

Локусы для определения половой принадлежности

Определение половой принадлежности образцов ДНК, выделенных из различных биологических объектов (пятен крови, волос, слюны, костных останков, зубов и др.), очень часто является первичной задачей молекулярно-генетической экспертизы. Исследуемый биологический материал нередко бывает деградирован, доступен в следовых количествах, загрязнён различными примесями. Также этот материал может иметь смешанное происхождение от двух и более лиц, в том числе мужское и женское, – например, образцы мазков содержимого влагалища в случаях изнасилований. В таких ситуациях требуется использование надёжных молекулярно-диагностических методов для эффективного определения половой принадлежности исследуемых объектов.

Описанные ниже методы определения половой принадлежности удовлетворяют современным международным требованиям, предъявляемым к молекулярно-генетическим исследованиям с использованием метода ПЦР. Анализ независимых локусов позволяет контролировать результаты в сомнительных случаях.

Эти же локусы могут быть использованы для уверенной пренатальной диагностики пола будущего ребёнка.

Коды продукции

| Классификатор | Код продукции | Расшифровка кода | Примечания |
|--|---------------|--|---|
| ОКПД2 (ОК 034-2014, КПЕС 2008) | 20.59.52.190 | Реагенты сложные диагностические или лабораторные, не включенные в другие группировки | Дата введения классификатора: 01.02.2014 |
| | 20.59.52.199 | Реагенты сложные диагностические или лабораторные прочие, не включенные в другие группировки | |

Предварительная информация

- Наборы **ТАПОТИЛИ** предназначены для исследовательских работ *in vitro* (то есть в пробирке, вне живого организма).
- Наборы не подлежат обязательной сертификации и декларированию соответствия в Системе сертификации ГОСТ Р.
- Наборы **ТАПОТИЛИ** не являются изделием медицинского назначения, не предназначены для использования в целях медицинской диагностики, для диагностических процедур, для профилактики и лечения заболеваний. По этим причинам наборы **ТАПОТИЛИ** не подлежат государственной регистрации на территории РФ (в том числе в Росздравнадзоре) в качестве медицинского изделия.
- Молекулярно-генетические исследования (МГИ) по установлению генотипов отдельных лиц, в том числе по идентификации личности и установлению спорного родства методом анализа полиморфных локусов генома человека не являются медицинской деятельностью: устанавливаются именно биологические факты (генотипы обследуемых лиц).
- Результаты МГИ мы рекомендуем оформлять в виде Заключения специалиста, отчёта о НИР и аналогичных документов, не являющихся медицинскими документами.
- Интерпретация медицинской значимости полученных данных и принятие клинического решения относится к компетенции врача.
- The *Tapotili Kit* is intended for molecular biology applications, including forensic or paternity usage. This product is not intended for the diagnosis, prevention, or treatment of a disease.

Референтные генотипы различных контрольных ДНК

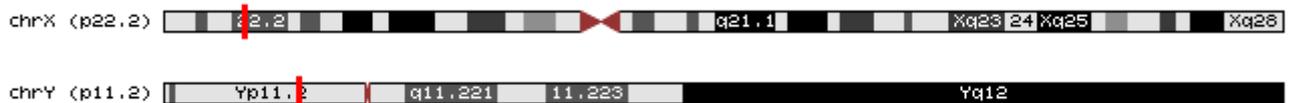
| K562 | 9947A | 9948 | L-68 | 007 | 2800M | CO | CP | Tap1 |
|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| X / X (жен) | X / X (жен) | X / Y (муж) | X / X (жен) | X / Y (муж) | X / Y (муж) | X / Y (муж) | X / X (жен) | X / Y (муж) |

Амелогенин

Амелогенин (Amelogenin, Amel) в настоящее время входит в число основных локусов (“core loci”) в национальных базах данных США (Combined DNA Index System, CODIS, 14 локусов), Великобритании (UK Core Loci, 11 локусов), Германии (German Core Loci, 9 локусов), а также в число дополнительных локусов международной базы данных Интерпола (8+1 локус) и Евросоюза (12 основных + 5 дополнительных локусов). Этот маркер включён в состав множества коммерческих мультилокусных наборов (производства “Applied Biosystems”, “Promega Corporation”, “Qiagen” – все США; ООО «Гордиз» - Россия).

Хромосомная локализация

По одной копии гена *амелогенина* локализовано как на X (*Xp22.2*, позиции амплифицируемой мишени 11 296 870 – 11 296 980), так и на Y хромосоме (*Yp11.2*, позиции амплифицируемой мишени 6 869 840 – 6 869 960):



По данным *BLAT*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (версия Dec. 2013, GRCh38/hg38).

Эти копии гена в высокой степени гомологичны между собой, однако в настоящее время большинством авторов считается, что хромосомы X и Y не рекомбинируют между собой в области локализации этих генов. Ген амелогенина экспрессируется только в тканях зубов, белок с аналогичным названием образует структурный матрикс зубной эмали. Сравнение последовательностей генов *AMGX* и *AMGY* выявляет наличие у них 19 областей абсолютного сходства длиной от 22 до 80 п.н. При этом в гене *AMGX* было обнаружено пять делеций размером от 1 до 6 п.н., и столько же делеций, размером от 1 до 183 п.н., было обнаружено в гене *AMGY* (Haas-Rochholz & Weiler, 1997).

