



UDK: 577.212

Dilnoza D. QURONBAYEVA,

Magistrant, O'zbekiston Milliy universiteti, Toshkent, O'zbekiston

E-mail: dilnozaquronbayeva1@gmail.com, ORCID: 0009-0004-9149-3476

Niyyora S. SAITOVA,

Laboratoriya mudirasi, O'zbekiston Respublikasi Adliya vazirligi huzuridagi X.Sulaymonova nomidagi Respublika sud ekspertizasi markazi, Toshkent, O'zbekiston

E-mail: Maryn1787@gmail.com, ORCID: 0009-0005-6172-1068

Ipakchilik ilmiy-tadqiqot instituti professori, PhD B.Nasirillayev taqrizi asosida

ANALYSIS OF THE HVI AND HVII SEGMENTS IN THE D-LOOP REGION OF MITOCHONDRIAL DNA

Annotation

This article presents an analysis of the HVI and HVII segments within the D-loop region of mitochondrial DNA. The variability of mitochondrial DNA is primarily observed in the HVI and HVII segments of the D-loop region. During the study, nucleotide variations and polymorphisms within these segments were analyzed. The obtained results demonstrated that the HVI and HVII segments possess high identification value and enable reliable identification even from degraded biological samples. The analysis of these segments is of significant importance in forensic science and molecular genetics.

Keywords: mitochondrial DNA, D-loop, HVI, HVII, polymorphism, personal identification, molecular genetics.

АНАЛИЗ СЕГМЕНТОВ HVI И HVII В ОБЛАСТИ D-LOOP МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Аннотация

В данной статье исследуется анализ сегментов HVI и HVII в области D-loop митохондриальной ДНК. Изменчивость митохондриальной ДНК в основном проявляется в сегментах HVI и HVII области D-loop. В ходе исследования были проанализированы нуклеотидные вариации и полиморфизмы в данных сегментах. Полученные результаты показали, что сегменты HVI и HVII обладают высокой идентификационной значимостью и позволяют проводить достоверную идентификацию даже на основе деградированных биологических образцов. Анализ данных сегментов имеет важное значение в судебно-медицинской экспертизе и молекулярной генетике.

Ключевые слова: митохондриальная ДНК, D-loop, HVI, HVII, полиморфизм, идентификация личности, молекулярная генетика.

MITOXONDRIAL DNKNING D-LOOP HUDUDIDAGI HVI VA HVII SEGMENTLARI TAHLILI

Annotatsiya

Ushbu maqolada mitoxondrial DNKning D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlari tahlili o'rganildi. Mitoxondrial DNKning o'zgaruvchanligi asosan D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlarida namoyon bo'ldi. Tadqiqot davomida ushbu segmentlardagi nukleotid o'zgarishlari va polimorfizmlar tahlil qilindi. Olingan natijalar HVI va HVII segmentlarining yuqori identifikatsion ahamiyatga ega ekanligini va degradatsiyaga uchragan biologik namunalarda asosida ham ishonchli identifikatsiya o'tkazish imkonini berishini ko'rsatdi. Mazkur segmentlarning tahlili sud-tibbiyot ekspertizasi va molekulyar genetika sohasida muhim ahamiyat kasb etadi.

Kalit so'zlar: mitoxondrial DNK, D-loop, HVI, HVII, polimorfizm, shaxs identifikatsiyasi, molekulyar genetika.

Kirish. Hozirgi vaqtda sud-ekspertizasi va molekulyar genetika sohasida inson shaxsini aniqlashda yuqori aniqlikka ega genetik markerlarni o'rganish muhim ahamiyat kasb etadi. Shu jihatdan mitoxondrial DNK (mtDNK) alohida o'rin tutadi. Mitoxondrial DNK ona tomonidan irsiylanishi, ko'p nusxaligi va degradatsiyalangan namunalarda ham aniqlanishi bilan ajralib turadi. Uning D-loop hududi esa yuqori o'zgaruvchanligi bilan ajralib turadi.

