Институт Биоорганической Химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)
Московская гимназия на Юго–Западе №1543

Применение полиморфных Alu–инсерций для идентификации личности

Гладкова София
Гусева Екатерина

Научные руководители:
д.б.н. Лебедев Ю. Б.
к.х.н. Комков А. Ю.

Москва
2015

Оглавление:

1. Список сокращений.....3
2. Введение.....4
    1. Обзор литературы.....5
    2. Материалы и методы ……..8
    3. Результаты и обсуждение.....11
3. Выводы.....18
4. Благодарности.....18
5. Список цитируемой литературы.....19
6. Приложения.....20

Список сокращений:

Indel – Insertions and Deletions – инсерционно–делеционный полиморфизм или тип мутации

LINE – Long Interspersed Nuclear Elements – длинные диспергированные повторы

SINE– Short Interspersed Nuclear Elements – короткие диспергированные повторы

SNP – Single Nucleotide Polymorphism – имеющие заметную частоту в популяции полиморфные мутации, возникающие при однонуклеотидных заменах

STR – Short Tandem Repeats – короткие тандемные повторы, тип повторяющихся элементов генома

МГМ – молекулярно–генетический маркер

МЭ – мобильные элементы

п. о. – пар оснований

ПЦР– полимеразная цепная реакция

т. п. о. – тысяч пар оснований

ЦФ – центрифугирование

Введение

Одно из крупнейших направлений современной генетики – изучение структурной и функциональной вариабельности генома человека. Огромный импульс к развитию этих исследований дали завершение международного проекта Геном Человека и появление новейших методов секвенирования ДНК. Определение генетических особенностей индивидов и различных групп людей имеет важное теоретическое значение и широкое практическое применение. Так, например, сравнение генетической структуры отдельных народностей позволяет реконструировать историю формирования и расселения крупных этносов. Медико-генетические исследования пациентов с определенными заболеваниями позволяют выявить спектр аллелей, являющихся факторами риска или генетической предрасположенности.

Сейчас можно выявлять различия структуры генома разных людей прямым секвенированием образцов индивидуальной ДНК. Однако такой подход остается крайне дорогостоящим и трудоемким. Поэтому для массовых исследований чаще используют наборы молекулярно-генетических маркеров (МГМ), позволяющие выяснить первичную структуру ДНК серии вариабельных участков генома у каждого человека из обследуемой группы.

Полиморфные инсерции Alu ретроэлементов относятся к indel типу маркеров. Их общее количество в геноме человека оценивается в 1,5-2 тысячи копий, расположенных в разных участках всех хромосом человека

Мы поставили своей <u>целью</u> изучение генетической вариабельности и индивидуальных особенностей генома ограниченной выборки здоровых доноров, включающей монозиготных близнецов.

Для достижения представленной цели мы выделили следующие <u>задачи:</u>

1) Освоение метода проведения геномной PCR
2) Проведение серийных PCR с использованием индивидуальных геномных ДНК ограниченной выборки здоровых доноров, включающей две пары монозиготных близнецов;
3) Реконструкция их генетических паспортов по Alu–инсерциям;
4) Сравнение друг с другом генетических паспортов близнецов и генетических паспортов людей, не состоящих в родственных отношениях.

Обзор литературы

Молекулярно–генетический маркер (МГМ) – это фрагмент ДНК с известной структурой (нуклеотидной последовательностью) и известным положением в геноме. По структуре маркеры могут быть одинаковые у всех людей, а могут у разных индивидов присутствовать в разных вариантах. В таких случаях они называются полиморфными. МГМ – надежный способ генетической идентификации личности, применяемый, например, в криминалистике [9], где широко применяются методы, основанные на использовании полиморфных STR (short tandem repeat). К настоящему времени на основе STR человеческого генома созданы многочисленные и разнообразные мультиаллельные полиморфные маркеры, которые намного более информативны, чем обычные биаллельные МГМ.

Другим типом маркеров могут являться, например, различные виды инсерций. Инсерции – тип мутации, при котором происходит встраивание одного или несколько нуклеотидов. Противоположным типом мутации являются делеции (выпадение одного или нескольких нуклеотидов). Общее название для таких изменений генома – indels (от англ. Insertions and Deletions). Возникновение инсерций происходит во время репликации нуклеотидов из–за выпетливания праймера[9]. Indels возникают с повышенной частотой в той части генома, где последовательности содержат повторяющиеся нуклеотиды[1].

Мобильные элементы являются особым типом indels и делятся на три типа: ретроэлементы SINE (short interspersed nuclear elements), LINE (long interspersed nuclear elements) и LTR (long terminal repeats).

Alu–ретроэлементы являются самым большим семейством среди генетических МЭ. Сами МЭ составляют примерно 45% человеческого генома, и примерно 10% генома приходится на Alu– инсерции[8].

Детальный анализ структуры РНК Alu–ретроэлемента показал, что предшественником Alu был ген 7SL РНК, продукт которого образует часть рибосомального комплекса 13[8].

Семейство Alu–повторов, встречающееся только у приматов, относится к группе SINE. За последние 65 млн лет Alu–ретроэлементы внедрились в геномы приматов в количестве более чем миллиона копий [7]. Только около 2000 Alu–инсерций специфичны для человеческого генома и не могут быть найдены, например, в гомологичных локусах геномов шимпанзе или гориллы. Таким образом, 99.8% Alu человека могут быть обнаружены в тех же локусах у широконосых и узконосых обезьян, а 85% – у всех приматов[7]. Эволюционно «молодые» подсемейства Alu включают примерно 2.000 Alu–повторов, которые внедрились в человеческий геном в течение 4–6 млн лет после того, как эволюционные ветви человека и других африканских приматов дивергировали[8]. Они относятся к подсемействам Alu Y, Ya5, Ya8 и Yb8. Наиболее распространенными Alu-повторами в геноме человека являются представители Ya5 и Yb8 подсемейств, в то время как человек-специфические инсерции из подсемейства Y достаточно редки [7].

Alu–инсерции удобны для изучения генома, так как их появление не связано с ошибками ДНК–полимераз при репликации, на основании чего можно утверждать, что этот маркер является устойчивым. Кроме того, не существует клеточных механизмов для специфического вырезания Alu-последовательностей с восстановлением того участка ДНК, который существовал до появления Alu–повтора. Стоит также отметить, что для Alu

крайне низка вероятность возвратных мутаций, в то время как для других МГМ, например, STR, она достаточно высока[5].

