ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ТРУДЫ МУЗЕЯ АРХЕОЛОГИИ И ЭТНОГРАФИИ СИБИРИ
ТОМСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

Том III

МАТЕРИАЛЫ И ИССЛЕДОВАНИЯ ДРЕВНЕЙ, СРЕДНЕВЕКОВОЙ И НОВОЙ ИСТОРИИ СЕВЕРНОЙ И ЦЕНТРАЛЬНОЙ АЗИИ

Вып. 1

Координатор проекта и ответственный редактор
Ю.И. Ожередов

Томск
2010

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА МОБИЛЬНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО ЭЛЕМЕНТА ALU В ЛОКУСЕ ГЕНА АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА В ВЫБОРКЕ ПРАСЕЛЬКУПСКОГО НАСЕЛЕНИЯ

(По данным средневековых некрополей Нарымского Приобья)

А.В. Марусин, А.И. Боброва, М.П. Рыкун, Ю.И. Ожередов, В.А. Степанов

Селькупы – один из коренных этносов Сибири, состоит из двух территориально изолированных групп – северной и южной. Северные (тазовско-туруханские) селькупы проживают в северо-восточных районах Тюменской области и в Туруханском районе Красноярского края. Они продвинулись на север из Нарымского Приобья в XVII–XVIII вв. Южные (нарымские, среднеобские) селькупы почти полностью обитают в пределах Томской области, их численность, по данным переписи населения 1989 г., составляла 1 347 чел. из 3,6 тыс. в Российской Федерации. Древняя история южных селькупов (томских самоедов, остяко-самоедов Томской губернии) насчитывает не одно тысячелетие, однако они не слились в прочную национальную единицу с общим для всех языком и самоназванием и подразделяются на восемь диалектно-локальных групп. Диалекты и говоры селькупского языка относятся к южной группе самодийских языков уральской языковой общности. В лингвистическом отношении к селькупам наиболее близки энцы, ненцы и нганасаны. Прасамодийский ареал локализовался в южной и среднетаёжной частях Обско-Енисейского междуречья и в хронологическом плане соотносится с Кулайской культурой (эпоха раннего железа, конец VI в. до н.э. – V в. н.э.) (Народы и культуры, 2001). Прасельскупской археологической культурой средневековья считается среднеобская релкинская культура (VI–IX в. н.э.) (Чиндина, 1991).

В генетическом отношении исследована только популяция северных селькупов (Дуброва и др., 1993; Фефелова и др., 1994; Карафет и др., 1994). Она детально изучена по гаплогруппам митохондриальной (мт) ДНК (Казаковцева и др., 1998), Y-хромосомы (Karafet et al. 1999, 2002; Tambets et al. 2002), по аллотипам Gm тяжёлых цепей иммуноглобулинов G и по полиморфизму длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) этих генов после обработки двумя рестриктазами Bam HI – Sac I (Osipova et al., 1999).

Селькупы демонстрируют сложность и многокомпонентность этногенеза. Наблюдается ряд противоречий данных антропологии, этнографии, лингвистики и генетических исследований, полученных при изучении отцовских (Y-хромосома) и материнских (мтДНК) линий. Митохондриальная ДНК и Y-хромосома представляют лишь малые части генома человека, причём по-разному отражающие миграционные события и, возможно, подверженные отбору. Эти маркеры, по сравнению с аутосомными, более чувствительны к стохастическим процессам, таким как дрейф генов и эффект основателя, которые являются следствием географической изоляции, миграций или подразделённости популяций. Одним из способов разрешения этих противоречий явилось изучение, наряду с мтДНК и Y-хромосомой, генетических маркеров, представляющих аутосомы (неполовые хромосомы) человека. Кроме того, анализ аутосомных ДНК-маркеров позволил бы свести вместе комбинативное действие материн-

ских и отцовских линий, поскольку такие маркеры наследуются и по матери, и по отцу (Zhivotovsky et al., 2003).