Мутации в генах амелогенина могут приводить к развитию *amelogenesis imperfecta* – сцепленной с полом разновидностью гипоплазии, характеризующейся нарушениями в развитии зубной эмали, и этот ген используется для молекулярно-генетической диагностики данного заболевания (Collier et al., 1997).

Использование мишеней в гене амелогенина для эффективного установления половой принадлежности биологических следов человеческого происхождения впервые было предложено в Японии (Akane et al., 1991, 1992; Nakahori et al., 1991) и в дальнейшем модифицировано в Великобритании (Sullivan et al., 1993; Mannucci et al., 1994). В 1995 г. амелогениновый тест был внедрён в практику экспертных исследований на территории России на уровне методических рекомендаций ЭКЦ МВД РФ (Перепечина и Стегнова, 1995).

В настоящее время амелогениновый тест, используемый различными производителями наборов, основан на одной и той же мишени: **по сравнению с гомологичной последовательностью интрона гена *AmelY*, в гене *AmelX* делегированы шесть пар оснований мотива AAAGTG / САСТТТ**. В результате фрагменты, амплифицируемые с X и Y хромосом, отличаются друг от друга по длине на 6 п.н. (Sullivan et al, 1993).

Референтные нуклеотидные последовательности

| Доступ к GenBank | Дата публикации | Размер амплифицируемого фрагмента, п.н. |
|---------------------------|-----------------|---|
| M55418 | 06-MAR-1995 | 106 |
| M55419 | 06-MAR-1995 | 112 |
| NT_011896 | 12-MAR-2015 | 112 |

M55418: “Human amelogenin (AMELX) gene, 3' end of cds”, позиции 287-392.

M55419: “Human amelogenin (AMELY) gene, 3' end of cds”, позиции 287-398.

NT_011896: “Homo sapiens chromosome Y genomic scaffold, GRCh38.p2 Primary Assembly HSCHRY_CTG7”.

Условия ПЦР

Набор предназначен для амплификации в одной пробирке гомологичных фрагментов гена амелогенина человека, расположенных на X и Y хромосомах.

| Первая денатурация | 30 или 35 циклов (*) | Последний синтез цепи |
|--------------------|--|-----------------------|
| 96°C, 2 мин | 94°C, 20 сек 58°C (до 62°C), 20 сек 72°C, 20 сек | 72°C, 5 мин |

Внимание!

(*) Количество анализируемой ДНК должно быть не менее **5,0** нг на 25 мкл реакционной смеси. При использовании меньшего стартового количества ДНК производитель не гарантирует адекватную наработку специфических продуктов реакции при 30 циклах ПЦР. При работе с малыми количествами стартовой ДНК (менее 5,0 нг) число циклов ПЦР следует увеличить до 35.

Постановка *отрицательных контролей ПЦР* при установлении половой принадлежности исследуемых объектов строго обязательна.

Регистрация результатов

Для уверенной идентификации половой принадлежности разделение продуктов ПЦР следует проводить в неденатурирующих ПАГ (6-10%T, 5%С, длина геля не менее 10 см). После электрофореза в исследуемых образцах должны отчётливо выявляться следующие специфические полосы:

одна – для **женской** половой принадлежности (106 п.н., *AmelX*)

две – для **мужской** половой принадлежности (106 п.н. *AmelX* и 112 п.н. *AmelY*).

Для уверенной идентификации пол-специфических фрагментов в ПАГ дополнительно следует использовать соответствующую фрагментную «лестницу», содержащую два фрагмента, 106 и 112 п.н.

Состав набора и условия хранения компонентов

| Компонент | Условия хранения | Количество |
|---|--|---------------------------------------|
| Реакционные компоненты (хранить в зоне для постановки ПЦР) | | |
| Смарт 10X ПЦР-буфер (Smart 10X PCR Buffer) | -20°C | 1 пробирка (250 мкл) |
| 12,5X Смесь праймеров (12,5X Set of primers) | -20°C | 1 пробирка (200 мкл) |
| Контрольная ДНК (Control DNA) | -20°C (+4°C) | 1 пробирка (30 мкл) |
| Деионизованная вода (Deionized water) | При комнатной температуре (также допустимо при -20°C) | 1 пробирка (2,5 мл) |
| Вазелиновое масло (Paraffinic Oil) | При комнатной температуре | 1 флакон (при необходимости, 4 мл) |
| Пост-реакционные компоненты (хранить в электрофоретической зоне) | | |
| 6X Буфер для нанесения на гель (6X Loading Solution) | -20°C (+4°C) | 1 пробирка (500 мкл) |
| Высокомолекулярный стандарт ДНК (DNA Marker) | -20°C (+4°C) | 1 пробирка (на 30 постановок) |
| Фрагментная лестница Amelogenin (Fragment Ladder Amelogenin) | -20°C (+4°C) | 1 пробирка (на 50 постановок) |
| Дополнительные материалы | | |
| Инструкция по применению | При комнатной температуре | 1 (при необходимости) |

Ограничения амелогенинового теста

Сейчас уже хорошо известно, что в отдельных случаях результаты исследования локуса *амелогенина* оказываются некорректными: половая принадлежность биологического материала человеческого происхождения определяется неправильно, и в большинстве таких случаев – мужскому биологическому материалу приписывается женское происхождение. Этой проблеме посвящено большое количество работ, например: *Brinkmann, 2002; Cadenas et al., 2007; Ferreira, 2010; Jobling et al., 2007; Lattanzi et al., 2005; Ma et al., 2012; Mitchell et al., 2006; Tozzo et al., 2013.*