В среднем длина Alu составляет примерно 300 п. о.(длина SINE колеблется в пределах 90–400 п. о., а длина LINE достигает 7000 п. о.).[1]

Каждый Alu–повтор состоит из двух гомологичных доменов, соединенных АТ-богатым «спейсером» длиной 31 нуклеотид. Длина Alu–инсерций зависит от длины полиаденилированного конца. 5'-концевой домен содержит внутренний промотор для РНК–полимеразы III. Последовательность Alu–ретроэлементов не содержит сигнал терминации транскрипции, поэтому продукт транскрипции может включать фланкирующую геномную последовательность[7]. Alu последовательности не имеют открытой рамки считывания, поэтому необходимые для амплификации белковые факторы им предоставляют транскрипционно активные LINE1 элементы [8].

В случае неудачного места встраивания Alu–ретроэлементы могут вызывать у человека различные заболевания [9]. Они являются причиной 0.1% генетических заболеваний человека, в том числе некоторых видов рака[7]. Таким образом, после дальнейшего изучения функционального влияния инсерций Alu, область их применения может быть значительно расширена.

Некоторые из известных примеров взаимосвязей инсерций Alu элементов с возникновением патологий представлены в таблице (табл. 1)

Табл.1. Примеры болезней, развитие которых связано с рекомбинациями с участием Alu или de novo инсерциями Alu элементов[7].

Мутируемый локус	Принадлежность встроенной копии к подсемейству Alu	Заболевание
CaR	Ya4	наследственная гипокальциурическая гиперкальциемия и острый гиперпаратиреоз
Mlvi–2	Ya5	Лейкемия
NF1	Ya5	нейрофиброматоз
PROGINS	Ya5	карцинома яичников
IL2RG	Ya5	Х–сцепленный тяжёлый комбинированный иммунодефицит

ACE	Ya5	повышенный риск развития сердечно-сосудистых заболеваний
Фактор свертывания крови IX	Ya5	Гемофилия
EYA1	Ya5	бранхио–ото–ренальный синдром
2 x FGFR2	Ya5 и Yb8	синдром Аперта
Холинэстераза	Yb8	дефицит холинэстеразы
APC	Yb8	наследственный фиброматоз
Btk	Y	X–связанная агаммаглобулинемия
C1 inhibitor	Y	недостаточность фактора системы комплимента
BRCA2	Y	рак молочной железы
GK	Y	недостаток глицеринкиназы

Как уже говорилось ранее, МГМ, и, в частности, Alu-повторы – надежный способ генетической идентификации личности.

Для достижения поставленной цели нам потребовалось составить генетические паспорта двух пар монозиготных близнецов и пары людей, не состоящих в родстве.

В некоторых странах обсуждается возможность создания базы данных генотипов определенных категорий населения. Генетические паспорта будут содержать информацию о многих МГМ, включая STR и SNP[5].

Материалы и методы

Мы проводили свои исследования на базе лаборатории сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН.

МАТЕРИАЛЫ

Когорта обследуемых:

В нашем исследовании использованы биологические образцы шести добровольцев, включавших две пары монозиготных близнецов и двух человек, не состоящих в родстве. Сбор биологических образцов (клеток букального эпителия) проводили в соответствующими с действующими этико-медицинскими нормами сбора, хранения и использования человеческого биоматериала.

Набор молекулярно-генетических маркеров:

Генотипирование и составление генетических паспортов проводили с использованием набора из 32 МГМ, представляющих из себя диморфные в человеческой популяции инсерции Alu-ретроэлемента. Основные характеристики МГМ и структуры ПЦР-праймеров приведены в приложении 1.

В работе было использовано следующее оборудование:

Центрифуги: Eppendorf 5415 и Eppendorf Minispin Plus (Eppendorf, Германия); сбрасыватель проб Microspin FV-2400 (Biosan, Латвия); УФ-трансиллюминатор (Ultraviolet Products, США); прибор для документирования и анализа гелей GDS7600 (Ultraviolet Products, США); термостат Термит (ДНК-технология, Россия); миксер Bio Vortex V1 (Biosan, Латвия); приборы для горизонтального электрофореза (Helicon, Россия); источники питания Эльф-4 и Эльф-8 (ДНК-технология, Россия); автоматический ПЦР-амплификатор DNA Engine (Biorad, США), автоматические пипетки переменного объема (HTL, Польша).

Реактивы:

Этиловый (EtOH) и изопропиловый спирты градации «ОСЧ», фенол и хлороформ градации «ХЧ» - всё (Химмед, Россия); агароза LE2 – градации “molecular biology grade” (Helicon, Россия); бромфеноловый синий (Bio-Rad, США); ксиленцианол (Bio-Rad, США); дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (Boehringer, Германия); додецилсульфат натрия (SDS) (Sigma, США); этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (Sigma, США); PBS (Invitrogen, США), фиколл с плотностью 1,077 г/см^3 для лабораторных целей (ПанЭко, Россия).

Препараты ферментов:

Encyclo полимераза – смесь термостабильных ДНК-полимераз (Evrogen, Россия), РНКаза Н (Boehringer, Германия); РНКаза А и протеиназа К (Promega, США).

Буферные и концентрированные растворы:

Буфер ТЕ (10х) - 0.1 М трис-HCl (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА

Буфер ТВЕ (5х) - 45 мМ трис, 45 мМ Н3ВО3, 10 мМ ЭДТА (pH 8.3)

Буфер для ПЦР реакции - 10х буфер для Encyclo полимеразы (Evrogen, Россия)

Lysis buffer: 10mM Tris pH 8,0 (8,8),100 mM EDTA, 0,5% SDS
Proteinase K 10 мг/мл в воде.
Фенол насыщенный 0,1 M Tris pH 8,0.

Раствор для нанесения образцов ДНК на агарозный гель – 1xTE, 0.1 % бромфеноловый синий, 0.1 % ксиленцианол, 30 % глицерин.

МЕТОДЫ

Сбор биологического материала.

Образцы буккального эпителия собирали стерильной ватной палочкой с внутренней стороны щеки донора.

Выделение геномной ДНК

Геномную ДНК из клеток буккального эпителия выделяли по модифицированному протоколу:

1) Конец ватной палочки, содержащий буккальный эпителий, отрезать и поместить в отдельную 2 мл пробирку;
2) Добавить 0,5 мл Lysis Buffer и 10 мкл Proteinase K (до конечной концентрации 0,2 мг/мл);
3) Инкубировать 1 час при 50 °C, периодически помешивая;
4) Добавить 1V фенола, перемешивать "на руках" 2-3 мин;
5) Центрифугировать 7 мин при 14-16000g;
6) Перенести верхнюю фазу в отдельную пробирку;
7) Добавить 0,5V фенола и 0,5V хлороформа, перемешивать на руках 2-3 мин.
8) Центрифугировать 7 мин при 14-16000g.
9) Перенести верхнюю фазу в отдельную пробирку;
10) Добавить 1V хлороформа, перемешивать "на руках" 5 мин.
11) Центрифугировать 7 мин при 14-16000g.
12) Перенести верхнюю фазу в отдельную пробирку;
13) Добавить 3V 96% EtOH, хорошо перемешать;
14) Центрифугировать 15 мин при 14-16000g;
15) Удалить супернатант;
16) Добавить 1V 70% EtOH;
17) Центрифугировать 7 мин при 14-16000g;
18) Удалить супернатант;
19) Высушить осадок ДНК при 50 °C;
20) Добавить 40 мкл mQ и инкубировать 30 мин при 50 °C.
21) Раствор ДНК хранить при +4C.