Таблица 1

Опись костных антропологических материалов из могильников с территории Нарымского Приобья

№ образца	Погребение (возраст индивида, лет)	Название и местонахождение памятника	Автор раскопок, дата	Датировка, века
1	Курган 1, погр. 3 (40–45)	Курганная группа Барклай, Чаинский р-н	Ю.И. Ожередов, 1985 г.	XV–XVII
2	Раскоп на курганах 2–4–6, погр. 3 (40–45)	» » » » »	Ю.И. Ожередов, 1987 г.	
3	Курган 1 (20–25)	Курганный могильник Сухая Речка, Бакчарский р-н	Ю.И. Ожередов, 2000 г.	XVII
4	Курган 1 (около 40)			
5	Курган 5, погр. 6 (40–45)	Кустовская курганная группа, Бакчарский р-н	Ю.И. Ожередов, 1991 г.	XVI–XVII
6	Могила 21 (30)	Грунтовый могильник Бедеревский Бор I, Каргасокский р-н	А.И. Боброва, 1990 г.	XV–XVII
7	Могила 4 (18–20)	Грунтовый могильник Бедеревский Бор II, Каргасокский р-н	А.И. Боброва, 1989 г.	XV–XVII
8	Могила 27 (30–40)	Грунтовый могильник Бедеревский Бор III, Каргасокский р-н	Н.В. Березовская, 1992 г.	XII–XIII
9	Могила 4 (около 20)	Могильник Алдыган, Колпашевский р-н	Я.А. Яковлев, А.И. Боброва, 1994–1995 гг.	XIII–XIV
10	Курган 10 (25–30)	Карбинский курганный могильник-II, Верхнекетский р-н	А.И. Боброва, 1991 г.	XVII
11	Курган 7, могила 24 (30–40)	Тискинский курганный могильник, Колпашевский р-н	А.И. Боброва, 1978 г.	XV–XVII
12	Курган 4, погр. 22, костяк 4 (18–20)	» » » » »	А.И. Боброва, 1979 г.	» »
13	Курган 4, погр. 24 (30–40)	» » » » »	А.И. Боброва, 1979 г.	» »
14	Курган 4, погр. 66 (35–40)	» » » » »	А.И. Боброва, 1979 г.	XIV–XVII
15	Курган 13, погр. 54, костяк 4 (25–30)	» » » » »	А.И. Боброва, 1980 г.	XIV
16	Курган 8, погр. 20 (взрослый)	» » » » »	А.И. Боброва, 1978 г.	»
17	Курган 12, погр. 30, костяк 4 (20)	» » » » »	А.И. Боброва, 1979 г.	XII–XIV
18	Курган 12, погр. 30, костяк 5 (25–30)	» » » » »	А.И. Боброва, 1979 г.	» »
19	Курган 24, могила 2 (35–40)	Курганный могильник Остяцкая Гора, Молчановский р-н	А.П. Дульзон, 1954 г.	XVII
20	Могила 2 (40–60)	Кладбище у д. Могильный Мыс, Колпашевский р-н	В.А. Дремов, 1964 г.	XIX–XX

Настоящее исследование посвящено оценке генетического разнообразия прасельскупского населения по одному полиморфному аутосомному локусу Alu-инсерции

(вставки) в гене ангиотензин-превращающего фермента (ACE), относящейся к подсемейству Ya5/8. Ряд свойств полиморфных Alu-инсерций делает их очень удобными для популяционно-генетического анализа. К числу таких характеристик относятся высокая стабильность Alu-элемента, низкий уровень инсерций *de novo*, отсутствие механизма удаления Alu-повтора из специфического локуса. Эти свойства позволяют с высокой степенью надежности рассматривать инсерцию Alu-элемента в каждый из локусов как независимое событие, произошедшее лишь однажды. Кроме того, природа перемещения Alu-элемента позволяет совершенно однозначно выявить начальное (отсутствие Alu-повтора) и конечное (инсерция) аллельное состояние локуса. Иными словами, для Alu-повторов, в отличие от большинства других полиморфных диалельных систем, всегда известно предковое состояние и направление мутации. Еще одно преимущество Alu-маркеров – относительная простота генотипирования, осуществляемого с помощью ПЦР и агарозного гель-электрофореза. В настоящее время Alu-повторы наряду с другими системами генетических маркеров широко применяются для анализа филогении и эволюции популяций человека (Batzer et al., 1996, 2002; Stoneking et al., 1997; Romualdi et al., 2002; Степанов, 2002).

