полиморфизм. Суть методов GlaI- и Bst2UI-ПЦР анализа заключается в альтернативном расщеплении ДНК ферментами GlaI или Bst2UI соответственно, и последующей ПЦР с праймеров, лежа-

CCCAGACTTCTGGCTGCTGAGTAATTTGTGGGGATCTGATTCTTATTAAGTGTGTACCCAACGTGGCTAAAA
 STTTTCCCAGGTATAGGAGGGGTGCGGTGCTGGGGGCAGGTGACCCCTGACTCTCTGGGTTCCAGCTCTGGCT
 GATGGATTCCCCAGTCGGACGTGGAGTACTGGGATCTTGGGTGCTCACGGATGCTTATGCCATAAAGGGTAA
 TGGAAGTAGCAAAGCCTTTGAAGCCAGTTGGTTCTGGGTTCAAATCGTGGCTTGGCCACTTGTTCCTGTGTGT
 ATGATTGTACAGCTTAGAACCTCAGTTTCCCCATCTGT

Рис. 1. Нуклеотидная последовательность анализируемого участка геномной ДНК *xp20:37351837–37352162*. Волнистой линией выделены сайты узнавания рестриктазы *BstDEI* (СТNAG), окаймляющие амплифицируемый участок. Зоны связывания прямого и обратного праймеров, а также флуоресцентно меченного *TaqMan*-зонда выделены серым фоном. Изучаемый сайт *ACGTGG*, содержащий метилируемый сайт *ACGT* [5], обведен рамкой. Подчеркнут гуаниновый остаток в сайте *ACGTGG*, который может замещаться цитозином.

щих до и после искомой последовательности. При расщеплении ДНК ферментами происходит следующее: рестриктаза *Bst2UI* (сайт узнавания *CC(A/T)GG*) расщепляет ДНК по последовательности *ACCTGG* и не расщепляет другие сайты, а ДНК-эндонуклеаза *GlaI* (сайт узнавания *R(5mC)GY*) [4] расщепляет только сайт *A(5mC)GTGG*. При гидролизе ДНК ферментом *Bst2UI* и последующей ПЦР происходит амплификация фрагмента при наличии последовательности *A(5mC)GTGG* или *ACGTGG* и не наблюдается продукта ПЦР в случае сайта *ACCTGG*. При гидролизе ДНК ферментом *GlaI* последующая амплификация фрагмента идет при наличии последовательностей *ACCTGG* и *ACGTGG* и не наблюдается продукта ПЦР в случае сайта *A(5mC)GTGG*. Для проведения контрольной ПЦР [5] в этом случае был подобран фермент рестрикции *BstDEI*, сайты узнавания которого (СТNAG) расположены вне участка амплификации (рис. 1).

При анализе диплоидной ДНК в случае гомозиготы по *G* фермент *Bst2UI* не расщепляет искомый фрагмент, и контрольная ПЦР после расщепления *BstDEI* и *Bst2UI*-ПЦР дают практически одинаковые результаты. В случае гомозиготы по *C* *Bst2UI* расщепляет ДНК близко к 100% и разница в результатах *Bst2UI*-ПЦР анализа и контрольной ПЦР составляет более восьми циклов (гидролиз сайта *CCTGG* более 99.5%). При этом в случае гетерозиготы расщепление ДНК ферментом *Bst2UI* происходит на 50% и разница результатов *Bst2UI*-ПЦР анализа с результатами контрольной ПЦР должна быть близка к одному циклу. Аналогичный результат будет наблюдаться и в случае *GlaI*-ПЦР-анализа, если значительная часть цитозин в положении, комплементарном гуанину в третьем положении последовательности *ACGCTGG*, метилирована. Тогда в случае гомозиготы по *C* *GlaI* не будет расщеплять ДНК, в случае гетерозиготы будет наблюдаться около

50% гидролиза и в случае гомозиготы по *G* глубина гидролиза будет зависеть от полноты метилирования цитозина. Результаты обоих методов должны соответствовать друг другу: в случае гетерозиготы оба метода должны давать разницу с контрольным ПЦР в один цикл, а в случае гомозигот один метод должен давать разницу с контролем около 0, при этом второй метод должен давать разницу в значительное число циклов.

Таким образом, мы определяем частоты вариантов полиморфизма *G/C* в положении *xp20:37352001* (по геномной сборке *GRCh38.p14*) в препаратах ДНК, выделенной из клеток крови 161 человека, и контрольных образцах ДНК, используя два метода. Поскольку методы *GlaI*- и *Bst2UI*-ПЦР анализа определяют наличие разных нуклеотидов и являются независимыми, их совместное применение подтверждает достоверность результатов, полученных каждым из них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения *Bst2UI*- и *GlaI*-ПЦР анализа использовались образцы ДНК 161 условно здорового донора, выделенной из лейкоцитов периферической крови. Методика выделения и использованные реактивы описаны ранее в работе [1]. В качестве контроля метилирования мы использовали *TaqI*-гидролизат ДНК *HeLa*, метилированный *SssI* метилазой (НПО «СибЭнзим»). Возраст и пол участников исследования, а также концентрация полученных препаратов ДНК и данные их спектрофотометрической чистоты приведены в табл. 1.