Xususan, D-loop hududidagi HVI (Hypervariable Region I) va HVII (Hypervariable Region II) segmentlari genetik polimorfizmning eng yuqori darajada namoyon bo'ladigan qismlari bo'lib, shaxs identifikatsiyasida muhim ahamiyatga ega. Shu sababli mazkur maqolada mtDNK D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlarining tahlili hamda ularning identifikatsion imkoniyatlari ko'rib chiqiladi.

Mavzuga oid adabiyotlar tahlili. Mitoxondrial DNKning D-loop hududi molekulyar genetika va sud-tibbiyot ekspertizasi sohalarida eng ko'p tadqiq etilgan genetik qismlardan biri hisoblanadi [1]. Ayniqsa, ushbu hudud tarkibiga kiruvchi HVI va HVII segmentlari yuqori darajadagi nukleotid variabelligi bilan ajralib turadi va shaxsni genetik identifikatsiya qilishda muhim rol o'ynaydi [2]. Ilmiy manbalarda mitoxondrial DNKning tuzilishi va uning irsiylanish xususiyatlari keng yoritilgan bo'lib, u ona tomonidan nasildan nasilga o'tishi bilan tavsiflanadi [3]. Shu bilan birga, D-loop hududidagi o'zgaruvchanlik inson populyatsiyalari o'rtasidagi genetik farqlarni aniqlashda asosiy indikatorlardan biri sifatida ko'rib chiqiladi [4].

HVI va HVII segmentlarida mutatsion o'zgarishlarning tez-tez uchrashini ularni individual genetik profilni shakllantirishda ishonchli markerga aylantiradi [5]. Sud-tibbiyot amaliyotida mitoxondrial DNK tahlili biologik materiallar degradatsiyalangan holatlarda ham genetik ma'lumot olish imkonini berishi bilan ajralib turadi [6]. Bu esa ayniqsa eski, kam miqdordagi yoki shikastlangan namunalarni tahlil qilishda muhim ahamiyat kasb etadi [7]. Zamonaviy molekulyar genetik texnologiyalar, jumladan

yuqori aniqlikdagi sekvenslash usullari mtDNK D-loop hududini yanada chuqur va aniq o'rganish imkonini bermoqda. Natijada genetik identifikatsiya jarayonlarining aniqlik darajasi sezilarli ravishda oshgan[8].

Tadqiqot metodologiyasi. Ushbu tadqiqotda mitoxondrial DNKning D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlarini tahlil qilish uchun molekulyar-genetik usullar qo'llanildi. Tadqiqot ishida biologik material sifatida inson qon namunalariidan foydalanildi.

Nuklein kislotalarni ajratish. Tadqiqotda qon namunalariidan DNK ajratish uchun fenol-xloroform usulidan foydalanildi. DNK ajratish jarayoni Daytes buffer va proteinaza K yordamida hujayralarni lizis qilishga asoslandi. Dastlab steril mikrotsentrifuga naychasiga lizis eritmasi solinib, unga 20 mkl suyuq qon namunasi qo'shildi. So'ngra proteinaza K eritmasi qo'shilib, namuna ehtiyotkorlik bilan aralashtirildi va 56°C haroratda 40 daqiqa davomida inkubatsiya qilindi. Fermentativ ishlodan so'ng namunaga fenol-xloroform : izoamil spirti aralashmasi qo'shilib, vorteks yordamida aralashtirildi hamda 14000 rpm tezlikda 5 daqiqa davomida sentrifugalandi. Fazalar ajralgach, yuqori suvli qavat steril pipetka yordamida alohida mikroprobirkaga o'tkazildi. Hujayraviy komponentlarni to'liq ajratish uchun ekstraktsiya jarayoni bir necha marta takrorlandi. Ajratib olingan suvli fazaga sovuq 96 % etanol qo'shilib, DNK cho'ktirildi va namunalar -20°C haroratda 1 soat inkubatsiya qilindi. Keyinchalik namunalar sentrifugalandi, hosil bo'lgan DNK cho'kmasi 70 % etanol bilan yuvildi va quritildi. Yakuniy bosqichda DNK deionizatsiyalangan suv yoki TE buferida eritilib, keyingi molekulyar-genetik tahlillar uchun foydalanildi.