Постановка локус-специфических ПЦР (или - Геномные ПЦР)

Мы использовали полученную нами ДНК для проведения ПЦР. Для этого мы готовили по 20мкл реакционных смесей следующего состава:

1) 15,35 мкл mQ;
2) 1 мкл ДНК;

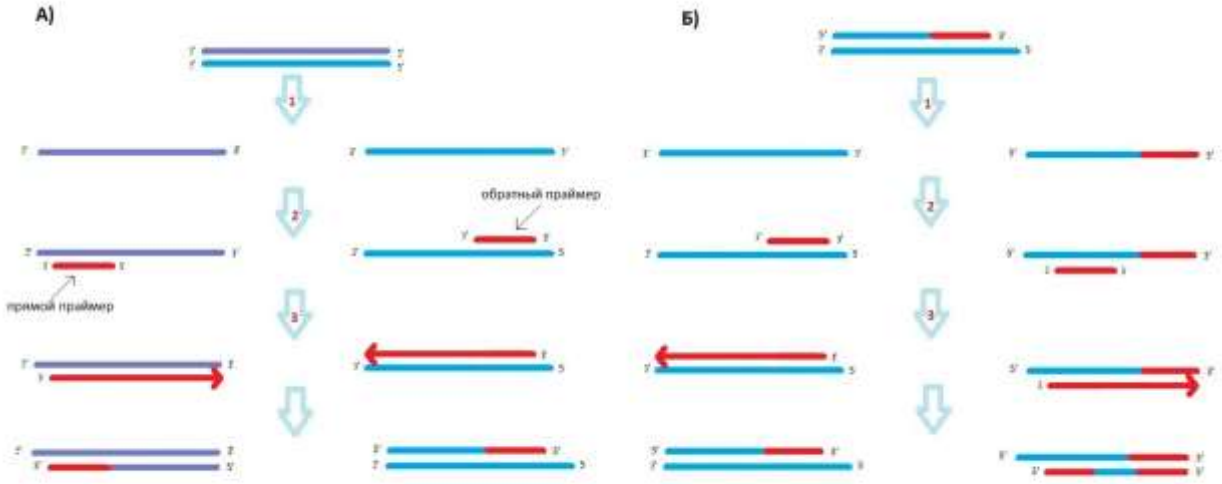
3) 2 мкл 10x encyclo buffer;
4) 1 мкл праймера;
5) 0,25 мкл dNTP ;
6) 0,4 мкл 50x Encyclo polymerase.

Перед началом реакции происходит длительный (3 минуты) прогрев реакционной смеси при 94 °С. Мы проводили 31 цикл амплификации. Реакция состоит из трех стадий (рис. 1):

1) денатурация;
2) отжиг праймеров;
3) элонгация.

На первой стадии (ее длительность – 20 секунд) под действием высокой температуры (94 °С) происходит денатурация ДНК с разрушением водородных связей между двумя цепочками ДНК. Нагрев никак не влияет на реакционную способность используемой бактериальной полимеразы – Taq-полимеразы, так как она является термоустойчивой.

На второй стадии (15 секунд) температура понижается до 60^0 С, благодаря чему праймеры могут связаться с одноцепочной матрицей. Температура для проведения данной стадии зависит от состава праймеров, обычно она на 5 градусов ниже, чем температура плавления.



На последней стадии (40 секунд) температура поднимается до 72^0 С, так как она оптимальна для работы Taq-полимеразы III. Происходит синтез второй цепи ДНК в направлении от 5' конца к 3' концу с праймером в качестве затравки. Время для данной стадии выбирается в соответствии с длинной конечного продукта, считая, что за 1 минуту полимераза синтезирует 1, 5 т.п.о.

Рис. 1. Схематическое изображение первого (А) и второго (Б) циклов ПЦР. 1. Денатурация; 2. Отжиг; 3. Элонгация.

Электрофорез ПЦР-продуктов в агарозном геле

При проведении электрофореза мы использовали 1,2% агарозный гель. К ПЦР-продуктам мы добавляли краситель, содержащий глицерин, благодаря чему продукт опускался в лунку в геле. В первую лунку ряда мы наносили маркер, показывающий каждые 100 п. о. Для получения электрофореграмм мы использовали камеру, имеющую ультрафиолетовую подсветку и компьютерную программу "GEl imager "

Результаты и их обсуждение

Один из наиболее перспективных подходов к изучению генетической вариабельности населения (отдельных групп людей) состоит в определении генотипа индивидов по представительному набору полиморфных локусов генома человека. В своей работе мы проводили такое генотипирование по 32 локусам, расположенных на всех аутосомах и паре половых хромосом. Каждый из этих локусов представлен в человеческой популяции двумя аллелями: не содержащим (древним, предковым) и содержащим инсерцию эволюционно «молодого» Alu-повтора. Для определения генотипирования исследуемых образцов ДНК мы применяли локус-специфические ПЦР с парами олигонуклеотидных праймеров, соответствующих уникальным участкам генома вблизи точки инсерции Alu-повтора. Общая схема локус-специфической ПЦР представлена на рисунке 2.