Ниже указаны структуры праймеров и флуоресцентно меченного зонда, использованных для проведения ПЦР-анализа участка *xp20:37351957–37352083*:

SRCd 5'-ACTCTCTGGGTTCCAGCTCTGGCT-3' (24)

SRCr 5'-CCAACTGGCTTCAAAGGCTTTGC-3' (23)

SRCz 5'-FAM-AGCATCCGTGAGCACCCAAGATCCC-BHQ1-3' (25).

Таблица 1. Значения Cq в случае гидролиза ДНК по сайтам CTNAG (BstDEI), CCWGG (Bst2UI-ПЦР анализ) и A(5mC)GT (GlaI-ПЦР анализ) и значения разницы величины Cq для двух последних реакций относительно первой ($\Delta Cq_C = Cq_{CCWGG} - Cq_{CTNAG}$ и $\Delta Cq_G = Cq_{A(5mC)GT} - Cq_{CTNAG}$) соответственно

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Донор	Пол	Возраст, лет	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	Cq_BstDEI	Cq_Bst2UI-ПЦР анализ	Cq_GlaI-ПЦР анализ	ΔCq_C	ΔCq_G
1172	ж	14	376	1.6	20.66 ± 0.05	20.76 ± 0.13	25.57 ± 0.09	0.10	4.91
1164	ж	17	252	1.7	20.19 ± 0.09	20.21 ± 0.04	24.05 ± 0.21	0.02	3.86
1147	м	18	180	2.0	21.31 ± 0.09	22.50 ± 0.04	22.25 ± 0.12	1.19	0.94
1133	м	18	55	1.7	20.10 ± 0.03	20.11 ± 0.07	23.83 ± 0.32	0.01	3.73
1181	ж	18	90	1.8	20.16 ± 0.03	29.68 ± 0.65	20.32 ± 0.04	9.52	0.16
1303	м	18	129	1.8	20.05 ± 0.00	20.04 ± 0.06	24.07 ± 0.09	-0.01	4.02
1187	м	20	304	1.8	21.29 ± 0.02	22.12 ± 0.04	22.11 ± 0.11	0.83	0.82
1502	ж	20	461	1.7	20.49 ± 0.07	20.38 ± 0.09	25.08 ± 0.03	-0.11	4.59
1487	ж	22	406	1.7	20.62 ± 0.06	21.78 ± 0.06	21.70 ± 0.04	1.16	1.08
1304	ж	23	129	1.7	21.08 ± 0.14	29.98 ± 0.38	21.11 ± 0.10	8.90	0.03
1218	м	24	317	1.7	21.88 ± 0.09	21.85 ± 0.13	26.13 ± 0.03	-0.03	4.25
1379	ж	24	241	1.8	20.00 ± 0.10	20.00 ± 0.03	23.36 ± 0.09	0.00	3.36
1243	м	24	280	1.7	21.50 ± 0.04	22.45 ± 0.07	22.62 ± 0.04	0.95	1.12
1332	м	25	507	1.9	21.06 ± 0.05	22.01 ± 0.12	21.98 ± 0.02	0.95	0.92
1263	м	26	252	1.9	20.56 ± 0.07	21.61 ± 0.15	21.41 ± 0.09	1.05	0.85
1173	ж	27	232	1.7	20.37 ± 0.06	21.51 ± 0.12	21.55 ± 0.12	1.14	1.18
1200	м	27	271	1.6	20.67 ± 0.06	21.50 ± 0.06	21.54 ± 0.03	0.83	0.87
1203	м	27	309	1.6	20.95 ± 0.13	22.02 ± 0.09	22.11 ± 0.07	1.07	1.16
1209	м	27	204	1.7	20.27 ± 0.06	21.15 ± 0.05	21.24 ± 0.03	0.88	0.97
1214	ж	27	265	1.6	20.49 ± 0.09	21.49 ± 0.09	21.40 ± 0.04	1.00	0.91
1329	м	27	488	1.8	20.25 ± 0.09	20.27 ± 0.12	24.10 ± 0.09	0.02	3.85
1224	м	28	213	1.9	21.22 ± 0.06	22.11 ± 0.05	22.06 ± 0.08	0.89	0.84
1225	м	28	114	1.9	21.69 ± 0.06	21.73 ± 0.07	24.38 ± 0.14	0.04	2.69
1226	ж	30	297	1.9	21.19 ± 0.04	21.30 ± 0.09	24.41 ± 0.03	0.11	3.22
1240	ж	30	252	1.8	21.38 ± 0.02	21.26 ± 0.04	24.98 ± 0.14	-0.12	3.60
1221	ж	31	263	1.7	20.22 ± 0.02	21.37 ± 0.04	21.33 ± 0.09	1.15	1.11
1134	м	32	53	1.7	19.66 ± 0.04	19.79 ± 0.07	24.21 ± 0.09	0.13	4.55
18л	ж	33	140	1.8	21.10 ± 0.01	21.06 ± 0.02	25.71 ± 0.06	-0.04	4.61
1161	м	33	197	1.7	20.34 ± 0.08	20.52 ± 0.03	24.50 ± 0.12	0.18	4.16
1192	ж	33	110	1.7	20.16 ± 0.12	20.23 ± 0.10	23.68 ± 0.14	0.07	3.52
1184	ж	34	305	1.7	21.50 ± 0.10	21.55 ± 0.08	25.00 ± 0.14	0.05	3.50
1300	м	34	127	1.9	20.79 ± 0.08	20.93 ± 0.07	24.52 ± 0.13	0.14	3.73
17л	ж	35	72	1.8	20.07 ± 0.03	21.18 ± 0.06	21.09 ± 0.04	1.11	1.02
1208	м	35	207	1.6	21.27 ± 0.06	21.27 ± 0.14	25.76 ± 0.19	0.00	4.49
1227	м	35	101	1.8	21.26 ± 0.04	22.42 ± 0.04	22.17 ± 0.09	1.16	0.91
272	ж	36	49	1.9	22.43 ± 0.12	23.48 ± 0.09	23.26 ± 0.09	1.05	0.83
285	м	36	20	2.0	22.41 ± 0.03	23.54 ± 0.05	23.42 ± 0.11	1.13	1.01
1086	м	36	193	1.7	21.37 ± 0.14	22.36 ± 0.15	22.26 ± 0.07	0.99	0.89