Из 31 популяции, которые на сегодняшний день являются аборигенными для Сибири, 26 рассматриваются как малочисленные этнические группы. Для селькупов и других малочисленных народов характерны такие демографические процессы, как снижение численности и темпов роста населения, продолжающийся процесс ассимиляции; уровень заболеваемости и смертности у них выше, чем для некоренного населения в тех же регионах (Karafet et al., 2002). Этнодемографическая ситуация в районах их расселения свидетельствует о глубоко зашедшем процессе культурной, языковой и биологической ассимиляции их русскими (Аксянова, 1999, 2001). В связи с этим изучение генетиками современного населения группы южных (нарымских) селькупов проблематично. Поэтому возникла необходимость исследования костных останков носителей древних культур, определяемых антропологами и археологами как прасельскупские и селькупские.

Материалом исследования являлись костные останки 20 мужчин в возрасте от 18 до 60 лет из погребений XII–XX вв., полученные археологами в Томской области и хранящиеся в кабинете антропологии ТГУ (табл. 1). Могильники, из которых извлечены изученные костные останки, отнесены авторами раскопок и антропологами к кругу прасельскупских культур.

Выделение и очистка ДНК из костных останков

Наружный слой костного вещества удаляли стерильным, обработанным 96%-ным спиртом и обожженным на открытом огне, напильником. Кости измельчали до порошкообразного состояния и 400–500 мг инкубировали в 4 мл лизирующего буфера следующего состава: 10 mM Tris-Hcl (pH = 7,5); 10 mM EDTA (pH = 8,0); 50 mM NaCl; 2% SDS, при 37°C в течение 24 ч на качающейся платформе. В два приёма добавляли протеиназу К и дитиотрейтол (DTT) до конечных концентраций 1 мг/мл и 0,5 мМ. ДНК из раствора экстрагирована фенол-хлороформным методом (Маниатис и др., 1984) и за-

тем очищена и сконцентрирована до объёма 150–200 мкл с помощью набора для микрофильтрации центрифугированием Centricon-100 (Millipore™). ДНК переосаждена этанолом, растворена в 50 мкл деионизованной воды и использована в качестве матрицы для амплификации.

Амплификация фрагментов ДНК

Alu-полиморфизм в локусе ACE идентифицировали с помощью праймеров, описанных в работах (Tiret L. et al., 1992). В общем объёме 25 мкл амплификационной смеси находилось: по 0,1–0,5 мкг ДНК; по 2,5 пМ прямого и обратного праймеров; смесь четырёх основных dNTP в концентрации по 0,2 мМ каждого; 1 ед. акт. Taq ДНК-полимеразы (ТОО «СибЭнзим», г. Новосибирск); буфер для амплификации содержал 65 мМ Трис-HCl (pH = 8,0); 16 мМ $(NH_4)_2SO_4$; 2,5 мМ $MgCl_2$; 0,01% Tween 20; в смесь добавляли DMSO до конечной концентрации 5%, реакционную смесь до конечного объёма доводили деионизованной водой, и наслаивали 15 мкл минерального масла для предотвращения испарения. В амплификационную смесь также добавляли бычий сывороточный альбумин V фракцию до конечной концентрации 0,2%. В каждом эксперименте использовали пустой (blank) контроль, содержащий все растворы за исключением ДНК, для контроля возможного загрязнения современной ДНК.