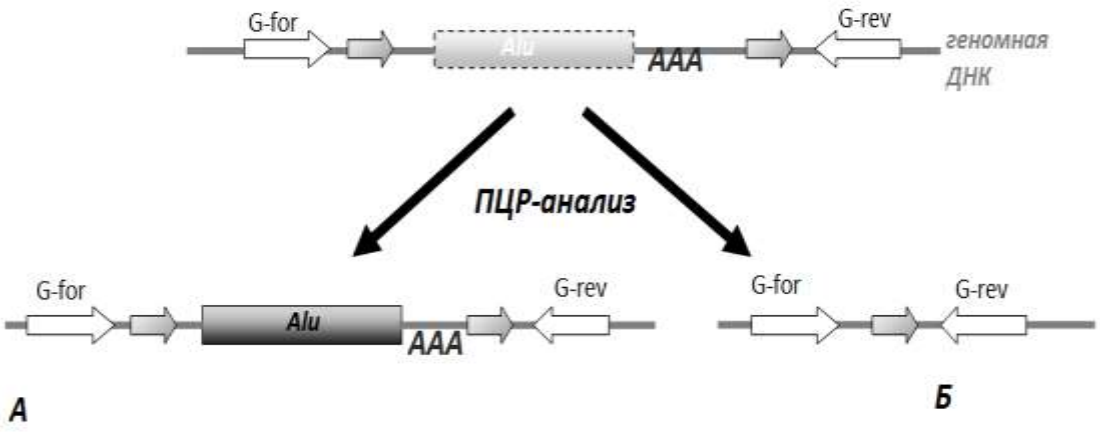


Рис. 2. Схема локус-специфической ПЦР. Уникальные геномные праймеры (G-For и G-Rev), их расположение и ориентации изображены белыми стрелками, серыми стрелками отмечены прямые повторы, фланкирующие Alu элемент, образующиеся в процессе его интеграции. Светлый прямоугольник в исходной геномной ДНК обозначает локус, который может как содержать Alu, так и не содержать. В ходе реакции возможно образование ПЦР-продуктов двух видов: А – Alu-содержащий ПЦР-продукт, Б – Alu-несодержащий ПЦР-продукт.

После проведения ПЦР и электрофореза мы получаем снимок геля с изображенными на нем ПЦР-продуктами и маркером, с помощью которого можно определить длину соответствующего ему фрагмента ДНК. Если фрагмент ДНК короткий (около 200 п. о., для разных локусов по разному), то он не содержит в себе Alu-инсерцию и на электрофореграмме располагается ниже. Если же ПЦР-продукт содержит Alu-ретроэлемент (около 500 п. о.) , то он располагается выше. Если исследуемый геном гетерозиготен по данному локусу, то мы видим оба случая. Примеры определения генотипов по диморфному Alu-содержащему локусу представлены на рис.3.

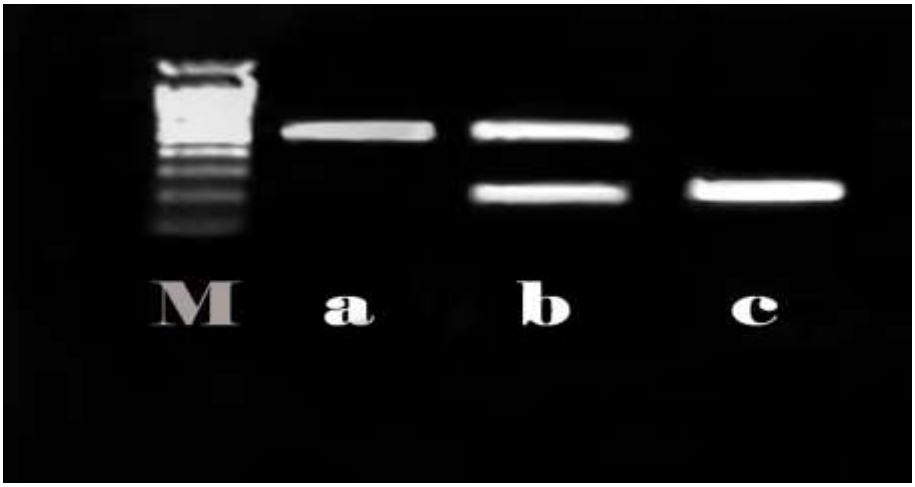


Рис. 3. Пример электрофореграммы результатов локус-специфической ПЦР
a) гомозиготы Alu+/Alu+; b) гетерозиготы Alu+/Alu0 ; c) гомозиготы A Alu0/Alu0.

Генетический паспорт – сумма индивидуальных данных об аллельном состоянии генома определенного человека в представительном наборе локусов/генов. Мы составляли паспорта с использованием молекулярно-генетических маркеров на 32 локуса генома человека, которые содержат полиморфные Alu-инсерции. Таким образом, генетический паспорт каждого из обследуемых представлял набор данных об аллельном состоянии 32 локусов, расположенных на всех аутосомах и паре половых хромосом. Выбранная нами для обследования группа состояла из 6 здоровых доноров из числа населения г.Москвы и включала две пары монозиготных близнецов, а также двух человек, не состоящих в родстве. Результирующие генетические паспорта, в виде электрофореграмм продуктов локус-специмфических ПЦР, представлены на рис. 4, рис. 5, рис. 6.