Таблица 1. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Донор	Пол	Возраст, лет	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	Cq_ BstDEI	Cq_Bst2UI-ПЦР анализ	Cq_GlaI-ПЦР анализ	ΔCq_C	ΔCq_G
1162	м	36	181	1.8	21.12 ± 0.06	22.17 ± 0.05	22.20 ± 0.11	1.05	1.08
1217	м	36	407	1.6	21.20 ± 0.09	22.11 ± 0.09	22.00 ± 0.09	0.91	0.80
1247	ж	36	286	1.7	21.10 ± 0.06	21.04 ± 0.13	25.19 ± 0.08	-0.06	4.09
273	ж	37	25	1.9	22.27 ± 0.09	22.22 ± 0.05	25.97 ± 0.15	-0.05	3.70
1186	ж	37	175	1.8	20.60 ± 0.00	20.57 ± 0.04	24.21 ± 0.07	-0.03	3.61
1235	ж	37	168	1.7	21.10 ± 0.14	22.11 ± 0.05	21.93 ± 0.05	1.01	0.83
1345	м	37	420	1.8	20.50 ± 0.10	21.32 ± 0.03	21.35 ± 0.09	0.82	0.85
1094	ж	38	172	1.7	20.89 ± 0.06	22.08 ± 0.06	22.04 ± 0.09	1.19	1.15
1236	м	39	196	1.8	20.02 ± 0.08	21.15 ± 0.01	20.98 ± 0.11	1.13	0.96
1376	ж	40	225	1.9	20.26 ± 0.07	20.22 ± 0.04	24.64 ± 0.06	-0.04	4.38
243	ж	41	67	1.9	21.88 ± 0.13	22.80 ± 0.08	22.82 ± 0.09	0.92	0.94
1219	ж	41	315	1.8	21.18 ± 0.09	21.25 ± 0.03	25.99 ± 0.07	0.07	4.81
1335	ж	41	782	1.9	20.34 ± 0.10	20.39 ± 0.11	24.88 ± 0.15	0.05	4.54
1381	ж	41	500	1.7	20.83 ± 0.04	20.71 ± 0.05	24.64 ± 0.09	-0.12	3.81
657	м	42	145	1.8	20.42 ± 0.04	21.21 ± 0.05	21.18 ± 0.11	0.79	0.76
1207	м	42	220	1.6	20.81 ± 0.04	20.67 ± 0.09	24.61 ± 0.14	-0.14	3.80
1331	ж	42	230	1.8	20.86 ± 0.14	20.66 ± 0.03	23.77 ± 0.08	-0.20	2.91
1323	м	42	300	1.8	20.60 ± 0.04	20.54 ± 0.11	24.23 ± 0.23	-0.06	3.63
1411	м	42	569	1.8	20.74 ± 0.07	20.73 ± 0.02	24.49 ± 0.18	-0.01	3.75
23л	м	44	25	1.7	21.25 ± 0.11	22.28 ± 0.09	22.18 ± 0.12	1.03	0.93
1374	ж	44	101	1.8	20.99 ± 0.11	21.06 ± 0.04	25.22 ± 0.08	0.07	4.23
661	ж	45	67	1.8	19.54 ± 0.05	20.74 ± 0.14	20.56 ± 0.05	1.20	1.02
1145	ж	45	323	1.6	20.66 ± 0.04	20.61 ± 0.05	25.30 ± 0.12	-0.05	4.64
1171	ж	45	67	1.6	21.23 ± 0.09	21.10 ± 0.04	24.53 ± 0.09	-0.13	3.30
1371	ж	46	233	1.8	20.27 ± 0.07	20.15 ± 0.10	23.78 ± 0.09	-0.12	3.51
1491	ж	46	498	1.7	20.39 ± 0.02	20.29 ± 0.11	23.99 ± 0.33	-0.10	3.60
123л	м	48	34	1.8	22.31 ± 0.10	22.46 ± 0.10	25.61 ± 0.12	0.15	3.30
1155	м	48	110	1.6	19.86 ± 0.12	19.92 ± 0.03	23.66 ± 0.13	0.06	3.80
1175	ж	49	202	1.9	20.35 ± 0.03	21.47 ± 0.05	21.40 ± 0.15	1.12	1.05
1313	м	49	157	1.8	19.52 ± 0.07	19.53 ± 0.06	22.77 ± 0.06	0.01	3.25
1317	ж	49	316	1.9	20.59 ± 0.08	21.51 ± 0.05	21.40 ± 0.04	0.92	0.81
1338	м	49	696	1.8	20.28 ± 0.04	21.21 ± 0.05	21.15 ± 0.05	0.93	0.87
1339	ж	49	506	1.9	20.20 ± 0.09	21.18 ± 0.11	21.14 ± 0.01	0.98	0.94
1099	м	50	144	1.7	21.91 ± 0.09	21.73 ± 0.10	25.69 ± 0.10	-0.18	3.78
1111	ж	50	141	1.7	20.63 ± 0.04	21.54 ± 0.07	21.64 ± 0.12	0.91	1.01
1151	ж	50	225	1.7	19.95 ± 0.09	21.06 ± 0.13	21.07 ± 0.04	1.11	1.12
1248	ж	50	154	1.7	19.97 ± 0.07	20.95 ± 0.10	20.88 ± 0.01	0.98	0.91
1321	м	50	112	1.8	21.22 ± 0.07	31.97 ± 0.42	21.12 ± 0.06	10.75	-0.10
1093	м	51	201	1.7	19.98 ± 0.08	21.12 ± 0.07	21.03 ± 0.10	1.14	1.05
1129	ж	51	72	1.7	19.14 ± 0.05	19.04 ± 0.02	22.95 ± 0.11	-0.10	3.81