(1) В первую очередь это связано с тем, что у отдельных мужчин может быть делетирована та или иная область хромосомы Y, включая ген *AMELY* (полностью или частично). Такие делеции в каждом конкретном случае бывают различной протяжённости и достигают более 2 Mb, в то время как размер гена *AMELY* составляет всего 8 110 п.н. Эти протяжённые делеции никак не сказываются на фенотипических признаках таких мужчин. Если такие делеции затрагивают ген *AMELY* целиком или же только участки посадки одного из праймеров, то целевой продукт ПЦР с гена *AMELY* будет, естественно, отсутствовать. Поскольку целевой продукт ПЦР с гена *AMELX* будет детектирован, то это приведёт к ошибочному определению половой принадлежности как женской. В англоязычной литературе для таких мужчин широко используются термины *negative males, AMELY-negative males, null Y allele males, deleted-amelogenin males (DAMs)*. Конкретная локализация праймеров на мишени *AMELY* в случае достаточно протяжённых делеций становится уже неприципиальной.

(2) Пара праймеров *AmelX-106 / AmelY-112* была впервые предложена в работе *Sullivan et al. (1993)*, и с тех пор с незначительными модификациями получила наиболее широкое распространение в составе различных коммерческих наборов, в том числе, например, – в наборе *PowerPlex16 System* (“Promega Corporation”, США). Праймеры специфичны к последовательности первого интрона гена *AMEL*, и эти же праймеры (в том числе модифицированные) используются в настоящее время в наборах *ТАПОТИЛИ*.

По всей видимости, первой работой, в которой для этой пары праймеров был показан феномен *AMELY-отрицательных мужчин*, является работа *Santos et al., 1998*. В последующих работах разных авторов описывались достаточно многочисленные случаи выявления *AMELY-отрицательных мужчин*, проводилось делеционное картирование Y хромосомы, предлагались различные альтернативные пары праймеров на мишень *AMELY*.

Анализ имеющихся литературных данных позволяет сделать вывод о том, что частота затрагивающих ген *AMELY* делеций весьма различна в разных популяциях. Данные российских исследователей о некорректности амелогенинового теста в отдельных случаях также есть, но представлены они весьма отрывочно (преимущественно – в сети Интернет, неопубликованные данные).

(3) Следует отметить, что для праймеров *AmelXY*, использовавшихся в коммерческих наборах *AmpFLSTR® Profiler Plus™ PCR amplification kit* (производства “Perkin-Elmer Applied Biosystems”, США), был описан более редкий и менее критичный феномен *AMELX-отрицательных мужчин* (*Shewale et al., 2000*). То есть у фенотипически нормальных мужчин амплифицировался только один специфический фрагмент, *AmelY*. Было показано, что при использовании другого коммерческого набора с другими *AmelXY* праймерами (*GenePrint™ Sex Identification System–Amelogenin*, производства “Promega Corporation”, США) эта проблема снималась.

Впоследствии аналогичный случай *AMELX-отрицательного мужчины* был подробно проанализирован в работе *Shadrach et al., 2004*. Было показано, что эта проблема обусловлена мутацией в области посадки одного из праймеров на гене *AMELX* и успешно решается при использовании модифицированного праймера или же вообще другой пары праймеров. Следует отметить, что в этом исследовании некорректный результат был получен с использованием именно набора *GenePrint PowerPlex 16* (производства “Promega Corporation”, США; пара праймеров *AmelX-106 / AmelY-112*).

(4) Отдельным «узким местом» амелогенинового теста является то, что он не является строго видоспецифичным для человека. И это показано не только на приматах (шимпанзе, горилла, макаки), но и на некоторых весьма отдалённых от человека видах домашних и диких животных (*Земскова и др., 2003; Buel et al., 1995; Jaran & Yasin, 2006; Morikawa et al., 2011*).

Корректное определение половой принадлежности: возможные решения

Ещё в 2002 году вопрос был поставлен весьма жёстко: является ли амелогениновый тест вообще пригодным для установления половой принадлежности человека (*Brinkmann, 2002*)? В настоящее время ответ видится следующим: этот тест в целом прост, удобен, нагляден и, как следствие, пригоден. Но с учётом описанных ограничений метода.

Поэтому для биологических следов человеческого происхождения при установлении женского пола (а также при существенном количественном дисбалансе целевых продуктов ПЦР с генов *AMELX* и *AMELY*) рекомендуется контролировать результаты амелогенинового теста исследованием дополнительных маркёров. И такой подход не зависит от того, какая именно пара праймеров (или коммерческий набор) используется для собственно амелогенинового теста.

Как одно из первых практических воплощений тест-системы для более корректного определения половой принадлежности, в 2012 г. на рынок был выпущен коммерческий набор *GlobalFiler™ Express PCR Amplification Kit* (производства “*Applied Biosystems*”, США). Этот набор предназначен для генотипирования 21 аутосомного локуса; при этом корректность используемого амелогенинового теста контролируется исследованием двух дополнительных локусов, расположенных на хромосоме Y – *DYS391* (хромосомная локализация *Yq11*) и некоего *Y-indel*. Производитель поскромничал (или поскрытничал), поскольку из описания к набору (Rev. A, October 2012) непонятно, что это за *Y-indel*. Наиболее вероятно, что это двухаллельный маркёр *M175* ([rs2032678](#)), локализованный также в области *Yq11* (*Butler, 2013; van Oven et al., 2012*).