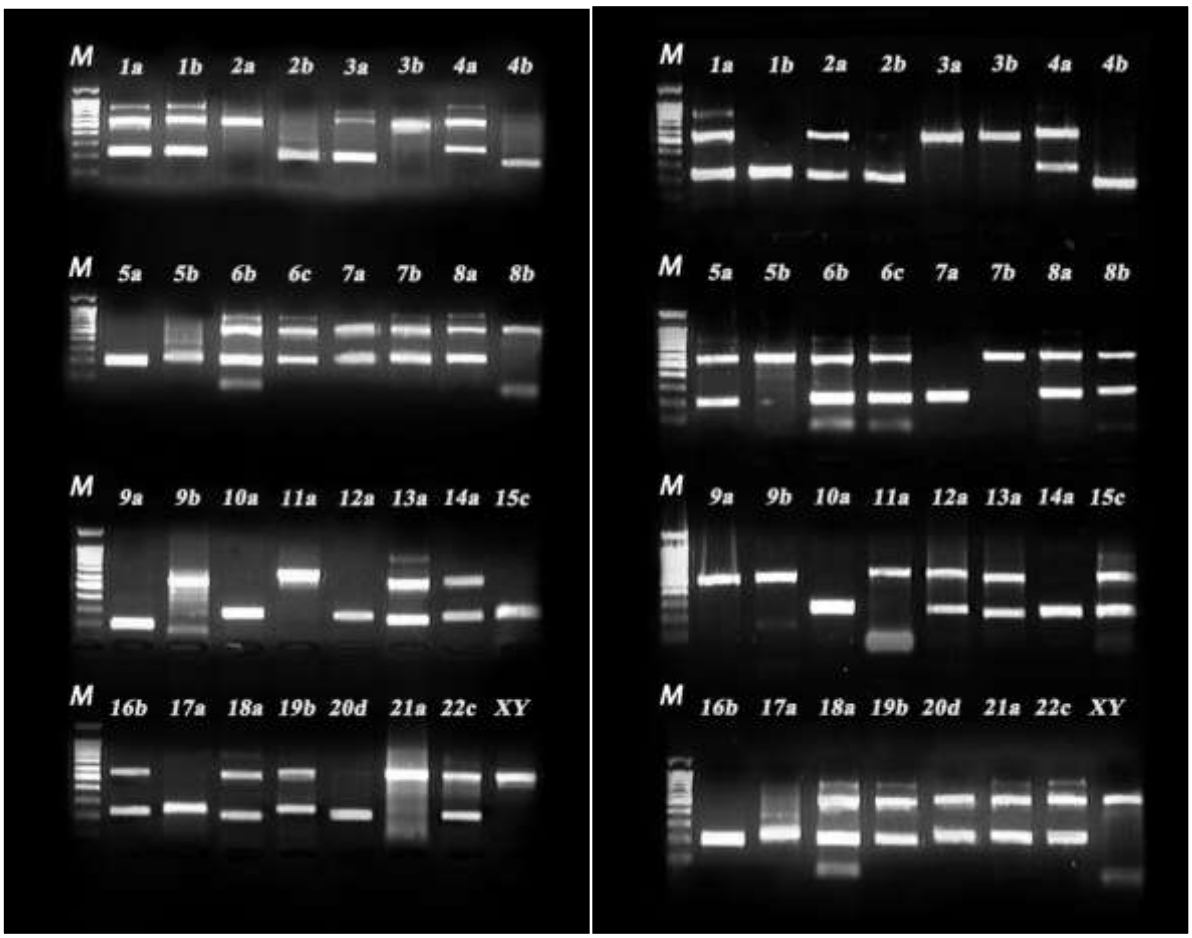


Рис. 4. Генетические паспорта пары людей, не состоящих в родстве (№1 и №2)*

*Здесь и далее: №1 и № 2 – обследуемые, не состоящие в кровном родстве; №3А и №3В, №4А и №4В – близнецовые пары.

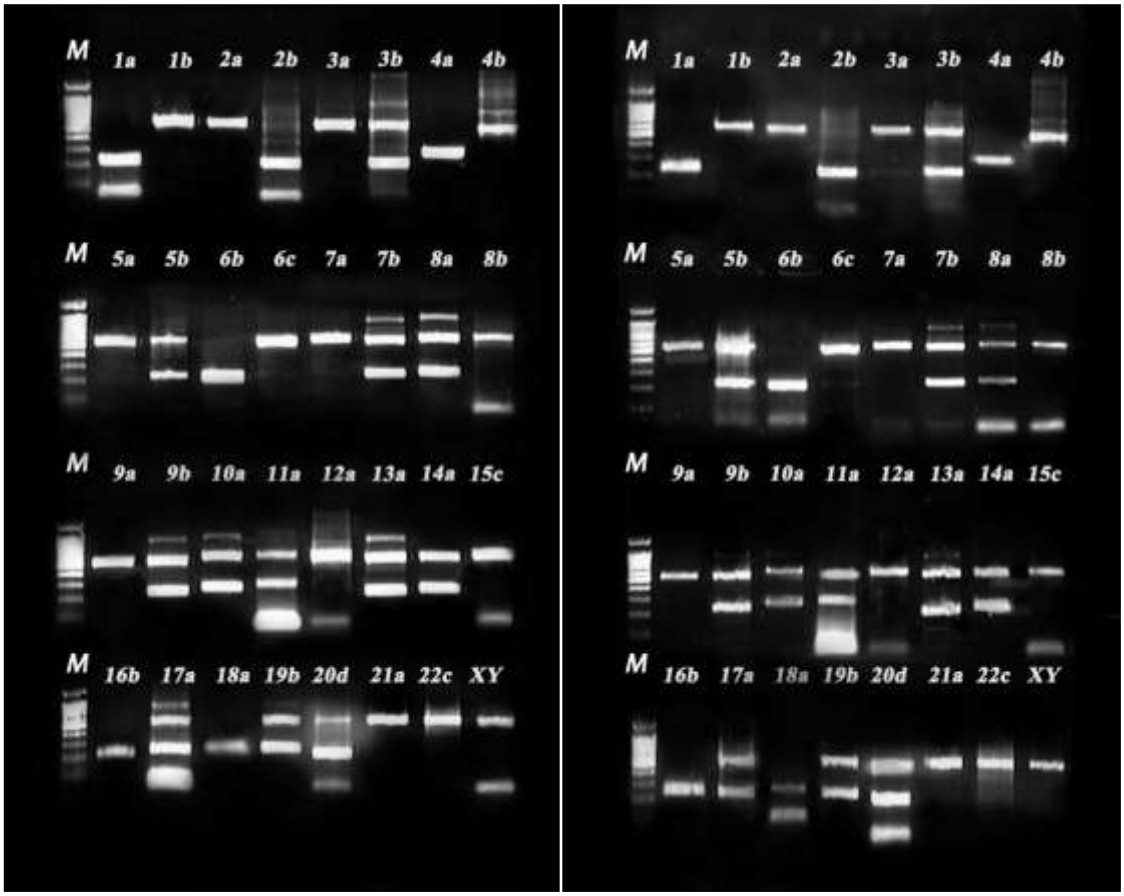


Рис. 5. Генетические паспорта первой пары близнецов (№ 3А и 3В)