Таблица 1. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Донор	Пол	Возраст, лет	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	Cq_ BstDEI	Cq_Bst2UI-ПЦР анализ	Cq_GlaI-ПЦР анализ	ΔCq_C	ΔCq_G
1165	м	51	356	1.6	20.39 ± 0.01	21.62 ± 0.05	21.46 ± 0.06	1.23	1.07
1337	ж	51	563	1.9	19.48 ± 0.14	19.48 ± 0.08	24.21 ± 0.18	0.00	4.73
1367	ж	51	188	1.9	20.29 ± 0.10	21.29 ± 0.03	21.09 ± 0.04	1.00	0.80
1230	ж	52	723	1.9	22.19 ± 0.14	22.30 ± 0.05	25.61 ± 0.18	0.11	3.42
1350	м	52	231	1.8	20.70 ± 0.10	21.96 ± 0.02	21.73 ± 0.04	1.26	1.03
6л	ж	53	288	1.8	21.09 ± 0.10	21.20 ± 0.08	26.13 ± 0.04	0.11	5.04
202	м	53	248	1.8	20.14 ± 0.02	20.10 ± 0.06	24.09 ± 0.21	-0.04	3.95
1159	м	53	358	1.7	20.50 ± 0.03	21.50 ± 0.08	21.40 ± 0.07	1.00	0.90
1239	ж	53	230	1.7	20.43 ± 0.14	20.41 ± 0.02	24.50 ± 0.16	-0.02	4.07
1358	м	53	784	1.8	21.73 ± 0.11	22.63 ± 0.12	22.54 ± 0.06	0.90	0.81
1361	ж	53	762	1.9	20.03 ± 0.10	20.24 ± 0.07	24.41 ± 0.08	0.21	4.38
53л	ж	54	88	1.9	21.17 ± 0.07	21.15 ± 0.08	26.02 ± 0.21	-0.02	4.85
1113	ж	55	109	1.9	20.49 ± 0.08	20.54 ± 0.02	24.78 ± 0.06	0.05	4.29
1246	ж	55	191	1.7	20.86 ± 0.06	21.01 ± 0.09	24.00 ± 0.14	0.15	3.14
1342	м	55	119	1.9	20.74 ± 0.08	21.82 ± 0.13	21.81 ± 0.10	1.08	1.07
54л	м	56	113	1.9	20.70 ± 0.01	20.79 ± 0.09	24.47 ± 0.03	0.09	3.77
1280	м	56	436	1.8	21.59 ± 0.03	21.43 ± 0.05	25.29 ± 0.05	-0.16	3.70
1127	ж	57	123	1.7	20.38 ± 0.13	20.21 ± 0.02	24.38 ± 0.09	-0.17	4.00
1135	ж	57	127	1.6	19.22 ± 0.02	20.15 ± 0.06	20.10 ± 0.06	0.93	0.88
1163	ж	57	157	1.7	20.48 ± 0.14	20.51 ± 0.12	24.42 ± 0.12	0.03	3.94
1183	ж	57	662	1.7	20.51 ± 0.10	20.56 ± 0.07	24.60 ± 0.05	0.05	4.09
1360	ж	57	570	1.9	20.34 ± 0.05	20.48 ± 0.14	24.48 ± 0.24	0.14	4.14
19л	ж	58	54	1.8	21.44 ± 0.13	21.35 ± 0.05	25.32 ± 0.10	-0.09	3.88
1130	ж	58	59	1.7	20.28 ± 0.10	20.24 ± 0.04	23.78 ± 0.08	-0.04	3.50
1351	ж	58	260	1.8	20.10 ± 0.02	21.09 ± 0.15	21.10 ± 0.06	0.99	1.00
297	ж	59	48	1.9	23.10 ± 0.12	24.24 ± 0.04	23.91 ± 0.10	1.14	0.81
1137	ж	59	299	1.6	21.42 ± 0.11	21.48 ± 0.05	25.00 ± 0.15	0.06	3.58
1182	ж	59	136	1.9	21.36 ± 0.01	21.47 ± 0.06	25.39 ± 0.15	0.11	4.03
1259	ж	59	111	1.8	20.72 ± 0.08	21.48 ± 0.05	21.66 ± 0.01	0.76	0.94
1299	ж	59	252	1.8	20.35 ± 0.14	21.30 ± 0.06	21.12 ± 0.03	0.95	0.77
1326	ж	59	380	1.8	19.71 ± 0.14	19.65 ± 0.14	23.15 ± 0.04	-0.06	3.44
1344	ж	59	381	1.7	20.26 ± 0.02	21.43 ± 0.05	21.21 ± 0.04	1.17	0.95
1340	ж	60	562	1.7	20.34 ± 0.09	20.27 ± 0.09	25.20 ± 0.18	-0.07	4.86
1348	м	60	761	1.7	20.35 ± 0.07	20.43 ± 0.08	24.51 ± 0.23	0.08	4.16
1353	ж	60	250	1.9	20.15 ± 0.02	20.17 ± 0.13	24.93 ± 0.20	0.02	4.78
298	ж	61	29	1.9	22.47 ± 0.02	23.39 ± 0.00	23.28 ± 0.01	0.92	0.81
1144	ж	61	147	1.8	20.27 ± 0.11	20.51 ± 0.08	24.48 ± 0.16	0.24	4.21
1234	ж	61	178	1.7	20.18 ± 0.05	21.29 ± 0.08	21.12 ± 0.09	1.11	0.94
1364	м	61	178	1.9	20.11 ± 0.10	21.22 ± 0.08	21.05 ± 0.16	1.11	0.94
1202	ж	62	111	1.8	20.48 ± 0.09	20.37 ± 0.14	24.22 ± 0.06	-0.11	3.74