Основной конкурент, “*Promega Corporation*” (США), в том же 2012 г. выпустила на рынок свой коммерческий набор, *PowerPlex® Fusion System*, в котором для определения половой принадлежности задействованы *AMEL + DYS391*. В 2014 г. он был допилен до *PowerPlex® Fusion 6C System*, в котором задействованы уже четыре маркёра: *AMEL, DYS391, DYS570* и *DYS576*.

Простой формат подстраховки амелогенинового теста был предложен в 2013 году группой итальянских исследователей (*Tozzo et al., 2013*). Они предложили достаточно эффективную дуплексную ПЦР (*Amel + SRY*) в формате детекции продуктов ПЦР в ПАГ с последующей окраской гелей бромистым этидием. Дополнительная целевая мишень *SRY* находится в коротком однокопийном одноимённом гене *SRY* (*sex determining region*, размером 887 п.н.), который состоит всего из одного экзона, имеет консервативную структуру и локализован в области *Yp11.31* (дистальнее относительно гена *AMELY*).

Мишень *SRY* задействована и в несколько более сложной системе из четырёх маркёров, которая была предложена японскими авторами: {*SRYa + SRYb + STS + Amel*} (*Morikawa et al., 2011*).

В целом, описанные выше форматы тест-систем для более корректного установления половой принадлежности (*Amel +* дополнительные мишени на Y хромосоме) не являются исчерпывающими и окончательными.

Мы также предлагаем свои решения в моноплексном формате наборов. В условиях проведения дополнительных к амелогениновому тесту исследований в этом формате выбор конкретных локусов (и собственно их числа) вовсе не является критичным. Можно вообще отказаться от амелогенинового теста: это будет передово, но многие соратники этого пока не поймут...

(1) В амелогениновом тесте 106/112 возможно использование дополнительного компенсирующего праймера на *del-amelX* (*AMELX-отрицательные мужчины*).

(2) Дополнительно к амелогениновому тесту возможно исследование отдельных микросателлитных локусов, расположенных на Y хромосоме человека. При этом следует учитывать, что маркёры *DYS390, DYS391, DYS392, DYS438, DYS439, Y-GATA-H4* расположены в области *Yq11*, то есть на другом плече Y хромосомы по сравнению с *AMELY*, на расстоянии **7,3-12 Mb** от него. А маркёры *DYS393, DYS456, DYS458* имеют хромосомную локализацию такую же, как *AMELY: Yp11*, но находятся от него на расстоянии **1,1-3,6 Mb**.

(3) Вместо амелогенинового теста возможно исследование других локусов, ориентированных именно на установление половой принадлежности. Часть таких локусов характеризуются ниже, в соответствующих разделах.

DXZ1 / DYZ3

Набор предназначен для амплификации в раздельных пробирках по общей программе ПЦР фрагментов локусов *DXZ1* и *DYZ3* человека, расположенных на X и Y хромосомах. Также возможно использование только одного из этих локусов: пары праймеров *DXZ1* или *DYZ3* для верификации результатов амелогенинового теста в сомнительных случаях.

Локусы *DXZ1* и *DYZ3* относятся к семейству альфоидной ДНК. Мультикопийные альфоидные повторы *DXZ1*, *DYZ1*, *DYZ2*, *DYZ3*, *DYZ4*, *DYZ5* широко распространены в ДНК половых хромосом, при этом нумерация локусов *DYZ* соответствует уменьшению числа копий этих локусов на хромосоме.

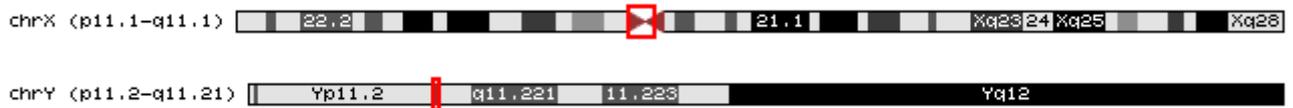
В 1989 г. был предложен быстрый и эффективный метод установления пола человека путем амплификации фрагментов последовательностей альфа-сателлитной ДНК длиной 130 п.н. на X-хромосоме и 170 п.н. на Y-хромосоме (*Witt & Erickson, 1989*). Впоследствии этот метод был усовершенствован и валидирован на образцах различного биологического происхождения, в том числе на древних костных останках (*Овчинников и др., 1993; Akane et al., 1991; Gavrilov et al., 1991; Lin et al., 1995; Norby & Eriksen, 1992; Tsuchimochi et al., 2002*).

В 2014 г. была предложена эффективная тест-система для определения пола человека при идентификации личности на основе мишени в локусе *DYZ1* с использованием технологических платформ пиросеквенирования и ПЦР-РВ (*Fazi et al., 2014*).

Уместно отметить, что с локусом *DXZ1* (хромосомная локализация *Xcen*) может рекомбинировать как локус *DYZ1* (хромосомная локализация *Yq*, около 3000-4000 копий на Y-хромосоме), так и локус *DYZ3* (хромосомная локализация *Ycen*, около 50-100 копий на Y-хромосоме) (*Shiono, 1996*).