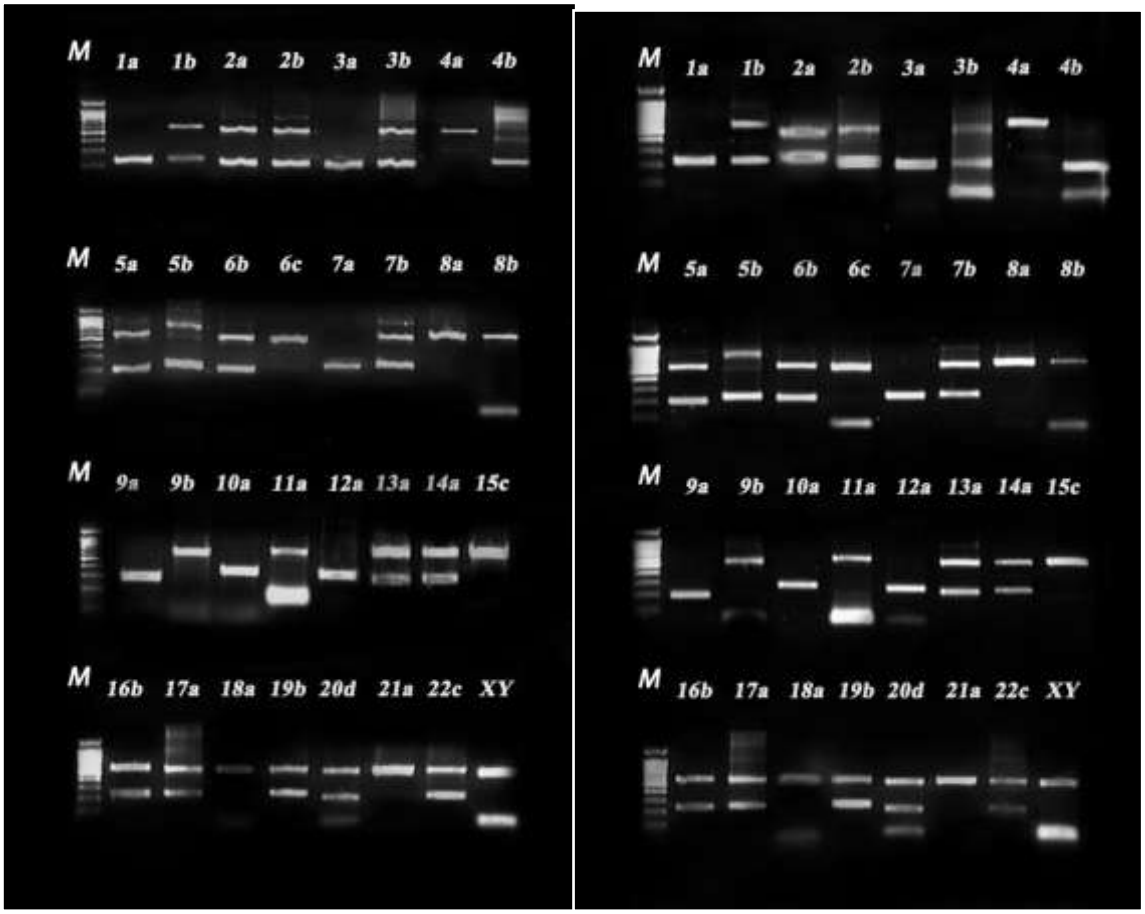


Рис. 6. Генетические паспорта второй пары близнецов (№4А и №4В)

Чтобы убедиться в том, что возможно достоверно отличить одного человека от другого с помощью данного генетического паспорта, составленного на основании использованных нами МГМ, мы рассчитали вероятность того, что 2 генетических паспорта разных людей, не являющихся кровными родственниками, окажутся одинаковыми. При расчете вероятности случайного совпадения генотипов по всем 32-м локусам мы учитывали частоту встречаемости генотипов по этим локусам в объединенной популяции европеоидного населения Евразии и Северной Америки. Использованные частоты генотипов[10] приведены в табл. 2.

Рассчитанные вероятности случайного совпадения генотипов по каждому локусу (см. колонку p** таблицы 2) мы использовали для определения случайного совпадения паспортов по формуле:

$$P=\prod^{31}_{i=1} p_i$$

P-вероятность случайного совпадения генетических паспортов двух индивидов; p_i – вероятность случайного совпадения генотипов двух индивидов по каждому локусу отдельно, она равна сумме квадратов вероятностей выявления каждого из возможных генотипов по данному локусу:

$$p_i=p_{(Alu+/Alu+)i}^{2}+ p_{(Alu+/Alu0)i}^{2}+ p_{(Alu/Alu0)i}^{2}.$$

Табл. 2: Вероятность того, что два генетических паспорта случайно выбранных людей совпадут.

Alu-маркеры	Частота встречаемости генотипов[10].*			p**
	Alu+/Alu+	Alu+/Alu0	Alu0/Alu0	
1a	0,22	0,48	0,3	0,3688
1b	0,28	0,45	0,27	0,3538
2a	0,46	0,43	0,11	0,4086
2b	0,16	0,44	0,4	0,3792
3a	0,24	0,42	0,34	0,3496
3b	0,4	0,42	0,18	0,3688
4a	0,16	0,46	0,38	0,3816
4b	0,28	0,42	0,3	0,3448
5a	0,24	0,42	0,34	0,3496
5b	0,08	0,49	0,43	0,4314
6a	0,1	0,38	0,52	0,4248
6b	0,43	0,45	0,12	0,4018
7a	0,19	0,45	0,36	0,3682
7b	0,19	0,38	0,43	0,3654
8a	0,15	0,52	0,33	0,4018
8b	0,52	0,32	0,16	0,3984
9a	0,33	0,4	0,27	0,3418
9b	0,57	0,34	0,09	0,4486
10	0,1	0,38	0,52	0,4248
11	0,38	0,46	0,16	0,3816
12	0,21	0,46	0,33	0,3646
13	0,42	0,43	0,14	0,3809
14	0,2	0,41	0,39	0,3602
15	0,28	0,47	0,25	0,3618
16	0,1	0,48	0,42	0,4168

17	0,21	0,52	0,27	0,3874
18	0,14	0,46	0,4	0,3912
19	0,23	0,46	0,31	0,3606
20	0,23	0,52	0,25	0,3858
21	0,37	0,49	0,13	0,3939
22	0,47	0,38	0,15	0,3878
				$P=286*10^{-27}$

* генотипы, гомозиготные по наличию Alu в локусе; Alu+/Alu0 – генотипы, гетерозиготные по наличию Alu в локусе; Alu0/Alu0 – генотипы, гомозиготные по отсутствию Alu в локусе.
** вероятность совпадения любого из трех генотипа двух индивидов по конкретному локусу.

Используя полученные нами в ходе эксперимента данные о генотипах обследуемых, мы посчитали коэффициент уникальности паспорта(U) каждого обследуемого – т.е. вероятность того, что выбранный случайным образом из населения Земли второй индивид будет иметь идентичный генетический паспорт.

$U=\prod^{31}_{i=1} u_i$,

где u_i – вероятность того, что у произвольно выбранного человека генотип по данному локусу совпадет с генотипом испытуемого. Более подробно расчеты представлены в приложении 2. Коэффициенты уникальности для каждой пары монозиготных близнецов одинаковы (две нижние строки таблицы 3), поскольку их генетические паспорта совпадают.

Табл. 3. Коэффициент уникальности (U) для обследуемых.

Обследуемый	Коэффициент уникальности **(U)**
№1	$102*10^{-38}$
№2	$613*10^{-41}$
№3А**, №3**В **(**первая пара близнецов**)**	$654*10^{-41}$
№4А**, №4**В**(**вторая пара близнецов**)**	$723*10^{-41}$

Исходя из рассчитанной нами вероятности того, что два паспорта, составленные с использованием данных МГМ, будут идентичными ($286*10^{-27}$), можно сделать вывод, что этот набор МГМ надежен, так как, при делении 1 на вероятность, мы получаем население, для которого может быть использован данный набор МГМ (приблизительно $3,5*10^{12}$), что значительно превышает население Земли ($7,3*10^{9}$). Коэффициенты уникальности также

крайне малы.

Составляя генетические паспорта близнецовых пар, мы можем предположить, что, если эти близнецы являются монозиготными, их генетические паспорта будут идентичными. Для исследованных нами локусов эта гипотеза подтвердилась в ходе работы.