Наличие полиморфизма определяли по позиции полос на дорожках после электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Номенклатура аллелей соответствует общепринятой: I – наличие, D – отсутствие Alu-вставки. Амплификацию фрагментов проводили по следующей схеме: начальная денатурация 94° – 4 мин; 35 циклов 94° – 40 с, 58° – 1 мин, 72° – 1 мин и конечная элонгация 72° – мин. После амплификации продукты окрашивали бромистым этидием, разделяли в 2%-ном агарозном геле и фотографировали в УФ-свете.

По причине того, что более короткий аллель (190 пар нуклеотидов (п.н.), D – отсутствие инсерции) в гетерозиготном состоянии преимущественно амплифицируется, для подтверждения наличия инсерции (аллель I, 490 п.н.) проводили дополнительную независимую ПЦР с парой праймеров специфичных для инсерционной ДНК-последовательности (Lindpaintner et al., 1995). Структура праймеров и условия ПЦР описаны в вышеупомянутой работе.

Часть результатов амплификации представлена на рис. 1. Как видно из рисунка, за исключением образца на дорожке *8* во всех образцах присутствует аллель D. При этом аллель I в явном виде амплифицировался только в образцах на дорожках *4*, *5* и *7*.

На рис. 2 изображены результаты амплификации тех же образцов с праймерами, специфичными для инсерции Alu.

Как видно из рис. 2, образцы 16–20 несут инсерцию, хотя амплификация аллеля I не обнаруживается при амплификации локуса гена ACE в образцах 16, 17, 20 (см. рис. 1, дорожки *2*, *3* и *6* соответственно). Таким образом, были проанализированы все 20 образцов, результаты представлены в табл. 2.

Частота инсерции Alu у изученных 19 образцов составила 63,2%. Наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности равны 73,7 и 46,5% соответственно. Наблюдается зна-

чительное отклонение наблюдаемой гетерозиготности от ожидаемой на 27,2%. Выявлено также отклонение от равновесия Харди – Вайнберга (РХВ) в изученной выборке ($\chi^2 = 6{,}5$; $p = 0{,}011$). Совокупность проанализированных образцов не является популяционной выборкой, поэтому обнаружено отклонение от РХВ и избыток гетерозигот. В табл. 3 представлены частоты распространённости изученного полиморфизма в этносах Сибири и Средней Азии (Хитринская и др., 2002). Как видно из табл. 3, изученная группа селькупов близка по частоте инсерции мобильного генетического элемента Alu в гене ACE, с одной стороны, к северным монголоидам (чукчи, якуты, эскимосы, эвенки), а с другой – к этносам, в формировании которых прослеживается европеоидный компонент (алтайцы и киргизы).

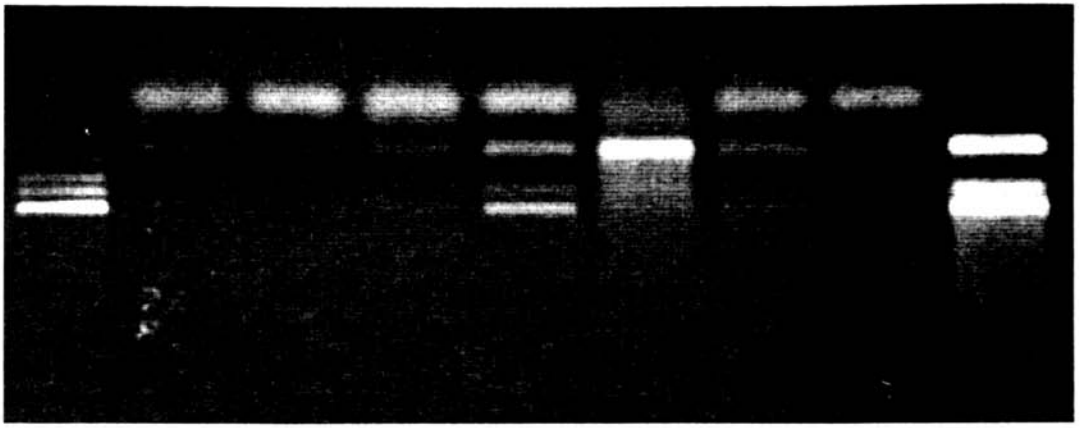

Рис. 1. Результаты амплификации инсерционно-делеционного полиморфизма в гене ACE. На дорожке *1* – маркеры молекулярного веса, фрагменты рестрикции плазмиды pUC19 по Msp I, на дорожках *2–6* – образцы 16–20, на дорожках *7* и *8* – другие образцы древней ДНК, на дорожке *9* – гетерозиготный образец современной ДНК (генотип ID)