Хромосомная локализация

Множественные копии локусов *DXZ1* и *DYZ3* локализованы на X (*Xp11.1-q11.1*, позиции амплифицируемой мишени 58 534 850 – 62 503 400 ≈ 4 млн п.н.) и Y хромосомах (*Yp11.2-q11.21*, позиции амплифицируемой мишени 10 250 850 – 10 621 300 ≈ 371 т.п.н.), соответственно:



По данным *BLAT*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (версия Dec. 2013, GRCh38/hg38).

Расстояние между *AmelY* и *DYZ3* составляет не менее 3 млн оснований, при этом ген *AmelY* расположен дистальнее.

Условия ПЦР

| Первая денатурация | 30 или 35 циклов (*) | Последний синтез цепи |
|--------------------|----------------------|-----------------------|
| 96°C, 2 мин | 94°C, 20 сек | 72°C, 5 мин |
| | 58°C, 20 сек | |
| | 72°C, 20 сек | |

Внимание!

(*) Количество анализируемой ДНК должно быть не менее **100 пикограмм** на 25 мкл реакционной смеси и 30 циклов ПЦР. Указанный нижний порог детекции определен по результатам титрования стандартного положительного контроля ДНК 007 (производства *Applied Biosystems*, США). Этот порог (100 pg) критичен для пары праймеров *DYZ3*, а для пары праймеров *DXZ1* порог детекции ниже.

При использовании меньшего стартового количества ДНК производитель не гарантирует адекватную наработку специфических продуктов реакции при 30 циклах ПЦР. При работе с малыми количествами стартовой ДНК (менее **0,1** нг) число циклов ПЦР следует увеличить до **35**.

Постановка *отрицательных контролей ПЦР* при установлении половой принадлежности исследуемых объектов строго обязательна.

Регистрация результатов

Для быстрого определения половой принадлежности разделение продуктов ПЦР допустимо проводить в 1,5-2%-ных агарозных гелях (длина геля 5-10 см). Для каждого исследуемого образца в «полном» формате исследования используются две дорожки в геле. После электрофореза должны выявляться следующие специфические фрагменты ДНК:

- **130** (или 129) п.н. – для праймеров *DXZI*, для любой половой принадлежности;
- **172** п.н. – для праймеров *DYZ3*, только для мужской половой принадлежности.

Пример электрофореграммы для локусов *AMGX/AMGY* в сравнении с *DXZI/DYZ3* изображён на рисунке ниже (фрагмент неденатурирующего ПАГ 10%Т, 5%С).



Дорожка 2 – высокомолекулярный стандарт ДНК *pBR322/MspI*: видны фрагменты размером 201, 190, 180, 160, **147**, 122 и 110 п.н. (сверху вниз, часть из них подписана слева).

Дорожки 1 и 3 – амелогениновый тест. Дорожка 1 – фрагменты *AMGX+AMGY* (106+112 п.н., мужской пол), дорожка 3 – фрагмент только *AMGX* (106 п.н., женский пол).

Дорожки 4 и 5 – тест *DXZI/DYZ3*, исследуемый образец **мужской** половой принадлежности. Дорожка 4 – фрагмент *DXZI* (130 п.н.), дорожка 5 – фрагмент *DYZ3* (172 п.н.).

Референтные нуклеотидные последовательности

| Доступ к GenBank | Дата публикации | Размер амплифицируемого фрагмента, п.н. |
|--------------------------|-----------------|---|
| X66290 | 07-JUL-1992 | 130 |
| AF522078 | 03-FEB-2003 | 172 |

X66290: “*H. sapiens* (HX1012) alphoid repetitive DNA”, позиции 1180-1320.

AF522078: “*Homo sapiens* alphoid repeat sequence”, позиции 5610-5790.

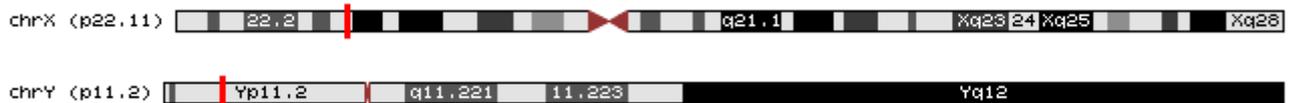
ZFX / ZFY

С 10-2021 г. поддержка локусов *ZFX* / *ZFY* в наборах *ТАПОТИЛИ* прекращена. Информация на сайте и в описании сохраняется в качестве справочной.

Однокопийные гомологичные гены *ZFX* и *ZFY* (*Zinc finger protein, белок цинковых пальцев X и Y*) являются универсальным транскрипционным фактором. В 1990 была показана возможность использования этих генов для видоспецифичного определения пола у человека и ряда домашних животных (*Aasen & Medrano, 1990*). В более поздних работах возможности этого теста для установления половой принадлежности следов человеческого происхождения были охарактеризованы более подробно (*Овчинников и др., 1993; Norby & Eriksen, 1992; Reynolds & Varlaro, 1996; Stacks & Witte, 1996*). В 2005 г. мишень в гене *ZFY* была использована отечественными авторами для неинвазивной пренатальной ПЦР диагностики пола (Федченко и др., 2005).

Хромосомная локализация

По одной копии генов *ZFX* и *ZFY* локализовано на X (*Xp22.11*, позиции амплифицируемой мишени 24 210 210 – 24 211 350) и на Y хромосоме (*Yp11.2*, позиции амплифицируемой мишени 2 978 830 – 2 979 970):



По данным *BLAT*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (версия Dec. 2013, GRCh38/hg38).