Таблица 1. Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Донор	Пол	Возраст, лет	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	Cq_ BstDEI	Cq_Bst2UI-ПЦР анализ	Cq_GlaI-ПЦР анализ	ΔCq_C	ΔCq_G
1347	м	62	590	1.9	20.34 ± 0.05	21.21 ± 0.12	21.14 ± 0.06	0.87	0.80
1349	м	62	355	1.8	21.57 ± 0.15	22.48 ± 0.03	22.44 ± 0.04	0.91	0.87
1250	м	63	271	1.8	21.40 ± 0.04	21.25 ± 0.05	24.86 ± 0.05	-0.15	3.46
1294	м	63	173	1.6	20.63 ± 0.11	20.57 ± 0.05	24.03 ± 0.05	-0.06	3.40
1369	ж	63	301	1.9	20.35 ± 0.12	21.21 ± 0.09	21.25 ± 0.09	0.86	0.90
206	ж	64	90	1.9	21.36 ± 0.06	22.30 ± 0.05	22.11 ± 0.04	0.94	0.75
264	м	64	35	2.0	24.27 ± 0.27	25.38 ± 0.14	25.26 ± 0.10	1.11	0.99
1211	ж	64	323	1.4	19.50 ± 0.04	19.52 ± 0.03	22.67 ± 0.09	0.02	3.17
1255	ж	64	357	1.9	21.00 ± 0.05	21.04 ± 0.08	23.95 ± 0.13	0.04	2.95
1277	ж	64	330	1.7	20.37 ± 0.03	21.32 ± 0.04	21.39 ± 0.05	0.95	1.02
16л	ж	65	95	1.8	20.97 ± 0.09	21.94 ± 0.10	21.89 ± 0.08	0.97	0.92
268	м	65	88	1.9	21.25 ± 0.04	22.28 ± 0.06	22.27 ± 0.05	1.03	1.02
299	м	65	56	1.9	21.41 ± 0.05	21.38 ± 0.14	25.04 ± 0.40	-0.03	3.63
1152	ж	65	112	1.7	19.78 ± 0.06	19.58 ± 0.06	23.05 ± 0.12	-0.20	3.27
1205	м	65	420	1.7	21.11 ± 0.09	21.19 ± 0.03	24.55 ± 0.08	0.08	3.44
1238	ж	66	346	1.7	20.28 ± 0.08	21.07 ± 0.09	21.07 ± 0.04	0.79	0.79
266	м	67	18	1.8	22.13 ± 0.14	22.08 ± 0.04	26.07 ± 0.14	-0.05	3.94
296ф	ж	67	175	1.8	21.43 ± 0.04	22.54 ± 0.03	22.33 ± 0.05	1.11	0.90
1143	ж	67	84	1.6	20.51 ± 0.09	21.58 ± 0.10	21.40 ± 0.08	1.07	0.89
1372	ж	67	221	1.8	20.23 ± 0.11	20.03 ± 0.07	23.81 ± 0.27	-0.20	3.58
1428	м	67	433	1.8	20.65 ± 0.04	20.61 ± 0.11	23.86 ± 0.12	-0.04	3.21
295	м	68	219	1.8	20.66 ± 0.01	20.66 ± 0.07	23.93 ± 0.14	0.00	3.27
1365	ж	68	204	1.8	20.30 ± 0.04	20.29 ± 0.05	24.03 ± 0.07	-0.01	3.73
173	м	68	352	1.7	19.98 ± 0.07	19.89 ± 0.02	23.39 ± 0.09	-0.09	3.41
1437	м	68	213	1.8	20.17 ± 0.05	20.19 ± 0.04	24.13 ± 0.18	0.02	3.96
237	м	69	31	1.8	21.60 ± 0.11	21.75 ± 0.06	25.14 ± 0.25	0.15	3.54
240	м	69	18	1.9	21.27 ± 0.09	21.41 ± 0.11	25.08 ± 0.13	0.14	3.81
293	м	69	359	1.8	20.02 ± 0.01	20.08 ± 0.05	23.06 ± 0.02	0.06	3.04
1146	ж	70	149	1.8	19.56 ± 0.06	20.76 ± 0.07	20.41 ± 0.08	1.20	0.85
1413	м	70	522	1.9	19.77 ± 0.02	19.82 ± 0.06	23.65 ± 0.17	0.05	3.88
40	ж	72	179	1.8	20.22 ± 0.03	20.20 ± 0.04	24.10 ± 0.12	-0.02	3.88
205а	ж	72	461	1.8	21.00 ± 0.03	20.90 ± 0.07	24.56 ± 0.18	-0.10	3.56
643	м	72	51	2.0	23.09 ± 0.02	23.08 ± 0.09	26.71 ± 0.10	-0.01	3.62
1115	м	72	78	1.7	21.24 ± 0.05	22.28 ± 0.10	22.21 ± 0.08	1.04	0.97
1576	м	72	307	1.8	21.06 ± 0.04	22.28 ± 0.10	21.98 ± 0.11	1.22	0.92
178	м	73	182	1.7	20.92 ± 0.05	20.92 ± 0.05	24.64 ± 0.13	0.00	3.72
1669	м	74	351	1.7	21.09 ± 0.02	20.90 ± 0.08	25.14 ± 0.07	-0.19	4.05
121	ж	75	163	1.7	20.36 ± 0.07	21.37 ± 0.07	21.19 ± 0.08	1.01	0.83
1168	ж	79	239	1.7	20.88 ± 0.12	20.96 ± 0.08	24.47 ± 0.11	0.08	3.59
1174	ж	79	271	1.6	21.05 ± 0.11	29.12 ± 0.41	20.98 ± 0.05	8.07	-0.07