Birinchi PZR (furst PCR). PZR reaksiyasi amalga oshirilganda har bir probirkaga 5 µl aktivator qo'shiladi, u reaksiya komponentlarini faollashtiradi. Genomik DNK esa namuna sifatida qo'shilib, ko'paytirish jarayoni uchun tayyorlandi; DNKning hajmi kontsentratsiyaga qarab 20 µl gacha etkazish mumkin. Reaksiyaning yakuniy hajmi deionizatsiyalangan suv yordamida 25 µl gacha yetkazildi. Bu komponentlarning kerakli konsentratsiyasini ta'minlanib, reaksiyaning samarali borishi kafolatlandi.

Tayyorlangan reaksiya aralashmalar amplifikatorga joylashtirildi va FAM, VIC va CY5 kanallarida fluorens signalini aniqlash orqali aniq vaqtidagi PZR reaksiyasi quyidagi tartibda olib borildi: dastlab 96 °C da 5 daqiqa denaturatsiya, so'ng 40 sikl davomida 95 °C da denaturatsiya (20 s), 58 °C da gibridizatsiya (30 s) va 72 °C da elongatsiya (60 s) jarayonlari amalga oshirildi; so'ng 15 °C da cheksiz sovutish bilan reaksiya to'xtatildi.

Tozalash. Keyingi Sekvins PZR uchun birinchi PZR namunalari tozalanildi. Bunig uchun PCR Clean Up to'plami va maxsus kolonkalaridan foydalanildi.

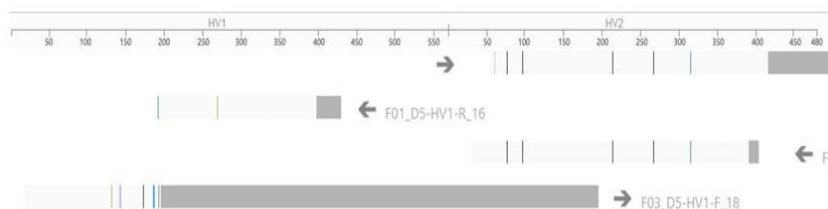
Sekvins PZR. Sekvenirlash reaksiyalari rangli probirkalarda taqdim etildi. Probirka rangi ma'lum bir sekvensirovlovchi praymerga mos keladi. Sekvenirlash reaksiyasi uchun har bir probirkaga 1 µl Dye Terminator va 9 µl oldindan tozalangan PZR mahsuloti qo'shildi, so'ngra cho'kma eriguncha aralashtirilib, zarur bo'lsa qisqa sentrifugalandi. Reaksiyalar amplifikatorda quyidagi tartibda amalga oshirildi: dastlab 96 °C da 60 soniya denaturatsiya, keyin 30 sikl davomida 96 °C da 10 soniya denaturatsiya, 50 °C da 5 soniya gibridizatsiya va 60 °C da 120 soniya elongatsiya; oxirida 15 °C da cheksiz sovutish bilan reaksiya to'xtatildi.

Ikkinchi Tozalash. Sekvins PZR ni so'ngi tozalash "MitoPlex SM Clean up module" maxsus to'plami asosida amalga oshirildi. Bu tozalash jarayonini amalga oshirish uchun maxsus magnit plashkalardan foydalanildi. Tozalash jaroni oxirida magnit plashkadagi probirkalarga 20 mkl HiDi formamid qo'shilib, toza DNK olinib, keying bosiqchga o'tildi.

Elektroforez. Olingan 20 µl sekvenirlash reaksiyasi mahsulotlari formamidli eritmasini kapillyar elektroforezni o'tkazish uchun 96 yacheykali plashkaga zarur ketma-ketlikda solindi. Qurilmada ishlatilgan Dye Terminator versiyasiga mos keladigan spektral kalibratsiya o'tkazilganligiga ishonch hosil qilindi. Elektroforez parametrlarining tavsiya etilgan qiymatlari foydalanilayotgan genetik analizator modeliga bog'liq bo'lib, xususan, ABI 3500 genetik analizatori uchun mos keluvchi Run Module parametrlaridan foydalanish tavsiya etildi. Uskuna ishga tushurilib, so'ng maxsus dastur asosida natijalar tahlil qilindi.