Таким образом, расстояние между генами *AmelX* и *ZFX* составляет около 13 млн оснований, а между генами *AmelY* и *ZFY* – около 4 млн оснований. При этом ген *AmelY* расположен проксимальнее (ближе к центромере), нежели ген *ZFY*.

Референтные нуклеотидные последовательности

| Доступ к GenBank | Дата публикации | Размер амплифицируемого фрагмента, п.н. |
|---------------------------|-----------------|---|
| NC_000023 | 13-AUG-2013 | 1 131 |
| NC_000024 | 13-AUG-2013 | 1 131 |
| NT_167197 | 13-AUG-2013 | 1 131 |
| NT_011896 | 13-AUG-2013 | 1 131 |

NC_000023: “Homo sapiens chromosome X, GRCh37.p13 Primary Assembly”.

NC_000024: “Homo sapiens chromosome Y, GRCh37.p13 Primary Assembly”.

NT_167197: “Homo sapiens chromosome X genomic contig, GRCh37.p13 Primary Assembly”.

NT_011896: “Homo sapiens chromosome Y genomic contig, GRCh37.p13 Primary Assembly”.

Результаты выравнивания референтных последовательностей *NT_011896* и *NT_167197* по амплифицируемому участку (экзонная область) свидетельствуют о том, что эти последовательности идентичны на 95,0%, и все отличия между ними являются точечными заменами.

Условия ПЦР

Набор предназначен для амплификации в одной пробирке гомологичных фрагментов генов *ZFX* и *ZFY* человека, расположенных на X и Y хромосомах.

| Первая денатурация | 30 или 35 циклов (*) | Последний синтез цепи |
|--------------------|--|-----------------------|
| 96°C, 2 мин | 94°C, 20 сек 58°C (до 60°C), 20 сек 72°C, 20 сек | 72°C, 5 мин |

Внимание!

(*) Количество анализируемой ДНК должно быть не менее **5,0** нг на 25 мкл реакционной смеси. При использовании меньшего стартового количества ДНК производитель не гарантирует адекватную наработку специфических продуктов реакции при 30 циклах ПЦР. При работе с малыми количествами стартовой ДНК (менее 5,0 нг) число циклов ПЦР следует увеличить до 35.

Постановка *отрицательных контролей ПЦР* при установлении половой принадлежности исследуемых объектов строго обязательна.

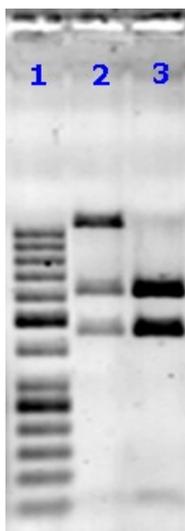
Регистрация результатов

Для проверки эффективности ПЦР следует наносить по 5 мкл пост-реакционных смесей на дорожки в агарозном геле. После ПЦР для **всех исследуемых образцов** человеческого происхождения на электрофорезе должен выявляться целевой продукт реакции размером 1 131 п.н.

Определение половой принадлежности исследуемых объектов на следующем этапе может проводиться как прямым секвенированием продуктов ПЦР, так и методом ПДРФ. Метод ПДРФ подразумевает возможность использования нескольких различных рестриктаз. Однако прямое секвенирование по Сэнгеру является более предпочтительным методом.

При использовании метода ПДРФ проводится расщепление продуктов ПЦР с использованием *рестриктазы TaqI* в суммарном объеме 20 мкл в течение 90 минут при 65°C.

Для идентификации половой принадлежности исследуемых образцов разделение продуктов рестрикции допустимо проводить в 1,5-2,0% агарозных гелях. После электрофореза в исследуемых образцах должны отчетливо выявляться разные наборы пол-специфичных фрагментов, как это изображено на рисунке ниже.



Электрофорез проводился в 1,5%-ном агарозном геле в горизонтальной камере с буфером *1X TBE* с последующей окраской бромистым этидием.

Дорожка 1 – высокомолекулярный стандарт ДНК *GeneRuler™ 50bp DNA Ladder* («Fermentas», Литовская Республика): видны фрагменты размером 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100 и 50 п.н. (сверху вниз).

Дорожка 2 – образец **мужской** половой принадлежности, видны **четыре** специфических фрагмента ДНК: размером 1082, 621, 461 и **49** п.н. (*ZFX / ZFY*).

Дорожка 3 – образец **женской** половой принадлежности, видны **три** специфических фрагмента ДНК: размером 621, 461 и **49** п.н. (только *ZFX*).

(*) короткие фрагменты ДНК размером 49 п.н. в обоих исследованных образцах видны достаточно слабо.