Таблица 1. Окончание

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Донор	Пол	Возраст, лет	Концентрация ДНК, нг/мкл	A260/280	Cq_BstDEI	Cq_Bst2UI-ПЦР анализ	Cq_GlaI-ПЦР анализ	ΔCq_C	ΔCq_G
1160	ж	80	195	1.7	21.20 ± 0.04	22.31 ± 0.02	22.12 ± 0.06	1.11	0.92
55	ж	81	221	1.7	19.17 ± 0.05	19.11 ± 0.03	22.35 ± 0.01	-0.06	3.18
56	м	81	414	1.7	20.09 ± 0.03	21.31 ± 0.06	21.18 ± 0.12	1.22	1.09
HeLa					20.77 ± 0.05	20.98 ± 0.11	23.81 ± 0.17	0.21	3.04
HeLa /Taq /Sss					20.63 ± 0.12	20.82 ± 0.16	27.52 ± 0.37	0.19	6.89

ПЦР в реальном времени проводили согласно протоколу производителя [6] в объеме 20 мкл в триплетах на детектирующем амплификаторе CFX-96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: при 95°C – 3 мин; 5 “слепых” циклов: 95°C – 10 с, 63°C – 20 с, 72°C – 10 с; 40 циклов: 95°C – 10 с, 63°C – 20 с (с детекцией флуоресцентного сигнала в канале FAM), 72°C – 10 с.

По завершении ПЦР, при помощи программного обеспечения амплификатора Bio-Rad CFX Manager v.2.1 устанавливали среднее значение Cq и значение среднеквадратичного отклонения для анализируемых образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 показаны значения Cq, полученные при ПЦР-анализе гидролизатов ДНК 161 донора крови и препаратов ДНК HeLa и HeLa/TaqI, метилированной ферментом SssI (столбцы 6–8). В столбцах 9 и 10 указаны значения величин Cq, полученные в Bst2UI- и GlaI-ПЦР анализе, за вычетом значений Cq в столбце 6 (контрольная ПЦР на BstDEI-гидролизате), обозначенные как ΔCq_G и ΔCq_{5mC} соответственно.

Анализ данных, представленных в табл. 1, показывает, что как и в предыдущих работах [1, 2] полученные значения ΔCq_G и ΔCq_C соответствуют друг другу для всех образцов ДНК в выборке. При этом выявляются три группы образцов ДНК. В первой из них значения ΔCq_G и ΔCq_C варьируют от 0.75 до 1.26, что приблизительно соответствует двукратному уменьшению количества нерасщепленных копий амплифицируемого участка. Таким образом, образцы первой группы представляют собой гетерозиготы по аллелям *G* и *C* в позиции chr20:37352001.

Во второй группе значения ΔCq_C варьируют от 8.07 до 10.75, в то время как значения ΔCq_G минимальны (от -0.1 до 0.16). Очевидно, что образцы ДНК второй группы полностью расщепляются ферментом Bst2UI и не содержат сайтов узнавания GlaI. Это свидетельствует о том, что в исследуемой позиции SNP находится лишь цитозинный остаток (гомозиготы по *C*).

Для третьей группы образцов ДНК характерно повышенное значение ΔCq_G (2.69–5.04) при небольших значениях ΔCq_C (от -0.2 до 0.24). Соответственно данные образцы можно расценивать как содержащие лишь гуаниновый остаток в позиции chr20:37352001 (гомозиготы по *G*), причем комплементарный ему цитозинный остаток находится преимущественно в метилированной форме.