Выводы

1) Нами проведены серийные PCR с использованием геномный ДНК шести здоровых доноров, включающей две пары монозиготных близнецов и людей не состоящих в родстве.
2) Мы реконструировали шесть генетических паспортов по 32 МГМ, представляющим полиморфные Alu-инсерции.
3) По результатам сравнения генетических паспортов близнецов и генетических паспортов людей, не состоящих в родстве, подтверждено, что паспорта монозиготных близнецов полностью совпадают, в то время как паспорта людей, не связанных родством, сильно отличаются.

Благодарности

Мы благодарим организатора практики С.М. Глаголева, наших научных руководителей Ю.Б. Лебедева и А. Ю. Комкова, доноров биологического материала, А. Ю. Комкова за помощь при сборе биологического материала.

Список цитируемой литературы

1. А. А. Курносов. Молекулярно-генетический анализ древнего населения Фракийскоий долины и центрального Предкавказья // Дипломная работа.— Москва.—Институт Биоорганической химии РАН, Лаборатория Сравнительной и Функциональной Геномики.—2010.—С. 6–21.
2. Глик Б., Пастернак Дж. молекулярная биотехнология: принципы и применение. Пер. с англ. — М.: Мир. — 2002. — 589 с
3. Bender S., Blanck A. et al. Principles of PCR and RT–PCR // PCR Applications Manual. — 3rd edition — Mannheim — Roche Diagnostics GmbH, 2006. — P. 9–15.
4. Ребриков Д. В., Лебедев Ю. Б. и др. Ассоциация аллельного варианта гена аминопептидазы ERAP1 с риском развития анкилозирующего спондилита. // Acta Naturae. — 2010. — Т. 2, N 3. — С. 86–92.
5. Mamedov I. Z., Shagina I. A., Kurnikova M. A., Novozhilov S. N., Shagin D. A., Lebedev YB.A new set of markers for human identification based on 32 polymorphic Alu insertions //Eur J. Hum Genet. — 2010. — Vol. 18, N 7. — P. 808–814 .
6. Lily Bazak, Erez Y. Levanon, Eli Eisenberg. Genome–wide analysis of Alu editability (online publication) //Nuclear acid research — 2014 — Vol.42, N 11. — Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25243180
7. Prescott L. Deininger, Mark A. Batzer. Alu Repeats and Human Disease // Molecular Genetics and Metabolism — 1999. — Vol. 67, N. 3. — P. 183–193.
8. Mark A. Batzer, Prescott L. Deininger. Alu repeats and human genomic diversity // Nature Publishing Group — 2002. — Vol. 3. — P. 370–380.
9. David A. Ray, Jerilyn A. Walker, Mark A. Bazer. Mobile element–based forensic genomics // ScienceDirect. — Pub.: Elsevier. — 2007. — Vol. 616. — P. 24–33.
10. Ilgar Z. Mamedov, Irina A. Shagina, Yury B. Lebedev, et. al. A new set of markers for human identification based on 32 polymorphic Alu insertions // Nature Publishing Group — 2010.— Vol. 18, N. 7 — P. 808–814.

Приложения

Приложение 1. Характеристики использованных МГМ и структуры соответствующих ПЦР-праймеров[10].

МГМ	Структуры пар праймеров (5’ – 3’)	Размеры ПЦР-продуктов (п.о.)	Локус
Al-1a	GCAGATTTCAGGTCATTATTG GGTCACTAGAGACCGTATCTGTA	547/224	1q25.3
Al-1b	TTTTGTGTCCATTAGGGTTAC GACCTCACTGTTAGACAATAATATC	540/229	1q42.2
Al-2a	TGTTTAAAATGATCAAAATTAGG AGATCTCTGGCTAAGTTCTTTAC	541/212	2p13.1
Al-2b	ATACTTTAATTTAGGCAATAGACAT TAGAGAAAAGGAGGTTTGAATG	531/210	2q23.3
Al-3a	ACCAAATACCCCTCAGAAGA CCTGACCTAGTGTACCCATTAG	534/207	3p22.1
Al-3b	TTTATACAAATACTACAGACAAAAGC CTGATCAAAGCTATAGACCTCTCT	549/219	3q11.2
Al-4a	GAGGTTAGACAACATACATTATATCA CCCTATTGTTTACATCTAATTCTA	594/287	4q25
Al-4b	TTCTGAACTGTGTACATATGACACT GCTTTTAGTAAAGGTCACACCA	596/194	4q13.2
Al-5a	ACGCAAGGACTTAATTGTAAC TAATGTTTGGATTATTCCTGGA	551/197	5q14.3
Al-5b	AGGTGCAGTCTTAACCCAGA AAAGCTATTTGGAAGATGAAGA	555/229	5q12.1
Al-6a	AGCTGATATATCTCAATAAGCAAC GATTAAAATCACTTGTCTGAGACT	555/218	6p24.3
Al-6b	TCACAAGTTCTTATAACTCTTTCC GGACACAATCATGATGATATTTAC	539/225	6q12
Al-7a	CAGAGTAAAGCTACAGTAAGACAGTA ATAACATAGGGAAAATCACTTCTA	566/230	7q21.11
Al-7b	GAATTCCAAATGTCTAGAGATTAGT TTGGAGAACCTTGACTTTTCA	562/244	7q32.1
Al-8a	TGTCTGTTTCAGCTCTTCACTA ATACTATTTGGTTGACCCTACTG	584/252	8q23.1

Al-8b	AGAATTTTGAGTGTGGGTATACT TGCACATTGAAGGACACAATGAGAATAC	586/269	8q12.1
Al-9a	TTGGAACCTTTGGTAAGTAACT AAAGCCACAGAAATACATCTAAT	523/193	9q22.33
Al-9b	ATGCCAAATATTGGTCAGAGA TATAACTGGGACAGTGAGTTTTAC	547/244	9p13.3
Al-10	TGCCAAACAGTGATTATAGAAC CTGTCTAGAAGACAACTAGGAATAG	588/275	10q23.1
Al-11	CTATGATGTGCTATGGAAGGTAGGT CCTAGTCCTCATAAATTAGTAACCTG	631/309	11p14.3
Al-12	ATTTGGGAGTTTCCATTATGA TATTAACCATATTATGTGCCAAGA	570/256	12q24.32
Al-13	AGTTACTGGATGCATTATATTGAG CCATGATAGCTAACAAAAGAAG	550/233	13q34
Al-14	TTAAAAATAAGTTCCTAATTGATTC CAAATTAGATAAGTAAGATAGGTAAGA	558/251	14q23.1
Al-15	TGGACTACTTTTAATAGTAATTTGTG ATTGCTTACACTGCTACCAAAG	564/246	15q22.1
Al-16	GATATCACATACTCATTAGATATAATCA CATATTCAATACTTTCAGTCATTCT	564/231	16q21
Al-17	CTCAGATCAGTTATGCAGACAG AAAGTAAGAGACTTTCCTTTGAG	561/244	17q25.1
Al-18	CAAATACAGGAATTATTATAATAATG ATCAAATAATGCACAGTAAAATCT	548/211	18q21.1
Al-19	GTCATACAAAATGATGATGATTG AAAAATATCTAACTTTGAAAATGG	578/262	19q13.12
Al-20	CTTTTGCTTCCTACTAAATACCT TTGAGGCATTGCTACTGAGAT	551/228	20p12.2
Al-21	AGTTTGGATGTGATGTTATATGTC TGTATACTTGTGTAGGATACTTGTGT	560/246	21q21.2
Al-22	TCGAGTGAGAAGAGGTAGTGAG TTGAATTTACGCAGCATAATG	560/238	22q11.21
Al-XY	CGGTAGAAATATTAAGTAGGGAC GTGTTTCTAACATTTCTTACGGT	554/239	Xq21.31/ Yp11.2