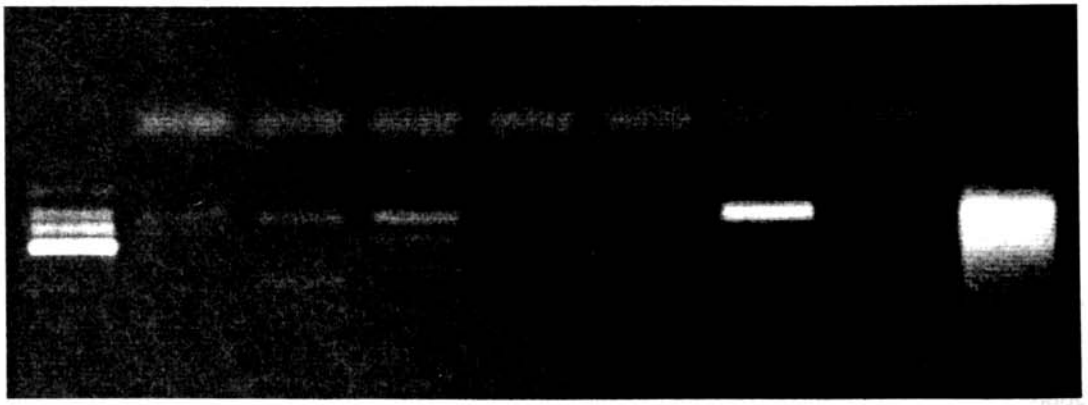

Рис. 2. Результаты амплификации инсерции Alu в гене ACE.
На дорожках то же, что на рис. 1. Ниже продукта амплификации Alu-вставки видна неспецифичная амплификация на дорожках *3* и *4*

Таблица 2

Генотипы образцов ДНК, выделенной из костного материала могильников с территории Нарымского Приобья

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Генотипы	II	II	ID	ID	II	ID	ID	ID	ID	ID	ID	ID	0*	II	II	ID	ID	ID	ID	ID

Примечание. *ДНК образца № 13 оказалась непригодной для амплификации.

Таблица 3

Частоты инсерции мобильного генетического элемента Alu в гене ACE в популяциях Сибири и Средней Азии

Популяция	Частота, %	2N
Таджики	32,93	82
Украинцы	45,36	194
Русские	47,61	418
Тувинцы	48,77	814
Узбеки	59,78	92
Казахи	60,13	158
Дунгане	60,23	88
Буряты	61,58	568
Алтайцы	62,74	620
Киргизы	62,98	208
Праселькупы	**63,16**	**40**
Чукчи	64,04	114
Якуты	64,95	402
Эскимосы	67,26	226
Эвенки	67,55	188
Нивхи	69,7	66
Кеты	70	80
Ханты	70,89	158
Манси	75	76
Коряки	81,68	142
Таджики	32,93	82
Украинцы	45,36	194
Русские	47,61	418
Тувинцы	48,77	814
Узбеки	59,78	92
Казахи	60,13	158
Дунгане	60,23	88

Примечание. 2N – количество изученных хромосом.

Полученные результаты демонстрируют возможность работы с костным материалом для анализа аутосомных ДНК-маркеров. Залогом успешной работы является тщательное выделение ДНК с соблюдением всех условий, предотвращающих её контаминацию. Планируется увеличить объём изучаемой выборки и расширить спектр исследуемых полиморфных инсерций Alu.

ЛИТЕРАТУРА

Аксянова Г.А. 100 народов Российской Федерации: численность населения, язык, религия, традиционные занятия, антропологические особенности: Справочные материалы. М.: Старый сад, 2001. 62 с.