Значения ΔCq_G (2.69–5.04) существенно меньше величин ΔCq_C (от 8.07 до 10.75), что, вероятно, связано с наличием неметилированного комплементарного цитозина, доля которого может достигать почти четверти. Для ДНК HeLa значение ΔCq_G составляет 3.04 и соответствует 12% неметилированной ДНК, тогда как при полностью метилированном сайте в этой ДНК (HeLa/TaqI, метилированной SssI) величина ΔCq_G составляет 6.89, что соответствует 99%-ному метилированию сайта.

На рис. 2 результаты, представленные в табл. 1, отсортированы в порядке уменьшения ΔCq_G .

Таким образом, гетерозиготный набор *G/C* имеется в 68 образцах ДНК, четыре образца представляют собой гомозиготу *C/C*, а 89 образцов являются гомозиготными по аллелю *G*. Частота аллеля *C* в исследованной выборке составляет 23.6%. Полученные данные показывают, что во всех образцах ДНК цитозинные остатки на обеих цепях

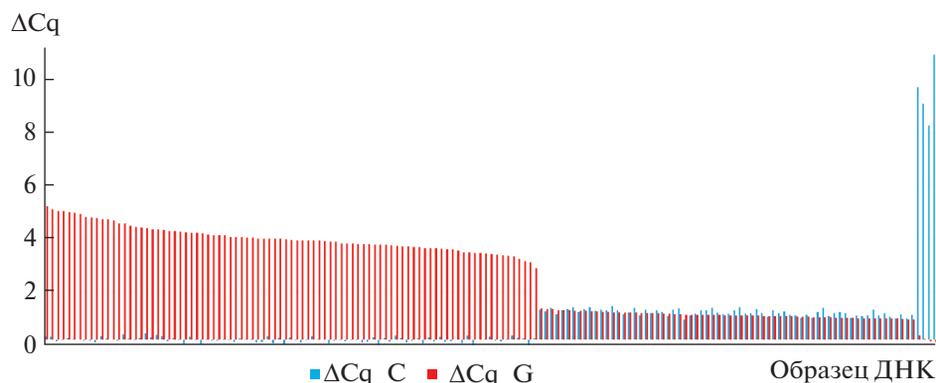


Рис. 2. Значения ΔCq_G и ΔCq_C для 161 образца донорской ДНК лейкоцитов (красный и синий цвет соответственно).

сайта ACGT в последовательности ACGTGG преимущественно метилированы. Как было показано ранее, метилированная форма CG-динуклеотидов преобладает во всех компартментах генома за исключением CpG-островков и первых экзонов, выполняющих функцию регуляции экспрессии генов [7]. Варибельный нуклеотид в положении chr20:37352001 расположен в первом интроне гена *SRC* и в случае аллеля *G* образующийся сайт ACGT метилирован по цитозинным остаткам в обеих цепях ДНК.

В табл. 2 показано число генотипов и их доля от общего количества проанализированных препаратов ДНК доноров крови.

В табл. 3 дано сравнение частот аллелей *G* и *C* в различных популяциях по данным проектов, представленных в базе “dbSNP”.

Как видно из табл. 3, полученная нами частота аллеля *C* в 24% близка к значениям 21–22% для всей мировой когорты обследованных без учета географического проживания или этнического происхождения (“Global”) в проектах “1000Genomes” и совпадает с частотой в проекте “TopMed”. Что же касается исследованных ранее жителей Сибири, то завышенная (0.57) частота аллеля *C*, скорее всего, связана с небольшим размером выборки ($n = 14$). Теоретически определенная по формуле Харди–Вайнберга [8] величина числа гомозигот *C/C* для нашей выборки равна 9, что существенно

больше экспериментально полученного значения 4, однако это различие может быть вызвано недостаточным числом обследованных в настоящей работе.

Интересно отметить, что аллель *C* в исследованной позиции считается “предковым” по отношению к аллелю *G* (по данным сравнения геномов гоминид, дополнительная информация к [9]). Гомозиготность по *C* выявлена также для денисовского генома и неандертальского генома из Виндии (<https://www.eva.mpg.de/genetics/genome-projects/>). Преваляирование варианта *G* у современных людей вне зависимости от расы и этноса свидетельствует о том, что нуклеотидная замена *C* на *G* произошла на ранних стадиях становления *Homo sapiens*, причем в дальнейшем более эволюционно успешными оказались носители аллеля *G*.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Таблица 2. Распределение диплоидных наборов аллелей в позиции chr20:37352001 в общей выборке

Всего доноров	<i>C/C</i>		<i>G/C</i>		<i>G/G</i>	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
161	4	2.48%	68	42.24%	89	55.28%

Таблица 3. Частоты аллелей G и C для SNP в положении chr20:37352001 по данным различных проектов