Приложение 2 . Коэффициент уникальности для обследуемых.
№1

Alu-маркер	Генотип по каждому исследованному локусу			**u_i**
	Alu+/Alu+	**Alu+/Alu0**	**Alu0/Alu0**	
1a	0	0,48	0	0,2304
1b	0	0,45	0	0,2025
2a	0,46	0	0	0,2116
2b	0	0	0,4	0,16
3a	0	0,42	0	0,1764
3b	0,4	0	0	0,16
4a	0	0,46	0	0,2116
4b	0	0	0,3	0,09
5a	0	0	0,34	0,1156
5b	0	0	0,43	0,1849
6a	0	0,38	0	0,1444
6b	0	0,45	0	0,2025
7a	0	0,45	0	0,2025
7b	0	0,38	0	0,1444
8a	0	0,52	0	0,2704
8b	0,52	0	0	0,2704
9a	0	0	0,27	0,0729
9b	0,57	0	0	0,3249
10	0	0	0,52	0,2704
11	0,38	0	0	0,1444
12	0	0	0,33	0,1089
13	0	0,43	0	0,1849
14	0	0,41	0	0,1681
15	0	0	0,25	0,0625

16	0	0,48	0	0,2304
17	0	0	0,27	0,0729
18	0	0,46	0	0,2116
19	0	0,46	0	0,2116
20	0	0	0,25	0,0625
21	0,37	0	0	0,1369
22	0	0,38	0	0,1444
				$102*10^{-38}$

№2

Alu- маркер	Генотип по каждому исследованному локусу			**u**
	Alu+/Alu+	**Alu+/Alu0**	**Alu0/Alu0**	
1a	0	0,48	0	0,2304
1b	0	0	0,27	0,0729
2a	0	0,43	0	0,1849
2b	0	0	0,4	0,16
3a	0,24	0	0	0,0576
3b	0,4	0	0	0,16
4a	0	0,46	0	0,2116
4b	0	0	0,3	0,09
5a	0	0,42	0	0,1764
5b	0,08	0	0	0,0064
6a	0	0,38	0	0,1444
6b	0	0,45	0	0,2025
7a	0	0	0,36	0,1296

7b	0,19	0	0	0,0361
8a	0	0,52	0	0,2704
8b	0	0,32	0	0,1024
9a	0,33	0	0	0,1089
9b	0,57	0	0	0,3249
10	0	0	0,52	0,2704
11	0,38	0	0	0,1444
12	0	0,46	0	0,2116
13	0	0,43	0	0,1849
14	0	0	0,39	0,1521
15	0	0,47	0	0,2209
16	0	0	0,42	0,1764
17	0	0,52	0	0,2704
18	0	0,46	0	0,2116
19	0	0	0,31	0,0961
20	0	0	0,25	0,0625
21	0,37	0	0	0,1369
22	0,47	0	0	0,2209
				$613*10^{-41}$

№3А, №3В

Alu-маркер	Генотип по каждому исследованному локусу			u_i
	Alu+/Alu+	**Alu+/Alu0**	**Alu0/Alu0**	
1a	0	0	0,3	0,09
1b	0,28	0	0	0,0784
2a	0,46	0	0	0,2116
2b	0	0	0,4	0,16

3a	0,24	0	0	0,0576
3b	0	0,42	0	0,1764
4a	0	0	0,38	0,1444
4b	0,28	0	0	0,0784
5a	0,24	0	0	0,0576
5b	0	0,49	0	0,2401
6a	0	0	0,52	0,2704
6b	0,43	0	0	0,1849
7a	0,19	0	0	0,0361
7b	0	0,38	0	0,1444
8a	0	0,52	0	0,2704
8b	0,52	0	0	0,2704
9a	0,33	0	0	0,1089
9b	0	0,34	0	0,1156
10	0	0,38	0	0,1444
11	0	0,46	0	0,2116
12	0,21	0	0	0,0441
13	0	0,43	0	0,1849
14	0	0,41	0	0,1681
15	0,28	0	0	0,0784
16	0	0	0,42	0,1764
17	0	0,52	0	0,2704
18	0	0,46	0	0,2116
19	0	0,46	0	0,2116
20	0	0	0,25	0,0625
21	0,37	0	0	0,1369
22	0,47	0	0	0,2209
				$654*10^{-41}$

№4А, №4В

Alu-маркер	Генотип по каждому исследованному локусу			u_i
	Alu+/Alu+	**Alu+/Alu0**	**Alu0/Alu0**	
1a	0	0	0,3	0,09
1b	0	0,45	0	0,2025
2a	0	0,43	0	0,1849
2b	0	0,44	0	0,1936
3a	0	0	0,34	0,1156
3b	0	0,42	0	0,1764
4a	0,16	0	0	0,0256
4b	0	0	0,3	0,09
5a	0	0,42	0	0,1764
5b	0	0,49	0	0,2401
6a	0	0,38	0	0,1444
6b	0,43	0	0	0,1849
7a	0	0	0,36	0,1296
7b	0	0,38	0	0,1444
8a	0,15	0	0	0,0225
8b	0,52	0	0	0,2704
9a	0	0	0,27	0,0729
9b	0,57	0	0	0,3249
10	0	0	0,52	0,2704
11	0,38	0	0	0,1444
12	0	0	0,33	0,1089
13	0	0,43	0	0,1849
14	0	0,41	0	0,1681
15	0,28	0	0	0,0784
16	0	0,48	0	0,2304

17	0	0,52	0	0,2704
18	0,14	0	0	0,0196
19	0	0,46	0	0,2116
20	0	0,52	0	0,2704
21	0,37	0	0	0,1369
22	0	0,38	0	0,1444
				$723*10^{-41}$