Аксянова Г.А. Антропология о традициях и современных процессах в расовом составе коренного населения Томской области // Традиционное и современное в культурах Томского Севера. Томск: Изд-во Том. гос. пед. ун-та, 1999. С. 108–142.

Дуброва Ю.Е., Карафет Т.М., Осипова Л.П. Гетерозиготность и плодовитость у северных селькупов // Генетика. 1993. Т. 29, № 10. С. 1697–1701.

Казаковцева М.А., Воевода М.И., Осипова Л.П. Полиморфизм митохондриальной ДНК у северных селькупов // Генетика. 1998. Т. 34, № 3. С. 416–422.

Карафет Т.М., Посух О.Л., Осипова Л.П. Популяционно-генетическое исследование коренных жителей Сибирского Севера // Сибирский экологический журнал. 1994. № 2. С. 113–127.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.

Народы и культуры Томско-Нарымского Приобья: Материалы к энциклопедии Томской области. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2001. 252 с.

Степанов В.А. Этногеномика населения Северной Евразии. Томск: Печатная мануфактура, 2002. 244 с.

Фефелова В.В., Осипова Л.П., Яготин В.А., Бронштейн Е.Л. Антигены системы HLA у селькупов // Сибирский экологический журнал. 1994. № 2. С. 141–148.

Чиндина Л.А. История Среднего Приобья в эпоху раннего средневековья (релкинская культура). Томск: Изд-во Том. ун-та, 1991. 184 с.

Batzer M.A., Deininger P.L. Alu repeats and human genomic diversity // Nature Rev. Genet. 2002. Vol. 3, № 5. P. 370–380.

Batzer M.A., Deininger P.L., Hellmann-Blumberg U. et al. Standardized nomenclature for Alu repeats // J. Mol. Evol. 1996. Vol. 42. P. 3–6.

Karafet T.M., Osipova L.P., Gubina M.A. et al. High levels of Y-chromosome differentiation among native Siberian populations and the genetic signature of a boreal hunter-gatherer way of life // Hum. boil. 2002. Vol. 74. P. 761–789.

Karafet T.M., Zegura S.L., Posukh O. et al. Ancestral Asian source(s) of New World Y-chromosome founder haplotypes // Am. J. Hum. Genet. 1999. Vol. 64. P. 817–831.

Lindpaintner K., Pfeffer M.A., Kreutz R., Stampfer M.J., Grodstein F., LaMotte F., Buring J., Hennekens C.H. A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease // N. Engl. J. Med. 1995. Vol. 332, № 11. P. 706–711.

Osipova L.P., Posukh O.L., Wiebe V.P. et al. bamHI-SacI RFLP and Gm analysis of the immunoglobulin IGHG genes in the Nothern Selkups (west Siberia): new haplotypes with deletion, duplication and triplication // Hum. Genet. 1999. Vol. 105, № 6. P. 530–541.

Romualdi Ch., Balding D., Nasidze I.S. Pattern of human diversity, within and among continents, inferred from biallelic DNA polymorphisms // Genome Res. 2002. Vol. 12, № 4. P. 602–612.

Stoneking M. Recent African origin of human mitochondrial DNA: review of the evidence and current status of the hypothesis // Progress in Population Genetics and Human Evolution. Berlin, 1997. P. 1–13.

Tambets K., Rootsi S., Kivisild T. et al. The western and eastern roots of the Saami – the story of genetic «outliers» told by mitochondrial DNA and Y chromosomes // Am. J. Hum. Genet. 2004. Vol. 74. P. 661–682.

Tiret L., Rigat B., Visvikis S. et al. Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I- converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels // Am. J. Hum. Genet. 1992. Vol. 51. P. 197–205.

Zhivotovsky L.A. et al. Features of evolution and expantion of modern humans inferred from genome-wide microsatellite markers // Am. J. Hum. Genet. 2003. Vol. 72. P. 1171–1186.