Tahlil va natijalar. Tadqiqot davomida qon namunalariidan ajratib olingan mitoxondrial DNKning D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlari tahlil qilindi. Olingan nukleotid ketma-ketliklari referens ketma-ketlik bilan solishtirildi hamda ayrim pozitsiyalarda nukleotid almashinishlari kuzatildi. Aniqlangan o'zgarishlarning asosiy qismi HVI segmentida qayd etildi, HVII hududida esa nisbatan kamroq variatsiyalar uchradi. Tahlil natijalari HVI va HVII segmentlarining polimorfik xususiyatga ega ekanligini ko'rsatdi. Ushbu hududlarda aniqlangan genetik farqlanishlar qon namunalari o'zaro taqqoslash hamda shaxs identifikatsiyasini amalga oshirishda qo'llanilishi mumkinligi aniqlandi. Olingan natijalar mitoxondrial DNKning D-loop hududi shaxsni genetik identifikatsiya qilishda muhim markerlardan biri ekanligini ko'rsatdi.

Tadqiqot doirasida organilgan soha	Gaplotip
HVI 16017 – 16394	16129A 16140C 16266A
HVII 26 – 410	73G 315.1C



1 - rasm. Tadqiqot jarayonida tahlil etilgan mtDNK ketma-ketliklari

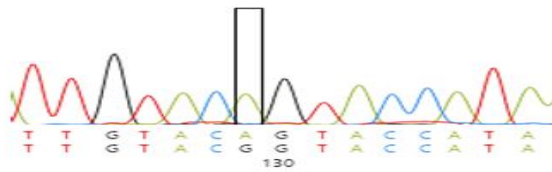
Mazkur tadqiqot davomida aniqlangan nukleotid almashinishlari, tadqiqot identifikatorlari

Hudud HVI.

Tadqiqot doirasida o'rganilgan sohalar: 16017 – 16394

16129A

Fayl F03_D5-HV1-F_18.ab1



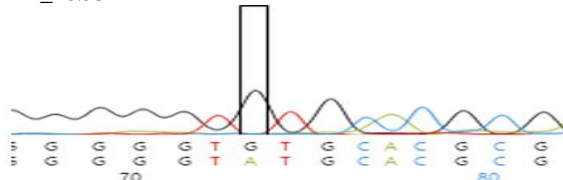
2-rasm. mtDNK D-loop hududida aniqlangan nukleotid o'zgarishlari

Rasmda korsatilgan sohada nukleotidlar ketma-ketligi aniq o'qilgan bolib, pozitsiya 130 atrofida joylashgan nukleotid o'zgarishi (polimorfizm) kuzatiladi. Ajratib korsatilgan hududda G (Guanin) joylashishi lozim bolgan soxada A (Adenin) namoyon bolganligini kuzatishimiz mumkin. Aynan shu turdagi ozgaruvchanlik, ya'ni mutatsiyalar mtDNKning oziga xos identifikatsion omili xisoblanadi.

Hudud HVII.

Tadqiqot doirasida organilgan sohalar: 26 – 410

73G Fayl F07_D5-HV2-F_16.ab1



3-rasm. Pozitsiya 70 atrofida joylashgan nukleotid o'zgarishi (polimorfizm) kuzatilishi.

Quyida ko'rsatilgan rasmlarda mitoxondrial DNKning ma'lum fragmenti uchun olingan sekvenirlash natijalari tasvirlangan. Har bir nukleotid turiga mos ravishda rangli cho'qilar (piklar) aks etgan bolib, odatda adenin (A) - yashil, timin (T) - qizil, sitozin (C) - kok va guanin (G) - qora rang bilan ifodalanadi. Cho'qilarning balandligi signal intensivligini bildiradi va bu sekvensiyaning ishonchlilik darajasini korsatadi.