Ссылки

- Благодатских Е.Г., Никитин А.Г., Серёгин Ю.А., Благодатских К.А., Носиков В.В. (2010) Маркер DYS14 и определение пола по биологическим образцам. – Молекулярная биология, 44 (4), 646–649. PMID: [20873223](#).
- Земскова Е.Ю., Фролова С.А., Слепцова Ж.В., Иванов П.Л. (2003) Изучение видовой специфичности амелогениновой системы установления генетического пола. – Судебно-медицинская экспертиза, 46 (4), 19-22. PMID: [12939838](#).
- Овчинников И.В., Савельев Ю.И., Калашников А.В., Челнокова М.В., Носиков В.В., Дебабов В.Г. (1993) Определение половой принадлежности вещественных доказательств биологического происхождения методом ферментативной амплификации ДНК. – Судебно-медицинская экспертиза, 36 (1), 30-31. PMID: [8036634](#).
- Перепечина И.О., Стегнова Т.В. (1995) Установление половой принадлежности крови полимеразной цепной реакцией. – Методические рекомендации. Москва, ЭКЦ МВД РФ.
- Федченко В.И., Гурьев С.О., Семенова Н.В. (2005) Неинвазивная пренатальная ПЦР диагностика пола. – Биомедицинская химия, 51 (5), 527-535. PMID: [16342670](#).
- Aasen E., Medrano J.F. (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. – Biotechnology (NY), 8 (12), 1279-1281. PMID: [1369448](#).
- Akane A., Seki S., Shiono H., Nakamura H., Hasegawa M., Kagawa M., Matsubara K., Nakahori Y., Nagafuchi S., Nakagome Y. (1992) Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. – Forensic Sci Int., 52 (2), 143-148. PMID: [1601346](#).
- Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., Seki S., Nagafuchi S., Yamada M., Nakagome Y. (1991) Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods. – Forensic Sci Int., 49 (1), 81-88. PMID: [2032670](#).
- Brinkmann B. (2002) Is the amelogenin sex test valid? – Int J Legal Med., 116 (2), 63. PMID: [12056521](#).
- Buel E., Wang G., Schwartz M. (1995) PCR amplification of animal DNA with human X-Y amelogenin primers used in gender determination. – J Forensic Sci., 40 (4), 641-644. PMID: [7595303](#).
- Butler J.M. (2013) New autosomal and Y-STR loci and kits: making data driven decisions. – ISHI Workshop on New Loci and Kits, October 10, 2013 (Atlanta, GA). <http://www.cstl.nist.gov/strbase/training/ISHI2013-Intro-Butler.pdf>
- Cadenas A.M., Regueiro M., Gayden T., Singh N., Zhivotovsky L.A., Underhill P.A., Herrera R.J. (2007) Male amelogenin dropouts: phylogenetic context, origins and implications. – Forensic Sci Int., 166 (2-3), 155-163. PMID: [16781100](#).
- Collier P.M., Sauk J.J., Rosenbloom S.J., Yuan Z.A., Gibson C.W. (1997) An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. – Arch Oral Biol., 42 (3), 235-242. PMID: [9188994](#).
- Fazi A., Gobeski B., Foran D. (2014) Development of two highly sensitive forensic sex determination assays based on human DYZ1 and Alu repetitive DNA elements. – Electrophoresis, 35 (21-22), 3028-3035. PMID: [25168471](#).
- Ferreira I. (2010) Sequence variation of the amelogenin gene on the Y-chromosome. – Thesis Ph.D. (Biochemistry), North-West University, Potchefstroom Campus; <http://hdl.handle.net/10394/4412>
- Gavrilo D.K., Ovchinnikov I.V., Chelnokova M.V., Nosikov V.V. (1991) The uses of synthetic oligonucleotide primers for prenatal diagnosis of sex in chorionic villi via the polymerase chain reaction. – Nucleic Acids Symposium Series, 24, 257. PMID: [1841323](#).
- Haas-Rochholz H., Weiler G. (1997) Additional primer sets for an amelogenin gene PCR-based DNA-sex test. – Int J Legal Med., 110 (6), 312-315. PMID: [9387013](#).
- Jaran A., Yasin S. (2006) Species specificity using fifteen PCR-based human STR systems. – Journal of Biological Sciences, 6 (1), 200-201.
- Jobling M.A., Lo I.C., Turner D.J., Bowden G.R., Lee A.C., Xue Y., Carvalho-Silva D., Hurles M.E., Adams S.M., Chang Y.M., Kraaijenbrink T., Henke J., Guanti G., McKeown B., van Oorschot R.A., Mitchell R.J., de Knijff P., Tyler-Smith C., Parkin E.J. (2007) Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. – Hum Mol Genet., 16 (3), 307-316. PMID: [17189292](#).
- Lattanzi W., Di Giacomo M.C., Lenato G.M., Chimienti G., Voglino G., Resta N., Pepe G., Guanti G. (2005) A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. – Hum Genet., 116 (5), 395-401. PMID: [15726419](#).