Проект	Когорта	Число обследованных	Частота G	Частота C
1000Genomes	Глобальная	5008	0.79	0.21
	Африка	1322	0.73	0.27
	Восточная Азия	1008	0.83	0.17
	Европа	1006	0.80	0.20
	Южная Азия	978	0.78	0.22
	Америка	694	0.83	0.17
1000Genomes_30x	Глобальная	6404	0.78	0.22
	Африка	1786	0.73	0.27
	Европа	1266	0.79	0.21
	Южная Азия	1202	0.78	0.22
	Восточная Азия	1170	0.83	0.17
	Америка	980	0.83	0.17
TopMed	Глобальная	264690	0.76	0.24
The Avon Longitudinal Study	Родители и дети	3854	0.73	0.27
Genetic variation in the Estonian population	Эстония	4480	0.84	0.16
Northern Sweden	Лен Вестерботтен	600	0.85	0.16
Genome of the Netherlands Release 5	Нидерланды	998	0.73	0.27
The Danish reference pan genome	Дания	40	0.72	0.28
UK 10K study – Twins	Близнецы	3708	0.73	0.27
Qatari	Глобальная	216	0.71	0.29
A Vietnamese Genetic Variation Database	Глобальная	214	0.85	0.15
Korean population from KRGDB	Корея	2930	0.83	0.17
Siberian	Глобальная	14	0.43	0.57
Настоящая работа	Новосибирская область	161	0.76	0.24

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Определение полиморфизма 5mC/T в повторе AluSx (Chr16: 75033884) в препаратах ДНК из крови человека методами GluI- и FatI-ПЦР анализа // Эпигенетическая ДНК диагностика. 2021. Т. 1. С. 1–12. <https://doi.org/10.26213/SE.2021.11.76.001>
2. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Определение полиморфизма 5mC/T в позиции Chr1: 245618129 в препаратах ДНК из крови человека методами GluI- и FatI-ПЦР анализа // Эпигенетическая ДНК диагностика. 2021. Т. 1. С. 13–23. <https://doi.org/10.26213/SE.2019.69.42836>
3. Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation // Nucl. Acids Res. 2001. V. 29. P. 308–311. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308>
4. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease GluI // BMC Molecular Biol. 2008. V. 9: 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-7>
5. Акишев А.Г., Нетесова Н.А., Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х. Выщепление рестриктазой амплифицируемого фрагмента ДНК как способ исключения ошибочных результатов ПЦР в реальном времени с TaqMan зондом // ДНК-узнающие ферменты. 2021. Т. 1. С. 1–13. <https://doi.org/10.26213/SE.2021.45.29.001>
6. CFX96 and CFX384 Real-Time PCR Detection Systems. Instruction Manual // <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10010424.pdf>
7. Edwards J.R., Yarychivska O., Boulard M., Bestor T.H. DNA methylation and DNA methyltransferases // Epigenet. Chromatin. 2017. V. 10: 23. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8>
8. Stark A.E., Seneta E. A reality check on Hardy–Weinberg // Twin Res. Hum. Genet. 2013. V. 16. P. 782–789. <https://doi.org/10.1017/thg.2013.40>
9. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation // Nature 2015. V. 526. P. 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>

Determination of *G/C* Polymorphism at chr20:37352001 Position in Human Blood DNA Preparations by *GlaI*- and *Bst2UI*-PCR Analyses Methods

A. G. Akishev^a, N. A. Netesova^b, M. A. Abdurashitov^a, and S. Kh. Degtyarev^{a, c, *}

^a*Scientific and Production Association "SibEnzyme", Novosibirsk, 630117 Russia*

^b*"EpigenLab" Ltd, Novosibirsk, 630559 Russia*

^c*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: degt@sibenzyme.com*

Single nucleotide polymorphism (SNP) is a change of one nucleotide by another. This change often leads to an emergence (or disappearance) of a site recognized by a certain restriction endonuclease. As a result amplification of DNA fragment using primers surrounding SNP point (containing either *N1* or *N2* nucleotide) followed by hydrolysis of the amplicon with this restriction enzyme will be different for three possible variants in a diploid genome (genotypes *N1/N1*, *N1/N2* and *N2/N2*). This method of restriction fragments length polymorphism (RFLP) is widely used in the genetic studies. Earlier we have developed *GlaI*- and *FatI*-PCR analyses methods which allowed to carry out real-time PCR and showed its applicability for SNP determination. In the current work a new way to determine the single nucleotide polymorphism *G/C* by the *Bst2UI*-PCR analysis is proposed. *GlaI*- and *Bst2UI*-PCR analyses have been used to determine the frequency of *G/C* polymorphism variants at the chr20:37352001 position (according to GRCH38.p14 genomic assembly) in the blood DNA samples of 161 donors. The study included: 1) the isolation of leukocyte DNA from blood cells; 2) *GlaI*- and *Bst2UI*-PCR analyses of the DNA fragment chr20:37351957-37352083, 3) determination of cytosine and guanine at the chr20:37352001 position in the analyzed DNA preparations, and 4) comparative analysis of the obtained results. It has been shown that 68 donors (42.2%) have a heterozygous set of *G/C* at the chr20:37352001 position, 89 donors (55.3%) are homozygous by *G*, and 4 donors (2.5%) are homozygous by *C*. Thus, taking into account that blood cells have a diploid set of chromosomes, *G* to *C* replacement occurs in 76 out of 322 analyzed cases (23.6%). At the same time, from the results obtained it follows that the cytosine residue complementary to *G* at the chr20:37352001 position exists in methylated form (5-methylcytosine) in most of the DNA molecules, both in homo- and heterozygotes. The proposed method of *Bst2UI*-PCR analyses extends the possibilities of SNP determination using real-time PCR.

Keywords: single nucleotide polymorphism *G/C*, allele frequency, blood DNA, *GlaI*-PCR analysis, *Bst2UI*-PCR analysis.