Xulosa va takliflar. Mitoxondrial DNKning D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlarini tahlil qilish ushbu hududlarning yuqori polimorfizmga ega ekanligini ko'rsatdi. Tadqiqot davomida qon namunalari ajratib olingan mtDNK ketma-ketliklari o'rganilib, ayrim nukleotid almashinishlari aniqlandi. Kuzatilgan genetik farqlanishlar HVI va HVII segmentlarining shaxs identifikatsiyasida muhim marker sifatida qo'llanilishi mumkinligini tasdiqladi. Tadqiqot natijalari mitoxondrial DNKning D-loop hududi sud- ekspertiza amaliyotida samarali qo'llanilishini ko'rsatdi. Ayniqsa, mtDNKning ko'p nusxada uchrashi va degradatsiyaga nisbatan barqarorroq saqlanishi uning amaliy ahamiyatini oshiradi. HVI va HVII segmentlarining tahlili biologik namunalarni o'zaro taqqoslash hamda genetik identifikatsiyani amalga oshirishda muhim o'rin tutadi.

Takliflar

1. Sud-biologik ekspertiza amaliyotida, ayniqsa, degradatsiyaga uchragan yoki kam miqdordagi biologik materiallarni tahlil qilishda mtDNKning D-loop hududidagi HVI va HVII segmentlari tahlilini keng joriy etish maqsadga muvofiq hisoblanadi.

2. O'zbekiston populyatsiyasi uchun mtDNKning HVI va HVII segmentlari bo'yicha referent genetik ma'lumotlar bazasini shakllantirish shaxs identifikatsiyasi natijalarining ishonchlilikini oshirishga xizmat qiladi.

3. Kelgusidagi tadqiqotlarda namunalar sonini ko'paytirish hamda D-loop hududining boshqa gipervariabel segmentlarini birgalikda tahlillarni amalga oshirish tavsiya etiladi.

4. HVI va HVII segmentlarida aniqlangan polimorf variantlarning populyatsion-genetik xususiyatlarini chuqur o'rganish identifikatsion tadqiqotlarning ilmiy asoslarini yanada takomillashtirish imkonini beradi.

Mazkur tadqiqot natijalari asosida kelgusida mtDNKning HVI va HVII segmentlarini o'rganish bo'yicha tadqiqotlarni turli biologik materiallar asosida kengaytirish maqsadga muvofiq hisoblanadi. Shuningdek, sekvensiya usullarini takomillashtirish va mtDNK bo'yicha mahalliy genetik ma'lumotlar bazasini shakllantirish sud- ekspertiza tadqiqotlar samaradorligini oshirishga xizmat qiladi.

ADABIYOTLAR

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. London: Nature Publishing Group, Nature, 1981, Vol. 290, pp. 457–465.
2. Wallace D.C. Mitochondrial DNA: variation in human evolution and disease. New York: Oxford University Press, 1999, pp. 120–145.
3. Brown W.M., George M., Wilson A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Washington: National Academy of Sciences, PNAS, 1979, Vol. 76, No. 4, pp. 1967–1971.
4. Stoneking M., Wilson A.C. Mitochondrial DNA and human evolution. Chicago: University of Chicago Press, Journal of Molecular Evolution, 1989, Vol. 28, pp. 128–143.
5. Wilson M.R., Holland M.M. Mitochondrial DNA analysis in forensic identification. USA: Wiley, Journal of Forensic Sciences, 1993, Vol. 38, No. 3, pp. 519–529.
6. Parson W., Bandelt H.J. Extended guidelines for mitochondrial DNA typing in forensic genetics. Amsterdam: Elsevier, Forensic Science International: Genetics, 2007, Vol. 1, No. 1, pp. 13–19.
7. Holland M.M., Parsons T.J. Mitochondrial DNA sequence analysis for forensic casework. USA: Wiley, Journal of Forensic Sciences, 1999, Vol. 44, No. 4, pp. 802–809.
8. Richards M.B., Macaulay V.A. et al. Tracing European founder lineages in mitochondrial DNA variation. Chicago: University of Chicago Press, American Journal of Human Genetics, 2000, Vol. 67, No. 5, pp. 1251–1276.
9. QTP 29.1-10 Экстракция ДНК из крови, слюны, эпителиальных клеток и других биологических следов, которые присутствуют на предмете носителя, а также мышцы, хрящей сухожилия, абортного материала и костного мозга методом органики.
10. Mito Plex to'plami orqali mitoxondrial DNK ketma-ketligini aniqlash" protokoli 230830