- Lin Z., Kondo T., Minamino T., Ohtsuji M., Nishigami J., Takayasu T., Sun R., Ohshima T. (1995) Sex determination by polymerase chain reaction on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912. – *Forensic Sci Int.*, 75 (2-3), 197-205. PMID: [8586344](#). **Comment in:** Ohshima T. (2005) Addendum to our previous article "Sex determination by polymerase chain reaction on mummies discovered at Taklamakan desert in 1912" [Z. Lin et al., *Forensic Sci Int.* 75 (1995) 197-205]. – *Forensic Sci Int.*, 148 (1), 83. PMID: [15607596](#).
- Ma Y., Kuang J.Z., Zhang J., Wang G.M., Wang Y.J., Jin W.M., Hou Y.P. (2012) Y chromosome interstitial deletion induced Y-STR allele dropout in AMELY-negative individuals. – *Int J Legal Med.*, 126 (5), 713-724. PMID: [22669323](#).
- Mannucci A., Sullivan H.M., Ivanov P.L., Gill P. (1994) Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. – *Int J Leg Med.*, 106 (4), 190-193. PMID: [8038111](#).
- Mitchell R.J., Kreskas M., Baxter E., Buffalino L., Van Oorschot R.A. (2006) An investigation of sequence deletions of amelogenin (AMELY), a Y-chromosome locus commonly used for gender determination. – *Ann Hum Biol.*, 33 (2), 227-240. PMID: [16684695](#).
- Morikawa T., Yamamoto Y., Miyaishi S. (2011) A new method for sex determination based on detection of SRY, STS and amelogenin gene regions with simultaneous amplification of their homologous sequences by a multiplex PCR. – *Acta Med Okayama*, 65 (2), 113-122. PMID: [21519369](#).
- Nakahori Y., Takenaka O., Nakagome Y. (1991) A human X-Y homologous region encodes 'amelogenin'. – *Genomics*, 9 (2), 264-269. PMID: [2004775](#).
- Norby S., Eriksen B. (1992) Sex identification of forensic samples using PCR analysis for the presence of Y-chromosome specific DNA sequences. – *Advances in Forensic Haemogenetics* (4). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1992.
- van Oven M., van den Tempel N., Kayser M. (2012) A multiplex SNP assay for the dissection of human Y-chromosome haplogroup O representing the major paternal lineage in East and Southeast Asia. – *J Hum Genet.*, 57 (1), 65-69. PMID: [22048658](#).
- Pouchkarev V.P., Shved E.F., Novikov P.I. (1998) Sex determination of forensic samples by polymerase chain reaction of the amelogenin gene and analysis by capillary electrophoresis with polymer matrix. – *Electrophoresis*, 19 (1), 76-79. PMID: [9511866](#).
- Reynolds R., Varlaro J. (1996) Gender determination of forensic samples using PCR amplification of ZFX/ZFY gene sequences. – *J Forensic Sci.*, 41 (2), 279-286. PMID: [8871388](#).
- Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C. (1998) Reliability of DNA-based sex tests. – *Nat Genet.*, 18 (2), 103. PMID: [9462733](#).
- Sex Determination in Mouse and Man (1988). – Proceedings of a Royal Society discussion meeting held on 9 and 10 March 1988. Edited by Anne McLaren and M. A. Ferguson-Smith. London, The Royal Society.
- Shadrach B., Commene M., Hren C., Warshawsky I. (2004) A rare mutation in the primer binding region of the amelogenin gene can interfere with gender identification. – *J Mol Diagn.*, 6 (4), 401-405. PMID: [15507681](#).
- Shewale J.G., Richey S.L., Sinha S. K. (2000) Anomalous amplification of the amelogenin locus typed by AmpFISTR Profiler Plus amplification kit. – *Forensic Science Communications*, 2 (4). <http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/oct2000/index.htm/shewale.htm>
- Shiono H. (1996) Personal identification using DNA polymorphism--the identification of forensic biological materials. – *Nihon Hoigaku Zasshi*, 50 (5), 320-330. PMID: [8952331](#).
- Stacks B., Witte M.M. (1996) Sex determination of dried blood stains using the polymerase chain reaction (PCR) with homologous X-Y primers of the zinc finger protein gene. – *J Forensic Sci.*, 41 (2), 287-290. PMID: [8871389](#).
- Sullivan K.M., Mannucci A., Kimpton C.P., Gill P. (1993) A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. – *BioTechniques*, 15 (4), 636-641. PMID: [8251166](#).
- Tozzo P., Giuliodori A., Corato S., Ponzano E., Rodriguez D., Caenazzo L. (2013) Deletion of amelogenin Y-locus in forensics: literature revision and description of a novel method for sex confirmation. – *J. Forensic Leg Med.*, 20 (5), 387-391. PMID: [23756502](#).
- Tsuchimochi T., Iwasa M., Maeno Y., Koyama H., Inoue H., Isobe I., Matoba R., Yokoi M., Nagao M. (2002) Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. – *Am J Forensic Med Pathol.*, 23 (3), 268-271. PMID: [12198355](#).
- Wayne J.S., Willard H.F. (1985) Chromosome-specific alpha satellite DNA: nucleotide sequence analysis of the 2.0 kilobasepair repeat from the human X chromosome. – *Nucleic Acids Res.*, 13 (8), 2731-2743. PMID: [2987865](#).

- Witt M., Erickson R.P. (1989) A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction. – Hum Genet., 82 (3), 271-274. PMID: [2567276](#). Erratum in: Hum Genet., 1991, 86 (5), 540, PMID: [2016097](#).
- Wolfe J., Darling S.M., Erickson R.P., Craig I.W., Buckle V.J., Rigby P.W., Willard H.F., Goodfellow P.N. (1985) Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome. – J Mol Biol., 182 (4), 477-485. PMID: [4040175](#).

Техническое содействие / информация

Благодарим Вас за то, что Вы предпочли нашу продукцию и будем рады продолжить сотрудничество.

Дополнительная информация о других наборах **Тапотили** (полная инструкция) доступна по ссылке:

<https://tapotili.ru/doc/tapotili.pdf>.

Актуальная версия непосредственно этого описания доступна здесь:

https://tapotili.ru/doc/gender_loci.pdf.

Адресуйте все вопросы, предложения, а также возможные рекламации:

Интернет: <https://www.tapotili.ru/>

Электронная почта: info@tapotili.ru

Моб. тел.: +7-903-786-4-789.

Ефремов Илья Алексеевич, кандидат биологических наук